

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Το WSTY στέλεχος του βακτηρίου *Wolbachia*  
και οι σχέσεις του με του ξενιστές του»**

*ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ: Πατάς, Σάββας*

*ΕΙΣΙΓΗΤΡΙΑ: Ζαμπάλου Σοφία*

*ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2004*

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Εισηγήτρια Καθηγήτριά μου Ζαμπάλου Σοφία για την ανάθεση του θέματος της πτυχιακής μου εργασίας καθώς και για την καθοδήγησή της κατά την εκτέλεση και συγγραφή της, χωρίς την οποία δεν θα είχε πραγματοποιηθεί η εργασία αυτή.

Ιδιαίτέρως θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής για τη βοήθειά τους στη συγγραφή και διόρθωση της πτυχιακής μου εργασίας.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον κ. Χ. Σαββάκη, Καθηγητή Μοριακής Γενετικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης, για τις συμβουλές του κατά τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας, καθώς και για το ότι μου 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.

Δεν πρέπει να παραλείψω να ευχαριστήσω τους ανθρώπους του εργαστηρίου, τη Νίκη, τον Γιώργο, το Θάνο και τον Jacques, που μου έμαθαν αρκετά πράγματα όλο αυτό τον καιρό που βρισκόμουν εκεί και με δέχθηκαν σαν φίλο τους.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου για τα τόσα χρόνια που έκαναν υπομονή και μου συμπαραστάθηκαν με κάθε τρόπο και σε κάθε στιγμή, γι' αυτό και τους αφιερώνω την εργασία αυτή.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
1.1 Γενικά .....	5
1.2 Ιστορική ανασκόπηση.....	6
1.3 Μορφολογική περιγραφή .....	7
1.4 Κατανομή και φυλογένεση .....	8
1.5 Επιπτώσεις της <i>Wolbachia</i> στους ξενιστές .....	13
1.5.1 <i>Wolbachia</i> και κυτταροπλασματική ασυμβατότητα.....	13
1.5.2 <i>Wolbachia</i> και παρθενογένεση.....	14
1.5.3 <i>Wolbachia</i> και θηλυκοποίηση.....	15
1.5.4 <i>Wolbachia</i> και θάνατος αρσενικών.....	15
1.5.5 <i>Wolbachia</i> στους νηματώδεις.....	15
1.5.6 <i>Wolbachia</i> και ειδογένεση .....	16
1.6 ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΑΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑ.....	16
1.6.1 Περιγραφή.....	16
1.6.2 Μηχανισμοί .....	17
1.7 Σκοπός της μελέτης του βακτηρίου <i>Wolbachia</i> .....	23
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
2.1 Στελέχη και Καλλιέργεια Εντόμων .....	27
2.2 Έλεγχος της ύπαρξης του βακτηρίου.....	28
2.3 Απομόνωση DNA από έντομα (STE μέθοδος) .....	28

2.4	PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης).....	28
2.5	Έλεγχος της μεταβίβασης των βακτηρίων στα έντομα.....	29
2.6	Μέτρηση της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας (CI).....	30
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	31
3.1	Δημιουργία μολυσμένων εντόμων .....	31
3.1.1	Έλεγχος στην G <sub>0</sub> γενιά .....	31
3.1.2	Έλεγχος στην G <sub>2</sub> γενιά.....	34
3.1.3	Έλεγχος στη G <sub>4</sub> γενιά.....	38
3.2	Έλεγχος επαγωγής κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας .....	42
3.3	Έλεγχος διάσωσης της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας.....	45
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	50
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	54

# 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 (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*. Όταν δεν έχουν αναπτύξει αμοιβαία συμβιωτική σχέση με τους ξενιστές τους, όπως με τα σκουλήκια που προκαλούν φιλαριάσεις (Bandi *et al.* 1999a), ένα είδος παρασιτικών σφηκών (Dedeine *et al.* 2001) ή ένα είδος κονουπιού (Dobson *et al.* 2002), προκαλούν μία σειρά αναπαραγωγικών ανωμαλιών σε αυτούς, όπως παρθενογένεση, θηλυκοποίηση, θανάτωση αρσενικών και κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (cytoplasmic incompatibility, **CI**) (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). Επιπρόσθετα, έχει περιγραφεί και ένα στέλεχος του βακτηρίου, το οποίο είναι παθογόνο στη μύγα του ξυδιού και προκαλεί πρόωμο θάνατο (Min and Benzer 1997). Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον των ερευνητών για αυτά έχει αυξηθεί μια και η *Wolbachia* είναι ίσως το πιο κοινό μολυσματικό παράσιτο στη γη, εκμεταλλεύεται τη σεξουαλική ζωή των ξενιστών της για δικό της όφελος, δημιουργεί καινούργια είδη και μπορεί τέλος 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*. 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 (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.

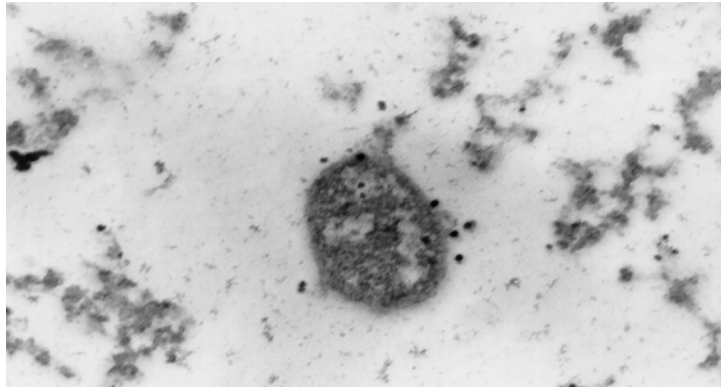
Σε παρόμοιες έρευνες βρέθηκαν αρκετοί μικροοργανισμοί, που κληρονομούνταν μητρικά και επηρέαζαν την αναλογία φύλου των ξενιστών τους, όπως για παράδειγμα, πρωτόζωα που σκότωναν μόνο τα αρσενικά στα κουνούπια ή μετέτρεπαν όλα τα άτομα σε θηλυκά σε κάποια αμφίποδα. Επίσης, σε άλλες περιπτώσεις διαπιστώθηκε επιλεκτική θανάτωση των αρσενικών ατόμων από οργανισμούς όπως τα σπιροπλάσματα στις μύγες, κάποια εντεροβακτήρια στις

σφήκες και ορισμένες ρικέτσιες στις πασχαλίτσες (Hurst 1993). Όμως, σχετικά με τη *Wolbachia*, δεν ήταν παρά μόνο δύο ευρήματα: πρώτος ο Legrand και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι κάποια κυτταροπλασματικά βακτήρια ήταν υπεύθυνα για την επαγωγή θηλυκοποίησης σε ισόποδα (Legrand *et al.* 1987) και δεύτερος ο Stouthamer έδειξε ότι η παρθενογένεση σε κάποια είδη *Trichogramma* μπορούσε να «θεραπευτεί» με αντιβιοτικά (Stouthamer 1990).

Τέλος, με τη χρήση μοριακών μεθόδων αναγνωρίστηκαν και επίσημα αυτοί οι μικροοργανισμοί. Κλωνοποιώντας γονίδια όπως το 16S rDNA, δείχθηκε ότι τα βακτήρια, τα οποία προκαλούσαν CI, θηλυκοποίηση, παρθενογένεση (Rousset *et al.* 1992, O'Neill *et al.* 1992, Breeuwer *et al.* 1992) και θανάτωση αρσενικών (Hurst *et al.* 2000), σχημάτιζαν μία μονοφυλετική ομάδα, τη *Wolbachia*.

### 1.3 Μορφολογική περιγραφή

Ο Hertig το 1936 δίνει μία λεπτομερή περιγραφή των βακτηρίων *Wolbachia*. Έχουν τα γενικά χαρακτηριστικά των ρικετσιών. Είναι διμορφικά, με ραβδοειδή (0.5-1.3 μm σε μήκος) ή κοκκοειδή μορφή (0.25-1.5 μm σε διάμετρο). Μερικές φορές δημιουργούν σύμπλοκα των δύο ή και περισσότερων μαζί. Η *Wolbachia pipientis* βρίσκεται σε κενοτόπιο (vacuole) και περιβάλλεται 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 (Wright *et al.* 1978, Wright and Barr 1980, Binnington and Hoffmann 1989, Louis and Nigro 1989). Συνήθως είναι παρούσα στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων των αναπαραγωγικών οργάνων, ωοθηκών και όρχεων (Εικ. 1.1). Επίσης έχουν παρατηρηθεί σε μαλπιγγειανά σωληνάκια, μυϊκό και νευρικό ιστό, καθώς και αιμοκύτταρα (Dobson *et al.* 1999). Ο αριθμός των βακτηρίων ανά ξενιστή ποικίλει μεταξύ εκατοντάδων και εκατομμυρίων (Bourtzis *et al.* 1996).



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

#### **1.4 Κατανομή και φυλογένεση**

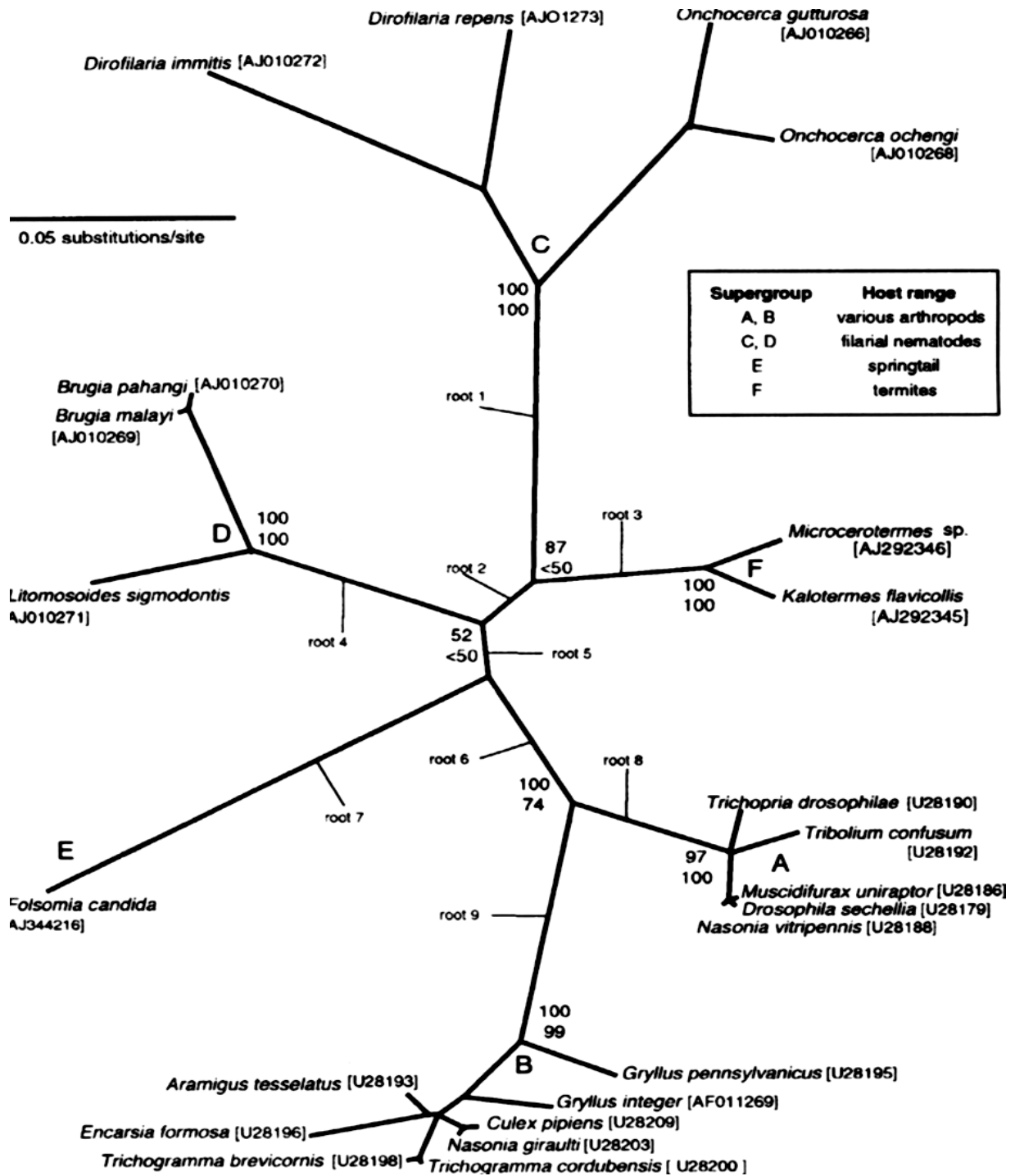
Ανάλυση της αλληλουχίας του 16S rDNA γονιδίου, έδειξε ότι η *Wolbachia* ανήκει στην α-υποκατηγορία των πρωτεοβακτηρίων και είναι κοντινός συγγενής κάποιων παθογόνων των θηλαστικών που μεταδίδονται μέσω αρθροπόδων, όπως είναι τα βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Cowdria* και *Rickettsia* (O'Neill *et al.* 1992). Παρόλη τη συγγένεια της με παθογόνα των θηλαστικών, η *Wolbachia* έχει βρεθεί μέχρι στιγμής μόνο σε αρθρόποδα και νηματώδεις. Μολαταύτα, αν κρίνει κανείς από το γεγονός ότι το βακτήριο αυτό μολύνει το 76% των 63 ειδών αρθροπόδων, που εξετάστηκαν με την τεχνική της επιμηκυσμένης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμερισμού (long PCR) (Jeyaprakash and Hoy 2000), η πιθανότητα της παρουσίας του σε άλλα ασπόνδυλα, σπονδυλωτά και ίσως και σε θηλαστικά, δεν μπορεί να αποκλειστεί.

Ο κλάδος που περιέχει το βακτήριο *Wolbachia*, είχε χωριστεί αρχικά σε 4 επιμέρους ομάδες (A-D) (O'Neill *et al.* 1992, Rousset *et al.* 1992, Breeuwer *et al.* 1992, Werren *et al.* 1995, Bandi *et al.* 1998). Οι ομάδες A και B περιέχουν τα βακτήρια των αρθροπόδων, ενώ οι C και D αυτές των νηματωδών (Εικ. 1.2 και 1.3). Υπολογίζεται ότι οι ομάδες A και B διαχωρίστηκαν πριν από 60 εκατομμύρια χρόνια, ενώ χώρισαν από τις ομάδες C και D πριν από περίπου 100 εκατομμύρια χρόνια. Λόγω του ότι τα αρθρόποδα διαχωρίστηκαν από τους νηματώδεις πριν από 600 εκατομμύρια χρόνια, έχει προταθεί το εξής σενάριο: πριν από 100 εκατομμύρια



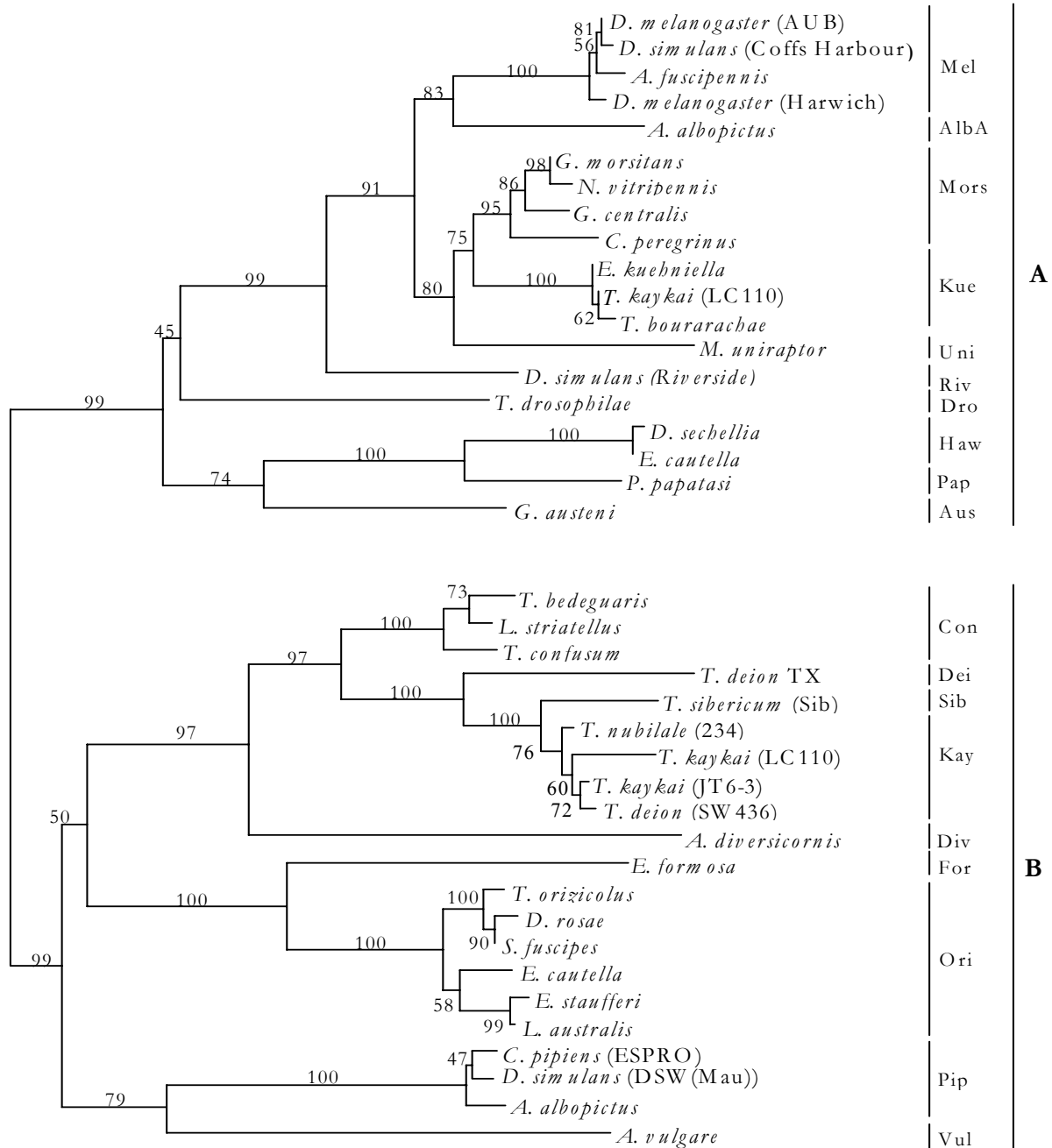
χρόνια, συνέβη είτε ένα γεγονός οριζόντιας μετάδοσης του βακτηρίου μεταξύ αρθροπόδων και νηματωδών, είτε τα φύλα αυτά κληρονόμησαν ανεξάρτητα το βακτήριο από κάποιο τρίτο οργανισμό. Θεωρείται απίθανο ότι η *Wolbachia* τα χρόνια αυτά ήταν αυτόνομο βακτήριο, μια και η ομάδα των βακτηρίων στα οποία ανήκει, απέκτησε ενδοκυττάριο τρόπο ζωής παλαιότερα.

Τα γονίδια που χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα για την εκτίμηση της φυλογένεσης του βακτηρίου είναι κυρίως το 16S rDNA, το *ftsZ* (γονίδιο για την κυτταρική διαίρεση) και το *wsp* (γονίδιο της εξωτερικής μεμβράνης) (van der Meer 1999, Schulenburg *et al.* 2000, Jeyaprakash and Hoy 2000, Casiraghi *et al.* 2001, Lo *et al.* 2002 και πληθώρα άλλων πρόσφατων μελετών). Η φυλογένεση του βακτηρίου παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον αφενός, γιατί δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της φυλογένεσης των βακτηριακών στελεχών και των αρθροπόδων-ξενιστών και αφετέρου, γιατί συγγενικά στελέχη προκαλούν διαφορετικούς φαινοτύπους στους ξενιστές τους. Συγκεκριμένα στα αρθρόποδα δεν υπάρχει συμφωνία της φυλογένεσης του βακτηρίου και των αναπαραγωγικών φαινοτύπων που αυτό προκαλεί (O'Neill *et al.* 1992, Rousset *et al.* 1992, Breeuwer *et al.* 1992, Werren *et al.* 1995, Van Meer *et al.* 1999), γεγονός που υποδηλώνει γεγονότα οριζόντιας μεταφοράς ή την εξέλιξη αυτών σχετικά εύκολα και κατ' επέκταση επαναλαμβανόμενα. Οριζόντια μεταφορά δείχθηκε να συμβαίνει συχνά στο εργαστήριο από μη μολυσμένες σε μολυσμένες προνύμφες σφηκών, οι οποίες μοιράζονταν τον ίδιο ξενιστή (Huijgens *et al.* 2000). Οριζόντια μεταφορά δείχθηκε να συμβαίνει επίσης με μεταφορά μολυσμένης αιμολέμφου στα ισόποδα (Rigaud *et al.* 1995, Bouchon *et al.* 1998). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ένα δεδομένο στέλεχος του βακτηρίου μπορεί να επάγει διαφορετικούς φαινοτύπους αν βρεθεί σε διαφορετικά γενετικά υπόβαθρα, για παράδειγμα ένα στέλεχος που προκαλεί θηλυκοποίηση σε ένα είδος λεπιδοπτέρου, προκαλεί θανάτωση αρσενικών αν μεταφερθεί σε ένα άλλο (Fujii *et al.* 2001), όπως και ένα άλλο που προκαλεί ασυμβατότητα στο φυσικό του ξενιστή (Sasaki *et al.* 2002). Από την άλλη πλευρά η αμοιβαία σχέση που έχουν αναπτύξει τα βακτήρια αυτά με τους νηματώδεις ξενιστές τους, αντανακλάται στη συμφωνία της φυλογένεσης τους (Bandi *et al.* 1998) (Πιν. 1.1).



ΕΙΚΟΝΑ 1.2 Φυλογενετικό δέντρο των στελεχών της *Wolbachia*, που υπάρχουν στα αρθρόποδα και στους νηματώδεις (από Lo et al. 2002).

Πρόσφατη μελέτη (Lo *et al.* 2002) επιβεβαιώνει την ύπαρξη δύο καινούργιων ομάδων, της E στο κολέμβολο *Folsomia candida* (Vandekerckhove *et al.* 1999) και της F σε δύο είδη τερμιτών (Bandi *et al.* 1997).



**ΕΙΚΟΝΑ 1.3** Φυλογενετικό δένδρο των *wsp* γονιδίων της *Wolbachia* των αρθροπόδων (ομάδες A και B). Τα ονόματα των ειδών των ξενιστών ακολουθούνται από το όνομα των στελεχών του βακτηρίου και την ομάδα στην οποία κατατάσσονται. Η εικόνα προέρχεται από van Meer *et al.* 1999.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.1 Ξενιστές στους οποίους απαντάται η *Wolbachia* και οι επαγόμενοι φαινότυποι.  
Ο πίνακας προέρχεται από Bourtzis and Braig, 1999

<i>Wolbachia</i> host	phenotype
phylum Nematoda	
class Secernentea	
order Spirurida	
family Onchocercidae	filarial worms, elephantitis worms
phylum Arthropoda	
subphylum Crustacea	
class Malacostraca	
order Isopoda	
family..Armadillidiidae	woodlice
family..Asellidae	pillbugs
family..Cylisticidae	woodlice
family..Ligiidae	woodlice, beach slaters
family..Oniscidae	sowbugs
family..Philosciidae	woodlice
family..Porcellionidae	sowbugs
family..Sphaeromatidae	marine pillbugs
family..Tylidae	woodlice
family..Trichoniscidae	woodlice
subphylum Chelicerata	
class Arachnida	
order Parasitiformis	
family..Phytoseiidae	predatory mites
family..Tetranychidae	spider mites
subphylum Tracheata	
class Insecta	
order Isoptera	termites
order Orthoptera	
family..Gryllidae	crickets
family..Tettigoniidae	long-horned grasshoppers, bush crickets, katydids
order Hemiptera	
family..Aleyrodidae	whiteflies
family..Delphacidae	planthoppers
family..Reduviidae	assassin bugs, ambush bugs, thread-legged bugs
order Coleoptera	
family..Chrysomelidae	leaf beetles
family..Cleridae	checkered beetles
family..Curculionidae	snout beetles, true weevils
family..Dermestidae	skin beetles, larder beetles
family..Scolytidae	bar beetles, engravers, ambrosia beetles
family..Tenebrionidae	darkling beetles
order Hymenoptera	
family..Agaonidae	fig wasps
family..Aphelinidae	parasitoid wasps
family..Apidae	parasitoid wasps
family..Braconidae	parasitoid wasps
family..Cynipidae	gall wasps
family..Encyrtidae	parasitoid wasps
family..Eulophidae	parasitoid wasps
family..Eucoilidae	parasitoid wasps
family..Formicidae	ants
family..Proctotrupidae	parasitoid wasps
family..Pteromalidae	jewel wasps
family..Sphecidae	digger wasps
family..Trichogrammatidae	parasitoid wasps
order Lepidoptera	
family..Nymphalidae	brush- or four-footed butterflies
family..Pyralidae	snout moths, grass moths
order Diptera	
family..Calliphoridae	blow flies
family..Culicidae	mosquitoes
family..Diopsidae	stalked-eyed flies
family..Drosophilidae	vinegar flies, pomace flies
family..Glossinidae	tsetse flies
family..Neridae	cactus flies
family..Psychodidae	sand flies
family..Stratiomyidae	soldier flies
family..Tephritidae	fruit flies

## 1.5 Επιπτώσεις της *Wolbachia* στους ξενιστές

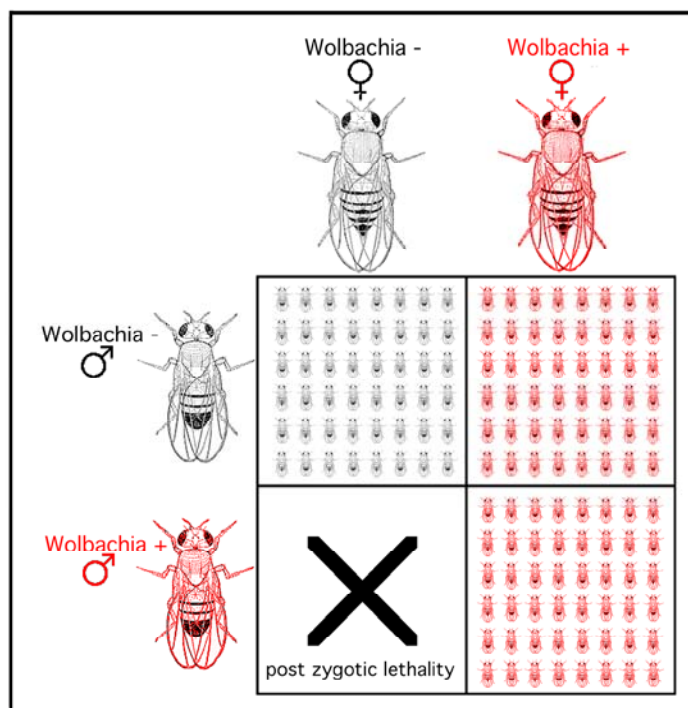
Η *Wolbachia* προκαλεί ένα πλήθος αναπαραγωγικών ανωμαλιών στους ξενιστές της, έτσι ώστε να ευνοείται η κάθετη μετάδοση και εξάπλωσή της. Η πρώτη αναφορά πάνω στις ανωμαλίες αυτές έγινε από τους Yen και Barr το 1971 (Yen and Barr 1973), οι οποίοι ανακάλυψαν ότι η ασυμβατότητα που είχε παρατηρηθεί στις 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 εμβρύων που προέρχονται από μη μολυσμένα θηλυκά που έχουν γονιμοποιηθεί 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). Τέλος βρέθηκε ένα στέλεχος *Wolbachia* το οποίο δεν φαίνεται να προκαλεί αναπαραγωγικές ανωμαλίες, αλλά μειώνει τη διάρκεια ζωής των ξενιστών. Το στέλεχος αυτό, που απαντάται στη *Drosophila melanogaster*, προκαλεί βλάβες στο νευρικό και στο μυϊκό ιστό του ξενιστή οδηγώντας τα άτομα σε πρόωρο θάνατο (Min and Benzer 1997).

Παρακάτω παρουσιάζονται αναλυτικότερα οι επιπτώσεις της *Wolbachia* στους διάφορους ξενιστές της.

### 1.5.1 *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 ακάρια (van Orijnen and Breeuwer 1999). Περιληπτικά, η CI είναι μία μορφή εμβρυϊκής θνησιμότητας σε διασταυρώσεις μεταξύ μολυσμένων αρσενικών με μη μολυσμένα θηλυκά (Εικ. 1.4). Όσον αφορά το μηχανισμό αυτής λίγα πράγματα είναι γνωστά μέχρι σήμερα. Σύμφωνα με γενετικές και κυτταρολογικές μελέτες, το βακτήριο τροποποιεί το σπέρμα κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης και αυτή η τροποποίηση πρέπει να διασωθεί από το ίδιο βακτηριακό στέλεχος στο

αυγό για να συνεχιστεί κανονικά η ανάπτυξη του εμβρύου. Η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα μπορεί να είναι μονόδρομη, όταν εμπλέκεται ένα βακτηριακό στέλεχος ή αμφίδρομη όταν εμπλέκονται παραπάνω από ένα στελέχη. Για την CI γίνεται εκτενέστερα λόγος παρακάτω.



**ΕΙΚΟΝΑ 1.4** 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.

### 1.5.2 *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 θυσανόπτερων (Arakaki *et al.* 2001). 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). Το βακτήριο τροποποιεί την πρώτη μιτωτική διαίρεση στα μη γονιμοποιημένα αυγά, και συγκεκριμένα την ανάφαση (Stouthamer and Kazmer 1994), με αποτέλεσμα τη δημιουργία διπλοειδούς πυρήνα και την περαιτέρω ανάπτυξη αυτών σε θηλυκά αντί αρσενικά άτομα. 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 αυτά.

### **1.5.3 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.

### **1.5.4 Wolbachia και θάνατος αρσενικών**

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

### **1.5.5 Wolbachia στους νηματώδεις**

Ένας από τους πιο ενδιαφέροντες τομείς έρευνας που σχετίζονται με τη *Wolbachia*, αφορά τη σχέση της με τους νηματώδεις που προκαλούν φιλαριάσεις. Συγκεκριμένα το βακτήριο έχει αναπτύξει αμοιβαία συμβιωτική σχέση με αυτούς, με αποτέλεσμα τη διακοπή της κανονικής ανάπτυξης των νηματωδών μετά τη χορήγηση αντιβιοτικών (Hoerauf *et al.* 1999). Ευρήματα όπως το ότι ασθένειες του ανθρώπου

σαν την τύφλωση του ποταμού (river blindness) σχετίζονται με φλεγμονώδη απόκριση του ανθρώπινου οργανισμού στα βακτήρια και όχι στους νηματώδεις που τα κουβαλούν (Saint Andre *et al.* 2002), ανοίγουν νέους δρόμους στη θεραπεία ασθενειών.

### **1.5.6 Wolbachia και ειδογένεση**

Μελέτες στο παρελθόν έχουν προσφέρει ενδείξεις για την πιθανή συμβολή της *Wolbachia* στη δημιουργία νέων ειδών (Bordenstein and Werren 1998, Giordano *et al.* 1997, Shoemaker *et al.* 1999). Επιπρόσθετα, στην παρασιτική σφήκα *Nasonia* έχει δειχθεί ότι η αμφίδρομη κυτταροπλασματική ασυμβατότητα σχετίζεται με τη δημιουργία νέων ειδών, μια και η χορήγηση αντιβιοτικών σε διαφορετικά είδη μολυσμένων εντόμων, οδηγεί στην παραγωγή βιώσιμων και γόνιμων υβριδίων (Bordenstein *et al.* 2001). Παρόλη την αυξανόμενη παραγωγή στοιχείων για την εμπλοκή του βακτηρίου σε φαινόμενα ειδογένεσης, η έκταση αυτής παραμένει αμφισβητήσιμη.

## **1.6 ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΑΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑ**

### **1.6.1 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) ή με θηλυκά μολυσμένα με διαφορετικό βακτηριακό στέλεχος (αμφίδρομη) (Εικ. 1.5 και 1.6). 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),



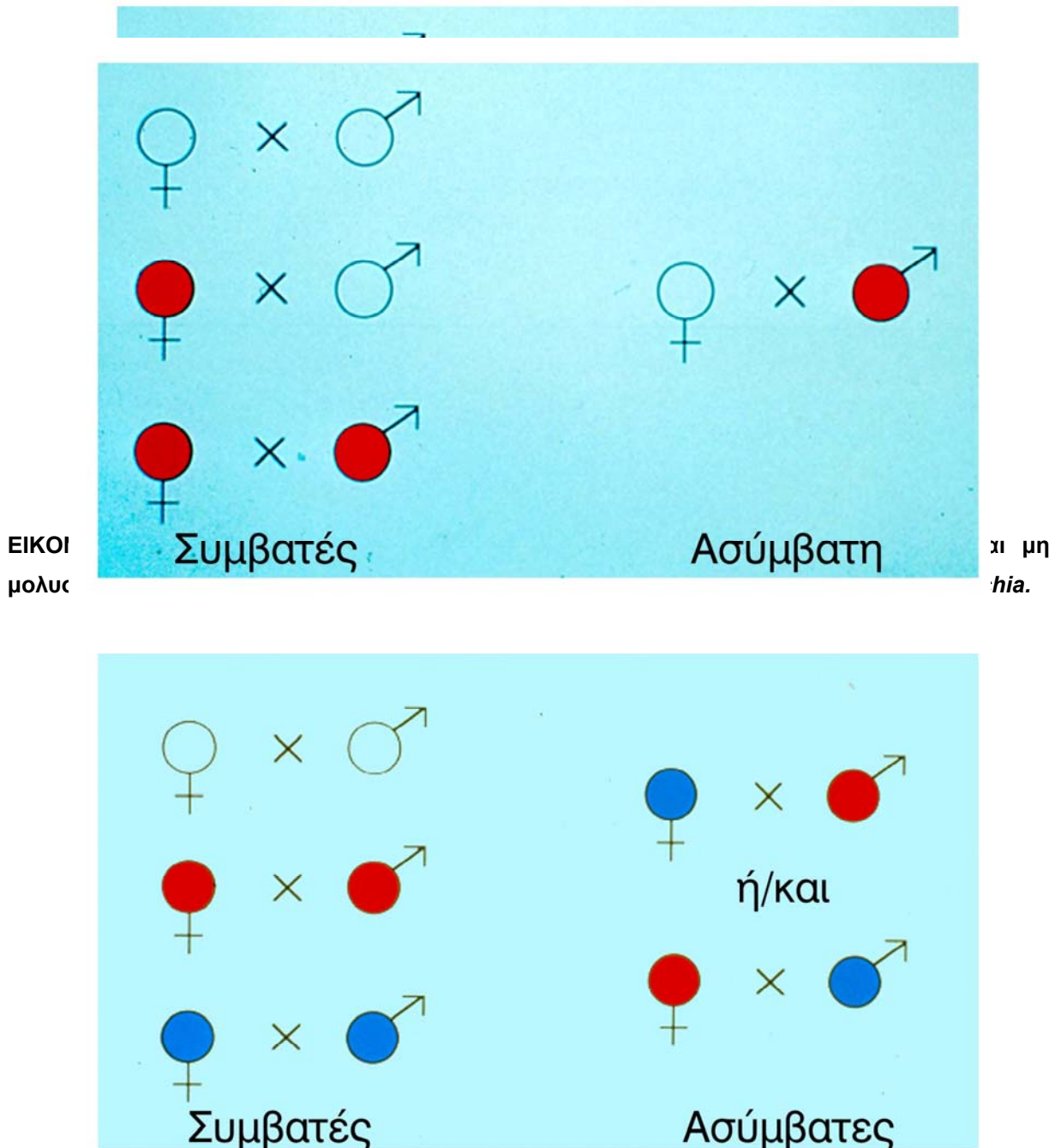
υμενόπτερα (Reed and Werren 1995), ομόπτερα (Hoshizaki and Shimada 1995), ισόπτερα (Bandi *et al.* 1997), λεπιδόπτερα (Brower 1976), ορθόπτερα (Kamoda *et al.* 2000) και ίσως αποτελεί τον πιο κοινό φαινότυπο που επάγεται από τη *Wolbachia*. Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι τα στελέχη της *Wolbachia* που επάγουν CI δεν αποτελούν μονοφυλετική ομάδα, σε σχέση με τα στελέχη που επάγουν διαφορετικούς φαινοτύπους (Werren *et al.* 1995, Zhou *et al.* 1998), οπότε μπορεί η επαγωγή της να αποτελεί αρχέγονη ιδιότητα του βακτηρίου.

### 1.6.2 Μηχανισμοί

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.

Η τροποποίηση και η διάσωση αλληλεπιδρούν με ειδικό τρόπο, όπως φαίνεται από την ύπαρξη της αμφίδρομης ασυμβατότητας. Δηλαδή, κάθε στέλεχος *Wolbachia*

είναι απολύτως συμβατό μόνο με τον εαυτό του. Αρσενικά μολυσμένα με δύο στελέχη είναι συμβατά μόνο με θηλυκά διπλά μολυσμένα με τα αντίστοιχα στελέχη (Perrot-Minnot *et al.* 1996, Rousset and Solignac 1995, Sinkins *et al.* 1995).



**ΕΙΚΟΝΑ 1.6** Αμφίδρομη κυτταροπλασματική ασυμβατότητα μεταξύ μολυσμένων με διαφορετικό βακτηριακό στέλεχος εντόμων. Το κάθε χρώμα αντιστοιχεί σε διαφορετικό είδος *Wolbachia*.

Επίσης, η τροποποίηση και η διάσωση είναι πιθανώς διαφορετικές λειτουργίες. Θεωρητικά, τέσσερις διαφορετικοί τύποι *Wolbachia* μπορούν να υπάρχουν:  $mod^+/resc^+$ ,  $mod^-/resc^-$ ,  $mod^+/resc^-$  και  $mod^-/resc^+$ . Τα περισσότερα στελέχη που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα ανήκουν στην πρώτη κατηγορία, μπορούν δηλαδή να τροποποιούν το σπέρμα και να διασώζουν την τροποποίηση. Ένα στέλεχος  $mod^-/resc^-$  έχει περιγραφεί στη *Drosophila simulans* (Hoffmann *et al.* 1996) μέχρι σήμερα, καθώς και δύο στελέχη που δεν επάγουν ασυμβατότητα ( $mod^-$ ), αλλά διασώζουν την ασυμβατότητα που επάγουν συγγενικά τους στελέχη ( $resc^+$ ) (Bourtzis *et al.* 1998, Mercot and Poinsot 1998). Στελέχη τέλος που επάγουν, αλλά δεν διασώζουν ( $mod^+/resc^-$ ), δεν έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα. Θεωρητικά μοντέλα υποστηρίζουν πως τα στελέχη αυτά είναι δύσκολο να διατηρηθούν σε ένα πληθυσμό, μια και είναι «αυτοκτονικά», αν και κάποιες θεωρητικές μελέτες υποστηρίζουν την πιθανή ύπαρξη τους κάτω από συγκεκριμένες προϋποθέσεις (Charlat *et al.* 2001).

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. 1.7). Συνεπώς η δράση της *Wolbachia* δεν είναι άμεση, αλλά επιτυγχάνεται μέσω κάποιας τροποποίησης του σπέρματος. Θεωρητικά, η τροποποίηση αυτή θα μπορούσε να έχει ως στόχο είτε απευθείας τα πατρικά χρωμοσώματα, είτε εξωπυρηνικούς παράγοντες του σπέρματος, απαραίτητους για την ανάπτυξη του εμβρύου. Πειράματα σε *D. melanogaster* έδειξαν ότι οι εξωπυρηνικοί παράγοντες δεν επηρεάζονται από την τροποποίηση αυτή (Presgraves 2000). Στόχος λοιπόν 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

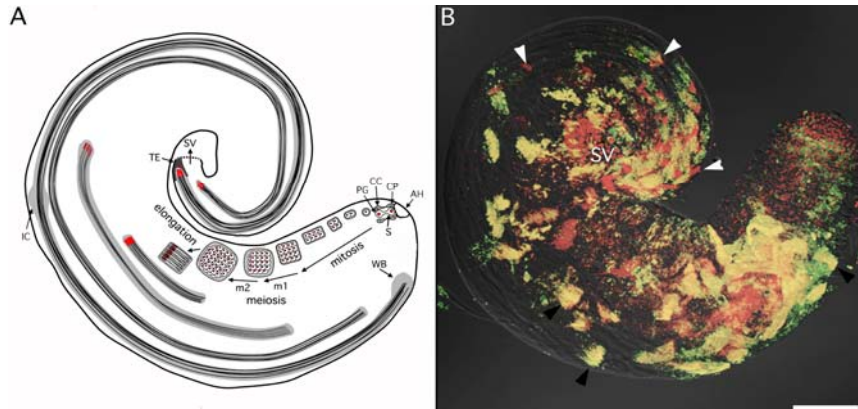
αρσενικών και θηλυκών. Αναλυτικότερα, παρατηρήθηκε ότι αρσενικά με υψηλούς αριθμούς βακτηρίων ήταν ασύμβατα με θηλυκά, μολυσμένα με λιγότερα βακτήρια. Στη *Drosophila simulans* έχει δειχθεί επίσης ότι ηλικιωμένα αρσενικά προκαλούν χαμηλότερη CI (Hoffmann *et al.* 1986) και έχουν λιγότερα βακτήρια στους όρχεις τους (Binnington and Hoffmann 1989). Επιπρόσθετα δειχθηκε ότι τα ηλικιωμένα αρσενικά έχουν λιγότερες μολυσμένες σπερματοκύστες (Bressac and Rousset 1993) στους όρχεις τους. Θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε επίσης στα πειράματα διαμόλυνσης (transinfection). Συγκεκριμένα, όταν το βακτηριακό στέλεχος της *D. melanogaster* μεταφέρθηκε στη *D. simulans*, τα επίπεδα CI αυξήθηκαν εντυπωσιακά, όπως και αριθμός των μολυσμένων σπερματοκύστων (Poinsot *et al.* 1998). Επίσης, όταν η *Wolbachia* μεταφέρθηκε από το φυσικό ξενιστή της *D. simulans* στη *D. melanogaster*, παρατηρήθηκε πτώση τόσο στα επίπεδα CI, όσο και στον αριθμό των βακτηρίων στα αυγά (Boyle *et al.* 1993). Εντούτοις, ασυμφωνία παρατηρήθηκε σε μερικές περιπτώσεις (Bourtzis *et al.* 1996, Bourtzis *et al.* 1998, Giordano *et al.* 1995), όπου δεν υπάρχει απόλυτη συσχέτιση μεταξύ βακτηριακής πυκνότητας και CI.

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. Στη σφήκα *Nasonia* επίσης τα πατρικά χρωμοσώματα δεν συμπυκνώνονται σωστά και χάνονται (Reed and Werren 1995), με αποτέλεσμα τη δημιουργία ανευπλοειδών και απλοειδών ατόμων. Στα απλοδιπλειοδή είδη, όπως η *Nasonia*, τα απλοειδή αυγά αναπτύσσονται ως αρσενικά. Μολαταύτα, κάποια από τα απλοειδή αυγά πεθαίνουν, αν η απλοειδία δεν ολοκληρωθεί σωστά. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγήσει γιατί η CI κάποιες φορές στα απλοδιπλειοδή είδη μπορεί να οδηγήσει σε αναλογία φύλου στην F1 γενιά, υπέρ των αρσενικών (Breeuwer 1997, Vala *et al.* 2000, Vavre *et al.* 2000). Εξαιρετική πρόσφατη κυτταρολογική μελέτη στη συγκεκριμένη σφήκα, έδειξε ότι η CI είναι αποτέλεσμα της

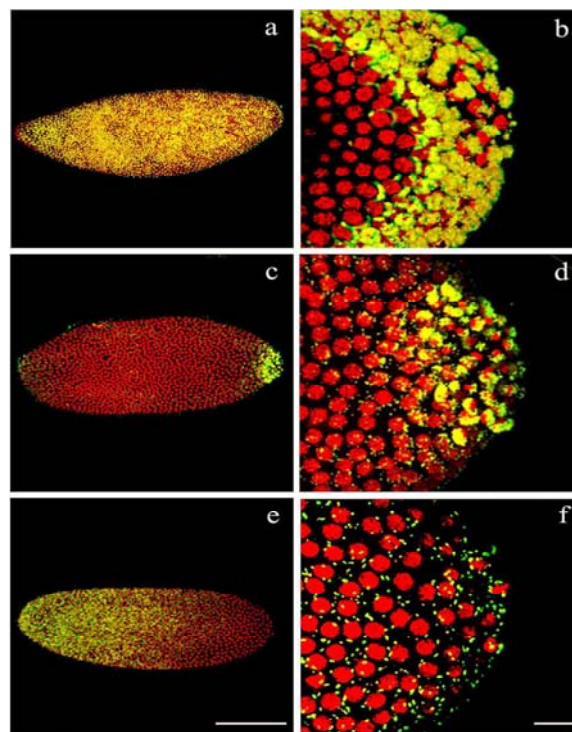
καθυστερημένης αποδιάταξης του πυρηνικού φακέλου του πατρικού προπυρήνα, υπονοώντας αλληλεπίδραση του βακτηρίου με πρωτεΐνες του ξενιστή που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο (Tram and Sullivan 2002).

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 *Nasonia* τα βακτήρια συγκεντρώνονται στον οπίσθιο πόλο του αυγού (Breeuwer and Werren 1990). Η συγκέντρωση αυτή παρατηρείται επίσης στη *D. melanogaster* (Hadfield and Axton 1999), στο *Trichogramma* (Stouthamer *et al.* 1993) και στην *Aphytis* (Zchori-Fein *et al.* 1998), ενώ στη *Drosophila simulans* παρατηρήθηκε ομοιόμορφη κατανομή γύρω από το φλοιό του αυγού (Εικ. 1.8) (Boyle *et al.* 1993, Callaini *et al.* 1994, Kose and Karr 1995, O'Neill and Karr 1990). Λίγα πράγματα είναι γνωστά για τη ρύθμιση της διαίρεσης των βακτηρίων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των ξενιστών της. Όσον αφορά την εμβρυογένεση της *Drosophila* τα βακτήρια δεν φαίνεται να πολλαπλασιάζονται στα πρώιμα στάδια αυτής (Lassy and Karr 1996). Επιπρόσθετα, η βακτηριακή κατανομή σε ιστούς πέρα από τους γενετικούς δεν έχει εξεταστεί με λεπτομέρεια. Εξαιρέση αποτελεί το λεγόμενο porcorn στέλεχος το οποίο πολλαπλασιάζεται στον εγκέφαλο της μύγας ανεξέλεγκτα και τη σκοτώνει στη μέση ηλικία περίπου της ζωής της (Min and Benzer 1997).

Τέλος, διάφοροι άλλοι παράγοντες επηρεάζουν τα επίπεδα της CI, όπως το θερμικό σοκ (heat shock) (Clancy and Hoffmann 1998, Snook *et al.* 2000), και το περιβάλλον που μεγαλώνουν οι προνύμφες (Clancy and Hoffmann 1998).



**ΕΙΚΟΝΑ 1.7** 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 1.8** 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 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 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 *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.

Θα αναρωτηθεί κανείς γιατί στα πειράματα που αφορούν την βιολογία του βακτηρίου χρησιμοποιούμε την *Drosophila* και όχι κάποιο άλλο είδος εντόμου, που να είναι και μεγαλύτερης γεωργικής σημασίας. Η απάντηση δίνεται παρακάτω:

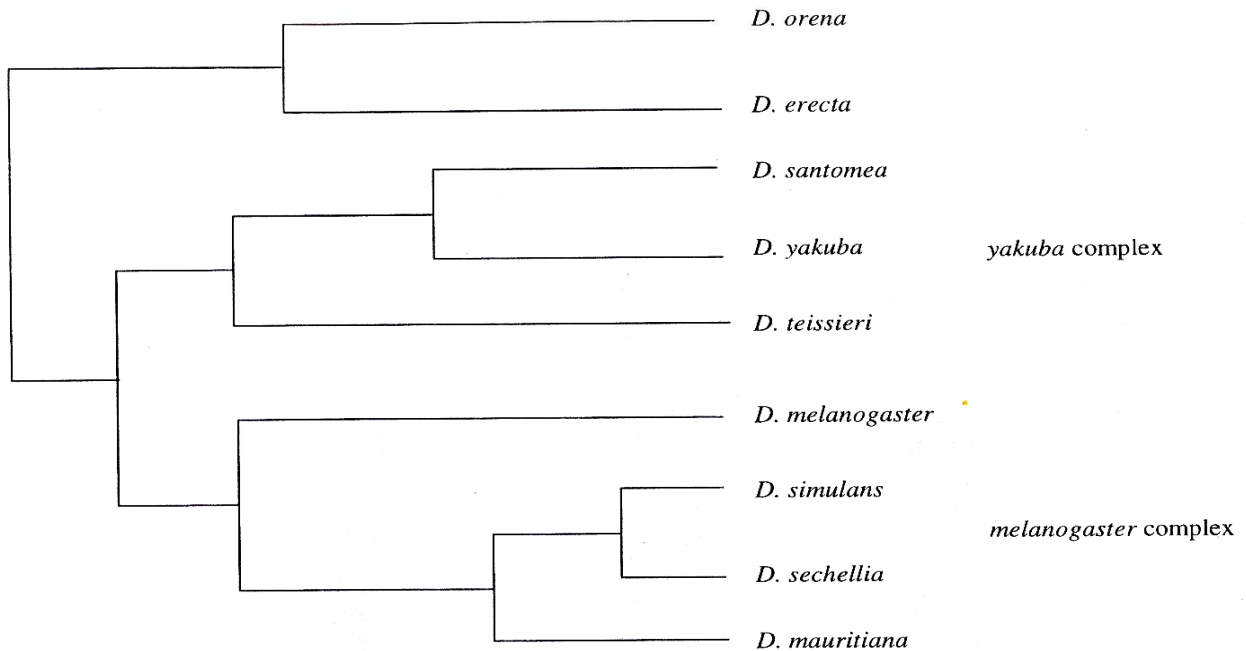
1. Η *Drosophila* είναι ένας οργανισμός μοντέλο.
2. Σήμερα μας είναι γνωστό όλο το γονιδίωμα της, πράγμα που διευκολύνει τα γενετικά πειράματα.
3. Η *Drosophila* έχει μικρό κύκλο ζωής (12–15 ημέρες) και έχει καλή προσαρμοστικότητα σε θερμοκρασία δωματίου.

4. Είναι εύκολο να πάρουμε αγονιμοποίητα αρσενικά και θηλυκά άτομα, καθώς τα αγονιμοποίητα διακρίνονται από τα ώριμα ενήλικα.
5. Η φροντίδα και διατήρηση των πληθυσμών απαιτεί λίγο και φτηνό εξοπλισμό και καταλαμβάνουν λίγο χώρο στο εργαστήριο, ακόμα και αν πρόκειται για μεγάλους πληθυσμούς.

Για τους παραπάνω λόγους λοιπόν χρησιμοποιούμε τη *Drosophila* για τα πειράματά μας 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 τα είδη εντόμων.

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. 1.9) : *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, Lachaise *et al.* 2000).





**ΕΙΚΟΝΑ 1.9** Σχηματικό διάγραμμα των ειδών της υποομάδας της *Drosophila melanogaster*.

Μέχρι στιγμής οι περισσότερες μελέτες της *Wolbachia* έχουν εστιαστεί στην υποομάδα της *melanogaster* (Bourtzis *et al.* 1998, Bourtzis *et al.* 1996, Bourtzis *et al.* 1994, Boyle *et al.* 1993, Giordano *et al.* 1995, Hoffmann 1988, Hoffmann *et al.* 1996, Hoffmann *et al.* 1994, Hoffmann *et al.* 1986, Holden *et al.* 1993, Mercot *et al.* 1995, O' Neill and Karr 1990, Poinso *et al.* 1998, Rousset *et al.* 1999, Rousset and Solignac 1995, Rousset *et al.* 1992, Solignac *et al.* 1994). 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 *w*Ri (Hoffmann *et al.* 1986) το *w*Ha (O'Neill and Karr 1990) και το *w*No (Mercot *et al.* 1995) βρέθηκε ότι εκφράζουν και τη *mod* και τη *resc* λειτουργία στον φυσικό τους ξενιστή (*mod*<sup>+</sup>/*resc*<sup>+</sup> φαινότυπος) και παρουσιάζουν όλα αμφίδρομη ασυμβατότητα. Το στέλεχος *w*Ma (Charlat *et al.* 2003, Rousset and Solignac 1995) δεν είναι ικανό να ασκήσει την τροποποίηση στο γονιδίωμα του αρσενικού. Εντούτοις, η μόλυνση αυτή μπορεί να διασώσει πλήρως την τροποποίηση του στελέχους *w*No (Bourtzis *et al.* 1998, Mercot and Poinso *et al.* 1998), κατά συνέπεια εκφράζει έναν *mod*<sup>-</sup> *resc*<sup>+</sup> φαινότυπο. Το πέμπτο στέλεχος, το *w*Au, δεν εμφανίζεται

να προκαλεί (Charlat *et al.* 2003, Hoffmann *et al.* 1996, James and Ballard 2000) ούτε να διασώζει τη CI (Poinsot *et al.* 1998), συνεπώς εκφράζει έναν *mod<sup>-</sup>/resc<sup>-</sup>* 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 *wAu* στη *D. simulans* κρίνοντας με βάση τις αλληλουχίες του *wsp* γονιδίου (Lachaise *et al.* 2000, Zabalou *et al.* 2003).

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 *wAu* στέλεχος της *D. Simulans* (Zabalou *et al.* 2003). 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<sup>-</sup>*) 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 για ένα από τα στελέχη *wSty* αυτό που προέρχονταν από την *D. santomea*.

# 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## 2.1 Στελέχη και Καλλιέργεια Εντόμων

Τα στελέχη εντόμων που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη αυτή είναι:

1. *Drosophila simulans* STCP : Το στέλεχος αυτό δεν έχει *Wolbachia* (μη μολυσμένο στέλεχος).
2. *Drosophila simulans Riverside* (DSR) : Το στέλεχος αυτό είναι φυσικά μολυσμένο με το στέλεχος *wRi* της *Wolbachia*.
3. *Drosophila yakuba*: Το στέλεχος αυτό είναι φυσικά μολυσμένο με *Wolbachia wSty*.
4. *Drosophila santomea*: Επίσης φυσικά μολυσμένο με *Wolbachia wSty*.
5. *Drosophila teissieri*: Φυσικά μολυσμένο στέλεχος με *Wolbachia wSty*.
6. *Drosophila simulans yaksim*: Το στέλεχος αυτό προέρχεται από στελέχη *Drosophila simulans* STCP που μολύνθηκαν τεχνητά στο εργαστήριο με το στέλεχος του βακτηρίου *wSty* που πάρθηκε από τη *Drosophila yakuba*.
7. *Drosophila simulans sansim* : Το στέλεχος αυτό προέρχεται από στελέχη *Drosophila simulans* STCP που μολύνθηκαν τεχνητά στο εργαστήριο με το στέλεχος του βακτηρίου *wSty* που πάρθηκε από τη *Drosophila santomea*.
8. *Drosophila simulans teisim*: Το στέλεχος αυτό προέρχεται από στελέχη *Drosophila simulans* STCP που μολύνθηκαν τεχνητά στο εργαστήριο με το στέλεχος του βακτηρίου *wSty* που πάρθηκε από τη *Drosophila teissieri*.

Οι καλλιέργειες των εντόμων έγιναν στους 25<sup>0</sup>C 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 απομονώθηκε από μεμονωμένες θηλυκές μύγες *Drosophila simulans* ακολουθώντας την STE μέθοδο (O' Neil *et al.* 1992). Η παρουσία της *Wolbachia* ανιχνεύτηκε με PCR χρησιμοποιώντας τους ειδικούς εκκινητές για το γονίδιο *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 Απομόνωση DNA από έντομα (STE μέθοδος)

Το κάθε άτομο ομογενοποιήθηκε μέσα σε ένα μικροσωληνάκι (microtube) τύπου Eppendorf των 1.5ml που περιέχει 50μl STE buffer 1x (100mM NaCl<sub>2</sub>, 10mM Tris HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0) και 1μl Proteinasse K (20mg/L)]. Στη συνέχεια τα μικροσωληνάκια μεταφέρθηκαν σε ένα θάλαμο με θερμοκρασία 37°C για 30 λεπτά, για να επωαστεί το μείγμα και να δράσει η πρωτεϊνάση. Μετά το πέρας των 30' τα μικροσωληνάκια τοποθετήθηκαν για 5 λεπτά σε heat blocks στους 95°C για να επωαστεί το μείγμα και να απενεργοποιηθεί η πρωτεϊνάση (prot. K). Τέλος φυγοκεντρήθηκαν 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)

Κάθε άτομο εξετάστηκε χωριστά. Οι αντιδράσεις έγιναν σε τελικό όγκο 25μl. Κάθε αντίδραση περιείχε: 2,5μl buffer 10x (50mM KCl, 10 mM Tris HCl pH 9.0, 1,5μl MgCl<sub>2</sub> 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), 1,5u Taq πολυμεράση και 16,2μl H<sub>2</sub>O. Τέλος, προστίθεται 1μl DNA total (100–200 ng). 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 του Taq πολυμεράση)
5. Επανάληψη από το βήμα 2 ως 5 για 35 φορές
6. 72°C για 10' για να ολοκληρωθούν τα τυχόν ατελή κομμάτια.

Η ανάλυση έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% σε 1x TAE (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA). Ακολούθησε φωτογράφιση με την **Kodak DC120 Electrophoresis Documentation and Analysis Camera** και επεξεργασία στον υπολογιστή με τη βοήθεια του προγράμματος φωτογραφίας **Kodak Digital Science1D**.

## 2.5 Έλεγχος της μεταβίβασης των βακτηρίων στα έντομα

Η μεταφορά του βακτηρίου έγινε στο στάδιο των εμβρύων. Από τους απογόνους των εμβρύων αυτών 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. 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.

## 2.6 Μέτρηση της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας (CI)

Πραγματοποιήθηκαν διασταυρώσεις μεταξύ ενός αγονιμοποίητου θηλυκού 3 ημερών και ενός νεαρού αρσενικού 1 ημέρας, σε μπουκαλάκια που στον πάτο τους έχουν πιατάκια Petri με πήκτωμα μηλόζουμου (100% φυσικός χυμός μήλου από συμπυκνωμένο χυμό, 3 % άγαρ, 3% Nitrogen). Πάνω σ' αυτό γεννούν τα αυγά τους οι μύγες. Για κάθε συνδυασμό στελεχών διασταυρώθηκαν 20–30 ζευγάρια εντόμων. Οι διασταυρώσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 25°C. Ανά 24 ώρες τα πιατάκια αλλάζονται και μετρούνται τα αυγά (έμβρυα) που είχαν αφεθεί πάνω στο πήκτωμα. Κατόπιν τα πιατάκια αυτά φυλάσσονται για άλλες 36 ώρες ώστε να εκκολαφθούν τα έμβρυα και στη συνέχεια μετρούνται τα αυγά που δεν εκκολάφθηκαν. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται έως ότου συλλεχθούν το λιγότερο 50 έμβρυα από κάθε διασταύρωση (ζευγάρι). Κατόπιν οι γονείς πετάχτηκαν. Με αυτόν τον τρόπο μετρείται το ποσοστό της στειρότητας για κάθε διασταύρωση. Το ποσοστό στειρότητας είναι ο αριθμός των μη εκκολαπτόμενων εμβρύων προς τον συνολικό αριθμό των εμβρύων που εκκολάφθηκαν.

Με σκοπό να ελαχιστοποιηθεί ο θόρυβος (background) από την εμβρυϊκή θνησιμότητα των διασταυρώσεων που δεν σχετίζεται με την κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (cytoplasmic incompatibility, CI), τα επίπεδα της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας υπολογίζονται ως εξής: Χρησιμοποιώντας τις μετρήσεις από τις αντίστροφες (reciprocal) διασταυρώσεις (μολυσμένα θηλυκά με μη μολυσμένα αρσενικά) προκύπτει ο δείκτης CCM (Compatible Cross Mortality), ο οποίος δείχνει τη θνησιμότητα στις διασταυρώσεις αυτές (Poinsot *et al.* 1998). Η διορθωμένη έκφραση του CI ( $CI_{corr}$ ) είναι ο αριθμός των εμβρύων που δεν εκκολάπτονται, ανάμεσα σε αυτά που θα είχαν επιζήσει απουσία CI. Υπολογίζεται από τον ακόλουθο τύπο και εκφράζεται σε ποσοστό ( $CI_{corr}\%$ ).

$$CI_{corr}(\%) = [(CI_{obs} - CCM) / (100 - CCM)] \times 100$$

όπου  $CI_{obs}$  είναι το ποσοστό των μη εκκολαφθέντων αυγών στην ασύμβατη διασταύρωση.

Ο υπολογισμός των μέσων τιμών, των τυπικών σφαλμάτων και η διορθωμένη κυτταροπλασματική ασυμβατότητα υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα Microsoft Excel.

# 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

## 3.1 Δημιουργία μολυσμένων εντόμων

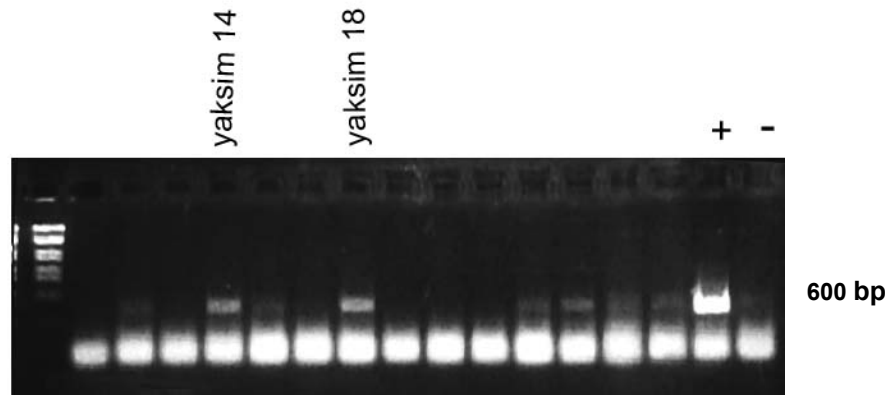
Όταν άρχισε η εκπόνηση της εργασίας αυτής οι ενέσεις μεταφοράς του βακτηρίου από τα τρία είδη *D. teissieri*, *D. santomea* και *D. yakuba*, στα έμβρυα της *D. simulans* είχαν ήδη γίνει και αναμενόταν να εκκολαφθούν τα ενήλικα άτομα της  $G_0$  γενιάς (πρώτη θυγατρική γενιά), για να γίνει ο έλεγχος της κληρονόμησης του βακτηρίου. Όταν εκκολάφθηκαν, δημιουργήθηκαν ισομετρικές σειρές από κάθε θηλυκό άτομο της  $G_0$  γενιάς. Τα άτομα αυτά αφέθηκαν να γεννήσουν αυγά και ακολούθησε ο έλεγχος με PCR για την ανίχνευση της *Wolbachia*. Υπήρχαν τρεις σειρές εντόμων *D. Simulans*: έντομα μολυσμένα με το στέλεχος του βακτηρίου που προέρχονταν από την *D. yakuba* και ονομάστηκαν **yaksim**, έντομα μολυσμένα με το στέλεχος του βακτηρίου που προέρχονταν από την *D. santomea* και ονομάστηκαν **sansim** και έντομα μολυσμένα με το στέλεχος του βακτηρίου που προέρχονταν από την *D. teissieri* και ονομάστηκαν **teisim** (Πιν. 1.1).

### 3.1.1 Έλεγχος στην $G_0$ γενιά

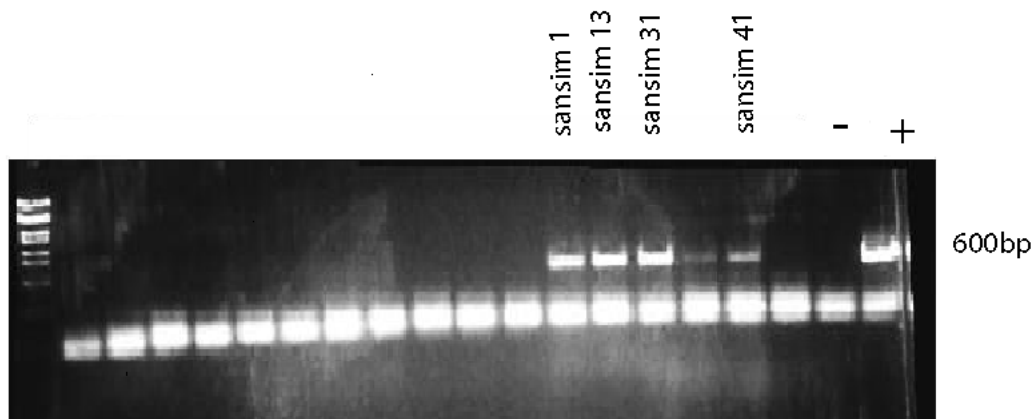
- Από τη σειρά *yaksim* ελέγχθηκαν 22  $G_0$  θηλυκά. Δύο από αυτά ήταν θετικά, οι αριθμοί 14 και 18. Από τους απογόνους των δύο αυτών θηλυκών και δημιουργήθηκαν δύο μολυσμένες σειρές εντόμων, η σειρά *yaksim14* και η σειρά *yaksim18* (Εικ.3.1).
- Από τη σειρά *sansim* ελέγχθηκαν 40  $G_0$  θηλυκά. Τέσσερα από αυτά ήταν θετικά, οι αριθμοί 1, 13, 31 και 41. Από τους απογόνους των τεσσάρων αυτών θηλυκών

και δημιουργήθηκαν τέσσερις μολυσμένες σειρές εντόμων, οι σειρές *sansim1*, *sansim13*, *sansim31* και *sansim41* (Εικ. 3.2).

- Από τη σειρά *teisim* ελέγχθηκαν 35 G0 θηλυκά. Έξι από αυτά ήταν θετικά, οι αριθμοί 1, 2, 4, 5, 19 και 23. Από τους απογόνους των έξι αυτών θηλυκών και δημιουργήθηκαν έξι μολυσμένες σειρές εντόμων, οι σειρές *teisim1*, *teisim2*, *teisim4*, *teisim5*, *teisim19* και *teisim23* (Εικ. 3.3).

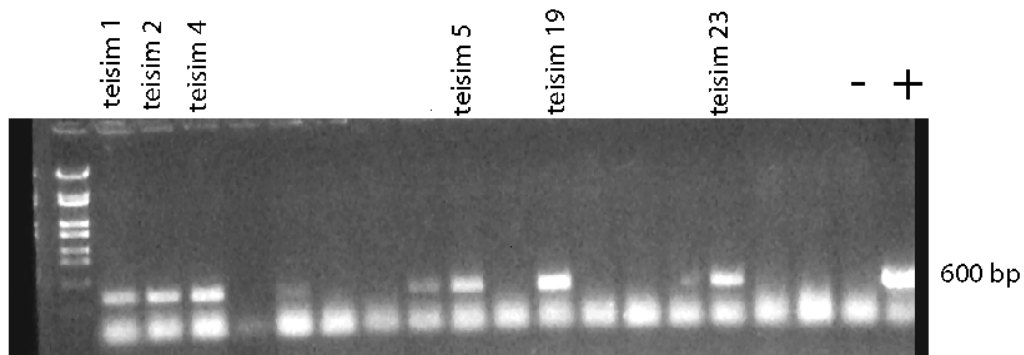


**ΕΙΚΟΝΑ 3.1** Έλεγχος των σειρών της *yaksim* με PCR (στην εικόνα φαίνονται μερικές από τις σειρές που ελέγχθηκαν). Το + είναι ο θετικός μάρτυρας και το - ο αρνητικός.



**ΕΙΚΟΝΑ 3.2** Έλεγχος των σειρών της *sansim* με PCR (στην εικόνα φαίνονται μερικές από τις σειρές που ελέγχθηκαν). Το + είναι ο θετικός μάρτυρας και το - ο αρνητικός.





**ΕΙΚΟΝΑ 3.3** Έλεγχος των σειρών της *teisim* με PCR (στην εικόνα φαίνονται μερικές από τις σειρές που ελέγχθηκαν). Το + είναι ο θετικός μάρτυρας και το – ο αρνητικός.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.1** Αποτελέσματα μεταβίβασης του βακτηρίου στην γενιά  $G_0$ .

ΕΙΔΟΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ	ΓΕΝΙΑ $G_0$	ΝΕΕΣ ΣΕΙΡΕΣ
	θετικά/σύνολο	
<i>D. yakuba</i> → <i>D. simulans</i> (yaksim)	2/22	yaksim 14 yaksim 18
<i>D. santomea</i> → <i>D. simulans</i> (sansim)	4/40	sansim 1 sansim 13 sansim 31 sansim 41
<i>D. teissieri</i> → <i>D. simulans</i> (teisim)	6/35	teisim 1 teisim 2 teisim 4 teisim 5 teisim 19 teisim 23

Οι μολυσμένες σειρές κρατήθηκαν στο εργαστήριο και μετά από δύο γενιές ( $G_2$  γενιά) έγινε επανέλεγχος για τη μεταβίβαση του βακτηρίου, παίρνοντας τυχαίο δείγμα θηλυκών ατόμων από κάθε σειρά.

### 3.1.2 Έλεγχος στην G<sub>2</sub> γενιά

#### Σειρές *yaksim*

- Από τη σειρά *yaksim14* δημιουργήθηκαν 9 ισομετρικές σειρές, από 9 τυχαία θηλυκά. Τα θηλυκά αφέθηκαν να γεννήσουν και μετά ελέγχθηκαν με PCR. Από τα 9 δείγματα μόνο τα 8 ήταν θετικά. Οι απόγονοι των θετικών θηλυκών κρατήθηκαν όλοι μαζί και από εδώ και πέρα θα αποτελούν τη σειρά *yaksim14*.
- Από τη σειρά *yaksim18* δημιουργήθηκαν 16 ισομετρικές σειρές, από 16 τυχαία θηλυκά. Τα θηλυκά αφέθηκαν να γεννήσουν και μετά ελέγχθηκαν με PCR. Από τα 16 δείγματα μόνο τα 5 ήταν θετικά. Οι απόγονοι των θετικών θηλυκών κρατήθηκαν όλοι μαζί και από εδώ και πέρα θα αποτελούν τη σειρά *yaksim18*.

#### Σειρές *sansim*

- Από τη σειρά *sansim1* δημιουργήθηκαν 6 ισομετρικές σειρές, από 6 τυχαία θηλυκά. Τα θηλυκά αφέθηκαν να γεννήσουν και μετά ελέγχθηκαν με PCR. Από τα 6 δείγματα και τα 6 ήταν θετικά. Οι απόγονοι των θετικών θηλυκών κρατήθηκαν όλοι μαζί και από εδώ και πέρα θα αποτελούν τη σειρά *sansim1*.
- Από τη σειρά *sansim13* δημιουργήθηκαν 18 ισομετρικές σειρές, από 18 τυχαία θηλυκά. Τα θηλυκά αφέθηκαν να γεννήσουν και μετά ελέγχθηκαν με PCR. Από τα 18 δείγματα μόνο τα 7 ήταν θετικά. Οι απόγονοι των θετικών θηλυκών κρατήθηκαν όλοι μαζί και από εδώ και πέρα θα αποτελούν τη σειρά *sansim13*.
- Από τη σειρά *sansim31* δημιουργήθηκαν 14 ισομετρικές σειρές, από 14 τυχαία θηλυκά. Τα θηλυκά αφέθηκαν να γεννήσουν και μετά ελέγχθηκαν με PCR. Από τα 14 δείγματα μόνο τα 6 ήταν θετικά. Οι απόγονοι των θετικών θηλυκών κρατήθηκαν όλοι μαζί και από εδώ και πέρα θα αποτελούν τη σειρά *sansim31*.
- Από τη σειρά *sansim41* δημιουργήθηκαν 8 ισομετρικές σειρές, από 8 τυχαία θηλυκά. Τα θηλυκά αφέθηκαν να γεννήσουν και μετά ελέγχθηκαν με PCR. Από τα

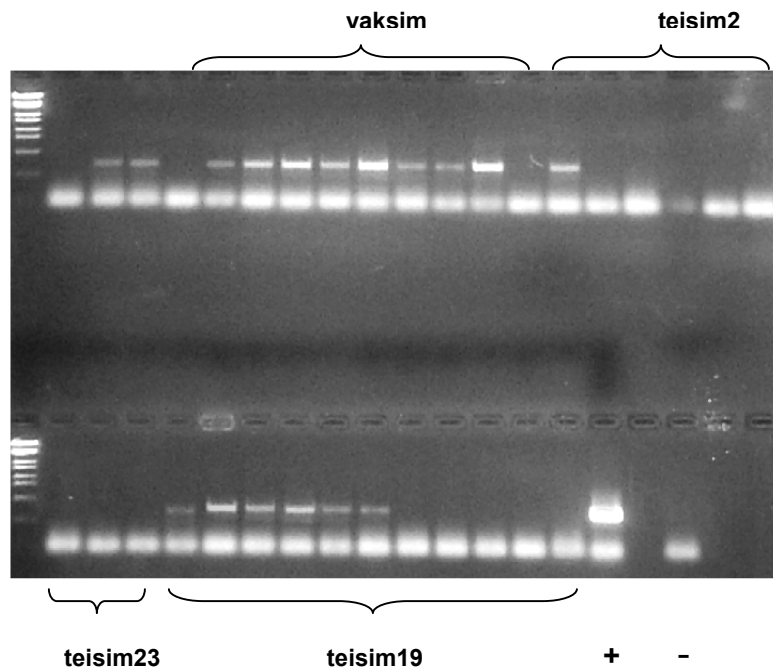
8 δείγματα μόνο τα 5 ήταν θετικά. Οι απόγονοι των θετικών θηλυκών κρατήθηκαν όλοι μαζί και από εδώ και πέρα θα αποτελούν τη σειρά *sansim41*.

#### Σειρές *teisim*

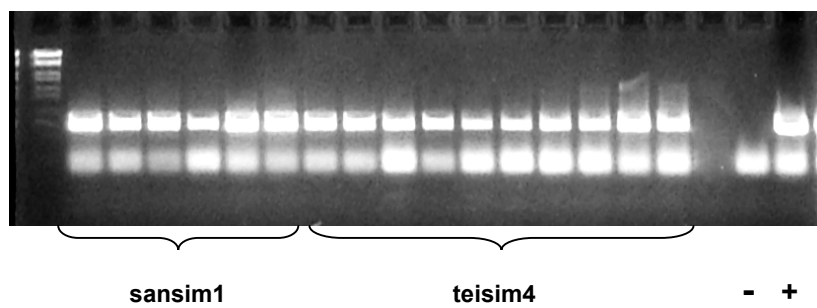
- Από τη σειρά *teisim1* δημιουργήθηκαν 10 ισομητρικές σειρές, από 10 τυχαία θηλυκά. Τα θηλυκά αφέθηκαν να γεννήσουν και μετά ελέγχθηκαν με PCR. Από τα 10 δείγματα μόνο τα 6 ήταν θετικά. Οι απόγονοι των θετικών θηλυκών κρατήθηκαν όλοι μαζί και από εδώ και πέρα θα αποτελούν τη σειρά *teisim1*.
- Από τη σειρά *teisim2* δημιουργήθηκαν 9 ισομητρικές σειρές, από 9 τυχαία θηλυκά. Τα θηλυκά αφέθηκαν να γεννήσουν και μετά ελέγχθηκαν με PCR. Από τα 9 δείγματα μόνο τα 4 ήταν θετικά. Οι απόγονοι των θετικών θηλυκών κρατήθηκαν όλοι μαζί και από εδώ και πέρα θα αποτελούν τη σειρά *teisim2*.
- Από τη σειρά *teisim4* δημιουργήθηκαν 10 ισομητρικές σειρές, από 10 τυχαία θηλυκά. Τα θηλυκά αφέθηκαν να γεννήσουν και μετά ελέγχθηκαν με PCR. Από τα 10 δείγματα και τα 10 ήταν θετικά. Οι απόγονοι των θετικών θηλυκών κρατήθηκαν όλοι μαζί και από εδώ και πέρα θα αποτελούν τη σειρά *teisim4*.
- Από τη σειρά *teisim5* δημιουργήθηκαν 8 ισομητρικές σειρές, από 8 τυχαία θηλυκά. Τα θηλυκά αφέθηκαν να γεννήσουν και μετά ελέγχθηκαν με PCR. Από τα 8 δείγματα μόνο τα 3 ήταν θετικά. Οι απόγονοι των θετικών θηλυκών κρατήθηκαν όλοι μαζί και από εδώ και πέρα θα αποτελούν τη σειρά *teisim5*.
- Από τη σειρά *teisim19* δημιουργήθηκαν 11 ισομητρικές σειρές, από 11 τυχαία θηλυκά. Τα θηλυκά αφέθηκαν να γεννήσουν και μετά ελέγχθηκαν με PCR. Από τα 11 δείγματα μόνο τα 6 ήταν θετικά. Οι απόγονοι των θετικών θηλυκών κρατήθηκαν όλοι μαζί και από εδώ και πέρα θα αποτελούν τη σειρά *teisim19*.
- Από τη σειρά *teisim23* δημιουργήθηκαν 9 ισομητρικές σειρές, από 9 τυχαία θηλυκά. Τα θηλυκά αφέθηκαν να γεννήσουν και μετά ελέγχθηκαν με PCR. Από τα

9 δείγματα μόνο το 1 ήταν θετικό. Οι απόγονοι του θετικού θηλυκού κρατήθηκαν όλοι μαζί και από εδώ και πέρα θα αποτελούν τη σειρά *teisim23*.

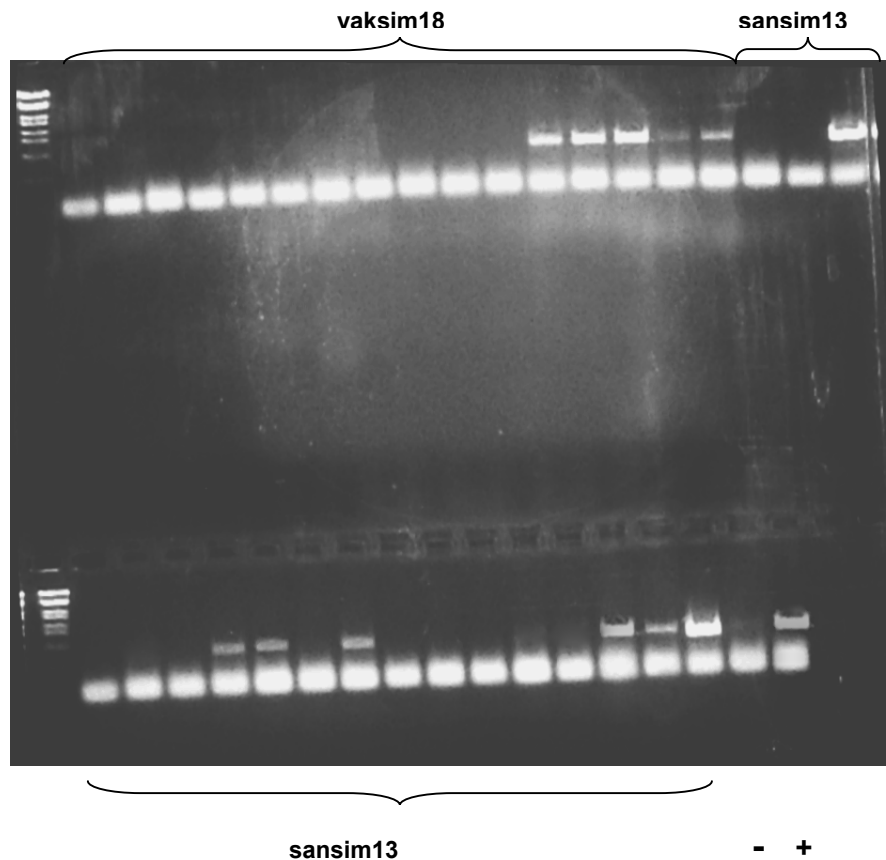
Στις εικόνες 3.4, 3.5 και 3.6 απεικονίζονται μερικοί από τους ελέγχους με PCR που έγιναν στην  $G_2$  γενιά των εντόμων. Στον πίνακα 3.2 φαίνονται συνολικά τα αποτελέσματα της  $G_2$  γενιάς.



**ΕΙΚΟΝΑ 3.4** Έλεγχος των σειρών με PCR στην  $G_2$  γενιά



**ΕΙΚΟΝΑ 3.5** Έλεγχος των σειρών με PCR στην  $G_2$  γενιά



**ΕΙΚΟΝΑ 3.6** Έλεγχος των σειρών με PCR στην G<sub>2</sub> γενιά

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.2** Αποτελέσματα μεταβίβασης του βακτηρίου στην γενιά G<sub>2</sub>

ΣΕΙΡΑ	ΓΕΝΙΑ G <sub>2</sub>
	θετικά/σύνολο
yaksim 14	8/9
yaksim 18	5/16
sansim 1	6/6
sansim 13	7/18
sansim 31	6/14
sansim 41	5/8
teisim 1	6/10
teisim 2	4/9
teisim 4	10/10
teisim 5	3/8
teisim 19	6/11
teisim 23	1/9

### 3.1.3 Έλεγχος στη G<sub>4</sub> γενιά

Επανελέγχτηκαν στην G<sub>4</sub> γενιά όλες οι σειρές των εντόμων και όλα τα δείγματα βρέθηκαν θετικά, επομένως η μόλυνση του βακτηρίου είχε σταθεροποιηθεί στις σειρές αυτές και μπορούσαμε να προχωρήσουμε στα γενετικά πειράματα.

#### Σειρές *yaksim*

- Από τη σειρά *yaksim14* δημιουργήθηκαν 10 ισομητρικές σειρές, από 10 τυχαία θηλυκά. Τα θηλυκά αφέθηκαν να γεννήσουν και μετά ελέγχθηκαν με PCR. Από τα 10 δείγματα και τα 10 ήταν θετικά. Οι απόγονοι των θετικών θηλυκών κρατήθηκαν όλοι μαζί και από εδώ και πέρα θα αποτελούν την τελική σειρά *yaksim14*.
- Από τη σειρά *yaksim18* δημιουργήθηκαν 10 ισομητρικές σειρές, από 10 τυχαία θηλυκά. Τα θηλυκά αφέθηκαν να γεννήσουν και μετά ελέγχθηκαν με PCR. Από τα 10 δείγματα μόνο τα 9 ήταν θετικά. Οι απόγονοι των θετικών θηλυκών κρατήθηκαν όλοι μαζί και από εδώ και πέρα θα αποτελούν την τελική σειρά *yaksim18*.

#### Σειρές *sansim*

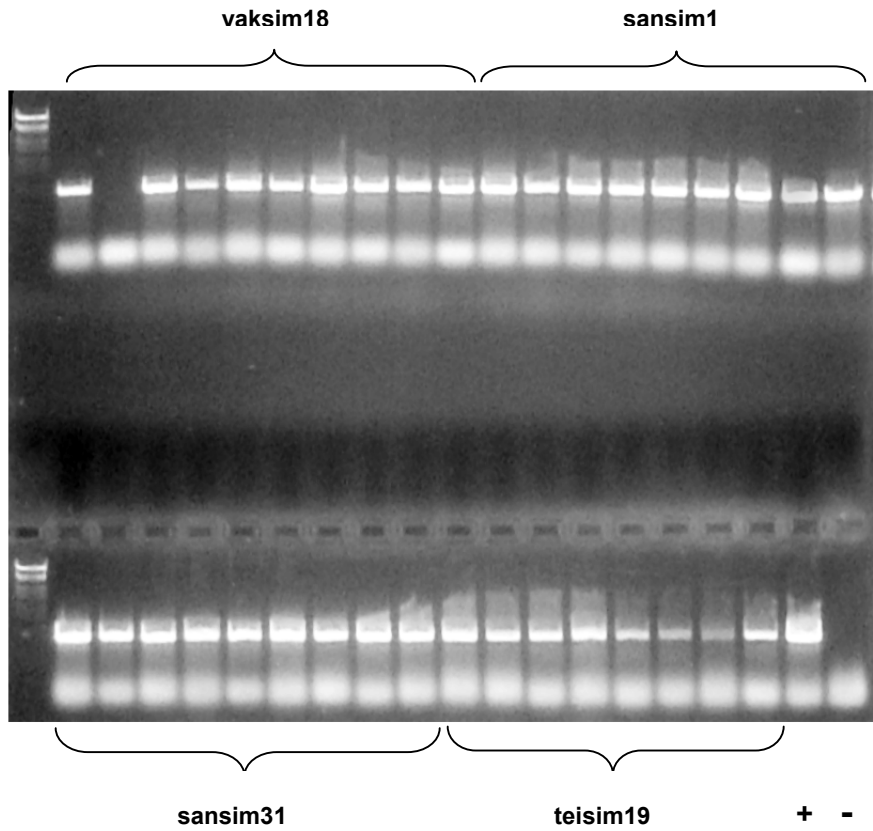
- Από τη σειρά *sansim1* δημιουργήθηκαν 9 ισομητρικές σειρές, από 9 τυχαία θηλυκά. Τα θηλυκά αφέθηκαν να γεννήσουν και μετά ελέγχθηκαν με PCR. Από τα 9 δείγματα και τα 9 ήταν θετικά. Οι απόγονοι των θετικών θηλυκών κρατήθηκαν όλοι μαζί και από εδώ και πέρα θα αποτελούν την τελική σειρά *sansim1*.
- Από τη σειρά *sansim13* δημιουργήθηκαν 10 ισομητρικές σειρές, από 10 τυχαία θηλυκά. Τα θηλυκά αφέθηκαν να γεννήσουν και μετά ελέγχθηκαν με PCR. Από τα 10 δείγματα και τα 10 ήταν θετικά. Οι απόγονοι των θετικών θηλυκών κρατήθηκαν όλοι μαζί και από εδώ και πέρα θα αποτελούν την τελική σειρά *sansim13*.
- Από τη σειρά *sansim31* δημιουργήθηκαν 9 ισομητρικές σειρές, από 9 τυχαία θηλυκά. Τα θηλυκά αφέθηκαν να γεννήσουν και μετά ελέγχθηκαν με PCR. Από τα 9 δείγματα και τα 9 ήταν θετικά. Οι απόγονοι των θετικών θηλυκών κρατήθηκαν όλοι μαζί και από εδώ και πέρα θα αποτελούν την τελική σειρά *sansim31*.

- Από τη σειρά *sansim41* δημιουργήθηκαν 10 ισομητρικές σειρές, από 10 τυχαία θηλυκά. Τα θηλυκά αφέθηκαν να γεννήσουν και μετά ελέγχθηκαν με PCR. Από τα 10 δείγματα και τα 10 ήταν θετικά. Οι απόγονοι των θετικών θηλυκών κρατήθηκαν όλοι μαζί και από εδώ και πέρα θα αποτελούν την τελική σειρά *sansim41*.

#### Σειρές *teisim*

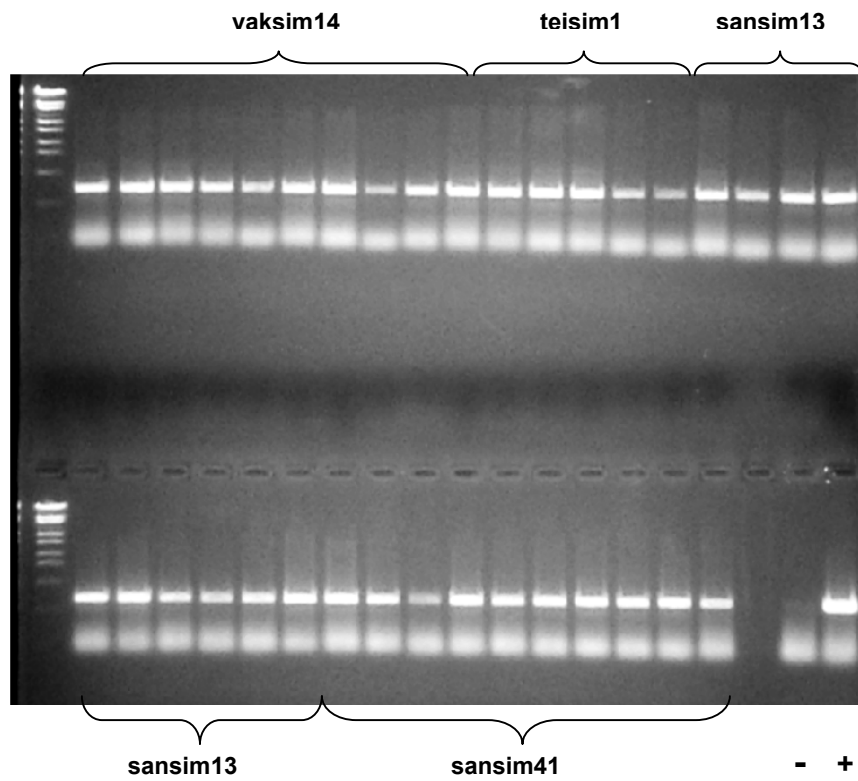
- Από τη σειρά *teisim1* δημιουργήθηκαν 5 ισομητρικές σειρές, από 5 τυχαία θηλυκά. Τα θηλυκά αφέθηκαν να γεννήσουν και μετά ελέγχθηκαν με PCR. Από τα 5 δείγματα και τα 5 ήταν θετικά. Οι απόγονοι των θετικών θηλυκών κρατήθηκαν όλοι μαζί και από εδώ και πέρα θα αποτελούν την τελική σειρά *teisim1*.
- Από τη σειρά *teisim2* δημιουργήθηκαν 10 ισομητρικές σειρές, από 10 τυχαία θηλυκά. Τα θηλυκά αφέθηκαν να γεννήσουν και μετά ελέγχθηκαν με PCR. Από τα 10 δείγματα και τα 10 ήταν θετικά. Οι απόγονοι των θετικών θηλυκών κρατήθηκαν όλοι μαζί και από εδώ και πέρα θα αποτελούν την τελική σειρά *teisim2*.
- Από τη σειρά *teisim4* δημιουργήθηκαν 10 ισομητρικές σειρές, από 10 τυχαία θηλυκά. Τα θηλυκά αφέθηκαν να γεννήσουν και μετά ελέγχθηκαν με PCR. Από τα 10 δείγματα και τα 10 ήταν θετικά. Οι απόγονοι των θετικών θηλυκών κρατήθηκαν όλοι μαζί και από εδώ και πέρα θα αποτελούν την τελική σειρά *teisim4*.
- Από τη σειρά *teisim5* δημιουργήθηκαν 7 ισομητρικές σειρές, από 7 τυχαία θηλυκά. Τα θηλυκά αφέθηκαν να γεννήσουν και μετά ελέγχθηκαν με PCR. Από τα δείγματα και τα 7 ήταν θετικά. Οι απόγονοι των θετικών θηλυκών κρατήθηκαν όλοι μαζί και από εδώ και πέρα θα αποτελούν την τελική σειρά *teisim5*.
- Από τη σειρά *teisim19* δημιουργήθηκαν 8 ισομητρικές σειρές, από 8 τυχαία θηλυκά. Τα θηλυκά αφέθηκαν να γεννήσουν και μετά ελέγχθηκαν με PCR. Από τα 8 δείγματα και τα 8 ήταν θετικά. Οι απόγονοι των θετικών θηλυκών κρατήθηκαν όλοι μαζί και από εδώ και πέρα θα αποτελούν την τελική σειρά *teisim19*.
- Από τη σειρά *teisim23* δημιουργήθηκαν 7 ισομητρικές σειρές, από 7 τυχαία θηλυκά. Τα θηλυκά αφέθηκαν να γεννήσουν και μετά ελέγχθηκαν με PCR. Από τα 7 δείγματα και τα 7 ήταν θετικά. Οι απόγονοι των θετικών θηλυκών κρατήθηκαν όλοι μαζί και από εδώ και πέρα θα αποτελούν την τελική σειρά *teisim23*.

Στις εικόνες 3.7, 3.8 και 3.9 απεικονίζονται οι έλεγχοι με PCR στην G<sub>4</sub> γενιά. Στον πίνακα 3.3 εμφανίζονται συνολικά τα αποτελέσματα της G<sub>4</sub> γενιάς.

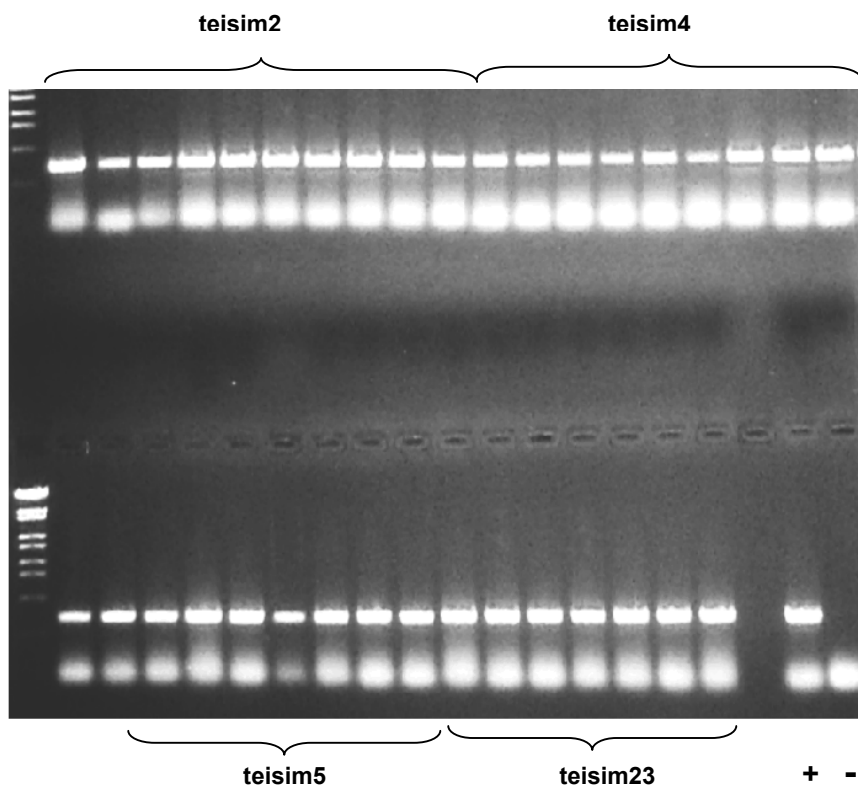


**ΕΙΚΟΝΑ 3.7 Έλεγχος των σειρών με PCR στην G<sub>4</sub> γενιά**





ΕΙΚΟΝΑ 3.8 Έλεγχος των σειρών με PCR στην G<sub>4</sub> γενιά



ΕΙΚΟΝΑ 3.9 Έλεγχος των σειρών με PCR στην G<sub>4</sub> γενιά

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.3

Αποτελέσματα μεταβίβασης του βακτηρίου στην γενιά G<sub>4</sub>.

ΣΕΙΡΑ	ΓΕΝΙΑ G <sub>4</sub>
	θετικά/σύνολο
yaksim 14	10/10
yaksim 18	9/10
sansim 1	9/9
sansim 13	10/10
sansim 31	9/9
sansim 41	10/10
teisim 1	5/5
teisim 2	10/10
teisim 4	10/10
teisim 5	7/7
teisim 19	8/8
teisim 23	7/7

### 3.2 Έλεγχος επαγωγής κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας

Λόγω του μεγάλου αριθμού στελεχών και επομένως μεγάλου όγκου πειραμάτων, για τα γενετικά πειράματα στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη *sansim1* και *sansim41* που προέρχονταν από την μόλυνση της *D. santomea* με σκοπό να βγάλουμε κάποια συμπεράσματα όσον αφορά στην πρόκληση της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας, σύμφωνα με το μοντέλο τροποποίησης-διάσωσης (*mod/resc*), μετά την προσθήκη του στελέχους του βακτηρίου *wSty* στη *D. simulans* 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 στελέχη 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 25 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 εμβρυϊκής θνησιμότητας και να πάρουμε έτσι αληθή τελικά αποτελέσματα.

Αναλυτικότερα, πραγματοποιήσαμε **22** διασταυρώσεις ανάμεσα στις σειρές ♀***STCP x sansim1***♂ και σε σύνολο 4090 εμβρύων, καταμετρήθηκαν 130 έμβρυα που δεν εκκολάφθηκαν, δηλαδή ένα ποσοστό 3,6%. Συγχρόνως πραγματοποιήσαμε **18** διασταυρώσεις ανάμεσα στις σειρές ♀***sansim1 x STCP***♂ και σε σύνολο 1691 εμβρύων, καταμετρήθηκαν 115 έμβρυα που δεν εκκολάφθηκαν, αριθμός που αναλογεί σε ποσοστό 7,9% των εμβρύων.

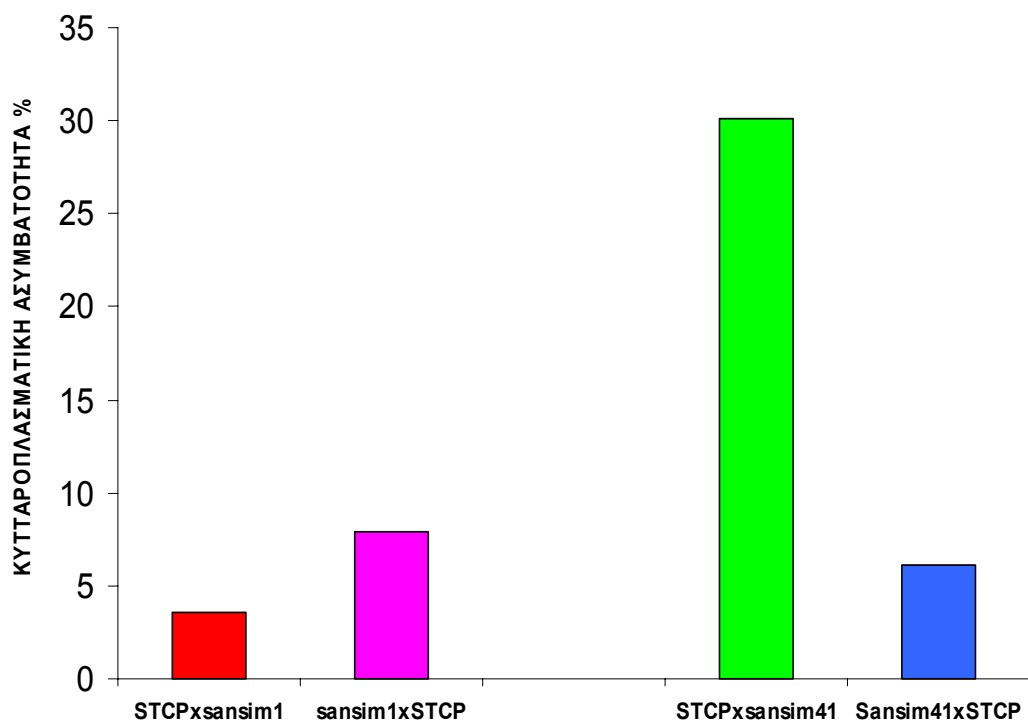
Επίσης, πραγματοποιήσαμε **26** διασταυρώσεις ανάμεσα στις σειρές ♀***STCP x sansim41***♂ και σε σύνολο 4107 εμβρύων, καταμετρήθηκαν 1234 έμβρυα που δεν εκκολάφθηκαν, δηλαδή ένα ποσοστό της τάξης του 30,1%. Από τις **16** διασταυρώσεις των σειρών ♀***sansim41 x STCP***♂ καταμετρήθηκαν 2328 έμβρυα, εκ των οποίων τα 151 δεν εκκολάφθηκαν, που αναλογούν σε ποσοστό 6,1% του συνόλου.

Στον πίνακα 3.4 και την εικόνα 3.10 φαίνονται αναλυτικότερα τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων για προσδιορισμό της *Wolbachia*-επαγόμενης κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.4**

**Κυτταροπλασματική ασυμβατότητα**

Διασταурωση ΘηλυκΟ x ΑρσενικΟ	Αριθμος διασταυρωσεων	ΑριθμΟς εμβρυων	ΑριθμΟς μη εκκολαΦΘΕΝΤΩΝ εμβρυων	% ΕμβρυικΗ θνησιμΟτητα± SE
1 <sup>ο</sup> στέλεχος				
<b>STCP x sansim1</b>	22	4090	130	<b>3,6 ± 0,75</b>
<b>sansim1 x STCP</b>	18	1691	115	<b>7,9 ± 3,13</b>
2 <sup>ο</sup> στέλεχος				
<b>STCP x sansim41</b>	26	4107	1234	<b>30,1 ± 6,55</b>
<b>sansim41 x STCP</b>	16	2328	151	<b>6,1 ± 2,23</b>



**ΕΙΚΟΝΑ 3.10** Παρουσίαση της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας που προκαλούν τα στελέχη (mod φαινότυπος)

### 3.3 Έλεγχος διάσωσης της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας

Για να ελέγξουμε εάν τα στελέχη *sansim1* και *sansim41* των εντόμων διασώζουν την κυτταροπλασματική ασυμβατότητα που προκαλεί το wRi στέλεχος (**resc function**), διασταυρώσαμε αρσενικά άτομα DSR που ήταν μολυσμένα με το στέλεχος wRi του βακτηρίου με θηλυκά από τις σειρές *sansim1* και *sansim41*. Συγχρόνως πραγματοποιήσαμε και την αντίστροφη διασταύρωση για να δούμε τα φυσιολογικά ποσοστά της εμβρυϊκής θνησιμότητας.

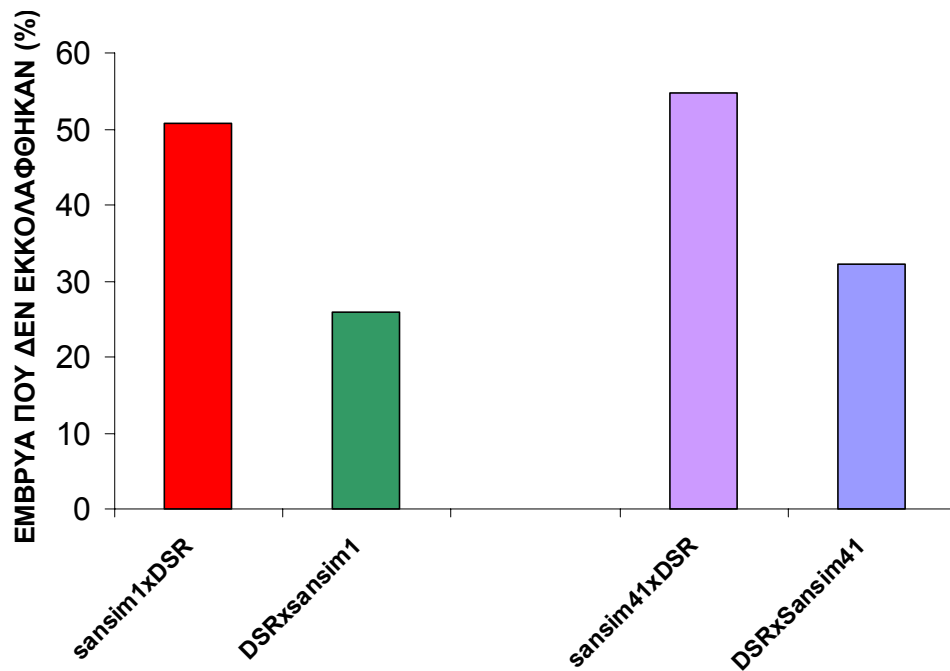
Πραγματοποιήσαμε **19** διασταυρώσεις ανάμεσα στις σειρές ♀ ***sansim1 x DSR*** ♂ και σε σύνολο 2092 εμβρύων καταμετρήθηκαν 1119 έμβρυα που δεν εκκολάφθηκαν, που αναλογεί στο 50,7% του συνόλου των εμβρύων. Ανάμεσα στις σειρές ♀ ***DSR x sansim1*** ♂ πραγματοποιήσαμε **23** διασταυρώσεις. Καταμετρήθηκαν 2685 έμβρυα, από τα οποία δεν εκκολάφθηκαν τα 652, δηλαδή ένα ποσοστό της τάξης του 25,9%.

Ακόμα, πραγματοποιήσαμε **19** διασταυρώσεις ανάμεσα στις σειρές ♀ ***sansim41 x DSR*** ♂ στις οποίες καταμετρήθηκαν συνολικά 2269 έμβρυα από τα οποία τα 1183 είναι έμβρυα που δεν εκκολάφθηκαν, δηλαδή ένα ποσοστό 54,7%. Συγχρόνως, ανάμεσα στις σειρές ♀ ***DSR x sansim41*** ♂ πραγματοποιήσαμε **23** διασταυρώσεις. Σ' αυτές καταμετρήθηκαν 3346 έμβρυα, δεν εκκολάφθηκαν τα 1039, δηλαδή ένα ποσοστό της τάξης του 32,2%.

Στον πίνακα 3.5 και την εικόνα 3.11 φαίνονται αναλυτικότερα τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων για τον προσδιορισμό της ικανότητας διάσωσης της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.5** Διάσωση της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας

Διασταύρωση Θηλυκο x Αρσενικο	ΑριθμΟς διασταυΡΩσεων	ΑριθμΟς εμβρυων	ΑριθμΟς μη εκκολαΦΘΕΝΤΩΝ εμβρυων	% ΕμβρυικΗ θνησιμΟτητα ± SE
1 <sup>ο</sup> στέλεχος				
<b>sansim1 x DSR</b>	19	2092	1119	<b>50,7 ± 3,33</b>
<b>DSR x sansim1</b>	23	2685	652	<b>25,9 ± 2,27</b>
2 <sup>ο</sup> στέλεχος				
<b>sansim41 x DSR</b>	19	2269	1183	<b>54,7 ± 2,84</b>
<b>DSR x sansim41</b>	23	3346	1039	<b>32,2 ± 3,54</b>



**ΕΙΚΟΝΑ 3.11** Παρουσίαση της διάσωσης της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας από τα στελέχη (resc φαινότυπος)

Με σκοπό να ελαχιστοποιηθεί ο θόρυβος από την εμβρυϊκή θνησιμότητα των διασταυρώσεων που δεν σχετίζεται με την κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (cytoplasmic incompatibility, CI), τα επίπεδα της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας υπολογίζονται ως εξής: Χρησιμοποιώντας τις μετρήσεις από τις αντίστροφες (reciprocal) διασταυρώσεις προκύπτει ο δείκτης CCM (Compatible Cross Mortality), ο οποίος δείχνει τη θνησιμότητα στις διασταυρώσεις αυτές (Poinsot *et al.* 1998). Η διορθωμένη έκφραση του CI ( $CI_{corr}$ ) είναι ο αριθμός των εμβρύων που δεν εκκολάπτονται, ανάμεσα σε αυτά που θα είχαν επιζήσει απουσία CI. Άρα:

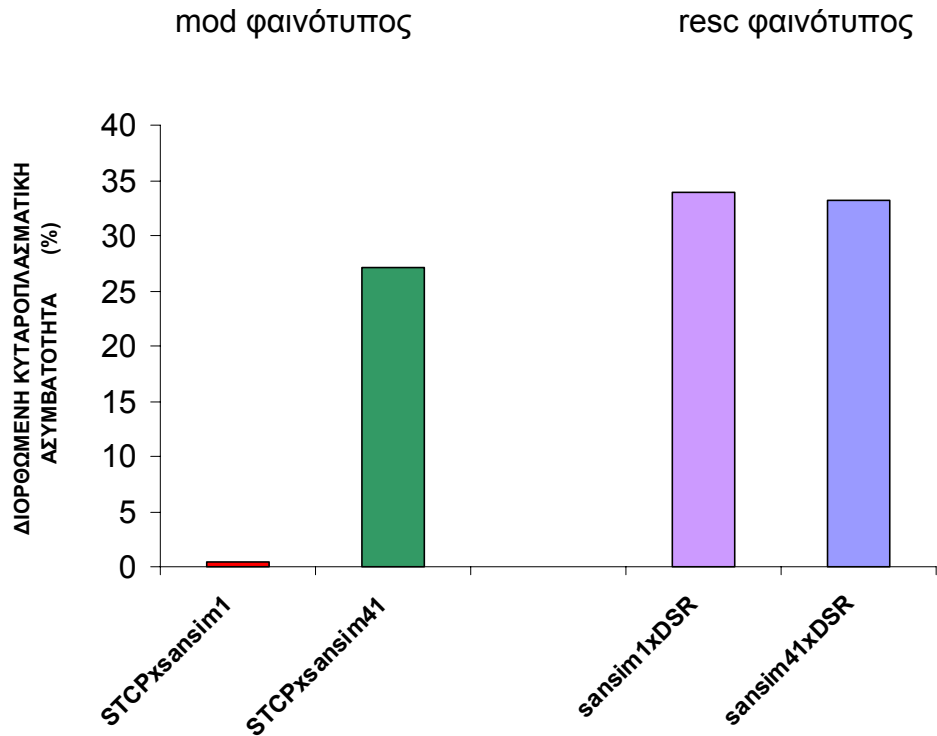
$$CI_{corr}(\%) = [(CI_{obs} - CCM) / (100 - CCM)] \times 100,$$

όπου  $CI_{obs}$  είναι το ποσοστό των μη εκκολαφθέντων αυγών στην ασύμβατη διασταύρωση.

Στον πίνακα 3.6 και την εικόνα 3.12 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των διασταυρώσεων μετά τη διόρθωσή τους.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.6** Κυτταροπλασματική ασυμβατότητα και διάσωση κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας μετά από διόρθωση

Διασταύρωση Θηλυκό x Αρσενικό	Αριθμός διασταυρώσεων	Αριθμός εμβρύων	Αριθμός μη εκκολαφθέντων εμβρύων	% κυτταροπλασματική ασυμβατότητα ± SE ( $CI_{corr} \pm SE_{corr}$ )
<b>Mod φαινότυπος</b>				
STCP x sansim1	<b>22</b>	<b>4090</b>	<b>130</b>	0,40 ± 0,40
STCP x sansim41	<b>26</b>	<b>4107</b>	<b>1234</b>	27,10 ± 6,72
<b>Resc φαινότυπος</b>				
sansim1 x DSR	<b>19</b>	<b>2092</b>	<b>1119</b>	33,87 ± 4,30
sansim41 x DSR	<b>19</b>	<b>2269</b>	<b>1183</b>	33,16 ± 4,20



**ΕΙΚΟΝΑ 3.12** Κυτταροπλασματική ασυμβατότητα και διάσωση κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας μετά από διόρθωση

Τέλος, ελέγξαμε την ενδογενή στειρότητα των στελεχών. Πραγματοποιήσαμε διασταυρώσεις μεταξύ των ατόμων της ίδιας σειράς εντόμων καθώς και όλων των στελεχών που χρησιμοποιήσαμε σε αυτή την εργασία. Αναλυτικότερα, πραγματοποιήσαμε 14 διασταυρώσεις μεταξύ των ατόμων της σειράς *sansim1* (♀*sansim1* x *sansim1*♂) όπου το ποσοστό των μη εκκολαφθέντων εμβρύων ανερχόταν στο 10,2%. Επίσης, έγιναν 16 διασταυρώσεις ♀*sansim41* x *sansim41*♂ και το ποσοστό μη εκκολαφθέντων εμβρύων ήταν 12,1%. Οι 19 διασταυρώσεις ♀*DSR* x *DSR*♂ έδωσαν ένα ποσοστό της τάξης του 39,6%. Τέλος, πραγματοποιήσαμε 24 διασταυρώσεις ♀*STCP* x *STCP*♂ και πήραμε ένα ποσοστό 16% μη εκκολαφθέντων εμβρύων (Πιν. 3.7).



**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.7** Ενδογενής θνησιμότητα στα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν.

<b>Διασταύρωση Θηλυκό x Αρσενικό</b>	<b>Αριθμός διασταυρώσεων</b>	<b>% ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ ΣΤΕΙΡΟΤΗΤΑ ± SE</b>
<b>sansim1 x sansim1</b>	14	<b>10,2 ± 6,28</b>
<b>sansim41 x sansim41</b>	16	<b>12,1 ± 4,1</b>
<b>DSR x DSR</b>	19	<b>39,6 ± 2,75</b>
<b>STCP x STCP</b>	24	<b>16 ± 3,02</b>

## 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μεταφέραμε με την μέθοδο της μεταφοράς κυτταροπλάσματος τρία στελέχη του βακτηρίου *Wolbachia* από τους φυσικούς τους ξενιστές (*D. santomea*, *D. teissieri* και *D. yakuba*) σε ένα νέο είδος την *D. simulans*. Η μεταφορά του βακτηρίου ήταν επιτυχής και καταφέραμε να δημιουργήσουμε σειρές μολυσμένων εντόμων. Η μόλυνση των σειρών σταθεροποιήθηκε μετά από τέσσερις γενιές και είχε μεταβίβαση από γενιά σε γενιά 100%. Δημιουργήθηκαν δύο νέες τεχνητά μολυσμένες σειρές *D. simulans* που έφεραν το βακτηριακό στέλεχος *wSty*, το οποίο προέρχονταν από φυσικά μολυσμένα άτομα του είδους *D. yakuba*. Δημιουργήθηκαν τέσσερις νέες τεχνητά μολυσμένες σειρές *D. simulans* που έφεραν το βακτηριακό στέλεχος *wSty*, το οποίο προέρχονταν από φυσικά μολυσμένα άτομα του είδους *D. santomea*. Επίσης δημιουργήθηκαν έξι νέες τεχνητά μολυσμένες σειρές *D. simulans* που έφεραν το βακτηριακό στέλεχος *wSty*, το οποίο προέρχονταν από φυσικά μολυσμένα άτομα του είδους *D. teissieri*.

Επιλέξαμε τις δύο από τις τέσσερις τεχνητά μολυσμένες σειρές της *D. simulans* που έφεραν το βακτηριακό στέλεχος *wSty* του είδους *D. santomea* (*sansim*) για να τις μελετήσουμε γενετικά. 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 του μολυσμένου στελέχους της *D. simulans* με το βακτηριακό στέλεχος *wRi*. Το συγκεκριμένο στέλεχος το επιλέξαμε γιατί είναι το στέλεχος που προκαλεί τα υψηλότερα επίπεδα κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας στο είδος *D. simulans*.

Τα αποτελέσματα, όσον αφορά την ικανότητα πρόκλησης κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας μεταξύ των δύο σειρών δεν ήταν ίδια. Η πρώτη σειρά μολυσμένων εντόμων (*sansim1*) φαίνεται να μην έχει την ικανότητα να προκαλεί

κυτταροπλασματική ασυμβατότητα, ενώ η δεύτερη σειρά μολυσμένων εντόμων (*sansim41*) φαίνεται να προκαλεί μετρίου επιπέδου κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (Πιν. 3.6 *sansim1*  $0,40 \pm 0,40$  και *sansim41*  $27,10 \pm 6,72$ ). Τα αποτελέσματά μας, μάς οδηγούν να χαρακτηρίσουμε το βακτηριακό στέλεχος *wSty* ως στέλεχος που έχει την ικανότητα της τροποποίησης ( $\text{mod}^+$ ), αν και σε χαμηλά επίπεδα. 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). Η επίδραση του ξενιστή θα μπορούσε να δικαιολογήσει και την διαφορά που παρατηρήθηκε ανάμεσα στις δύο σειρές εντόμων.

Τα αποτελέσματα που αφορούν τη διάσωση της τροποποίησης που προκαλεί το *wRi* στέλεχος δείχνουν ότι και οι δύο σειρές εντόμων έχουν την ικανότητα να διασώζουν αυτή την τροποποίηση αλλά όχι πλήρως (Πιν 3.6 *sansim1*  $33,78 \pm 4,30$  και *sansim41*  $33,16 \pm 4,20$ ). Τα αποτελέσματά μας, μάς οδηγούν να χαρακτηρίσουμε το βακτηριακό στέλεχος *wSty* ως στέλεχος ικανό να διασώζει ( $\text{resc}^+$ ). Η έκφραση της ικανότητας αυτής σχετίζεται επίσης με τον ξενιστή, γιατί στον φυσικό του ξενιστή είχε την ικανότητα να διασώζει πλήρως το στέλεχος *wRi* (Zabalou *et al.* 2003).

Το *wSty* στέλεχος του βακτηρίου *Wolbachia* βάσει της αλληλουχίας του γονιδίου *wsp* (*Wolbachia* surface protein) είναι ίδιο με το στέλεχος *wAu* της *D. simulans*. Το στέλεχος *wAu* είναι ένα χαρακτηρισμένο γενετικά στέλεχος ( $\text{mod}^-$ ), το οποίο δεν προκαλεί κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (CI). Το ίδιο είναι γνωστό ότι συμβαίνει και με το *wSty* της *D. santomea* στον φυσικό του ξενιστή. Το ερώτημα που υπήρχε ήταν εάν αυτό συμβαίνει επειδή το *wSty* δεν είναι ικανό να επάγει τη λειτουργία της τροποποίησης ή επειδή ο φυσικός του ξενιστής έχει την ικανότητα να το καταστέλλει ειδικά. Όπως φάνηκε όμως όταν το στέλεχος *wRi* ( $\text{mod}^+$ ) μεταφέρθηκε στην *D. santomea* εξακολουθούσε να επάγει τη λειτουργία της τροποποίησης ( $\text{mod}^+$ ), που σημαίνει πως ο φυσικός του ξενιστής είναι επιδεκτικός στην τροποποίηση άλλων στελεχών (Zabalou *et al.* 2003). Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν στην υπόθεση ότι τα *wSty* και *wAu* ανήκουν στην ίδια κατηγορία στελεχών. Το *wSty* όμως διασώζει πλήρως την τροποποίηση που προκαλεί το *wRi* ( $\text{resc}^+$ ), ενώ το *wAu* όχι ( $\text{resc}^-$ ). 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 στην *D. santomea*;

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 σχέσεων *Drosophila-Wolbachia*: 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 μολυσμένη με *wSty*, *D. santomea* ανήκει 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 ( $mod^+$  φαινότυπος), 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 στην *D. santomea* οφείλεται στην καταστολή που δέχεται από τον ξενιστή 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 ως  $mod^+/resc^+$  στέλεχος, ενώ στο νέο του ξενιστή συμπεριφέρεται ως  $mod^+/resc^+$ . Η αλλαγή σχετίζεται με την επίδραση του ξενιστή. Το στέλεχος *wSty* είναι ένα  $mod^+/resc^+$  που

καταστέλλεται ειδικά στον φυσικό του ξενιστή *D. santomea*. Η *D. simulans* φαίνεται να είναι περισσότερο επιδεκτική ως προς την έκφραση της τροποποίησης του αν και το συγκεκριμένο στέλεχος δεν φαίνεται να είναι ένα ισχυρό  $\text{mod}^+$  στέλεχος.

Ακόμη το *wSty* δεν διαφέρει από το *wAu* ως προς την αλληλουχία του γονιδίου *wsp*, αλλά φαίνεται να διαφέρει ως προς τα γονίδια που σχετίζονται με την ικανότητα τροποποίησης και διάσωσης της τροποποίησης.

Το γεγονός ότι το *wSty* της *D. santomea* είναι ένα  $\text{mod}^+/\text{resc}^+$  στέλεχος το οποίο εκφράζει την τροποποίηση ή τη διάσωση της τροποποίησης άλλων στελεχών σε σχέση με το γονιδίωμα του ξενιστή στον οποίο βρίσκεται επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα που πήρε από ανάλογα πειράμα με δυο στελέχη *D. simulans* μολυσμένα με το στέλεχος *wSty* που προέρχονταν από την *D. Teissieri*, η Lydie Morel (φοιτήτρια που έκανε την πτυχιακή της στην χώρα μας μέσω των προγραμμάτων Erasmus). Μετά την μεταφορά του *wSty* από την *D. teissieri* στη *D. simulans* το βακτήριο φάνηκε πάλι να είναι ένα  $\text{mod}^+/\text{resc}^+$  στέλεχος και μάλιστα με υψηλότερες ικανότητες τροποποίησης από το στέλεχος της *D. santomea* που μελετήσαμε εμείς.

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

- Andersson, S. G., A. Zomorodipour, J. O. Andersson, T. Sicheritz-Ponten, U. C. Alsmark, R. M. Podowski, A. K. Naslund, A. S. Eriksson, H. H. Winkler, and C. G. Kurland. 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396: 133-40.
- Ashburner, M., M.A. Hoy and J.J. Peloquin. 1998. Prospects for the genetic transformation of arthropods. *Insect Molecular Biology* 7: 201-213.
- Arakaki, N., T. Miyoshi, and H. Noda. 2001. Wolbachia-mediated parthenogenesis in the predatory thrips *Franklinothrips vespiformis* (Thysanoptera: Insecta). *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 268: 1011-6.
- Bandi, C., T. J. Anderson, C. Genchi, and M. L. Blaxter. 1998. Phylogeny of Wolbachia in filarial nematodes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 265: 2407-13.
- Bandi, C., M. Sironi, C.A. Nalepa, S. Corona and L. Sacchi. 1997. Phylogenetically distant intracellular symbionts in termites. *Parassitologia* 39: 71-75.
- Bandi, C., J. W. McCall, C. Genchi, S. Corona, L. Venco, and L. Sacchi. 1999a. Effects of tetracycline on the filarial worms *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* and their bacterial endosymbionts Wolbachia. *Int J Parasitol* 29: 357-64.
- Bandi, C., B. Slatko, and S. L. O'Neill. 1999b. Wolbachia genomes and the many faces of symbiosis. *Parasitol Today* 15: 428-9.
- Beard, C. B., S.L. O'Neill, R.B. Tesh, F.F. Richards and S. Aksoy. 1993. Modification of arthropod vector competence via symbiotic bacteria. *Parasitology Today* 9: 179-183.
- Binnington, K. C. and A. A. Hoffmann. 1989. Wolbachia-like organisms and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. *Journal of Invertebrate Pathology* 54: 344-352.
- Bordenstein, S. R., F. P. O'Hara, and J. H. Werren. 2001. Wolbachia-induced incompatibility precedes other hybrid incompatibilities in *Nasonia*. *Nature* 409: 707-10.
- Bordenstein, S. R. and J. H. Werren. 1998. Effects of A and B Wolbachia and host genotype on interspecies cytoplasmic incompatibility in *Nasonia*. *Genetics* 148: 1833-1844.
- 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., A. Nirgianaki, G. Markakis, and C. Savakis. 1996. Wolbachia infection and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* species. *Genetics* 144: 1063-73.
- 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 H.R. Braig 1999. The many faces of *Wolbachia*. In: D. Raoult, P. Brouqui, eds. *Rickettsiae and Rickettsial diseases at the turn of the third millennium*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 199-219.
- Bourtzis, K., A. Nirgianaki, P. Onyango and C. Savvakis, 1994. A prokaryotic dnaA sequence in *Drosophila melanogaster*: Wolbachia infection and cytoplasmic incompatibility among laboratory strains. *Insect Mol Biol* 3: 131-142.
- 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.
- 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.
- Breeuwer, J. A. J., R. Stouthamer, S.M. Barns, D.A. Pelletier, W.G. Weisburg and J.H. Werren. 1992. Phylogeny of cytoplasmic incompatibility microorganisms in the parasitoid wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera: *Pteromalidae*) based on 16S ribosomal DNA sequences. *Insect Molecular Biology* 1: 25-36.
- Breeuwer, J. A. J., and J.H. Werren. 1993. Cytoplasmic incompatibility and bacterial density in *Nasonia vitripennis*. *Genetics* 135: 565-574.
- Breeuwer, J. A. J. 1997. Wolbachia and cytoplasmic incompatibility in the spider mites *Tetranychus urticae* and *T. turkestanii*. *Heredity* 78: 41-47.
- 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.
- Brower, J. H. 1976. Cytoplasmic incompatibility: Occurrence in a stored-product pest *Ephesia cautella*. *Annals of the Entomological Society of America* 69: 1011-1015.
- 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.

- Casiraghi, M., T. J. Anderson, C. Bandi, C. Bazzocchi, and C. Genchi. 2001. A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts. *Parasitology* 122 Pt 1: 93-103.
- Caspari, E. and G. S. Watson. 1959. On the evolutionary importance of cytoplasmic sterility in mosquitoes. *Evolution* 13: 568-570.
- Charlat, S., C. Calmet, and H. Mercot. 2001. On the mod resc model and the evolution of *Wolbachia* compatibility types. *Genetics* 159: 1415-22.
- 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.
- Clancy, D. J., and A.A. Hoffmann. 1998. Environmental effects on cytoplasmic incompatibility and bacterial load in *Wolbachia*-infected *Drosophila simulans*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 86: 13-24.
- Curtis, C. F., and S.P. Sinkins. 1998. *Wolbachia* as a possible means of driving genes into populations. *Parasitology* 116: S111-S115.
- Dedeine, F., F. Vavre, F. Fleury, B. Loppin, M. E. Hochberg, and M. Bouletreau. 2001. Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6247-52.
- Dobson, S., K. Bourtzis, H.R. Braig, B.F. Jones, W. Zhou, F. Rousset and S.L. O'Neill. 1999. *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. *Insect Biochemistry Molecular Biology* 29: 153-160.
- Dobson, S. L., E. J. Marsland, and W. Rattanadechakul. 2002. Mutualistic *Wolbachia* Infection in *Aedes albopictus*. Accelerating cytoplasmic drive. *Genetics* 160: 1087-94.
- Dyson, E. A., M. K. Kamath, and G. D. Hurst. 2002. *Wolbachia* infection associated with all-female broods in *Hypolimnas bolina* (Lepidoptera: Nymphalidae): evidence for horizontal transmission of a butterfly male killer. *Heredity* 88: 166-71.
- Fujii, Y., D. Kageyama, S. Hoshizaki, H. Ishikawa, and T. Sasaki. 2001. Transfection of *Wolbachia* in Lepidoptera: the feminizer of the adzuki bean borer *Ostrinia scapulalis* causes male killing in the Mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 268: 855-9.
- Ghelelovitch, S. 1952. Sur la determinisme genetique de la sterilité dans le croisement entre différentes souches de *Culex autogenicus* Roubaud. *C. R. Acad. Sci. Paris* 24: 2386-88.
- Giordano, R., J.J. Jackson and H.M. Robertson. 1997. The role of *Wolbachia* bacteria in reproductive incompatibilities and hybrid zones of *Diabrotica* beetles and *Gryllus* crickets. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 11439-11444.



- 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.
- Hoerauf, A., K. Nissen-Pahle, C. Schmetz, K. Henkle-Duhrsen, M. L. Blaxter, D. W. Buttner, M. Y. Gallin, K. M. Al-Qaoud, R. Lucius, and B. Fleischer. 1999. Tetracycline therapy targets intracellular bacteria in the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis* and results in filarial infertility. *J Clin Invest* 103: 11-8.
- Hoffmann A. A., 1988. Partial cytoplasmic incompatibility between two Australian populations of *Drosophila melanogaster*. *Entomol. Exp. Appl.* 48: 61-67.
- 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.
- Hoffman, A. A., D. J. Clancy and E. Merton. 1994. Cytoplasmic incompatibility in Australian populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 136: 993-999.
- Hoffmann, A. A., M. Turelli and G.M. Simmons. 1986. Unidirectional incompatibility between populations of *Drosophila simulans*. *Evolution* 40: 692-701.
- Holden, P. R., P. Jones and J. F. Brookfield. 1993. Evidence for a *Wolbachia* symbiont in *Drosophila melanogaster*. *Genet Res* 62: 23-9.
- Hoshizaki, S., and T. Shimada. 1995. PCR-based detection of *Wolbachia*, cytoplasmic incompatibility microorganisms, infected in natural populations of *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae) in central Japan: has the distribution of *Wolbachia* spread recently? *Insect Molecular Biology* 4: 237-243.
- Huigens, M. E., R. F. Luck, R. H. Klaassen, M. F. Maas, M. J. Timmermans, and R. Stouthamer. 2000. Infectious parthenogenesis. *Nature* 405: 178-9.
- Hurst, G. D., A. P. Johnson, J. H. Schulenburg, and Y. Fuyama. 2000. Male-killing *Wolbachia* in *Drosophila*: a temperature-sensitive trait with a threshold bacterial density. *Genetics* 156: 699-709.
- Hurst, L. D. 1993. The incidences, mechanisms and evolution of cytoplasmic sex ratio distorters in animals. *Biol. Rev.* 68: 121-98.
- James, A. C., and J. W. Ballard. 2000. Expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans* and its impact on infection frequencies and distribution of *Wolbachia pipientis*. *Evolution* 54: 1661-72.
- Jeyaprakash, A., and M. A. Hoy. 2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Mol Biol* 9: 393-405.

- Kamoda, S., S. Masui, H. Ishikawa and T. Sasaki. 2000. *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility in the cricket *Teleogryllus taiwanemma*. *The Journal of Experimental Biology* 203: 2503-2509.
- 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.
- Lachaise D., P. Capi 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.
- Laven, H. 1967. Eradication of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmic incompatibility. *Nature* 216: 383-384.
- Legrand, J. J., E. Legrand-Hamelin, and P. Juchault. 1987. Sex determination in *Crustacea*. *Biol. Rev.* 62: 439-70.
- Lo, N., M. Casiraghi, E. Salati, C. Bazzocchi, and C. Bandi. 2002. How many *wolbachia* supergroups exist? *Mol Biol Evol* 19: 341-6.
- 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.
- Majerus, M. E. N., J.H. Graf von der Schulenburg and I.A. Zakharov. 2000. Multiple causes of male-killing in a single sample of the two-spot ladybird, *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) from Moscow. *Heredity* 84: 605-609.
- Mercot, H., and D. Poinot. 1998. Rescuing *Wolbachia* have been overlooked and discovered on Mount Kilimanjaro. *Nature* 391: 853.
- 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.
- Min, K. T., and S. Benzer. 1997. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10792-6.

- Moret, Y., P. Juchault, and T. Rigaud. 2001. *Wolbachia* endosymbiont responsible for cytoplasmic incompatibility in a terrestrial crustacean: effects in natural and foreign hosts. *Heredity* 86: 325-32.
- Oh, H. W., M. G. Kim, S. W. Shin, K. S. Bae, Y. J. Ahn, and H. Y. Park. 2000. Ultrastructural and molecular identification of a *Wolbachia* endosymbiont in a spider, *Nephila clavata*. *Insect Mol Biol* 9: 539-43.
- O'Neill, S. L., R. Giordano, A. M. Colbert, T. L. Karr, and H. M. Robertson. 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 2699-702.
- O'Neill, S. L., M. M. Pettigrew, S. P. Sinkins, H. R. Braig, T. G. Andreadis, and R. B. Tesh. 1997. In vitro cultivation of *Wolbachia pipientis* in an *Aedes albopictus* cell line. *Insect Mol Biol* 6: 33-9.
- O'Neill, S. L. and T. L. Karr. 1990. Bidirectional incompatibility between conspecific populations of *Drosophila simulans*. *Nature* 348: 178-180.
- Perrot-Minnot, M. J., L.R. Guo and J.H. Werren. 1996. Single and double infections with *Wolbachia* in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*: effects on compatibility. *Genetics* 143: 961-972.
- 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.
- Poinsot, D. and H. Mercot. 1999. *Wolbachia* can rescue from cytoplasmic incompatibility while being unable to induce it. In: E. Wagner et al., ed. *From Symbiosis to Eukaryotism - Endocytobiology VII*. Universities of Geneva and Freiburg im Breisgau.
- Reed, K. M. a. J. H. Werren. 1995. Induction of paternal genome loss by the paternal-sex-ratio chromosome and cytoplasmic incompatibility bacteria (*Wolbachia*): A comparative study of early embryonic events. *Molecular Reproduction and Development* 40: 408-418.
- Rigaud, T. and P. Juchault. 1995. Success and failure of horizontal transfers of feminizing *Wolbachia* endosymbionts in woodlice. *Journal of Evolutionary Biology* 8: 249-255.
- Rousset, F., H. R. Braig and S. L. O' Neill. 1999. A stable triple *Wolbachia* infection in *Drosophila* with nearly additive incompatibility effects. *Heredity* 82: 620-627.
- Rousset, F., D. Bouchon, B. Pintureau, P. Juchault and M. Solignac. 1992. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proceedings of Royal Society of London Biological Series* 250: 91-98.
- Rousset, F., and E. de Stordeur. 1994. Properties of *Drosophila simulans* strains experimentally infected by different clones of the bacterium *Wolbachia*. *Heredity* 72: 325-31.
- Rousset, F., D. Vautrin and M. Solignac. 1992. Molecular identification of *Wolbachia*, the agent of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*, and variability in relation with host mitochondrial types. *Proc R Soc London B* 247: 163-168.

- Rousset, F., and M. Solignac. 1995. Evolution of single and double *Wolbachia* symbioses during speciation in the *Drosophila simulans* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 6389-93.
- Sasaki, T. and H. Ishikawa. 2000. Transinfection of *Wolbachia* in the mediterranean flour moth, *Ephesia kuehniella*, by embryonic microinjection. *Heredity* 85: 130-135.
- Saint Andre, A., N. M. Blackwell, L. R. Hall, A. Hoerauf, N. W. Brattig, L. Volkmann, M. J. Taylor, L. Ford, A. G. Hise, J. H. Lass, E. Diaconu, and E. Pearlman. 2002. The role of endosymbiotic *Wolbachia* bacteria in the pathogenesis of river blindness. *Science* 295: 1892-5.
- Schulenburg, J. H., G. D. Hurst, T. M. Huigens, M. M. van Meer, F. M. Jiggins, and M. E. Majerus. 2000. Molecular evolution and phylogenetic utility of *Wolbachia* *ftsZ* and *wsp* gene sequences with special reference to the origin of male-killing. *Mol Biol Evol* 17: 584-600.
- Shigenobu, S., H. Watanabe, M. Hattori, Y. Sakaki, and H. Ishikawa. 2000. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. *Nature* 407: 81-6.
- Shoemaker, D. D., V. Katju and J. Jaenike. 1999. *Wolbachia* and the evolution of reproductive isolation between *Drosophila recens* and *Drosophila subquinaria*. *Evolution* 53: 1157-1164.
- Sinkins, S. P., H.R. Braig and S.L. O'Neill. 1995. *Wolbachia* superinfections and the expression of cytoplasmic incompatibility. *Proceedings of Royal Society of London Biological Series* 261: 325-330.
- Sinkins, S. P., C.F. Curtis and S.L. O'Neill. 1997. The potential application of inherited symbiont systems to pest control. Pages 155-175 in S. L. O'Neill, A.A. Hoffmann and J.H. Werren, ed. *Influential passengers*. Oxford University Press, Oxford.
- Snook, R. R., S. Y. Cleland, M. F. Wolfner, and T. L. Karr. 2000. Offsetting effects of *Wolbachia* infection and heat shock on sperm production in *Drosophila simulans*: analyses of fecundity, fertility and accessory gland proteins. *Genetics* 155: 167-78.
- Solignac, M., D. Vautrin and F. Rousset. 1994. Widespread occurrence of the proteobacteria *Wolbachia* and partial cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster*. *C. R. Acad. Sci. Paris* 317:461-470.
- Stevens, L., L. Giordano, and R. Fialho. 2001. Male-killing, nematode infections, bacteriophage infection, and virulence of cytoplasmic bacteria in the genus *Wolbachia*. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 32: 519-545.
- Stouthamer, R. 1997. *Wolbachia*-induced parthenogenesis. Pages 102-124 in S. L. O'Neill, A.A. Hoffmann and J.H. Werren, ed. *Influential passengers*. Oxford University Press, Oxford.
- Stouthamer, R., J. A. Breeuwer, and G. D. Hurst. 1999. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu Rev Microbiol* 53: 71-102.
- 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.

- Stouthamer, R., R.F. Luck and W.D. Hamilton. 1990. Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera/Trichogrammatidae) to revert to sex. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87: 2424-2427.
- Stouthamer, R. and D. J. Kazmer. 1994. Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. *Heredity* 73: 317-327.
- Taylor, M. J., and A. Hoerauf. 1999. *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes. *Parasitol Today* 15: 437-42.
- Tram, U., and W. Sullivan. 2002. Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. *Science* 296: 1124-6.
- Turelli, M. 1994. Evolution of incompatibility-inducing microbes and their hosts. *Evolution* 48: 1500-1513.
- Turelli, M., and A.A. Hoffmann. 1991. Rapid spread of an inherited incompatibility factor in California *Drosophila*. *Nature* 353: 440-442.
- Turelli, M., and A.A. Hoffmann. 1999. Microbe-induced cytoplasmic incompatibility as a mechanism for introducing transgenes into arthropod populations. *Insect Molecular Biology* 8: 243-255.
- Vala, F., J.A.J. Breeuwer and M.W. Sabelis. 2000. *Wolbachia*-induced 'hybrid breakdown' in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch. *Proceedings of Royal Society of London Biological Series* 267: 1931-1937.
- Van Meer, M. M., J. Witteveldt, and R. Stouthamer. 1999. Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on the *wsp* gene. *Insect Mol Biol* 8: 399-408.
- van Opijnen, T., and J. A. Breeuwer. 1999. High temperatures eliminate *Wolbachia*, a cytoplasmic incompatibility inducing endosymbiont, from the two-spotted spider mite. *Exp Appl Acarol* 23: 871-81.
- Vandekerckhove, T. T., S. Watteyne, A. Willems, J. G. Swings, J. Mertens, and M. Gillis. 1999. Phylogenetic analysis of the 16S rDNA of the cytoplasmic bacterium *Wolbachia* from the novel host *Folsomia candida* (Hexapoda, Collembola) and its implications for wolbachial taxonomy. *FEMS Microbiol Lett* 180: 279-86.
- Vavre, F., F. Fleury, J. Varaldi, P. Fouillet and M. Bouletreau. 2000. Evidence for female mortality in *Wolbachia*-mediated cytoplasmic incompatibility in haplodiploid insects: epidemiologic and evolutionary consequences. *Evolution* 54: 191-200.
- 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* (in press).
- Veneti, Z. 2003. Cytoplasmic Incompatibility: a comparative study of *Wolbachia* strains in *Drosophila*. *Ph. D. Thesis*
- Wade, M. J., and L. Stevens. 1985. Microorganism mediated reproductive isolation in flour beetles (Genus *Tribolium*). *Science* 277: 527-528.
- Weeks, A. R., and J. A. Breeuwer. 2001. *Wolbachia*-induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 268: 2245-51.

- 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 pipkins*. *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 wRi modification. *Genetics* In press.
- Zchori-Fein, E., R.T. Roush and D. Rosen. 1998. Distribution of parthenogenesis-inducing symbionts in ovaries and eggs of *Aphytis* (Hymenoptera: *Aphenilidae*). *Current Microbiology* 36: 1-8.
- 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.