

Abstract

The olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, is the most important pest of cultivated olives causing significant production losses and olive fruit impoverishment. After mating, the female insect deposits its eggs in the olive fruit where the developing larvae feed and grow. In most insects, mating is a prerequisite for reproduction and, thus, critical to the maintenance of their population and the continuation of their species.

Currently, olive fly control mostly relies on insecticide spraying. However, the use of insecticides has led to resistance development and environmental damages, rendering the design of new alternative methods of control a necessity. Targeting the reproductive success of the olive fly is a promising method for pest control as manipulation of the reproductive system could affect the destructive activity of the fly. At present, genomic and transcriptomic data of the fly's reproductive system is practically non-existent.

Based on the above, a comprehensive analysis of the reproductive system was performed focusing on the identification of genes related to post-mating response. Specifically, RNAseq was performed for 1. testes and accessory glands with the ejaculatory bulb from virgin (7th-day old insects) and mated male insects and 2. lower reproductive tract from virgin (7th-day old insects) and mated female insects. Comparison of the transcriptomes between virgin and mated insects resulted in the identification of genes that are differentially expressed after mating. In testes, 107 genes were up-regulated and 345 genes were down-regulated, while in male accessory glands with ejaculatory bulb 1,608 genes were up-regulated and 383 genes were down-regulated in mated insects. In females, 1,705 genes were up-regulated and 120 genes were down-regulated in mated insects.

The top 100 most highly differentially expressed genes from each comparison were further annotated to the newly sequenced olive fly genome and functionally annotated through the Gene Ontology database. Annotations showed an alteration in metabolic, catalytic and cellular processes in the mated tissues. The identified genes encoded proteins implicated in immune response, mucins, antigen 5 proteins, proteases inhibitors and proteins with putative secretory activity.

Several genes were further selected for validation through qRT-PCR. For testes, nine reproductive loci were considered. Results showed significant overexpression in mated flies of genes *c58283*, *c37552*, *hemolectin*, *mucin* and *cation transporter*, while significant downregulation was detected for scribbler. qRT-PCR did not confirm the expression profile of *c15699* and *c52071* genes obtained from RNAseq and *c42528* showed very low expression. For male accessory glands six reproductive loci were analyzed and confirmed their overexpression in mated flies through qRT-PCR: *timeless*, *c52416*, *c57257*, *c52655*, *yellow-g* and *c53574*. Furthermore, we determined

the expression profile of the selected genes from the first day of the insect eclosion to DAY 7. If a gene codes for a protein in the seminal fluid that is important for mating, it should be expressed earlier so that the protein will be present at the time of mating.

For the female lower reproductive tract six loci were analyzed. The results of the qRT-PCR confirmed the upregulation of *lingerer*, *bestrophin-2*, *ornithine decarboxylase genes* but did not confirm the RNAseq results for *troponin C* and *glutathione S-transferase epsilon class genes*. *Yolk protein-2* had low expression. The expression profile of the selected genes was determined in 7-day old virgin females and at five-time points (0, 3, 6, 9, 12, 24 h) after mating. Expression profiles of the 6 genes were different. For example, *ornithine decarboxylase antizyme* showed an increased expression with the highest expression 24 hours after mating, while *bestrophin-2* and *lingerer* expression peaked after 12 hours and fell afterwards.

Functional analysis through RNAi silencing was performed through RNAi injections or RNAi feeding. For *yellow-g* (from the male accessory glands) and *troponin C* (from the lower female reproductive tract) transfer of the dsRNA to insects was achieved through injections. Transient silencing through feeding was used for silencing of the *sex peptide receptor (spr)* based on its known involvement in reproduction in other insects.

For RNAi silencing through injections, results indicated a high percentage of silencing in the insect, reaching 81% for *yellow-g* and 70% for *troponin-C*. Furthermore, mating experiments showed that transient silencing of the two genes had an impact on reproduction since the oviposition rate of injected females was significantly reduced. For RNAi silencing through feeding, there was 90% and 40% downregulation of the *spr* gene on the female reproductive tract and head, respectively, resulting in significantly lower oviposition rate and reduced longevity compared to controlled flies.

This thesis constitutes the first comprehensive analysis of the reproductive system of *B. oleae*, identifying genes that could be a target for the development of new intervention methods. Moreover, it demonstrated the first successful application of RNAi-feeding in *B. oleae*, giving new prospects to the use of this molecular tool.

Περίληψη

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, είναι ο σημαντικότερος εχθρός των ελαιοκαλλιεργειών προκαλώντας την ποσοτική και ποιοτική υποβάθμιση της παραγωγής. Τα συζευγμένα θηλυκά έντομα, ωαποθέτουν στους καρπούς, εντός των οποίων εκκολάπτονται οι προνύμφες και αναπτύσσονται τρεφόμενες από το

εσωτερικό του. Η σύζευξη επομένως, στα περισσότερα έντομα, είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την αναπαραγωγή και κατ' επέκταση για τη διατήρηση του πληθυσμού τους.

Σήμερα, η καταπολέμησή του εντόμου γίνεται κυρίως με τη χρήση εντομοκτόνων. Η αλόγιστη χρήση όμως των εντομοκτόνων έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη φαινομένων ανθεκτικότητας των εντόμων αλλά και σε περιβαλλοντικές συνέπειες καθιστώντας απαραίτητη την ανάγκη για την εύρεση αποτελεσματικότερων και φιλικότερων προς το περιβάλλον μεθόδων ελέγχου. Το αναπαραγωγικό σύστημα του εντόμου θα μπορούσε να είναι ένας πολλά υποσχόμενος στόχος για την ανάπτυξη τέτοιων μεθόδων. Εμποδίζοντας είτε τη διαδικασία της σύζευξης είτε μειώνοντας την αναπαραγωγική ικανότητα των εντόμων, αναπόφευκτα θα υπάρξει και ελάττωση του πληθυσμού. Ωστόσο, μέχρι σήμερα, ελάχιστες είναι οι πληροφορίες για το αναπαραγωγικό σύστημα του δάκου της ελιάς σε γονιδιωματικό και μεταγραφικό επίπεδο.

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του αναπαραγωγικού συστήματος με έμφαση στην ταυτοποίηση γονιδίων που εμπλέκονται στη μετα-συζευκτική δραστηριότητα του εντόμου. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε μεταγραφομική ανάλυση των ακόλουθων ιστών: 1. όρχεις και βοηθητικοί αδένες μαζί με εκσπερματική βαλβίδα από παρθένα (7 ημερών) και συζευγμένα αρσενικά έντομα αντίστοιχα και 2. αναπαραγωγικό σύστημα των θηλυκών (εκτός από ωοθήκες) από παρθένα και συζευγμένα θηλυκά έντομα αντίστοιχα. Η σύγκριση του μεταφρατώματος των ιστών μεταξύ παρθένων και συζευγμένων εντόμων ανέδειξε γονίδια που παρουσίασαν διαφορετική έκφραση μετά τη σύζευξη. Για ότι αφορά τον ιστό των όρχεων εντοπίστηκαν 107 γονίδια να υπερεκφράζονται και 345 να υποεκφράζονται στα συζευγμένα έντομα. Αντίστοιχα, στους ιστούς των βοηθητικών αδένων με εκσπερματική βαλβίδα εντοπίστηκαν 1,608 γονίδια να υπερεκφράζονται και 383 να υποεκφράζονται, ενώ στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα 1,705 γονίδια να υπερεκφράζονται και 120 γονίδια να υποεκφράζονται στα συζευγμένα έντομα.

Τα 100 πρώτα υπερεκφραζόμενα γονίδια από κάθε σύγκριση επισημειώθηκαν στο πρόσφατα αλληλουχημένο γονιδίωμα του δάκου της ελιάς και πραγματοποιήθηκε κατηγοριοποίηση τους με βάση τους όρους γονιδιακής οντολογίας (Go annotation). Από τη διαδικασία αυτή εντοπίστηκε μια αύξηση των βιολογικών διαδικασιών που συμμετέχουν σε μεταβολικά, κυτταρικά και καταλυτικά μονοπάτια. Η πλειοψηφία των γονιδίων κωδικοποιεί πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην ανοσοαπόκριση, αναστολείς πρωτεασών, εκκριτικές πρωτεΐνες και μουκίνες.

Στη συνέχεια επαληθεύτηκαν τα αποτελέσματα της μεταγραφομικής ανάλυσης μέσω πραγματοποίησης ποσοτικής qRT-PCR σε ομάδα γονιδίων από κάθε ιστό. Για τον ιστό των όρχεων αναλύθηκαν 9 γονίδια από τα οποία επαληθεύτηκε η υπερέκφραση των *c58283*, *c37552*, *hemolectin*, *mucin* και *cation transporter* και η

υποέκφραση του *scribbler*. Δεν επαληθεύτηκε η έκφραση για τα *c15699*, *c52071* ενώ το *c42528* έδωσε πολύ χαμηλή έκφραση. Για τον ιστό των βοηθητικών αδένων με εκσπερματική βαλβίδα επαληθεύτηκε η υπερέκφραση και των 6 γονιδίων που επιλέχθηκαν (*timeless*, *c52416*, *c57257*, *c52655*, *yellow-g* και *c53574*). Επιπλέον καθορίστηκε το προφίλ έκφρασης των επιλεγμένων γονιδίων από την πρώτη μέρα έκδυσης των ενήλικων εντόμων μέχρι και την έβδομη μέρα ζωής τους (σεξουαλικά ώριμα έντομα). Αν ένα γονίδιο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που συμμετέχει στην αναπαραγωγή θα πρέπει να εκφράζεται κατά τη σεξουαλική ωρίμανση του εντόμου ώστε αυτή να είναι διαθέσιμη κατά τη διάρκεια της σύζευξης. Σε συμφωνία με την παραπάνω υπόθεση, τα περισσότερα γονίδια παρουσίασαν μέγιστη έκφραση πριν από την ημέρα που πραγματοποιήθηκε η συλλογή ιστών για τη μεταγραφομική ανάλυση.

Για το θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα αναλυθήκαν 6 γονιδιακοί τόποι. Τα αποτελέσματα της qRT-PCR επιβεβαίωσαν την υπερέκφραση των *lingerer*, *bestrophin-2*, *ornithine decarboxylase genes* ενώ δεν επιβεβαίωσαν την υπερέκφραση των γονιδίων *troponin C* και *glutathione S-transferase epsilon class*. Η *yolk protein-2* είχε ελάχιστη έκφραση. Για τα επιλεγμένα αυτά γονίδια καθορίστηκαν επιπλέον τα επίπεδα έκφρασής τους μέσω ποσοτικής qRT-PCR σε αναπαραγωγικούς ιστούς παρθένων θηλυκών εντόμων ηλικίας 7 ημερών και σε διάφορες χρονικές στιγμές μετά τη σύζευξη (0, 3, 6, 9, 12, 24 h). Τα προφίλ έκφρασής τους ωστόσο παρουσίασαν διαφοροποιήσεις. Για παράδειγμα το γονίδιο *ornithine decarboxylase antizyme* έδειξε αυξημένη έκφραση 24 ώρες μετά τη σύζευξη ενώ τα γονίδια *bestrophin-2* και *lingerer* 12 ώρες μετά.

Επιπλέον πραγματοποιήθηκε λειτουργική ανάλυση με παροδική σίγηση των γονιδίων είτε μέσω της έγχυσης δίκλωνων μορίων RNA στην αιμολέμφο είτε μέσω της τροφής. Παράλληλα καταγράφηκε η φαινοτυπική επίδραση της σίγησης στην αναπαραγωγική δραστηριότητα των εντόμων (καταγραφή σύζευξης και ωαπόθεσης). Για τα γονίδια *yellow-g* (από τους αρσενικούς βοηθητικούς αδένες) και *troponin C* (από το κατώτερο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα) η έγχυση του dsRNA στα έντομα έγινε μέσω μικροενέσεων. Η παροδική σίγηση μέσω τροφής χρησιμοποιήθηκε για την αποσιώπηση του υποδοχέα του συζευκτικού πεπτιδίου (*spr*) λόγω της γνωστής συμμετοχής του στην αναπαραγωγή άλλων εντόμων.

Για τα γονίδια *yellow-g* και *troponin-C* καταγράφηκε 81% και 70% σίγηση αντίστοιχα. Επίσης παρατηρήθηκε μείωση του ρυθμού ωαπόθεσης των εντόμων υποδηλώνοντας την πιθανή συμμετοχή των συγκεκριμένων γονιδίων στην αναπαραγωγή. Το ποσοστό σίγησης του υποδοχέα του συζευκτικού πεπτιδίου (*spr*) μέσω τροφής καθορίστηκε στο 90% στο αναπαραγωγικό σύστημα και 40% στο κεφάλι του εντόμου. Επίσης παρατηρήθηκε μείωση της ωαπόθεσης των εντόμων σε σύγκριση με τα έντομα ελέγχου.

Συνολικά, μέσω της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε η πρώτη ανάλυση του αναπαραγωγικού συστήματος του δάκου της ελιάς, ταυτοποιώντας γονίδια που θα μπορούσαν να αποτελέσουν στόχους για την ανάπτυξη καινοτόμων μεθόδων καταπολέμησης του εντόμου. Παράλληλα, καταγράφηκε και η πρώτη επιτυχημένη εφαρμογή της παροδικής αποσιώπησης γονιδίων μέσω της τροφής σε ενήλικα έντομα *B. oleae*, δίνοντας μια καινούρια προοπτική για τη χρήση της μεθόδου ως μοριακό εργαλείο.