



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Λειτουργική ανάλυση γονιδίων που εμπλέκονται στην απόκριση της μεσογειακής μύγας με το συμβιωτικό βακτήριο *Wolbachia*»

Φοιτητής: Βαζαίος Κωνσταντίνος

Ακαδημαϊκό Έτος:

2014-2015

Λάρισα

[Πληκτρολογήστε κείμενο]

Λειτουργική ανάλυση γονιδίων που εμπλέκονται στην απόκριση της μεσογειακής
μύγας με το συμβιωτικό βακτήριο *Wolbachia*.

Functional analysis of genes involved in the response of Mediterranean fruit fly with
its symbiotic bacterium *Wolbachia*.

Τριμελής Επιτροπή

Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος: Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Καρπούζας Δημήτριος: Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τσουμάνη Κωνσταντίνα: Συμβασιούχα Καθηγήτρια Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Περίληψη

Η μεσογειακή μύγα *Ceratitis capitata* (Wiedeman) ανήκει στην οικογένεια Tephritidae . Θεωρείται ως ένα από τα πιο καταστρεπτικά παράσιτα στην παγκόσμια παραγωγή φρέσκων φρούτων και λαχανικών, με ξενιστές που ξεπερνούν σε εύρος τα 300 είδη φυτών. Η καταστροφή του φυτού προκαλείται τόσο από την εναπόθεση των αυγών στους καρπούς, όσο και από το γεγονός ότι οι περιοχές ωοαπόθεσης αποτελούν εστίες μόλυνσης από μικροοργανισμούς, όπως βακτήρια και μύκητες.

Μέθοδοι για τον πληθυσμιακό έλεγχο των μυγών αυτών αναπτύσσονται, ώστε να καταπολεμηθούν οι καταστροφικές συνέπειες που προκαλεί η ραγδαία αύξηση των πληθυσμών τους, όπως η μέθοδος των ασύμβατων εντόμων. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη κυτταροπλασμική ασυμβατότητα (CI), που επάγεται από τον ενδοσυμβιώτη *Wolbachia*. Η *Wolbachia pipientis* είναι ένα gram αρνητικό, υποχρεωτικά ενδοκυττάριο και μητρικά κληρονομούμενο α-πρωτεοβακτήριο, που μολύνει έναν αριθμό εντόμων, και πρόσφατα εισήχθη σε εργαστηριακά στελέχη *Ceratitis capitata*. Ο ενδοσυμβιώτης επιδρά στην έκφραση γονιδίων του ξενιστή ίσως ως μέσο για την διευκόλυνση της ενδοκυτταρικής του επιβίωσης και διάδοσής του στις επόμενες γενιές.

Στην συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη της διαφοράς των επιπέδων έκφρασης γονιδίων, τα οποία προέκυψαν και επιλέχθηκαν ύστερα από τρανσκριπτομική ανάλυση 3 διαφορετικών στελεχών [Benakeion (μη μολυσμένη *Ceratitis capitata*), 88,6 (μολυσμένη *Ceratitis capitata* με wCer2), και S10,3(μολυσμένη *Ceratitis capitata* με wCer4)], μέσω της διαδικασίας της Real-time PCR σε ιστούς κεφαλιού, ωοθηκών και όρχεων μεταξύ στελεχών Vienna8 και 56S,2.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Real-time PCR ο ενδοσυμβιώτης *Wolbachia* επιδρά στον ξενιστή του *Ceratitis capitata* αλλάζοντας τα επίπεδα έκφρασης αρκετών γονιδίων (είτε υπερ-εκφράζονται είτε υπό-εκφράζονται) τα οποία εμπλέκονται σε ένα εύρος διαδικασιών. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η *Wolbachia* επιδρά στο ανοσοποιητικό του εντόμου αυξάνοντας την ικανότητα του να αμύνεται σε εισβολές άλλων μικροοργανισμών, με τέτοιο τρόπο ώστε να μπορεί να αντιμετωπίσει τυχόν ανταγωνισμό μέσα στο έντομο και να εδραιώσει την κυριαρχία της. Επίσης η *Wolbachia* επιδρά σε αρκετά μεταβολικά μονοπάτια του εντόμου με σκοπό να καλύψει τις κυτταρικές της ανάγκες.

Abstract

The Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata* (Wiedeman) belongs to the family Tephritidae. It is considered as one of the most destructive pests in the world production of fresh fruits and vegetables, with hosts that exceed a range of 300 plant species. The plant destruction is caused both by depositing the eggs on the wrists, and in the fact that the oviposition sites constitute source of contamination by microorganisms, such as bacteria and fungi.

Methods for population control of these flies are being developed to combat the devastating effects caused by the rapid growth of their populations, such as the method of incompatible insects. This method is based on cytoplasmic incompatibility (CI), induced by symbiot *Wolbachia*. *Wolbachia pipientis* is a gram negative, obligatory intracellular and maternally inherited a-proteo bacterium which infects a number of insects, and was recently introduced into laboratory strains of *Ceratitidis capitata*. The symbiot affects the expression of host genes perhaps as a means to facilitate intracellular survival and proliferation of its next generations.

In this study an analysis on the difference in gene expression levels was conducted, on genes which were resulted and selected after a transcriptomic analysis of three different strains [Benakeion (uninfected *Ceratitidis capitata*), 88,6 (*Ceratitidis capitata* infected with wCer2), and S10,3 (*Ceratitidis capitata* infected with wCer4)], through the process of Real-time PCR in head, ovaries and testes tissues between Vienna8 and 56S,2 strains.

According to the results of Real-time PCR, symbiot *Wolbachia* affects its host *Ceratitidis capitata* by changing the expression levels of several genes (which are either up-regulated or down-regulated), involved in a range of processes. These results suggest that *Wolbachia* affects the insects immunity by increasing its ability to defend itself from invasions by other microorganisms, in such a way that it can face any competition in the insect and to consolidate its sovereignty. Also *Wolbachia* affects several of insect's metabolic pathways in order to meet its cell's needs.

Περιεχόμενα

1.Εισαγωγή	1
1.1Μεσογειακή μύγα	1
1.2.Μορφολογία	1
1.3.Βιολογικός κύκλος	2
1.4.Προέλευση, κατανομή και οικονομική σημασία	3
1.5.Πληθυσμιακός έλεγχος του εντόμου	4
1.6. <i>Wolbachia ripientis</i>	5
1.7.Ανοσοποιητικό σύστημα	8
2.Στόχος της εργασίας.....	13
3.Υλικά και μέθοδοι	14
3.1.Δείγματα <i>Ceratitis capitata</i>	14
3.2.Εκκνητές γονιδίων Real –time PCR.....	14
3.3.Εκχύλιση RNA.....	15
3.4.Πέψη DNA.....	16
3.5.Σύνθεση cDNA.....	17
3.6. Real-Time PCR	17
4.Αποτελέσματα	20
4.1.Γονίδια ωοθηκών	20
4.2.Γονίδια όρχεων.....	21
4.3Γονίδια κεφαλιού	22
5.Συζήτηση.....	27
6.Βιβλιογραφία.....	31

1.Εισαγωγή

1.1 Μεσογειακή μύγα

Η μεσογειακή μύγα *Ceratitis capitata* (Wiedeman) ανήκει στην οικογένεια Tephritidae και είναι ένα δίπτερο, ολομετάβολο έντομο.



Εικόνα 1.1.1: Απεικόνιση *Ceratits capitata*
(πηγή Population-specific demography and invasion potential in medfly ,2011)

1.2.Μορφολογία

Το ενήλικο άτομο της *Ceratits capitata* έχει μήκος 4-5 εκ., δηλ. περίπου τα 2/3 του μεγέθους της οικιακής μύγας. Το γενικό χρώμα του σώματος είναι κιτρινωπό με λίγο καφέ, ειδικά στο υπογάστρο, στα πόδια και κάποια σημάδια στα φτερά. Το ωοειδές υπογάστρο φέρει λεπτό μαύρο τρίχωμα και δύο στενές εγκάρσιες λωρίδες στο κάτω μισό. Το θηλυκό ξεχωρίζει από τη θήκη εναπόθεσης αυγών στο πάνω μέρος της κοιλιάς. Όταν αυτό τεντωθεί πλήρως, φτάνει 6 φορές το κανονικό του πλάτος. Τα φτερά είναι πλατιά, διάφανα και γυαλιστερά, με μαύρα, καφέ και καστανοκίτρινα στίγματα. Στο μέσον κάθε φτερού υπάρχει μια καφεκίτρινη, πλατιά λωρίδα. Η κεφαλή του αρσενικού έχει δύο μακριές μαύρες τρίχες με άκρες σε σχήμα διαμαντιού, που υψώνονται ανάμεσα στα μάτια, κοντά τις κεραίες. Τα μάτια είναι πορφυρο-κόκκινα.

Η προνύμφη έχει μέγεθος 9x2 χιλ., είναι επιμήκης, μπεζ χρώματος, κυλινδρική, και στενή, με στενό πρόσθιο μέρος, με αρπάγες στο στόμα και επίπεδη

ουρά. Η προνύμφη αυτή διακρίνεται από άλλα έντομα των καρπών λόγω του πρόσθιου τμήματός της, ή του θώρακα, που φέρουν 7-11 λεπτούς σωλήνες για την αναπνοή, και συνηθέστερα 9-10.

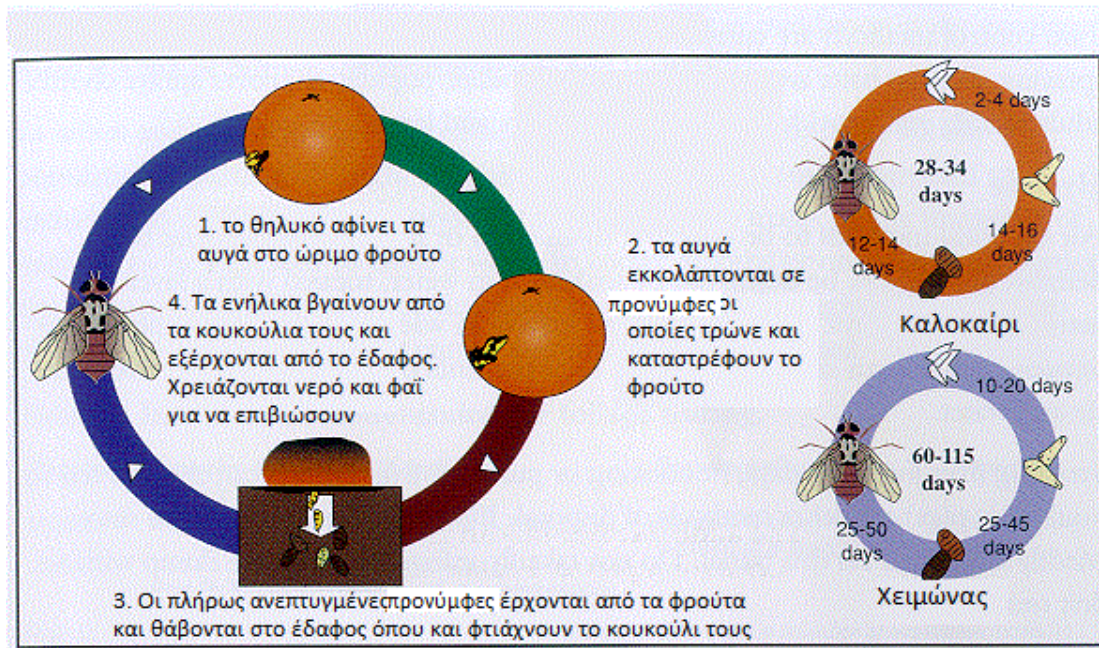
Η νύμφη είναι κυλινδρική, σκούρο καφεκόκκινη. Τα αυγά, λεία, λευκά, λαμπερά, επιμήκη, κυλινδρικά με μήκος 0,9-1,mm (Immaculada, 2010).

1.3.Βιολογικός κύκλος

Ο κύκλος ζωής μίας *Ceratits capitata* ξεκινά όταν τα θηλυκά εναποθέτουν τα αυγά τους κάτω από τη φλούδα του καρπού που μόλις αρχίζει να ωριμάζει. Ενδέχεται να χρησιμοποιήσουν αρκετά θηλυκά τον ίδιο χώρο εναπόθεσης με 75 ή περισσότερα αυγά σε ένα σημείο. Κάθε θηλυκό εναποθέτει 2-10 αυγά. Τα αυγά εκκολάπτονται σε 1,5-3 ημέρες σε ζεστό καιρό. Τα θηλυκά κατά κανόνα πεθαίνουν μόλις σταματήσουν την εναπόθεση των αυγών τους. Όταν εκκολαφθούν τα αυγά, οι προνύμφες αρχίζουν σχεδόν αμέσως να τρέφονται.

Το στάδιο της προνύμφης μπορεί να διαρκέσει μόλις 6-10 ημέρες αλλά και να φτάσει τις 14-26 ημέρες, ανάλογα με τη θερμοκρασία και τον ξενιστή. Όταν οι προνύμφες αναπτυχθούν πλήρως, πέφτουν στο έδαφος όπου και βομβυκιώνονται. Οι προνύμφες εγκαταλείπουν τον καρπό σε μεγάλες ομάδες με την εμφάνιση του ήλιου, και φτιάχνουν το κουκούλι τους στο χώμα, στα 2-4εκ. κάτω από την επιφάνεια ή όπου μπορούν. Η ελάχιστη διάρκεια του σταδίου της νύμφης είναι 6-13 ημέρες.

Οι ενήλικες βγαίνουν από τα κουκούλια ομαδικά συνήθως το πρωί όταν ο καιρός είναι θερμός, και ελάχιστα όταν είναι ψυχρός. Πετούν σε μικρές αποστάσεις αλλά ο άνεμος τις μεταφέρει σε απόσταση μέχρι 1χλμ. Τα νεοεμφανιζόμενα ενήλικα έντομα δεν είναι σεξουαλικά ώριμα. Τα αρσενικά συνήθως δείχνουν σεξουαλική δραστηριότητα 4 ημέρες μετά την εμφάνισή τους και η συνουσία έχει καταγραφεί 5 μέρες μετά την εμφάνιση. Τα περισσότερα θηλυκά είναι σε θέση να ζευγαρώσουν 6-8 ημέρες μετά την έξοδό τους από το κουκούλι. Αμφότερα τα φύλλα είναι ενεργά σεξουαλικά καθ' όλη τη διάρκεια της ημέρας. Ο χρόνος που απαιτείται για να ολοκληρώσει η *Ceratits capitata* τον κύκλο της υπό τροπικές συνθήκες είναι 21-30 μέρες. (Immaculada, 2010).



Εικόνα 1.3.1: Βιολογικός κύκλος φρουτόμυγων (πηγή bouncingideas.wordpress.com)

1.4. Προέλευση, κατανομή και οικονομική σημασία

Τα τελευταία 200 χρόνια παρατηρείται εξάπλωση της Μεσογειακής μύγας από την τροπική Αφρική. Συγκεκριμένα μάλιστα ζει στην περιοχή νοτιοανατολικά της ερήμου Σαχάρα (Kenya), σε έναν μεγάλο αριθμό χωρών, όπως τη λεκάνη της Μεσογείου, την κεντρική και νότια Αμερική και την Αυστραλία (Fletcher, 1989). Θεωρείται ως ένα από τα πιο καταστρεπτικά παράσιτα στην παγκόσμια παραγωγή φρέσκων φρούτων και λαχανικών, με ξενιστές που ξεπερνούν σε εύρος τα 300 είδη φυτών (Liquido et al. 1991).



Εικόνα 1.4.1: Γεωγραφική κατανομή *Ceratitis capitata* (πηγή nemertes.lis.upatras.gr)

Στην Ελλάδα προξενεί κυρίως ζημιές σε σαρκώδη φρούτα και φρούτα με σκληρό κουκούτσι καθώς και λωτούς(μήλο, σύκα, βερίκοκο, ροδάκινο, πορτοκάλι και κυδώνι) στις περιοχές της βόρειας Ελλάδας αλλά και σε περιοχές με παρόμοιες κλιματικές συνθήκες.

Ως αποτέλεσμα, προκαλεί κάθε χρόνο τεράστιες καταστροφές σε τροπικές-υποτροπικές και εύκρατες περιοχές που χρηματικά ανέρχονται σε εκατοντάδες

εκατομμύρια δολάρια. Η καταστροφή του φυτού προκαλείται τόσο από την εναπόθεση των αυγών στους καρπούς, όσο και από το γεγονός ότι οι περιοχές ωοαπόθεσης αποτελούν εστίες μόλυνσης από μικροοργανισμούς, όπως βακτήρια και μύκητες. Η παρασιτική αυτή δράση της Μεσογειακής μύγας, σε συνδυασμό με τη μεγάλη και γρήγορη γεωγραφική της εξάπλωση, δικαίως την κατατάσσουν στα έντομα μεγάλης οικονομικής σημασίας και καθιστούν αναγκαίο τον έλεγχο των φυσικών πληθυσμών της (Nimertis and Οικονομου, 2006).

1.5. Πληθυσμιακός έλεγχος του εντόμου

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, λόγω της μεγάλης οικονομικής σημασίας που κατέχει η *Ceratitis capitata* (Wiedeman) έχουν δημιουργηθεί διάφορες μέθοδοι, είτε χημικοί είτε μη, για τον έλεγχο των φυσικών πληθυσμών της. Στις χημικές μεθόδους συγκαταλέγονται: η μαζική παγίδευση (Jackson trap, Mc Phail trap) (Haniotakis et al., 1991), η απολύμανση των εξαγωγίμων φρούτων (Mansour and Franz, 1996) και η πιο διαδεδομένη η χρήση εντομοκτόνων. Ενώ στις μη χημικές η μέθοδος των στειρών εντόμων S.I.T. και η μέθοδος των ασύμβατων εντόμων I.I.T..



Εικόνα 1.5.1: Αριστερά, Jackson trap. Δεξιά, McPhail trap (Bergsten et al., 1999).

Χημικές μέθοδοι

Η χρήση εντομοκτόνων (Μαλάθειο, Τρέισερ, Σαξές, Φένθιον και Τρίχλορφον) για τον έλεγχο των φυσικών πληθυσμών αποτελεί τον πιο διαδεδομένο τρόπο ελέγχου, στις Μεσογειακές χώρες όπως και στη χώρα μας. Εφαρμόζονται στο έδαφος κάτω από τα δέντρα. Έτσι σκοτώνονται μερικές προνύμφες, καθώς αυτές θα εισέρχονται στο χώμα για να βομβυκιωθούν, και κυρίως το μεγαλύτερο μέρος των ενηλίκων ατόμων. Αν και με την συχνή τους χρήση μπορούν να επιτύχουν στη μείωση των παρασιτικών ατόμων, έχουν σοβαρές επιπτώσεις στην ποιότητα των προϊόντων και στο περιβάλλον, γι' αυτό και σε διεθνές επίπεδο επιζητείται η περιορισμένη χρήση τους.

Οι συνέπειες από τη χρήση των εντομοκτόνων είναι ευρέως γνωστές και αυτό κάνει επιτακτική την ανάγκη αναζήτησης μεθόδων ελέγχου των παρασίτων- εντόμων που να είναι φιλικές στο περιβάλλον (Robinson, 2002). Την εποχή μας, οι μόνες μέθοδοι που ανταποκρίνονται στα σημερινά οικολογικά ζητούμενα, είναι εκείνες που έχουν ως βάση την γενετική, τη βιολογία και την οικολογία των εντόμων-παρασίτων. Ο όλο και αναπτυσσόμενος τομέας της γενετικής τεχνολογίας δημιουργεί μεθόδους που είναι συνήθως ειδικές για κάθε είδος, γεγονός που σχετίζεται άμεσα με την ισορροπία των οικοσυστημάτων.

Μη χημικές μέθοδοι

Μέθοδος Στείρου Εντόμου

Σήμερα, όπως είναι φυσικό, υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη νέων μεθόδων ή τη βελτίωση υπαρχόντων, φιλικών προς το περιβάλλον (Robinson, 2002). Η πιο γνωστή σε Ευρωπαϊκό και διεθνές επίπεδο αποτελεί η μέθοδος των στείρων εντόμων S.I.T. (sterile insect technique) (Hendrichs et al., 1995; Kerremans and Franz, 1994; Robinson, 2002). Στηρίζεται στη μαζική αναπαραγωγή, στείρωση με τη χρήση ακτινοβολίας γ και απελευθέρωση στο περιβάλλον στείρων αρσενικών ατόμων. Τα απελευθερωμένα άτομα ζευγαρώνουν με το ντόπιο πληθυσμό και οδηγούν σε μείωση της αναπαραγωγικής δυνατότητας του τοπικού πληθυσμού. Τα στείρα αρσενικά ανταγωνίζονται με τα αρσενικά αγρίου τύπου για το ποια θα ζευγαρώσουν με τα θηλυκά που υπάρχουν στην περιοχή, με αποτέλεσμα την μείωση του γηγενούς πληθυσμού καθώς όσα θηλυκά ζευγαρώσουν με τα στείρα αρσενικά θα γεννήσουν απογόνους που θα πεθάνουν στα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης. Η τεχνική αυτή είναι αποτελεσματική όταν απελευθερώνονται τουλάχιστον 100:1 στείρα αρσενικά: αρσενικά αγρίου τύπου (Bushland et al., 1951; Lindquist et al., 1955; Runner et al., 1916; Muller et al., 1927; Tan et al., 2000). Μειονέκτημα της τεχνικής αυτής αποτελεί ότι τα ακτινοβολημένα αρσενικά συνήθως είναι αποδυναμωμένα εάν δεν λάβουν τις σωστές δόσεις ακτινοβολίας, καθιστώντας τα λιγότερο ικανά να αγωνιστούν τα άγρια αρσενικά για να ζευγαρώσουν με τα θηλυκά. Επιπλέον το κόστος παραγωγής ικανοποιητικού αριθμού στείρων εντόμων είναι πολύ μεγάλο για να μπορέσει να την στηρίξουν φτωχά κράτη.

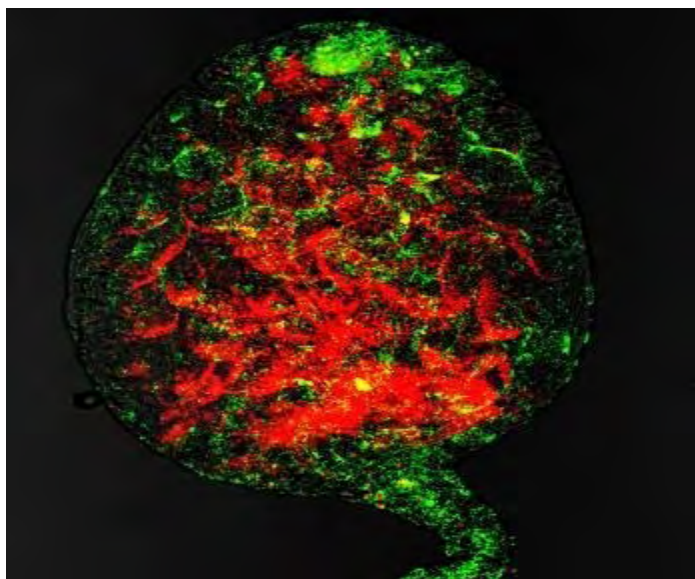
Μέθοδος Ασύμβατου Εντόμου

Ανάλογη μέθοδος με την SIT για τον έλεγχο των φυσικών πληθυσμών των εντόμων παρασίτων αποτελεί η μέθοδος των ασύμβατων εντόμων I.I.T. (Incompatible insect technique) (Zabalou, 2009). Το πλεονέκτημά της βρίσκεται στο γεγονός ότι τα έντομα δεν χρειάζεται να έχουν ακτινοβοληθεί πριν απελευθερωθούν στον αγρό. Η ΙΙΤ στηρίζεται στη κυτταροπλασμική ασυμβατότητα (CI), που επάγεται από τον ενδοσυμβιώτη *Wolbachia* και απελευθέρωση στο περιβάλλον στείρων ατόμων. Η πρώτη επιτυχημένη χρήση της ΙΙΤ έγινε τα μέσα των 60s, για τον έλεγχο του φορέα της φιλαρίας, *Culex pipiens* (Laven, 1967). Επίσης χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς ενάντια αγροτικών παρασίτων όπως *Cadra* (*Ephestia*) *anetella* (Brower, 1979, 1980) και σε ελεγχόμενες δοκιμές σε αγρούς σε *R. cerasi*, όπου εμφανίστηκε σημαντική μείωση στα επίπεδα προσβολής (Ranner, 1985).

1.6. *Wolbachia pipientis*

Η *Wolbachia pipientis* είναι ένα gram αρνητικό, υποχρεωτικά ενδοκυττάριο και μητρικά κληρονομούμενο α -πρωτεοβακτήριο που μολύνει έναν αριθμό ασπόνδυλων ειδών, περιλαμβανόμενων ακάρεων, αραχνών, νηματωδών, και ιδίως έντομα (Zabalou, 2009). Πρωτο-ανακαλύφθηκε στα ωάρια του κουνουπιού *Culex pipiens* και έκτοτε έχει βρεθεί σε αρκετά εκατοντάδες είδη αρθροπόδων όπου

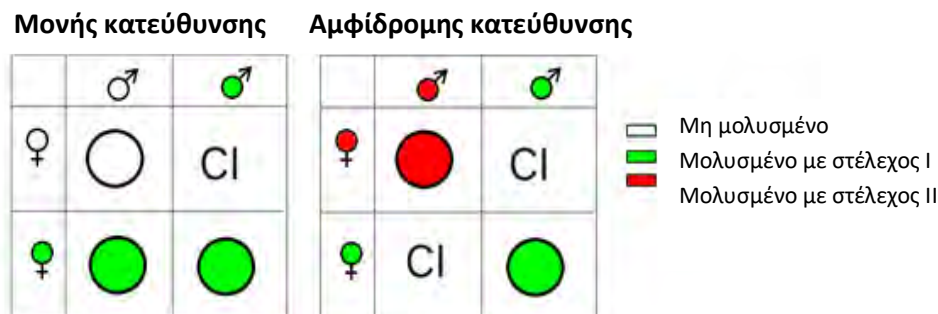
κατοικούν στους αναπαραγωγικούς ιστούς και στους ιστούς του κεφαλιού (Bourtzis, 2008).



Εικόνα 1.6.1: Όρχις εντόμου DNA σπέρματος (κόκκινο) και ενδοσυμβίωσης *Wolbachia* (πράσινο). (Πηγή http://eol.org/data_objects/399974)

Η *Wolbachia* χρησιμοποιεί διάφορες στρατηγικές (παρθενογένεση, θηλυκοποίηση, θανάτωση αρσενικών, και κυτταροπλασματική ασυμβατότητα) για να ελέγξει την αναπαραγωγή των ξενιστών της, ενισχύοντας έτσι την ραγδαία εξάπλωσή της στους μολυσμένους πληθυσμούς (Weeks et al, 2007). Κατά την παρθενογένεση η οποία παρατηρείται στα περισσότερα παρασιτοειδή έχουμε αποκλειστική παραγωγή θηλυκών απογόνων από μολυσμένα θηλυκά. Στην θηλυκοποίηση η οποία παρατηρείται κυρίως στα ισόποδα έχουμε την μετατροπή γενετικών αρσενικών σε λειτουργικά θηλυκά. Κατά την θανάτωση αρσενικών έχουμε θάνατο των αρσενικών εμβρύων κατά το πρώιμο εμβρυικό στάδιο παρατηρείται στα έντομα. Η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα αποτελεί την πιο εξάπλωμένη επίδραση που έχουν οι ενδοσυμβιώτες *Wolbachia* στην πλειοψηφία των τάξεων των εντόμων και μπορεί να είναι είτε μονής κατεύθυνσης είτε αμφίδρομη. Στην κυτταροπλασματική ασυμβατότητα μονής κατεύθυνσης η σύζευξη μεταξύ αρσενικών ατόμων μολυσμένων με *Wolbachia* και μη μολυσμένων θηλυκών οδηγεί στον εμβρυικό θάνατο των απογόνων. Το αντίθετο ζευγάρωμα είναι εντελώς συμβατό, όπως είναι και οι ζεύξεις μεταξύ δύο μολυσμένων ατόμων. Αμφίδρομη CI συνήθως συμβαίνει σε ζευγαρώματα μεταξύ μολυσμένων ατόμων που φέρουν διαφορετικά στελέχη *Wolbachia*. Ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει ακόμη εξακριβωθεί σε μοριακό επίπεδο (Bourtzis et al, 2003; Tram et al, 2003). Ωστόσο, γενετικά και κυτταρικά στοιχεία δείχνουν ότι στα CI έμβρυα, τα πατρικά χρωμοσώματα έχουν συμπιεστεί εσφαλμένα όταν ευθυγραμμίζονται στην μεταφασική πλάκα για την πρώτη μιτωτική διαίρεση μετά την γονιμοποίηση. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στην καθυστερημένη ενεργοποίηση της CDK1 (κινάση εξαρτώμενη από κυκλίνη, ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου) στον προπυρήνα του σπέρματος, στα μολυσμένα από *Wolbachia*

αρσενικά. Όταν και το ωάριο είναι μολυσμένο παρατηρείται καθυστερημένη ενεργοποίηση της CDK1 με συνέπεια η μετάφαση να καθυστερεί και ο προπυρήνας του σπέρματος να έχει αρκετό χρόνο να συμπιέσει σωστά τα πατρικά χρωμοσώματα διασώζοντας το έμβρυο, το οποίο αναπτύσσεται σωστά (Callaini et al, 1997; Tram et



al, 2006; Zheng et al, 2011; Landmann et al, 2009).

Εικόνα 1.6.2: Αναπαράσταση CI

(Πηγή www.wikiwand.com)

Παρόλο ότι η *Wolbachia* είναι ευρέως διανεμημένη, πολλά σημαντικά αγροτικά παράσιτα και φορείς ασθενειών δεν φέρουν τον ενδοσυμβιώτη (Bourtzis, 2008). Πρόσφατα όμως, εδραιώθηκε μολυσμένο από *Wolbachia* στέλεχος *Ceratitis capitata* μέσω εμβρυικών κυτταροπλασματικών μικροεγχύσεων χρησιμοποιώντας μολυσμένα δίπτερα *R. cerasi* ως δότες (Zabalou et al., 2004). Η *Wolbachia* είναι παρούσα με υψηλά επίπεδα στον νέο της ξενιστή και προκαλεί ολική CI. Επιπλέον, εργαστηριακοί πληθυσμοί καταστάληκαν τελείως από μία και μόνο απελευθέρωση μολυσμένων αρσενικών (Zabalou et al., 2004).

Για μία επιτυχημένη εφαρμογή της ΠΤ, η οποία βασίζεται σε μονής κατεύθυνσης CI προσέγγιση, είναι αναγκαίο να απελευθερώνονται στην φύση μόνο αρσενικά, διότι η απελευθέρωση θηλυκών θα οδηγούσε στην εγκαθίδρυση πληθυσμών του αγρού που φέρουν *Wolbachia*. Το πρόβλημα λύνεται με την χρήση στελεχών γενετικού διαχωρισμού (GSS, genetic sexing strains), όπως το στέλεχος Vienna 8 το οποίο φέρει μία μετατόπιση που συνδέει ένα άγριου τύπου χρωμόσωμα 5 με το χρωμόσωμα Y που καθορίζει τα αρσενικά [(T(Y;5)101] (Robinson & van Heemert, 1982; Franz, 1996). Αυτή η μετατόπιση συνδυάζεται με την αναστροφή D53 (Franz, 2005) που φέρει τους δείκτες επιλογής white pupae (wp; Rossler, 1975) και temperature sensitive lethal (tsl; Franz et al., 1994). Το Vienna 8 φέρει συγκεκριμένα το tsl, στο στέλεχος αυτό τα θηλυκά είναι ομόζυγα και τα αρσενικά ετερόζυγα για το D53. Η ειδική για τα θηλυκά θνησιμότητα επάγεται μετά από 24ωρη επώαση των αυγών στους 34 °C προκαλώντας την παραγωγή 100% αρσενικών (Bourtzis et al, 1994). Τα στελέχη Vienna 8 που είναι μολυσμένα με *Wolbachia* (wCer2) ονομάζονται 56S,2.

Η χρήση της *Wolbachia* για τον πληθυσμιακό έλεγχο των παρασίτων του αγρού και συγκεκριμένα της *Ceratitidis capitata* φέρει πολλά πλεονεκτήματα (αποφυγή χρήσης ακτινοβολίας, αρσενικά με την ίδια ή υψηλότερη ικανότητα σύζευξης με θηλυκά). Γι' αυτό σκοπός αρκετών ερευνών που αφορούν την μεσογειακή μύγα είναι η μελέτη και ο χαρακτηρισμός των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της *Wolbachia* και του ξενιστή της. Ο ενδοσυμβιώτης επιδρά στην έκφραση γονιδίων του ξενιστή ίσως ως μέσο για την διευκόλυνση της ενδοκυτταρικής του επιβίωσης και διάδοσής του στις επόμενες γενιές. Διαφορετική έκφραση γονιδίων έχει παρατηρηθεί σε πολλά μετάγραφα που σχετίζονται με την σεξουαλική αναπαραγωγή και την ανοσολογική απόκριση (Zhiyong, 2008).

1.7. Ανοσοποιητικό σύστημα

Πλέον σημαντικό βήμα στην προσπάθεια να κατανοήσουμε την ενδοσυμβίωση *Wolbachia*- *Ceratitidis capitata*, για την εφαρμογή της για αγροτικούς σκοπούς αλλά και για σκοπούς άλλων τομέων όπως της γενετικής, είναι η μελέτη της επίδρασης της *Wolbachia* στα γονίδια του ανοσοποιητικού της *Ceratitidis capitata*. Χρησιμοποιώντας ως μοντέλο την *Drosophila melanogaster*, το πιο καλά μελετημένο δίπτερο, έχουν περιγραφεί τα ανοσοποιητικά συστήματα και οι ανοσοποιητικές αντιδράσεις άλλων δίπτερων, που έχουν δραματικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη ζωή, ως αγροτικά παράσιτα. Ένα από αυτά είναι και η *Ceratitidis capitata*.

Για την αντιμετώπιση των μικροοργανισμών, μία εκ των οποίων είναι η *Wolbachia*, η φρουτόμυγα στηρίζεται σε πολλούς μηχανισμούς (Lemaitre et Hoffmann, 2007).

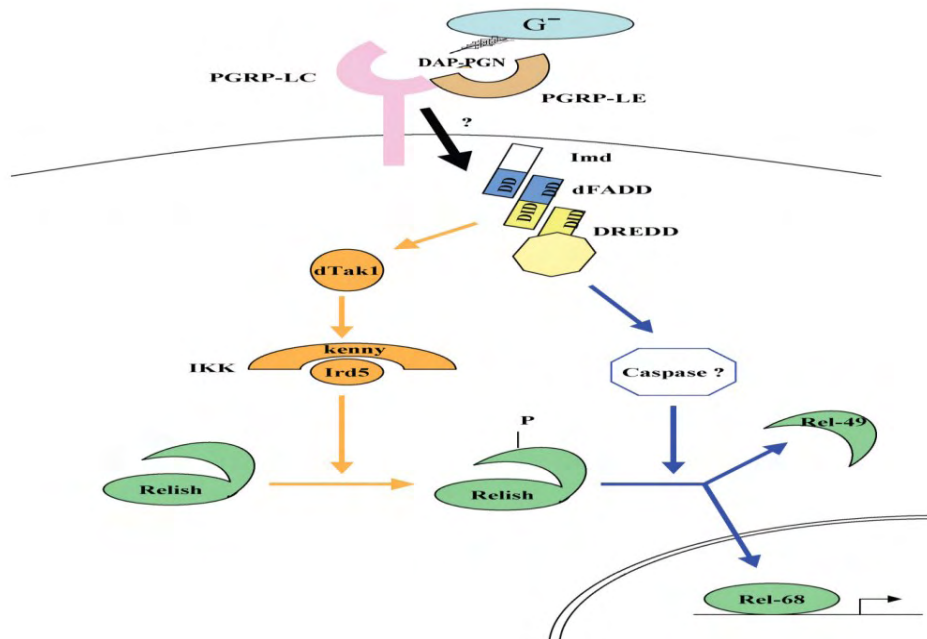
Μηχανισμοί αποφυγής εισόδου μικροοργανισμών

Η πρώτη γραμμή άμυνας κατά των μικροοργανισμών συνίσταται από φυσικούς φραγμούς όπως ο εξωσκελετός ο οποίος αποτελείται από χιτίνη και περιβάλλει το έντομο και το προστατεύει από άμεση έκθεση σε μικροοργανισμούς. Το μεσεντερικό επιθήλιο προστατεύεται και αυτό από την άμεση επαφή με το γεύμα και τους μικροοργανισμούς από ένα στρώμα χιτίνης. Ωστόσο, επιθηλιακοί ιστοί οι οποίοι έρχονται σε επαφή με το περιβάλλον όπως της αναπνευστικής οδού, της στοματικής περιοχής, των μαλπιγκιανών σωλήνων και των αναπαραγωγικών οδών των αρσενικών και θηλυκών ατόμων μπορούν και εκφράζουν αντιμικροβιακά πεπτίδια (AMPs) τα οποία θα αναλυθούν παρακάτω. Κάθε επιθηλιακός ιστός εκφράζει ιδιόσυστατα τουλάχιστον 2 διαφορετικά AMPs με συμπληρωματικό φάσμα λειτουργίας, και σε περίπτωση τοπικής μόλυνσης η έκφραση των AMPs επάγεται από το IMD (Immune deficiency) μονοπάτι (ένα από τα δύο μονοπάτια της χυμικής απόκρισης). Το επιθήλιο του εντέρου διαθέτει έναν επιπλέον μηχανισμό για την αντιμετώπιση των μικροοργανισμών, την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου οι οποίες είναι τοξικές για τους μικροοργανισμούς.

Μηχανισμοί εξουδετέρωσης μικροοργανισμών

Όσοι μικροοργανισμοί καταφέρουν να περάσουν τους παραπάνω μηχανισμούς έρχονται αντιμέτωποι με μία άλλη ομάδα μηχανισμών. Τη χυμική και κυτταρική απόκριση. Κατά την χυμική απόκριση έχουμε αναγνώριση των μικροοργανισμών από τις πρωτεΐνες αναγνώρισης προτύπου PRRs (pattern recognition proteins) τα οποία είναι πρωτεΐνες οι οποίες εκφράζονται στο λιπώδες σώμα και αναγνωρίζουν ειδικά μοτίβα των επιφανειών των μικροοργανισμών. Υπάρχουν δύο οικογένειες PRRs οι πρωτεΐνες αναγνώρισης πεπτιδογλυκάνης PGRPs (13 στο σύνολο) και οι πρωτεΐνες δέσμησης gram αρνητικών GNBPs. Η αναγνώριση των μικροοργανισμών από τα PRRs επάγει την ενεργοποίηση δύο μονοπατιών (IMD, Toll) τα οποία ελέγχουν την έκφραση και των 7 τάξεων AMP, τα οποία εκφράζονται και απελευθερώνονται στην αιμόλεμφο από το λιπώδες σώμα για να αντιμετωπίσουν τους μικροοργανισμούς. Τα AMPs είναι αντιμικροβιακά πεπτίδια τα οποία έρχονται σε επαφή με τους μικροοργανισμούς και μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων δημιουργούν πόρους στις επιφάνειες του μικροοργανισμού σκοτώνοντας το.

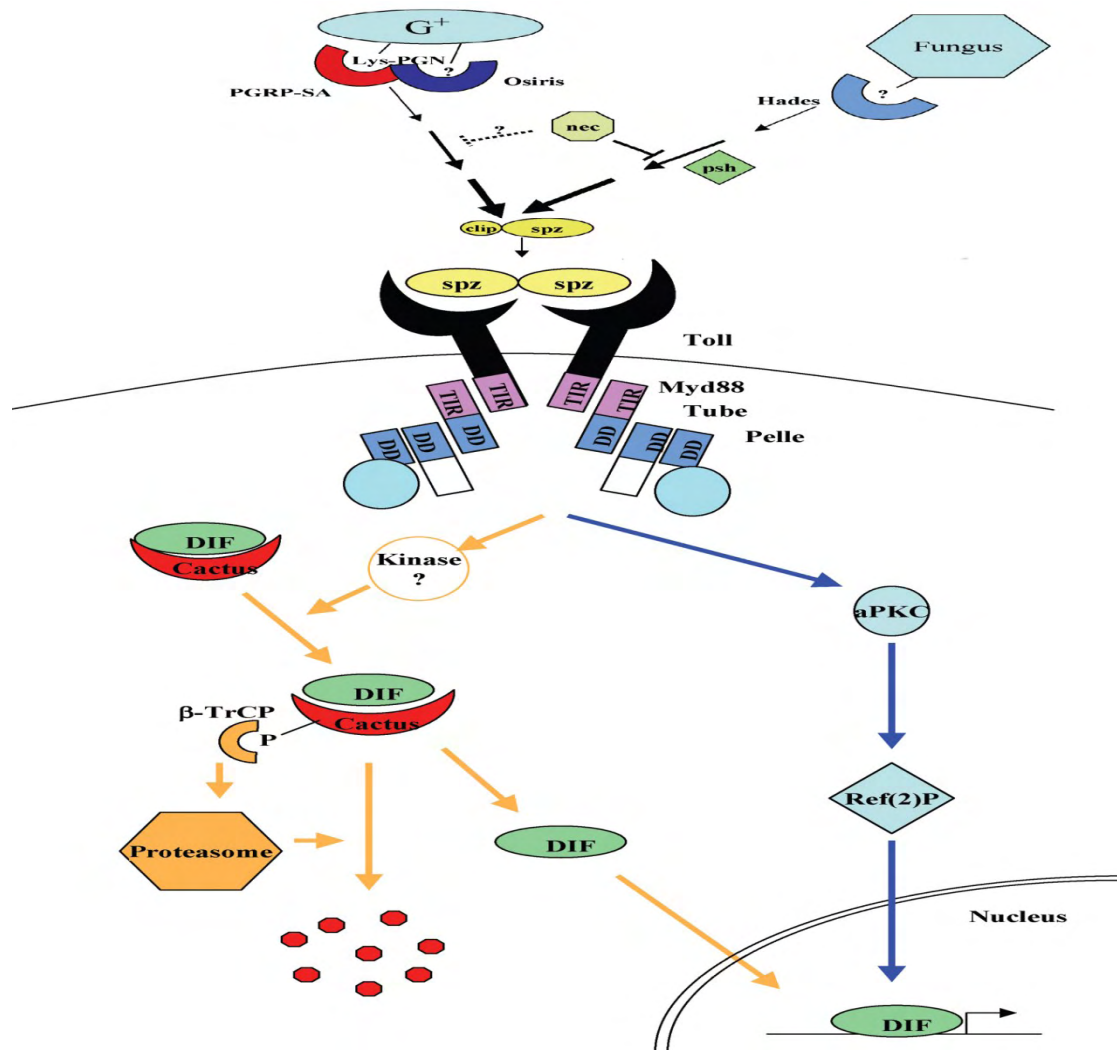
Το IMD μονοπάτι ενεργοποιείται μετά την αναγνώριση συστατικών της επιφάνειας gram αρνητικών βακτηρίων που έχουν εισβάλει στο έντομο. Η αναγνώριση του βακτηρίου και ενεργοποίηση του IMD μονοπατιού δίνει στην IMD δράση κασπάσης και επίσης ενεργοποιεί ένα σύμπλεγμα IKK(I κάππα κινάση) που φωσφορυλιώνει τον μεταγραφικό παράγοντα Relish. Η Relish κόβεται στην Rel-49 που παραμένει στο κυτταρόπλασμα και στον μεταγραφικό παράγοντα Rel-68. Ο Rel-68 επάγει την παραγωγή attacins, cecropins, dipterocins και drosocins τα οποία αποτελούν ειδικά AMPs κατά των gram αρνητικών βακτηρίων (εικόνα 1.7.1).



Εικόνα 1.7.1: IMD μονοπάτι

[Πηγή The immune response of *Drosophila melanogaster* (Leclerc et al,2004)]

Ενώ το Toll μονοπάτι ενεργοποιείται μετά την αναγνώριση συστατικών της επιφάνειας gram θετικών βακτηρίων και μυκήτων που έχουν εισβάλει στο έντομο. Μετά την ενεργοποίηση του Toll μονοπατιού (Toll είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας με έναν εξωτερικό τομέα που περιέχει επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη). Το υποδοχέας Toll μετά την ενεργοποίηση του διμερίζεται με την βοήθεια της Spaetzle και επάγει την στρατολόγηση ενός ετερο-τριμερούς συμπλόκου (Myd88, Pelle και Tube). Το αποτέλεσμα του σχηματισμού του συμπλόκου είναι η ενεργοποίηση της Pelle κινάσης, η οποία φωσφορυλιώνει την Cactus. Η φωσφορυλιωμένη Cactus υδρολύεται και απελευθερώνεται ο παράγοντας DIF (ανοσοποιητικός παράγοντας που σχετίζεται με την Dorsal). Ο παράγοντας DIF επάγει την έκφραση AMPs που δρουν έναντι gram θετικών βακτηρίων (defensins) και έναντι μυκήτων όπως drosomycins και metchnikowins εφόσον αλληλεπιδράσει με την Ref(2)P (εικόνα 1.7.2) .

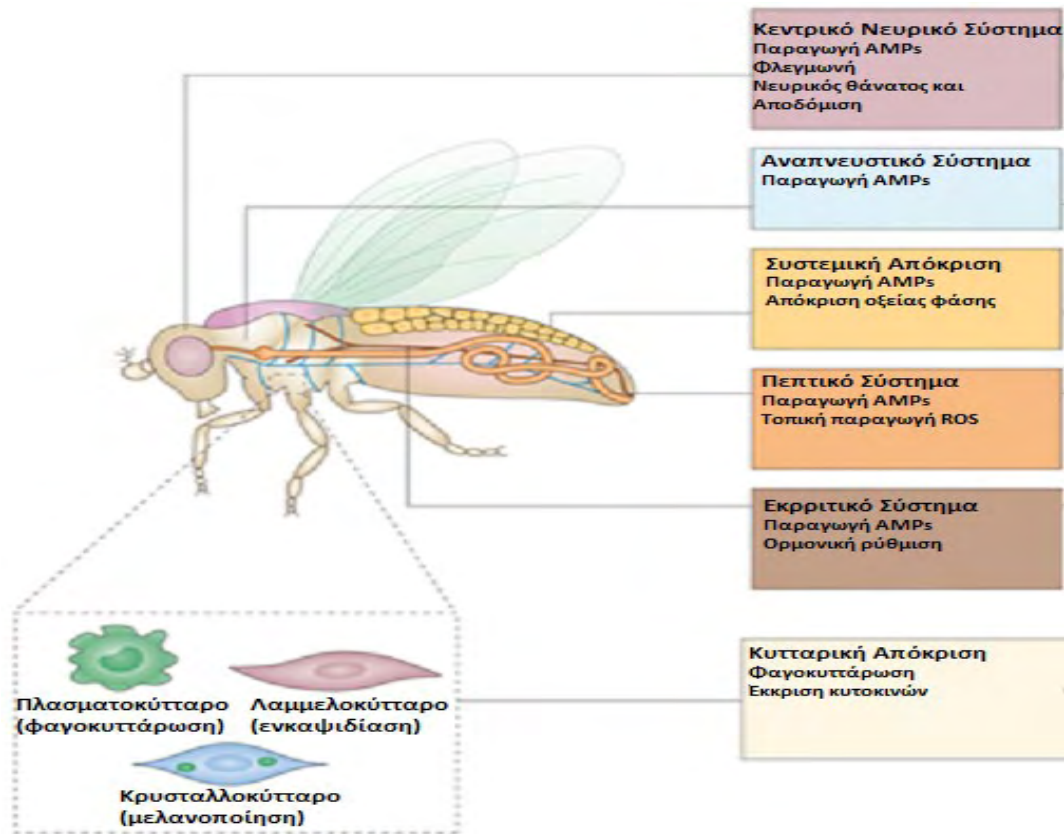


Εικόνα 1.7.2: Toll μονοπάτι

[Πηγή The immune response of *Drosophila melanogaster* (Leclerc et al,2004)]

Τέλος, ο επόμενος μηχανισμός ο οποίος δρα ταυτόχρονα με την χυμική απόκριση κατά των μικροοργανισμών των οποίων έχουν εισέλθει στην αιμόλεμφο του εντόμου αποτελεί η κυτταρική απόκριση. Στην κυτταρική απόκριση έχουμε δράση 3 τάξεων κυττάρων του αίματος τα οποία εμφανίζουν εξειδικευμένες λειτουργίες. Τα κύτταρα αυτά αποτελούν τα πλασματοκύτταρα, τα κρυσταλλικά κύτταρα και τα λαμελλοκύτταρα.

- Τα πλασματοκύτταρα έχουν τον ρόλο της αναγνώρισης και φαγοκυττάρωσης των μικροοργανισμών με την βοήθεια των πρωτεϊνών που περιέχουν θειολεστέρα TEP (thiolester-containing protein), τα οποία βοηθούν στην διαδικασία της οψωνινοποίησης και την ενεργοποίηση της φαγοκυττάρωσης. Τα πλασματοκύτταρα μέσω κυτοκινών ενεργοποιεί το JAK/STAT μονοπάτι του λιπώδους σώματος το οποίο επάγει την έκφραση του στρεσογόνου παράγοντα Turnadot ο οποίος δρα έναντι των ιών.
- Τα κρυσταλλοκύτταρα είναι υπεύθυνα για την παραγωγή μελανίνης μίας τοξικής χρωστικής, η οποία παράγεται μετά την αναγνώριση των μικροοργανισμών. Η παραγόμενη μελανίνη βοηθάει στην επούλωση των πληγών και στην θανάτωση των ενδοκαυσιωμένων και οψωνινοποιημένων μικροοργανισμών. Το ένζυμο κλειδί της μελανοποίησης είναι η φαινολοξιδάση η οποία κατέχει δράση μονοφαινόλο μονοοξυγενάσης που μετατρέπει την τυροσίνη σε μελανίνη. Το ένζυμο αυτό κωδικοποιείται από τρία διαφορετικά γονίδια που εκφράζονται στα κρυσταλλοκύτταρα.
- Τα λαμελλοκύτταρα είναι υπεύθυνα για την αντιμετώπιση των παράσιτων τα οποία έχουν εισέλθει στο έντομο. Καθώς τα λαμελλοκύτταρα αναγνωρίζουν τα παράσιτα διαφοροποιούνται και σχηματίζουν πολυστρωματικά καψίδια γύρω τους και συνοδευόμενα από μελανίνη τα σκοτώνουν. (Leclerc,2004).



Εικόνα 1.7.3: Ανοσοποιητικό *Ceratitis Capitata*

(Πηγή <http://www.nature.com/nri/journal/v14/n12/full/nri3763.html>)

Η πιο δημοφιλής προσέγγιση που έχουν επιλέξει οι περισσότεροι ερευνητές για την κατανόηση των γενετικών τόπων που συνδέονται με την μόλυνση της *Wolbachia* είναι η ανάλυση του συνολικού τρανσκριπτόματος σε μολυσμένα και μη έντομα. Από αυτήν την ανάλυση έχουν προκύψει αρκετές δημοσιεύσεις οι οποίες εμπλέκουν αρκετούς γενετικούς τόπους και αρκετοί από τους οποίους συνδέονται με το ανοσοποιητικό σύστημα. Η προσέγγιση αυτή έχει ήδη επιχειρηθεί από το εργαστήριο στο οποίο υλοποιήθηκε η ανάλυση του τρανσκριπτόματος σε 3 διαφορετικά στελέχη [(Benakeion (μη μολυσμένη *Ceratitis capitata*), 88,6 (μολυσμένη *Ceratitis capitata* με wCer2), και S10,3(μολυσμένη *Ceratitis capitata* με wCer4)] στους ιστούς των ωοθηκών, των όρχεων και του κεφαλιού. Έγινε σύγκριση μεταξύ μολυσμένων και μη μολυσμένων και προέκυψαν κάποια γονίδια που είτε υπερ-εκφράζονται είτε υπο-εκφράζονται στα μολυσμένα στελέχη. Στη συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία επιλέχθηκαν κάποια από αυτά τα γονίδια για να προσδιοριστούν οι διαφορές στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ των στελεχών Vienna8 και 56S,2 με την διεξαγωγή Real-time PCR.

2.Στόχος της εργασίας

Στόχος της εργασίας ήταν η μελέτη της διαφοράς των επιπέδων έκφρασης γονιδίων, τα οποία προέκυψαν και επιλέχθηκαν ύστερα από τρανσκριπτομική ανάλυση 3 διαφορετικών στελεχών [Benakeion (μη μολυσμένη *Ceratitidis capitata*), 88,6 (μολυσμένη *Ceratitidis capitata* με wCer2), και S10,3(μολυσμένη *Ceratitidis capitata* με wCer4)], μέσω της διαδικασίας της Real-time PCR σε ιστούς κεφαλιού, ωοθηκών και όρχεων μεταξύ στελεχών Vienna8 και 56S,2.

3.Υλικά και μέθοδοι

3.1.Δείγματα *Ceratitis capitata*

Στο πειραματικό μέρος της πτυχιακής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δείγματα *Ceratitis capitata* από pools ιστών κεφαλιού, ωοθηκών και όρχεων στελεχών Vienna 8 (μη μολυσμένα) και 56S,2 (μολυσμένα).

3.2.Εκκινητές γονιδίων Real –time PCR

Για την διεξαγωγή της Real – time PCR και την ενίσχυση των γονιδίων που θέλουμε να πραγματοποιήσουμε την λειτουργική ανάλυση σχεδιάστηκαν ζεύγη εκκινητών. Η σχεδίαση των εκκινητών για τα γονίδια της *Ceratitis Capitata* έγινε με την βοήθεια βάσεων δεδομένων όπως το Flybase (www.flybase.org) και NCBI (National Center for Biotechnology Information) σε συνδυασμό με αλληλουχίες του γονιδιώματος της *Drosophila melanogaster* από την Flybase.

Γονίδιο στόχος	Αλληλουχία εκκινητή	Ta	Μέγεθος προϊόντος
Attacin-B-like	F: AGCTAATCTGTGGTCTTCAC	55 °C	150bp
	R: CCACATATAAAGTCTCAACC		
PGSB1	F: GTCAGCGTTTGTATGATGAG	55 °C	104bp
	R: AACTGGGACCCTAACAAG		
Serine-pyruvate aminotransferase XLOC_017362	F: ATGGTGATGTACGTTATGTG	55 °C	96bp
	R: AGAATACTTGTGGTTTGTGG		
Maltase A3-like	F: TGGCGGAAAGAACCAGAC	55 °C	104bp
	R: AACGGTTACGGGACACTCTG		
Larval cuticle protein 5-like XLOC_021396	F: ACAGTGAATGTGGAGACC	55 °C	90bp
	R: CAGTGTTCCTTGACTTACGC		
Cecropin 1	F: ACTTCATTGTGGAGACTAGC	55 °C	120bp
	R: GTCTTCTCATCGGTCCAC		
Ceratotoxin A	F: AATTCGTAAAAACGTACCC	55 °C	81bp
	R: GAAAATCTCTAAAAGTTATCGAC		
IGF1R	F: TCAACAAAGTCTTCATCCTC	55 °C	121bp
	R: GCATCTCTTGTATGCTGAC		
Trypsin-like	F: ATTCCATTGCGTAGTAGC	55 °C	110bp
	R: CCTACCAATCTTCTTCG		
Succinate dehydrogenase B	F: GGCTCAACTGTGCTAGATAC	55 °C	93bp
	R: CATATTGACTTGTCTCTGG		
Succinate dehydrogenase B	F: ATTGGTTGGTGTGTGTC	55 °C	88bp
	R: CCATGAGTACAGTGATGC		
Succinate dehydrogenase B	F: AGTATTTGATGGGTTGTAG	55 °C	147bp
	R: ATAGCTCACCAGGATTTAG		

Πίνακας 1

3.3. Εκχύλιση RNA

Η εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων είναι το βασικό βήμα για επακόλουθες μοριακές βιολογικές μεθόδους όπως η PCR, Real-time PCR, blotting, spectroscopy, ενζυμικές δοκιμασίες, αλληλούχηση νουκλεϊκών οξέων. Έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι για την εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων, οι οποίες μοιράζονται τρεις σκοπούς: 1) τη λύση των κυττάρων και εκχύλιση των ενδοκυτταρικών νουκλεϊκών οξέων σε υδατικό διάλυμα, 2) την αφαίρεση των μη-νουκλεϊκών οργανικών και ανόργανων μορίων από το προκύπτοντα υδατικά εκχυλίσματα και 3) την ελαχιστοποίηση των απωλειών νουκλεϊκών οξέων κατά την διάρκεια της διαδικασίας. Η λύση των κυττάρων μπορεί να επιτευχθεί μηχανικά π.χ. με άλεση, κατάψυξη- απόψυξη ή με χρήση σφαιρών (Tsai and Olson, 1991; MacGregor et al., 1997; Hurt et al., 2001), ενζυμικά μέσω επώασης με ένζυμα που υδρολύουν συστατικά του κυτταρικού τοίχου και της κυτταρικής μεμβράνης (Holben et al., 1988; Smalla et al., 1993; Zhou et al., 1996), και/ή χημικά, με απορρυπαντικά που διαλυτοποιούν συστατικά της λιπιδικής μεμβράνης ή χαστροπικούς φορείς που διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες μετουσιώνοντας διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (Czomczynski and Sacchi, 1987; Pitcher et al., 1989; Moré et al., 1994; Zhou et al., 1996). Ο καθαρισμός που ακολουθεί γίνεται με ξέβγαλμα με οργανικά διαλύματα και απορρυπαντικά, όπως η φαινόλη, το χλωροφόρμιο, ή cetyl trimethylammonium bromide (Ogram et al., 1987; Stahl et al., 1988; Porebski et al., 1997), κατακρίμνιση με αιθανόλη, ισοπροπανόλη ή γλυκοπολυαιθυλένιο (Ogram et al., 1987; Stahl et al., 1988; Porebski et al., 1997), και με φιλτράρισμα μέσω κολώνων Silica, μαγνητικών σφαιριδίων, ιοντοανταλλακτικών ρινισμάτων ή τζελ (Zhou et al., 1996; Hurt et al., 2001; Arbeli and Fuentes, 2007; Zhao et al., 2008; Tanaka et al., 2009).

Πρώτο βήμα του πειραματικού μέρους ήταν η εκχύλιση του γενετικού υλικού (RNA) που έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Bioline. Πριν την έναρξη της διαδικασίας οι ιστοί βρίσκονται στην βαθειά ψύξη (-80 °C), σε eppendorf των 1,5ml. Αφού ξεπαγώσουν τα δείγματα ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα

1. Προσθήκη σε κάθε eppendorf 100 μl trisure και καταστροφή των κυττάρων του ιστού με χρήση pellet. Μετά την ομογενοποίηση των δειγμάτων, τα pellet ξεπλένονται με 50 μl trisure, οπότε κάθε eppendorf περιέχει συνολικά 150 μl trisure.
2. Επώαση των ιστών για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Vortex και επώαση για 5 λεπτά.
4. Φυγοκέντρηση στους 4 °C σε 12.000 RPM για 10 λεπτά ώστε να απομακρυνθούν τα κυτταρικά κατάλοιπα. Τα διαλύματα αποκτούν 3 φάσεις μια πράσινη οργανική φάση, μία ενδιάμεση και μία άχρωμη υδατινή φάση στην κορυφή που περιέχει το RNA. Μεταφορά του υπερκείμενου προσεκτικά σε νέο eppendorf των 1,5 ml.
5. Προσθήκη 15 μl BCP (1-Bromo-3-chloropropane) και συνεχόμενη ανάδευση για 15 sec.
6. Επώαση για 2-3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

7. Φυγοκέντρηση στους 4 °C 12.000g για 18 λεπτά. Μεταφορά της υδάτινης φάσης σε νέα erpendorf των 1,5 ml.
8. Προσθήκη ισοπροπανόλης 75 μl (500μl/ml Trisure) και 0,5 μl glycogen ακολουθεί ανάδευση και επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Φυγοκέντρηση στους 4 °C 12.000g για 30 λεπτά. Αφαίρεση του υπερκείμενου και ξέπλυμα του ιζήματος με 200 μl 75% αιθανόλης. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στους 4 °C σε 7.500g.
10. Απομάκρυνση του υπερκείμενου, ξέπλυμα του ιζήματος με 200 μl 75% αιθανόλη και φυγοκέντρηση στους 4 °C 12.000g για 5 λεπτά.
11. Το ίδιο βήμα επαναλαμβάνεται 2 ακόμη φορές.
12. Η αιθανόλη αφαιρείται μετά από στέγνωμα από τα erpendorf και επαναδιάλυση ιζήματος σε 15,2 μl RNase free νερό. Το RNA των δειγμάτων φυλάγεται στους -80 °C για μελλοντική χρήση.

3.4. Πέψη DNA

Το ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA) αντιπροσωπεύει έναν σημαντικό στόχο σε ένα πλατύ εύρος εργαστηριακών αναλύσεων. Για να ληφθούν σχετικά και αξιόπιστα αποτελέσματα, οι μοριακές τεχνικές χρειάζονται καθαρά και ανέγγιχτα μόρια RNA. Υπάρχουν πολλές τεχνικές για την απομόνωση μόνο μορίων RNA από ένα εκχύλισμα όπως χρήση φαινόλης: χλωροφορμίου και χρήση ένζυμων π.χ Dnase. (Vomelona, 2009).

Για να εξασφαλιστεί η καθαρότητα των δειγμάτων ώστε να περιέχουν μόνο RNA έγινε πέψη με DNase στα εκχυλισμένα δείγματα σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Ambion (TURBO DNA- free™ Kit). Μετά την μεταφορά των 15,2μl διαλυμάτων που περιέχει το RNA της προηγούμενης διαδικασίας για κάθε δείγμα σε tubes των 0,5ml, ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα.

1. Προσθήκη των υλικών του πίνακα σε κάθε tube:

Διάλυμα RNA	15,2 μl
Turbo Dnase buffer	1,8 μl
Turbo Dnase	0,5 μl
H ₂ O	0,5 μl
Τελικός όγκος	18 μl

2. Ήπια ανάδευση και επώαση για 25 λεπτά στους 37 °C.
3. Προσθήκη 2 μl Turbo Dnase inactivation Buffer και επώαση για 5 λεπτά με τακτό ανακάτεμα.

4. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 11.000 g για 2 λεπτά προκαλώντας τον σχηματισμό δύο φάσεων, μία περιέχει το inactivation Buffer και η άλλη (υπερκείμενο) περιέχει το καθαρό πλέον RNA.
5. Μεταφορά υπερκείμενου σε νέα eppendorf των 0,5 ml. Το RNA των δειγμάτων φυλάγεται στους -80 °C για μελλοντική χρήση.

3.5. Σύνθεση cDNA

Η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής κατά την οποία το RNA μετατρέπεται σε cDNA είναι απαραίτητη προκειμένου να ακολουθήσει Real-Time PCR για την ενίσχυση των γονιδίων που μας ενδιαφέρουν. Κατά την σύνθεση του cDNA το ένζυμο που χρησιμοποιείται είναι η αντίστροφη μεταγραφάση, μία RNA εξαρτώμενη DNA πολυμεράση που απομονώνεται συνήθως από ρετροϊούς. Η αντίστροφη μεταγραφάση χρησιμοποιεί RNA ως καλούπι και έναν κοντό συμπληρωματικό εκκινητή με το 3' άκρο του RNA για να συνθέσει μία αλυσίδα DNA.

Η διαδικασία της σύνθεσης cDNA ακολουθεί τα παρακάτω βήματα.

Υλικά	Ποσότητα
RNA	εξαρτάται από τη συγκέντρωση του RNA
Τυχαιοί εκκινητές	2 μL (600ng)

1. επώαση στους 70°C για 10min,
2. έπειτα στον πάγο για 5min
3. προετοιμασία master mix για κάθε αντίδραση

Υλικά	Ποσότητα
dNTPs	5 μL (2mM)
Buffer	10 (1X)
Αναστολέας ριβονουκλεασών	1 μL
Αντίστροφη μεταγραφάση	1 μL
ddH ₂ O	εξαρτάται από την ποσότητα του RNA
Τελικός όγκος	100 μL

- RNase Inhibitor, Murine: M0314L από NEW ENGLAND BioLabs
- M-MuLV Reverse Transcriptase: M0253L από NEW ENGLAND BioLabs

4. επώαση στους 42°C για 60min και
5. έπειτα στους 70°C για 10min

3.6. Real-Time PCR

Η ενίσχυση και ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων είναι οι πιο πολύτιμες τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην βιολογική έρευνα σήμερα. Στην συμβατική PCR, το ενισχυμένο προϊόν, ή απλικόνιο, ανιχνεύεται από μία τελική ανάλυση,

ηλεκτροφορώντας το DNA σε πήκτωμα αγαρόζης μετά το πέρας της PCR. Σε αντίθεση, η real-time PCR επιτρέπει στο ενισχυμένο προϊόν να ανιχνεύεται και να ποσοτικοποιείται καθώς γίνεται η αντίδραση, δηλαδή σε πραγματικό χρόνο.

Η πραγματικού χρόνου ανίχνευση των προϊόντων της PCR γίνεται εφικτή μέσω ενός φθορίζοντος μορίου που αναφέρει μία αύξηση στην ποσότητα του DNA με μία αξιόλογη αύξηση στο φθορίζον σήμα. Τα φθορίζοντα μόρια μπορεί να είναι χρωστικές που δεσμεύονται στο DNA και primers ή δορυφόροι που φέρουν φθορίζουσα ουσία. Για την μέτρηση του φθορισμού καθώς γίνεται η ενίσχυση χρησιμοποιούνται ειδικοί θερμικοί κυκλοποιητές οπλισμένοι με ανιχνευτές φθορισμού. Ο μετρημένος φθορισμός αντιπροσωπεύει την ποσότητα του ενισχυμένου προϊόντος σε κάθε κύκλο (Bio-rad Laboratories, 2006).

Για την μελέτη του επιπέδου της έκφρασης των γονιδίων που μας ενδιαφέρουν χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της Real-Time PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Applied Biosystems.

Πριν την έναρξη της διαδικασίας προετοιμάστηκε το εξής μίγμα για κάθε αντίδραση:

SYBR green	7,5 μl
Forward primer	0,6 μl
Reverse primer	0,6 μl
H₂O	1,3 μl

Κάθε αντίδραση περιέχει 5μl cDNA του δείγματος αραιωμένο κατά 10 φορές. Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνται εκκινητές ειδικοί για το κάθε γονίδιο (βλ. Πίνακας 1). Το μίγμα και το cDNA τοποθετούνται σε ειδικά στριπς με τελικό όγκο 15 μl μέσα σε ειδικό θερμικό κυκλοποιητή (CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System) στις εξής συνθήκες:

1 κύκλο	2 λεπτά στους 50 °C για hot start
1 κύκλο	3 λεπτά στους 95°C για την αποδιάταξη του cDNA
50 κύκλους	-10 δευτερόλεπτα στους 95 °C για την αποδιάταξη του cDNA. -20 δευτερόλεπτα στους 55 °C, για τον υβριδισμό των εκκινητών -30 δευτερόλεπτα στους 72 °C για την επιμήκυνση των κλώνων από την Taq πολυμεράση
1 κύκλο	-5 δευτερόλεπτα στους 55 °C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων -50 δευτερόλεπτα στους 95 °C για την αποδιάταξη του cDNA.

Μαζί με τα δείγματα χρησιμοποιήθηκε και cDNA με ενισχυμένο το γονίδιο GAPDH το οποίο λειτούργησε ως *interrun* με σκοπό την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Για την λειτουργική ανάλυση των γονιδίων τα αποτελέσματα των αντιδράσεων της Real-Time PCR επεξεργάζονται και ομαδοποιούνται με την βοήθεια του προγράμματος Bio-Rad CFX Manager. Κάθε Gene study περιέχει τα αποτελέσματα της Real-Time PCR ενός γονιδίου και αποτελέσματα Real-Time PCR γονιδίου αναφοράς το οποίο εξαρτάται από τον ιστό τον οποίο έχει απομονωθεί το γονίδιο που μελετήθηκε. Τα γονίδια αναφοράς για το κεφάλι είναι το 14-3-3 zeta, για τις ωοθήκες το Tbr και για τους όρχεις το TBA1. Τα αποτελέσματα Real-Time PCR των γονιδίων αναφοράς είχαν βρεθεί από συνάδελφο του εργαστηρίου. Μέσω της διαδικασίας αυτής δίνεται η ικανότητα σύγκρισης των επίπεδων έκφρασης των γονιδίων στους ιστούς των στελεχών Vienna8 και 56S,2.

4.Αποτελέσματα

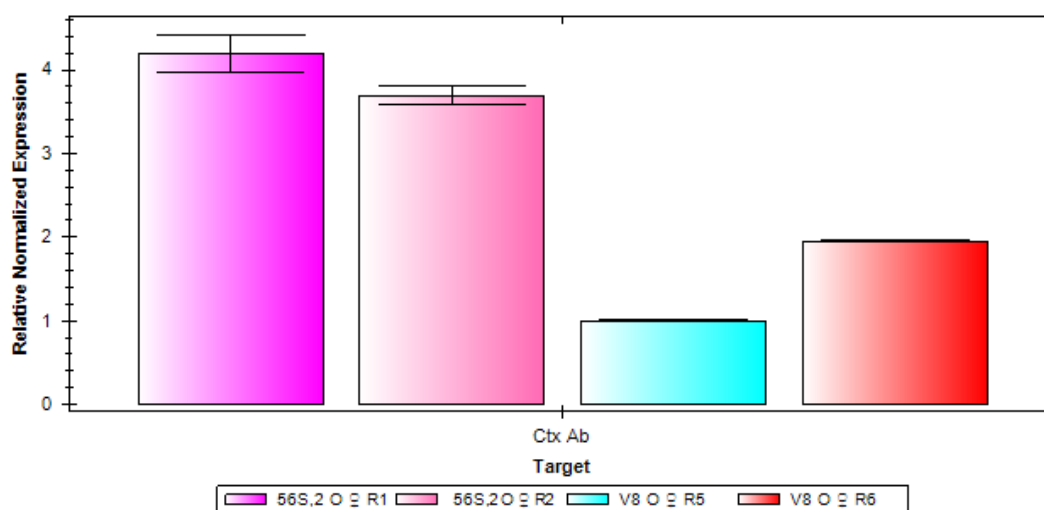
Μετά την Real-time PCR των δειγμάτων μας ακολούθησε Gene study για την λειτουργική ανάλυση των γονιδίων μας που επηρεάζονται από την παρουσία του ενδοσυμβιώτη *Wolbachia* στην μεσογειακή μύγα *Ceratitis Capitata*.

Ιστοί	Γονίδια
Ωοθήκες	Ceratotoxin A (CTXA)
Όρχεις	IGF1R, Trypsin-like, Succinate dehydrogenase B (SdhB)
Κεφάλια	Attacin-B-like (AttB), PGSB1, Serine-pyruvate aminotransferase, XLOC_017362, Maltase A3-like, Larval cuticle protein 5-like, XLOC_021396, Cecropin 1(Cec1)

Τα αποτελέσματα παρίστανται στα παρακάτω διαγράμματα για κάθε γονίδιο ξεχωριστά, αλλά και για κάθε ιστό ξεχωριστά.

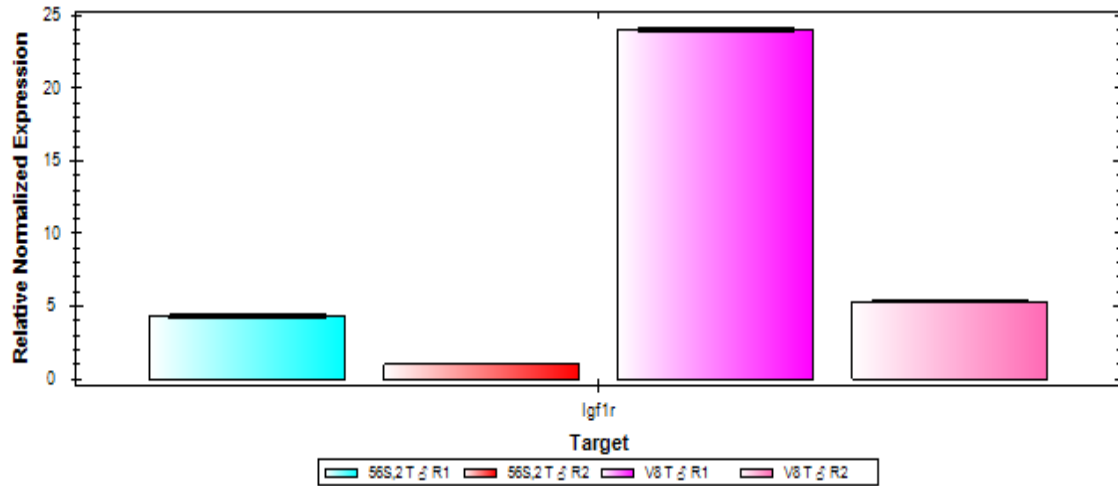
4.1.Γονίδια ωοθηκών

Για το γονίδιο CTXA: Στα στελέχη 56S,2 παρατηρήθηκε υψηλότερη έκφραση σε σχέση με τα στελέχη Vienna8.

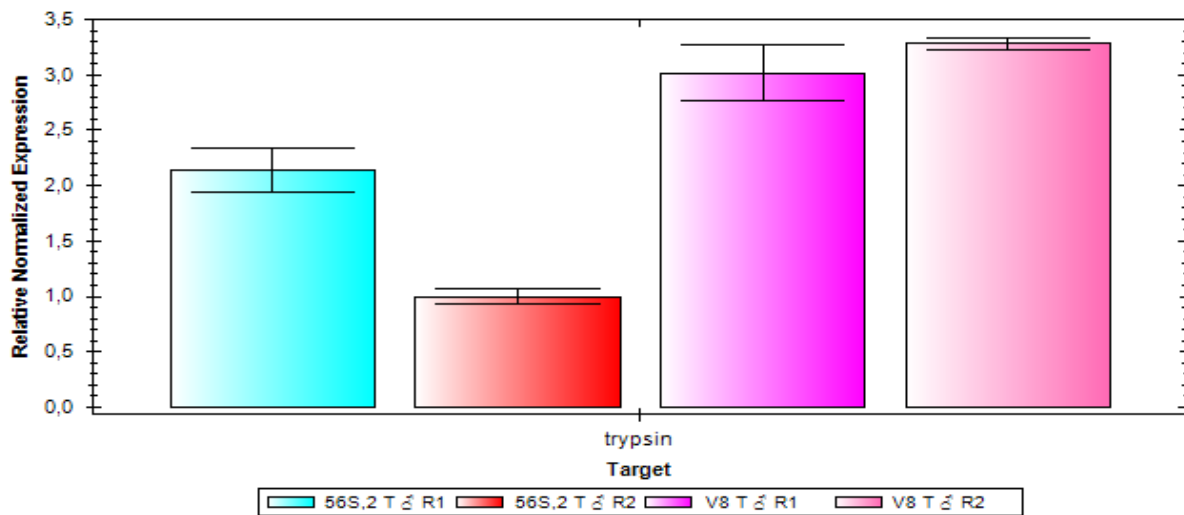


4.2. Γονίδια όρχεων

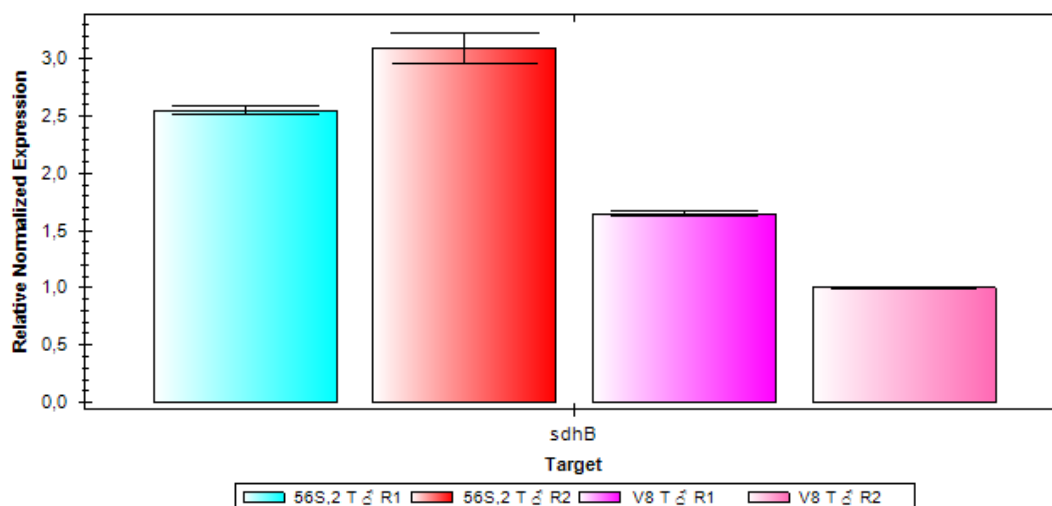
Για το γονίδιο IGF1R: Στα στελέχη 56S,2 παρατηρήθηκε χαμηλότερη έκφραση σε σχέση με τα στελέχη Vienna8.



Για το γονίδιο Trypsin: Στα στελέχη 56S,2 παρατηρήθηκε χαμηλότερη έκφραση σε σχέση με τα στελέχη Vienna8.

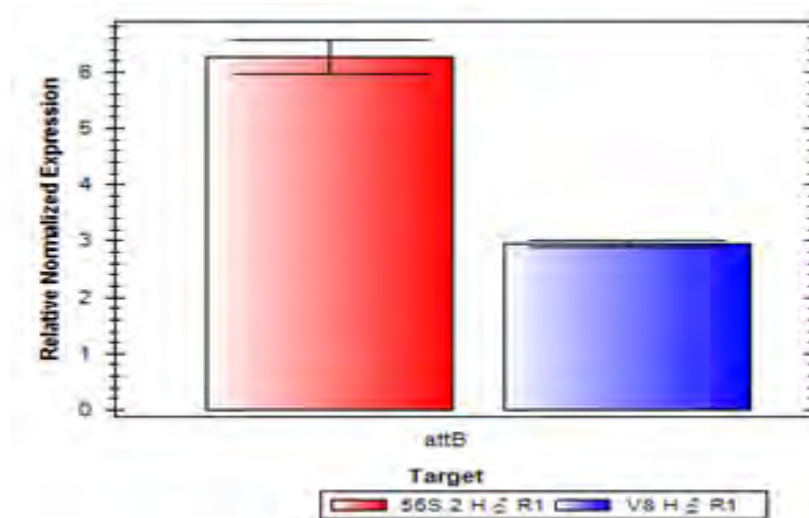


Για το γονίδιο Sdh B: Στα στελέχη 56S,2 παρατηρήθηκε υψηλότερη έκφραση σε σχέση με τα στελέχη Vienna8.

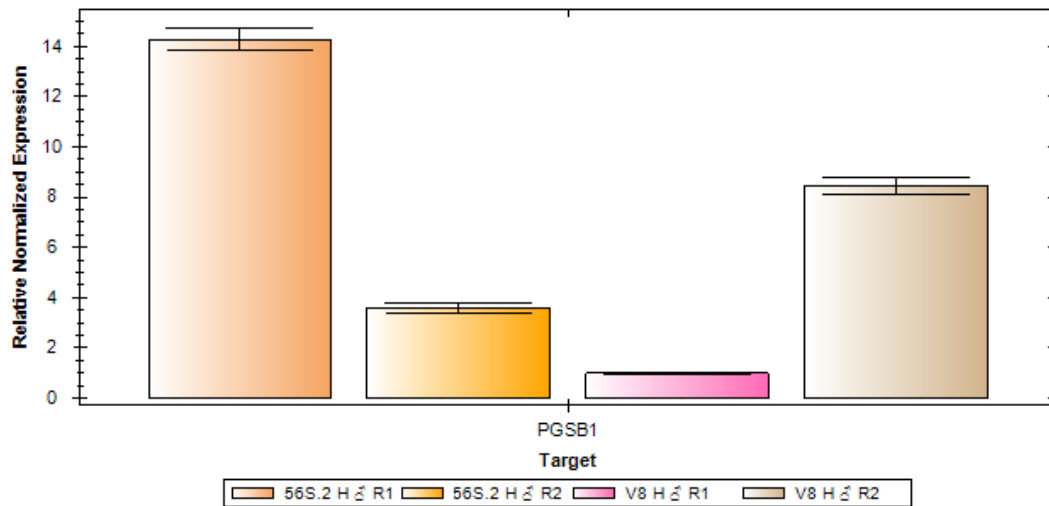


4.3 Γονίδια κεφαλιού

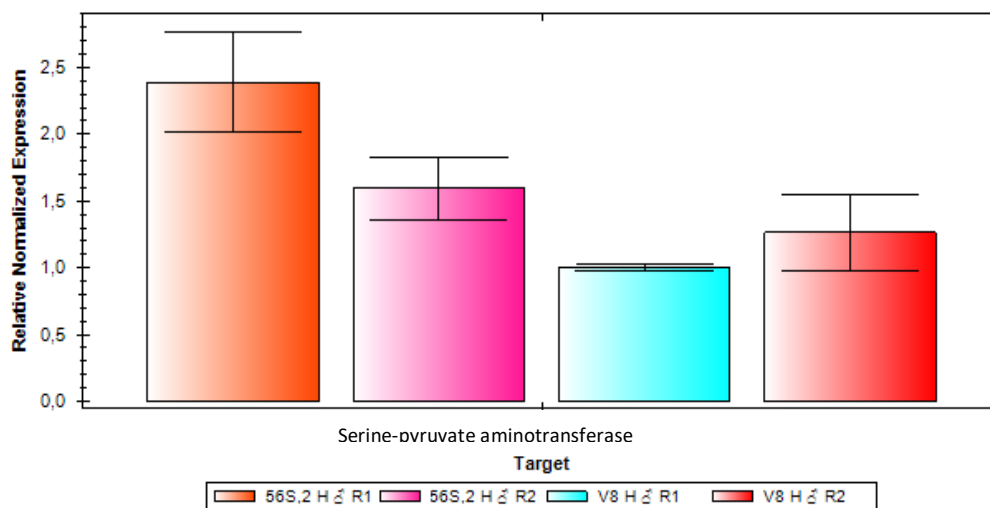
Για το γονίδιο attacin B: Στα στελέχη 56S,2 παρατηρήθηκε υψηλότερη έκφραση σε σχέση με τα στελέχη Vienna8.



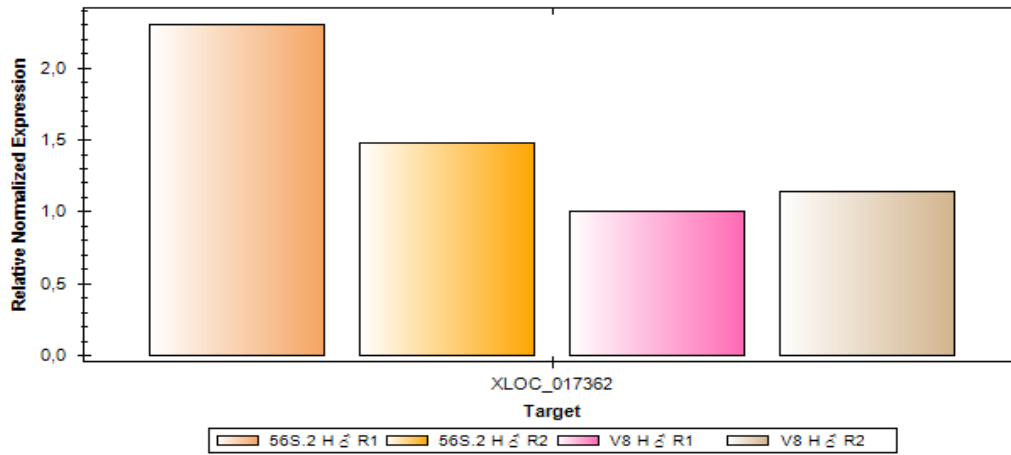
Για το γονίδιο PGSB1: Στα στελέχη 56S,2 παρατηρήθηκε υψηλότερη έκφραση σε σχέση με τα στελέχη Vienna8.



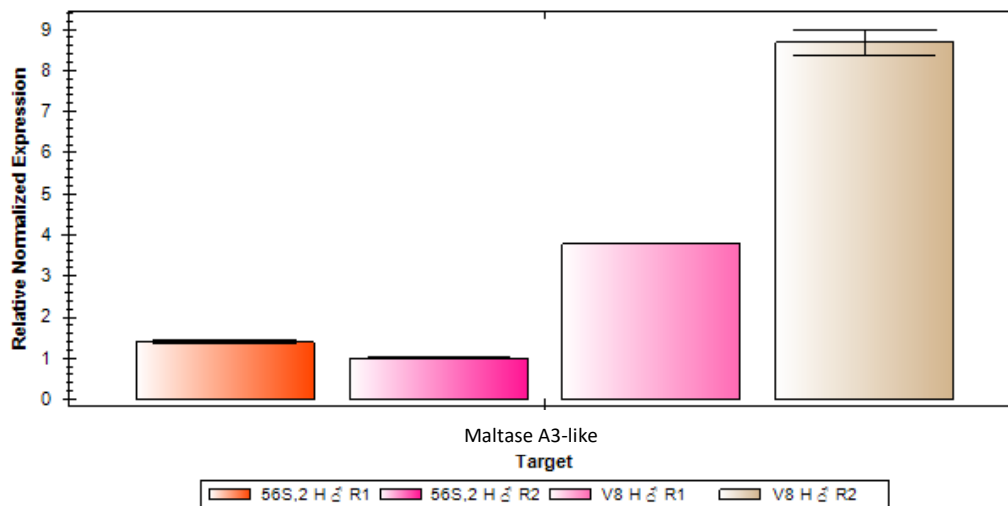
Για το γονίδιο Serine-pyruvate aminotransferase: Στα στελέχη 56S,2 παρατηρήθηκε υψηλότερη έκφραση σε σχέση με τα στελέχη Vienna8.



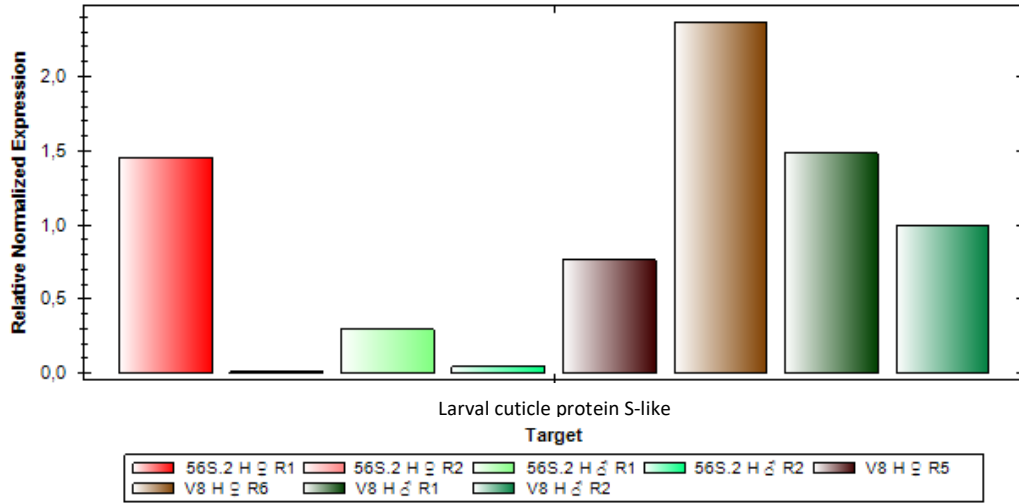
Για το γονίδιο XLOC_017362: Στα στελέχη 56S,2 παρατηρήθηκε υψηλότερη έκφραση σε σχέση με τα στελέχη Vienna8.



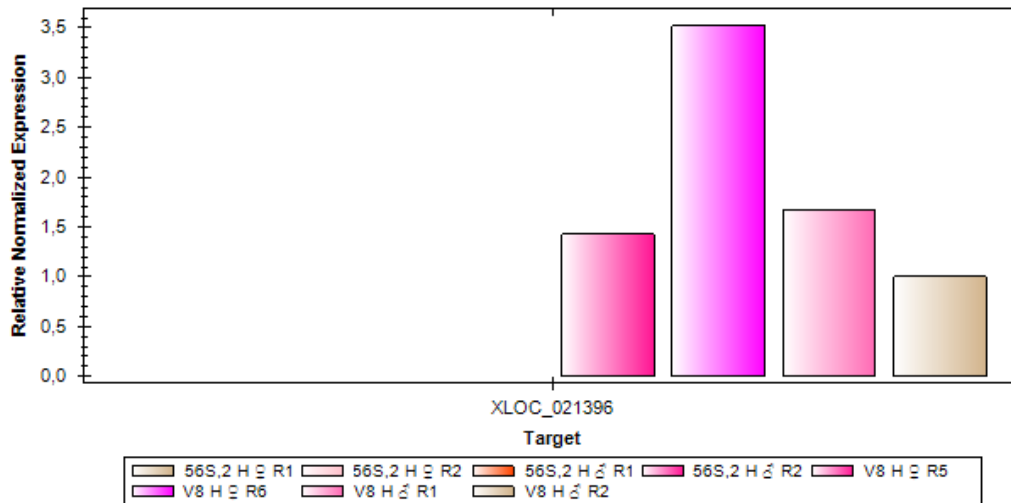
Για το γονίδιο Maltase A3-like: Στα στελέχη 56S,2 παρατηρήθηκε χαμηλότερη έκφραση σε σχέση με τα στελέχη Vienna8.



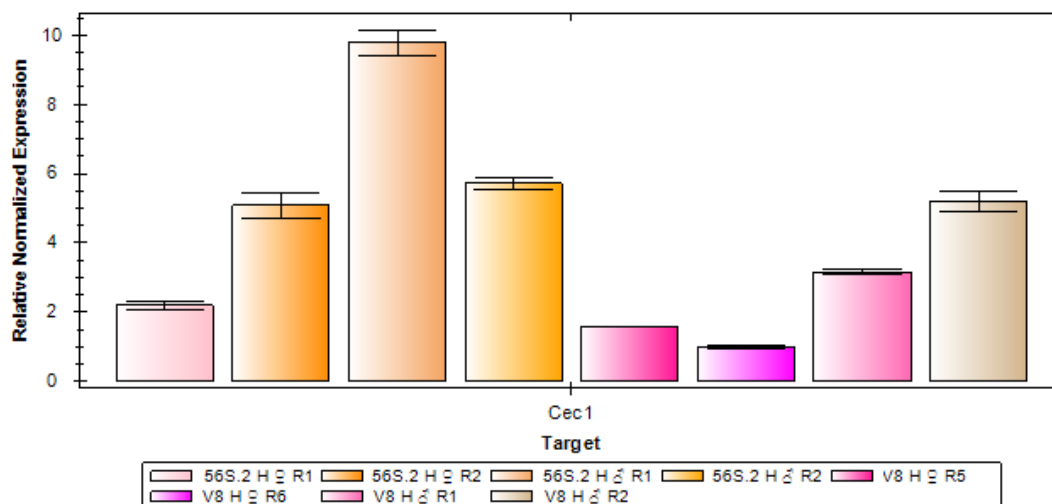
Για το γονίδιο Larval cuticle protein S-like: Στα στελέχη 56S,2 παρατηρήθηκε χαμηλότερη έκφραση σε σχέση με τα στελέχη Vienna8.



Για το γονίδιο XLOC_021396: Στα στελέχη 56S,2 δεν παρατηρήθηκε έκφραση ενώ παρατηρήθηκε στα στελέχη Vienna8.



Για το γονίδιο Cecropin 1: Στα στελέχη 56S,2 παρατηρήθηκε υψηλότερη έκφραση σε σχέση με τα στελέχη Vienna8.



Στον παρακάτω πίνακα βρίσκονται συγκεντρωμένα τα προηγούμενα αποτελέσματα όπου δίνεται και ο \log_2 της διαφοράς των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων.

Ιστός (up-regulated)	Γονίδιο	Μέση τιμή Vienna8	Μέση τιμή 56S,2	$\log_2(\text{fold_change})$
Ωοθήκες	CTXA	1.47485	3.94154	1.41819
Όρχεις	SdhB	1.32409	2.82315	1.09231
Κεφάλι αρσενικά	AttB	2.96039	6.26008	1.08039
	PGSB1	4.72251	8.93651	0.92016
	serine--pyruvate aminotransferase	1.13155	1.99324	0.81682
	XLOC_017362	1.06919	1.89083	0.82250
Κεφάλι θηλικά	Cec1	4.17744	7.77201	0.89567
	Cec1	1.28792	3.63515	1.49698
Ιστός (down-regulated)	Γονίδιο	Μέση τιμή Vienna8	Μέση τιμή 56S,2	$\log_2(\text{fold_change})$
Ωοθήκες	-	-	-	-
Όρχεις	IGF1R	14.65357	2.648	-2.46828
	Trypsin-like	3.14757	1.569225	-1.00419
Κεφάλι αρσενικά	Maltase A3-like	6.23427	1.19872	-2.37872
	larval cuticle protein 5-like	1.24239	0.16963	-2.87265
	XLOC_021396	1.33608	-	-
Κεφάλι θηλικά	larval cuticle protein 5-like	1.56311	0.73445	-1.08968
	XLOC_021396	2.47218	-	-

5. Συζήτηση

Η μεσογειακή μύγα *Ceratitis capitata* ευθύνεται για τις καταστροφές ενός μεγάλου ποσοστού καλλιεργειών πολλών ειδών φρούτων καθώς η απόθεση των αυγών τους γίνεται στην επιφάνεια των φρούτων. Η διεργασία αυτή μειώνει την ποιότητα των φρούτων καθώς αυτά σαπίζουν. Για την αντιμετώπιση της γρήγορης και καταστροφικής της εξάπλωσης έχουν στρατολογηθεί αρκετές μέθοδοι για τον πληθυσμιακό έλεγχο του εντόμου αυτού, όπως τα εντομοκτόνα, η μαζική παγίδευση, η απολύμανση των εξαγωγίμων φρούτων, η SIT και η IIT.

Η IIT αποτελεί την μέθοδο που τώρα τελευταία έχει κινήσει το ενδιαφέρον των ερευνητών καθώς βασίζεται στον έλεγχο του πληθυσμού του εντόμου μέσω της διαδικασίας της CI που προκύπτει από την αλληλεπίδραση του εντόμου με τον ενδοσυμβιώτη *Wolbachia*. Η μόλυνση με *Wolbachia* φαίνεται να επιδρά στην έκφραση πολλών γονιδίων του εντόμου, περιλαμβανομένων και του ανοσοποιητικού. Ο μηχανισμός με τον οποίο γίνεται η CI δεν έχει ακόμη διαλευκανθεί και σε συνδυασμό με την οικονομική σημασία που προκύπτει από τον πληθυσμιακό έλεγχο της *Ceratitis capitata* μέσω της εκμετάλλευσης των επιδράσεων της *Wolbachia*, είναι αναγκαία η μελέτη των επιδράσεων αυτών.

Στην παρούσα μελέτη επιλέξαμε έναν αριθμό γονιδίων της μεσογειακής μύγας τα οποία είχαν ανιχνευτεί και ταυτοποιηθεί σε προηγούμενες τρανσκριπτομικές αναλύσεις μολυσμένων με *Wolbachia* ιστών της μύγας. Οι ιστοί που μελετήθηκαν ήταν το κεφάλι, οι όρχεις και οι ωοθήκες. Για την λειτουργική μελέτη των γονιδίων που προέκυψαν από την τρανσκριπτομική ανάλυση, χρησιμοποιήθηκαν αυτοί οι ιστοί από δύο διαφορετικά στελέχη της *Ceratitis capitata* το στέλεχος Vienna8 το οποίο δεν ήταν μολυσμένο από *Wolbachia* και το στέλεχος 56S,2 που ήταν μολυσμένο με *Wolbachia*. Από τα γονίδια που μελετήθηκαν αρκετά ανήκουν σε διεργασίες του ανοσοποιητικού συστήματος, φανερώνοντας ότι η *Wolbachia* επιδρά στην ανοσολογική απόκριση του οργανισμού.

Όσον αφορά τα γονίδια τα οποία εμφάνισαν μεγαλύτερη έκφραση στα στελέχη που ήταν μολυσμένα με *Wolbachia* αυτά ήταν η Ceratotoxin-A-like στις ωοθήκες, succinate dehydrogenase (Sdh B) στους όρχεις ενώ στο κεφάλι serine pyruvate aminotransferase, attacin-B-like, peptidoglycan-recognition protein SB1-like, XLOC_017362 και cecropin-1-like.

Η Ceratotoxin-A-like είναι ένα αντιμικροβιακό πεπτίδιο το οποίο εκφράζεται ειδικά στα θηλυκά άτομα της *Ceratitis capitata* και συγκεκριμένα στους αναπαραγωγικούς ιστούς της. Η έκφρασή τους όμως δεν επάγεται από βακτηριακή μόλυνση όπως συμβαίνει με τα περισσότερα αντιμικροβιακά πεπτίδια, αλλά επάγεται από την νεανική ορμόνη η οποία εκκρίνεται μόλις επιτευχθεί η σεξουαλική ωριμότητα του εντόμου. Ο ρόλος της είναι να προστατεύει την θηλυκή αναπαραγωγική οδό από βακτηριακή μόλυνση κατά το ζευγάρωμα και να

προστατεύει τα έμβρυα και τις προνύμφες στα πρώιμα στάδια από τα βακτήρια του περιβάλλοντος (Marchini et al, 1995,1997,2002; Manetti et al, 1997). Κρίνοντας από τα παραπάνω θα μπορούσε κανείς να πει, ότι η *Wolbachia* κάνει τον ξενιστή της να εκφράζει το πεπτιδίο αυτό σε μεγαλύτερο βαθμό σε σύγκριση με μη μολυσμένα στελέχη της *Ceratitidis capitata* με σκοπό να αυξήσει τις πιθανότητες επιβίωσης των εμβρύων, μειώνοντας τις πιθανότητες μόλυνσης τους από άλλα βακτήρια τα οποία θα ανταγωνίζονταν την *Wolbachia* ή θα σκότωναν τα έμβρυα.

Το Sdh B (αφυδρογονάση σουκινικού, υπομονάδα B) είναι μία σιδηρο-πρωτεΐνη και συγκεκριμένα υπομονάδα του μεμβρανικού συμπλέγματος II της αναπνευστικής αλυσίδας του μιτοχονδρίου. Είναι υπεύθυνο για την μεταφορά ηλεκτρονίων από το σουκινικό στο συνένζυμο Q. Επίσης συμμετέχει στον κύκλο του Krebs μετατρέποντας το σουκινικό σε φουμαρικό, παίζοντας σημαντικό ρόλο στην επιβίωση όλων των κυττάρων που χρησιμοποιούν το οξυγόνο ως μέρος της κυτταρικής αναπνοής. Η αυξημένη έκφραση του Sdh B μάλλον προκαλείται για την κάλυψη των αναγκών της *Wolbachia*, η οποία ως ενδοσυμβιώτης χρησιμοποιεί τους μηχανισμούς του ξενιστή της.

Η αμινοτρανσφεράση σερίνης—πυροσταφυλικού serine (pyruvate aminotransferase) είναι μία αμινοτρανσφεράση η οποία καταλύει τις εξής αντιδράσεις:

L-alanine + glyoxylate → pyruvate + glycine και

L-serine + pyruvate → 3-hydroxypyruvate + L-alanine.

Η αυξημένη έκφραση του ενζύμου αυτού στα 56S,2 στελέχη μας οδηγεί στην υπόθεση ότι η *Wolbachia* προσπαθεί να καλύψει τις λειτουργικές τις ανάγκες.

Η attacin-B-like είναι αντιμικροβιακό πεπτιδίο πλούσιο σε γλυκίνη το οποίο επάγεται από το IMD μονοπάτι του ανοσοποιητικού συστήματος κατά την μόλυνση από Gram αρνητικά βακτήρια. Η *Wolbachia* αποτελεί gram αρνητικό βακτήριο και ίσως οι πεπτιδογλυκάνες της αναγνωρίζονται από τα PGRP, κάτι αρκετά πιθανό καθώς αποτελεί πρόσφατο ενδοσυμβιώτη για το έντομο, προκαλώντας ανοσολογική απόκριση (Eleftherianos et al,2013). Η αυξημένη έκφραση της attacin-B-like στα 56S,2 στελέχη μπορεί να ευνοεί τον έλεγχο του πληθυσμού της *Wolbachia* και την προστασία του εντόμου από μολύνσεις gram αρνητικών βακτηρίων.

Η πρωτεΐνη αναγνώρισης πεπτιδογλυκάνης SB1-like (peptidoglycan-recognition protein SB1-like) ανήκει στην οικογένεια των PGRP είναι μία πρωτεΐνη που αναγνωρίζει πεπτιδογλυκάνες που βρίσκονται στην επιφάνεια των gram αρνητικών βακτηρίων. Η αναγνώριση των πεπτιδογλυκάνων από την πρωτεΐνη αυτή ενεργοποιεί το IMD μονοπάτι το οποίο με την σειρά του επάγει την έκφραση ειδικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων για τα gram αρνητικά βακτήρια. Η αυξημένη έκφρασή τους η οποία προκαλείται από την παρουσία της *Wolbachia* οδηγεί στην αύξηση της άμυνας του οργανισμού σε gram αρνητικά βακτήρια.

Για τον γονιδιακό τόπο XLOC_017362 δεν υπάρχουν ακόμη πληροφορίες καθώς δεν έχει αναγνωρισθεί και δεν υπήρχε ομόλογό του στο γονιδίωμα της *Drosophila melanogaster*.

Η cecropin-1-like είναι α-ελικοειδές αντιμικροβιακό πεπτίδιο το οποίο επάγεται από το ανοσοποιητικό σύστημα και δρα έναντι gram αρνητικών και θετικών βακτηρίων αλλά και έναντι μυκήτων. Τα στελέχη 56S,2 έχουν μεγαλύτερη έκφραση του πεπτιδίου αυτού σε σχέση με τα στελέχη Vienna8 το οποίο μας οδηγεί στην υπόθεση ότι η *Wolbachia* επιδρά στην αύξηση της άμυνας του οργανισμού έναντι άλλων μικροοργανισμών.

Όσον αφορά τα γονίδια τα οποία εμφάνισαν μικρότερη έκφραση στα στελέχη που ήταν μολυσμένα με *Wolbachia* αυτά ήταν στους όρχεις trypsin-like, insulin-like growth factor 1 receptor, στο κεφάλι maltase A3, larval cuticle protein 5-like, XLOC_021396.

Η trypsin-like είναι πρωτεάση σερίνης, η οποία εκκρίνεται κυρίως στο στομάχι ως πεπτικό ένζυμο. Όμως παράγεται και στους αναπαραγωγικούς ιστούς των αρσενικών και παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση τριών αναπαραγωγικών συμβάντων: έναρξη της μείωσης, σπερματογένεση και γονιμοποίηση (Chiemi Miura et al,2009). Τα στελέχη που είναι μολυσμένα με *Wolbachia* εκφράζουν την πρωτεάση αυτή σε μικρότερα επίπεδα γεγονός το οποίο θα μπορούσε να δημιουργήσει προβλήματα κατά την σύζευξη των γαμετών. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το ένζυμο αυτό πιθανόν εμπλέκεται στον μηχανισμό της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας.

Ο υποδοχέας της ινσουλίνης-like αυξητικού παράγοντα 1 (insulin-like growth factor 1 receptor) παίζει σημαντικό ρόλο στην αύξηση και την ανάπτυξη όλων των κυττάρων των εντόμων. Ο insulin-like growth factor 1 receptor παίζει ακόμη ρόλο και στην αναπαραγωγική επίδοση. Τα στελέχη 56S,2 παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση του υποδοχέα αυτού, ο οποίος ίσως εμπλέκεται στον μηχανισμό της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας καθώς αλληλεπιδρά και με την trypsin-like η οποία και τον ενεργοποιεί μέσω φωσφορυλίωσης της β-υπομονάδας του υποδοχέα (Chiemi Miura et al,2009).

Η maltase A3 είναι μία γλυκοσυλο-υδρολάση η οποία μετατρέπει την μαλτόζη σε γλυκόζη και προκαλεί παρόμοιο κόψιμο σε πολλές άλλες γλυκοσιδάσες. Η μείωση της έκφρασης της maltase A3 στα στελέχη 56S,2 ίσως προκαλείται από την *Wolbachia* ώστε να καλύψει τις διατροφικές της ανάγκες σε μαλτόζη ή μπορεί να αντικαθιστά τον μηχανισμό του ξενιστή της με τον δικό της μηχανισμό οποίος να είναι και πιο αποτελεσματικός (Combe et al, 2014).

Η πρωτεΐνη της προνυμφικής πρωτεΐνης 5-like (larval cuticle protein 5-like) είναι κύριο συστατικό της επιδερμίδας του εντόμου, όπως και οι άλλες πρωτεΐνες της οικογενείας. Παρότι πολλά γονίδια έχουν αναγνωρισθεί, παραμένουν άγνωστες οι λειτουργίες τους στην διατήρηση του σχήματος του σώματος του εντόμου και στην

προσαρμοστικότητα του εντόμου. Επίσης βοηθάει στον σχηματισμό του εξωτερικού φραγμού καθώς δεσμεύει χιτίνη η οποία περιβάλλει το έντομο και το προστατεύει από τους μικροοργανισμούς του περιβάλλοντος (Qiao et al,2014). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η πρωτεΐνη αυτή εμφανίζει χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης στους ιστούς του κεφαλιού των στελεχών 56S,2 σε σχέση με τα Vienna8, ο σκοπός για τον οποίο παρατηρείται αυτή η διαφορά δεν έχει διευκρινιστεί.

Για τον γονιδιακό τύπο XLOC_021396 δεν υπάρχουν ακόμη πληροφορίες καθώς δεν έχει αναγνωριστεί και δεν υπήρχε ομόλογό του στο γονιδίωμα της *Drosophila melanogaster*.

Συμπεράσματα

Τέλος από τα παραπάνω διαπιστώνουμε ότι ο ενδοσυμβιώτης *Wolbachia* επιδρά στον ξενιστή του *Ceratitidis capitata* αλλάζοντας τα επίπεδα έκφρασης αρκετών γονιδίων τα οποία εμπλέκονται σε ένα εύρος διαδικασιών. Η *Wolbachia* επιδρά στο ανοσοποιητικό του εντόμου αυξάνοντας την ικανότητα του να αμύνεται σε εισβολές άλλων μικροοργανισμών, με τέτοιο τρόπο ώστε να μπορεί να αντιμετωπίσει τυχόν ανταγωνισμό μέσα στο έντομο και να εδραιώσει την κυριαρχία της. Επίσης η *Wolbachia* επιδρά σε αρκετά μεταβολικά μονοπάτια του εντόμου με σκοπό να καλύψει τις κυτταρικές της ανάγκες.

Όλες αυτές οι επιδράσεις της *Wolbachia* στην *Ceratitidis capitata* προσφέρουν πλεονεκτήματα στο έντομο, σε σχέση με έντομα που δεν είναι μολυσμένα με τον ενδοσυμβιώτη, καθώς εμφανίζουν αυξημένη άμυνα έναντι μικροοργανισμών και μεγαλύτερες πιθανότητες επιβίωσης λόγω των τροποποιημένων επιπέδων έκφρασης αρκετών γονιδίων τους.

Επιπλέον έρευνες στο πεδίο αυτό, ίσως μας βοηθήσουν να κατανοήσουμε τις πολύπλοκες επιδράσεις της *Wolbachia* στην *Ceratitidis capitata* όπως και τον μηχανισμό κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας και να βοηθήσουν μαζί με την έρευνα αυτή στην ανάπτυξη τεχνικών όπως της IPT. Η ανάγκη για την ανάπτυξη τέτοιων τεχνικών είναι σημαντική στην εποχή μας, καθώς έντομα όπως η *Ceratitidis capitata* αποδεκατίζουν την αγροτική οικονομία μέσω της καταστροφής των φρούτων και καρπών σε χώρες όπως και η Ελλάδα, οι οποίες βασίζουν ένα μεγάλο μέρος της οικονομίας τους στην αγροτική παραγωγή. Μέσω των επιδράσεων της *Wolbachia* σε έντομα όπως και η μεσογειακή μύγα εκτός του πληθυσμιακού ελέγχου που επιτυγχάνεται από την διαδικασία της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας, οι αυξημένες πιθανότητες επιβίωσης που προσφέρει ο ενδοσυμβιώτης στον ξενιστή της καθιστούν τα απελευθερωμένα μολυσμένα αρσενικά πιο ανταγωνιστικά από τα αρσενικά του φυσικού πληθυσμού. Το αποτέλεσμα είναι πιο αποδοτικός πληθυσμιακός έλεγχος, που οδηγεί σε μειωμένο κόστος για την αντιμετώπιση των εντόμων καθώς έχουμε χρήση λιγότερων χημικών.

6.Βιβλιογραφία

1. *Immaculada E.P.M., 2010. Biology Studies and Improvement of Ceratitis capitata (Wiedemann) Mass Trapping Control Technique. Ph.D Thesis, University de Lleida.*
2. *Fletcher B.S. (1989). Life history strategies of tephritid fruit flies. In World Crop Pests. Fruit Flies. Their biology, natural enemies and control, Volume 3B, pp. 195-206, Elsevier: Amsterdam & New York.*
3. *Liquido, N. J., L. A. Shinoda, and R. T. Cunningham. 1991. Pp. 1863–1878. Host plants of the Mediterranean fruit fly (Diptera, Tephritidae) an annotated world review. Miscellaneous Publications 77. Entomological Society of America, Lanham, MD.*
4. *Nimertis and Oikonomou, 2006. Natural population analysis of C.Capitata. University of Patra.*
5. *Haniotakis G., Kozyakis T., Fitsakis T. and Antonidaki A. (1991). An effective mass trapping method for the control of Dacus oleae (Diptera: Tephritidae). J. Econ. Entomol. 84-(2): 564-569.*
6. *Mansour and Franz G. (1996). A rapid test for distinguishing irradiated from unirradiated Mediterranean fruit-fly, Ceratitis capitata, larvae. In: Fruit fly pests: a world assessment of their biology and management. Bruce A. McPheron, Gary J. Steck (eds). St. Lucie Press. pp. 505-510.*
7. *Robinson A.S. (2002) Genetic sexing strains in medfly, Ceratitis capitata, sterile insect technique programmes. Genetica 116: 5-13.*
8. *Hendrichs J., Franz G. and Rendon P. (1995). Increased effectiveness and applicability of the sterile insect technique through male-only releases for control of Mediterranean fruit flies during fruiting season. J. Appl. Entomol. 119: 371-377.*
9. *Bushland R.C., D.E. Hopkins, Experiments with screw-worm flies sterilized by Xrays (1951), J. Econ. Entomol. 44 725-731.*
10. *Lindquist A.W., (1955) The use of gamma for control or eradication of the screwworm, J.Econ.Entomol., 48: 467-469.*
11. *Runner G.A. (1916) Effects of roentgen rays on the tobacco or cigarette beetle and the results of an experiement with a new roentgen tube, J.Agric. Res. 6: 383-388.*
12. *Muller H.J., Artificial transmutation of the gene, Science 66 (1927) 84-88.*
13. *Tan K.H. Area-wide Control of Fruit Flies and other Insect Pests, Penerbit University Sains Malaysia, Pulau Pinang, 2000, p.782.*
14. *Zabalou(2009) Incompatible insect technique: incompatible males from a Ceratitis capitata genetic sexing strain.*

15. Laven H (1967) Eradication of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmic incompatibility. *Nature* 216: 383–384.
16. Brower JH (1979) Suppression of laboratory populations of *Ephestia cautella* (Walker) (Lepidoptera, Pyralidae) by release of males with cytoplasmic incompatibility. *Journal of Stored Products Research* 15: 1–4.
17. Brower JH (1980) Reduction of almond moth (Lepidoptera, Pyralidae) populations in simulated storages by the release of genetically incompatible males. *Journal of Economic Entomology* 73: 415–418.
18. Blümel S & Russ K (1989) Manipulation of races. Fruit flies, Their Biology, Natural Enemies and Control. *World Crop Pests 3B* (ed. by AS Robinson & G Hooper), pp. 387–389. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
19. Beard CB, O'Neill SL, Tesh RB, Richards FF & Aksoy S (1993) Modification of arthropod vector competence via symbiotic bacteria. *Parasitology Today* 9: 179–183.
20. Bourtzis K & O'Neill SL (1998) *Wolbachia* infections and their influence on arthropod reproduction. *BioScience* 48: 287–293.
21. O'Neill SL, Hoffmann AA & Werren JH (1997) *Influential Passengers: Inherited Microorganisms and Arthropod Reproduction*. Oxford University Press, Oxford, UK.
22. Stouthamer R, Breeuwer JAJ & Hurst GDD (1999) *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annual Review of Microbiology* 53: 71–102.
23. Stevens L, Giordano R & Fialho RF (2001) Male-killing, nematode infections, bacteriophage infection, and virulence of cytoplasmic bacteria in the genus *Wolbachia*. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 32: 519–545.
24. Min KT, Benzer S. *Wolbachia*, normally symbiont of *wolbachia*, can be virulent, causing degeneration and death. *Proc Natl Acad and sci USA* 1997; 94: 10792 – 10796.
25. Bourtzis (2008) *Wolbachia* based- technologies for Insect Pest population control. *Transgenesis and the management of Vector-Borne Disease*, edited by Serap Aksoy.
26. Weeks AR, Turelli M, Harcombe WR, Reynolds KT & Hoffmann AA (2007) From parasite to mutualist: rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila*. *PLoS Biology* 5: e114.
27. Bourtzis K & Robinson AS (2006) Insect pest control using *Wolbachia* and/or radiation. *Insect Symbiosis 2* (ed. by K Bourtzis & T Miller), pp. 225–246. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
28. Bourtzis K, Braig HR & Karr TL (2003) Cytoplasmic incompatibility. *Insect Symbiosis* (ed. by K Bourtzis & T Miller), pp. 217–246. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
29. Tram U, Ferree PA & Sullivan W (2003) Identification of *Wolbachia*- host interacting factors through cytological analysis. *Microbes and Infection* 5: 999–1011.

30. Callaini G, Dallai R, Riparbelli MG (1997) *Wolbachia-induced delay of paternal chromatin condensation does not prevent maternal chromosomes from entering anaphase in incompatible crosses of Drosophila simulans*. *J Cell Sci* 110: 271–280.
31. Tram U, Fredrick K, Werren JH, Sullivan W (2006) *Paternal chromosome segregation during the first mitotic division determines Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility phenotype*. *J Cell Sci* 119: 3655–3663.
32. Ya Zheng , Pan-Pan Ren , Jia-Lin Wang, Yu-Feng Wang (2011) *Wolbachia-Induced Cytoplasmic Incompatibility Is Associated with Decreased Hira Expression in Male Drosophila* PLoS ONE 6(4): e19512. doi:10.1371/journal.pone.0019512
33. Landmann F, Orsi GA, Loppin B, Sullivan W (2009) *Wolbachia-Mediated Cytoplasmic Incompatibility Is Associated with Impaired Histone Deposition in the Male Pronucleus*. *PLoS Pathog* 5(3): e1000343. doi:10.1371/journal.ppat.1000343
34. Zabalou S, Riegler M, Theodorakopoulou M, Stauffer C, Savakis C & Bourtzis K (2004) *Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101: 15042–15045.
35. Robinson S.A. (1999) *Genetic sexing strains in the medfly, Ceratitis capitata: development, mass rearing and field application*, *Trends Entomol.* 2: 81-104.
36. Willhoeft U., Franz G. and McInnis D.O. (1996). *Towards the application of Genetic Sexing in Tephritid Fruit fly SIT programs*. In: *Fruit fly pests: a world assessment of their biology and management*. Bruce A. McPheron, Gary J. Steck (eds). St.Lucie Press. pp. 179-184.
37. Radu M., Rossler Y. and Koltin Y. (1975). *The chromosome of the Mediterranean fruit fly, Ceratitis capitata (Weid.): karyotype and chromosomal organization*. *Cytology* 40: 823-828.
38. Franz G., Genscheva E. and Kerremans P. (1994). *Improved stability of sexseparation strains of the Medfly, Ceratitis capitata*. *Genome* 37: 72-82.
39. Kerremans P., Bourtzis K. and Zacharopoulou A. (1990). *Cytogenetic analysis of three genetic sexing strains of C. capitata*. *Theor. Appl. Genet.* 80: 177-182.
40. Zhiyong Xi, Laurent Gavotte, Yan Xie and Stephen L Dobson (2008). *Genome-wide analysis of the interaction between the endosymbiotic bacterium Wolbachia and its Drosophila host*.
41. Lemaître et Hoffmann. (2007). *The Host Defense of Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.* 2007. 25:697–743
42. Leclerc V., Reichhart. (2004). *The immune response of Drosophila melanogaster*. *Immunological Reviews* 2004 Vol. 198: 59–71
43. Tsai, Y.L., and Olson, B.H. (1991). *Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1070–1074.

44. MacGregor, B.J., Moser, D.P., Alm, E.W., Neilson, K.H., and Stahl, D.A. (1997). *Crenarchaeota in Lake Michigan sediment*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1178–1181.
45. Hurt, R.A., Qiu, X., Wu, L., Roh, Y., Palumbo, A.V., Tiedje, J.M., et al. (2001). *Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4495–4503. doi:10.1128/AEM.67.10.4495-4503.2001
46. Holben, W.E., Jansson, J.K., Chelm, B.K., and Tiedje, J.M. (1988). *DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 703–711.
47. Smalla, K., Cresswell, N., Mendonca-Hagler, L.C., Wolters, A., and van Elsas, J. D. (1993). *Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification*. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 78–85. doi: 10.1111/j.1365-2672.1993.tb02999.x
48. Zhou, J., Bruns, M.A., and Tiedje, J.M. (1996). *DNA recovery from soils of diverse composition*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 316–322.
49. Czomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Anal. Biochem.* 162, 156–159. doi:10.1016/0003-2697(87)90021-2
50. Pitcher, D.G., Saunders, N.A., and Owen, R.J. (1989). *Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidinium thiocyanate*. *Lett. Appl. Microbiol.* 8, 151–156. doi: 10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x
51. Moré, M.I., Herrick, J.B., Silva, M.C., Ghiorse, W.C., and Madsen, E.L. (1994). *Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1572–1580.
52. Ogram, A., Sayler, G.S., and Barkay, T. (1987). *The extraction and purification of microbial DNA from sediments*. *J. Microbiol. Methods* 7, 57–66. doi: 10.1016/0167-7012(87)90025-X
53. Porebski, S., Bailay, L.G., and Baum, B.R. (1997). *Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components*. *Plant Mol. Biol. Reporter* 15, 8–15. doi:10.1007/BF02772108
54. Arbeli, Z., and Fuentes, C.L. (2007). *Improved purification and PCR amplification of DNA from environmental samples*. *FEMS Microbiol. Lett.* 272, 269–275. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00764.x
55. Tanaka, T., Sakai, R., Kobayashi, R., Hatakeyama, K., and Matsunaga, T. (2009). *Contributions of phosphate to DNA adsorption/desorption behaviors on aminosilane-modified magnetic nanoparticles*. *Langmuir* 25, 2956–2961. doi: 10.1021/la8032397
56. I. VOMELOVA, Z. VANIČKOVA, A. ŠEDO. (2009). *Methods of RNA Purification. All Ways (Should) Lead to Rome*. *Folia Biologica (Praha)* 55, 243-251
57. S. Taylor, M. Wakern, G. Dijkman, M. Alsarraj, and M. Nguyen. *A practical approach to RT-qPCR- Publishing data that conform to the MIQE guidelines*. Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA 94547

58. Manetti AGO, Rosetto M, de Filippis T, Marchini D, Baldari CT, Dallai R (1997). Juvenile hormone regulates the expression of the gene encoding ceratotoxin A, an antibacterial peptide from the female reproductive accessory glands of the medfly *Ceratitis capitata*. *J Insect Physiol* 43: 1161–1167.
59. Marchini D, Manetti AGO, Rosetto M, Bernini LF, Telford JL, Baldari CT et al (1995). cDNA sequence and expression of the ceratotoxin gene encoding an antibacterial sex-specific peptide from the medfly *Ceratitis capitata* (Diptera). *J Biol Chem* 270: 6199–6204.
60. Marchini D, Rosetto M, Dallai R, Marri L (2002). Bacteria associated with the oesophageal bulb of the medfly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Curr Microbiol* 44: 120–124.
61. Marchini D, Marri L, Rosetto M, Manetti AGO, Dallai R (1997). Presence of antibacterial peptides on the laid egg chorion of the medfly *Ceratitis capitata*. *Biochem Biophys Res Commun* 240: 657–663.
62. Ioannis Eleftherianos, Jaishri Atri, Julia Accetta and Julio C. Castillo (2013). Endosymbiotic bacteria in insects: guardians of the immune system?. *Insect Infection and Immunity Lab, Department of Biological Sciences, Columbian College of Arts and Sciences, Institute for Biomedical Sciences, The George Washington University, Washington, DC, USA*
63. Chiemi Miura, Takashi Ohta, Yuichi Ozaki, Hideki Tanaka and Takeshi Miura (2009). Trypsin is a multifunctional factor in spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Dec 8; 106(49): 20972–20977.
64. Bergsten D., Lance D., Stefan M., 1999. Mediterranean fruit flies and their management in the U.S.A. *The Royal Society of Chemistry*, 10, 207-212
65. Combe BE, Defaye A, Bozonnet N, Puthier D, Royet J, Leulier F (2014) *Drosophila* Microbiota Modulates Host Metabolic Gene Expression via IMD/NF- κ B Signaling. *PLoS ONE* 9(4): e94729. doi:10.1371/journal.pone.0094729
66. Liang Qiao, Gao Xiong, Ri-xin Wang, Song-zhen He, Jie Chen, Xiao-ling Tong, Hai Hu, Chun-lin Li, Ting-ting Gai, Ya-qun Xin, Xiao-fan Liu, Bin Chen, Zhong-huai Xiang, Cheng Lu, Fang-yin Dai (2014) Mutation of a cuticular protein, *BmorCPR2*, alters larval body shape and adaptability in silkworm, *Bombyx mori*. *Key Laboratory for Sericulture Functional Genomics and Biotechnology of Agricultural Ministry, Southwest University, Chongqing, 400715, China Institute of Entomology and Molecular Biology, College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing, 401331, China.*