

Τρανσκριπτομική και πρωτεομική ανάλυση του σημαντικότερου παρασίτου της ελιάς, του εντόμου *Bactrocera oleae*, με έμφαση στα συστήματα φυλοδιαχωρισμού και ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα

Λέξεις κλειδιά: Next generation sequencing, ανθεκτικότητα εντομοκτόνου, Spinosyns, ανάλυση έκφρασης, σεξουαλική διαφοροποίηση, πρωτεομική ανάλυση

Το έντομο *Bactrocera oleae* (*Tephritidae*), κοινώς ο δάκος της ελιάς, είναι ο σημαντικότερος εχθρός της ελιάς και η ζημιά που προκαλεί φτάνει το 30% ετησίως. Οι καταστροφικές του συνέπειες τον καθιστούν στόχο συστηματικού ελέγχου, κυρίως με χρήση χημικών εντομοκτόνων. Για την καταπολέμηση του εντόμου στη χώρα μας χρησιμοποιούνται κυρίως οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, ενώ σε μικρότερη κλίμακα εφαρμόζονται οι συνθετικές πυρεθρίνες και πρόσφατα ο νατουραλίτης spinosad. Η μη ορθολογική χρήση αυτών εμπιριέχει κινδύνους, όπως οικολογικές διαταραχές, δημιουργία και εξάπλωση ανθεκτικότητας, επιβλαβείς τοξικολογικές επιδράσεις και συνέπειες στην υγεία του ανθρώπου. Για τον έλεγχο φυσικών πληθυσμών του εντόμου έχουν προταθεί νέες φιλικότερες προς το περιβάλλον μέθοδοι, όπως η τεχνική του στείρου εντόμου (*Sterile Insect Technique*, SIT) που προϋποθέτει τη μαζική εκτροφή και εξαπόλυση στείρων εντόμων στη φύση. Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τον έλεγχο άλλων εντόμων (πχ. Μεσογειακή μύγα) σε διάφορες περιοχές του κόσμου, ωστόσο η SIT δεν έχει εφαρμοσθεί με επιτυχία ακόμη στον δάκο. Όπως έχει δείχθει σε πολλές περιπτώσεις, η επιτυχής εφαρμογή της SIT προϋποθέτει καλή γνώση της βιολογίας και της οικολογίας του εντόμου, καθώς και αποτελεσματικά μοριακά και γενετικά εργαλεία. Δεδομένου ότι οι πληροφορίες για το γονιδίωμα του δάκου είναι ελάχιστες, η παρούσα έρευνα έχει σκοπό την ανάπτυξη εργαλείων πρωτεομικής και τρανσκριπτομικής που θα βοηθήσουν τις προσπάθειες αποτελεσματικότερης εφαρμογής SIT και τον εντοπισμό και την απομόνωση γονιδίων του δάκου που εμπλέκονται είτε σε μονοπάτια φυλοδιαχωρισμού είτε ανθεκτικότητας στο εντομοκτόνο spinosad.

Τρανσκριπτομική ανάλυση: Η ανάλυση του τρανσκριπτομάτος του δάκου στόχευε αφενός στην αποκάλυψη γενετικών τόπων που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα του δάκου στο spinosad και αφετέρου στον εντοπισμό γονιδίων διαχωρισμού των δύο φύλων. Για το σκοπό αυτό, RNA απομονώθηκε είτε από κεφάλια ανθεκτικών και ευαίσθητων στο spinosad εντόμων, είτε από το αναπαραγωγικό σύστημα αρσενικών και θηλυκών ατόμων. Το RNA αυτό μετατράπηκε σε cDNA και ακολούθησε η αλληλούχησή του. Η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Φλέμινγκ με την τεχνολογία SOLiD (Πίνακας I). Η βιοπληροφορική ανάλυση των δειγμάτων κατέληξε σε πλήθος γονιδίων διαφορετικής έκφρασης σε ευαίσθητα και ανθεκτικά στο spinosad έντομα καθώς επίσης και σε αρσενικά και θηλυκά άτομα *B. oleae*. Η επεξεργασία και σύγκριση περισσότερων από 13.000 γονιδίων προσδιόρισε τη στατιστικά σημαντική υπερέκφραση 9 γονιδίων και στατιστικά σημαντική υποέκφραση ~40 γονιδίων ανάμεσα σε ευαίσθητα και ανθεκτικά στο spinosad έντομα. Αντίστοιχα, 330 γονίδια είχαν υπερέκφραση στα θηλυκά έντομα ενώ 1238 υπερεκφράζονται στα αρσενικά έντομα (Εικ.1). Στη συνέχεια επιλέχθηκαν είτε γονίδια με ιδιαίτερα διαφορετική έκφραση είτε γονίδια ιδιαίτερου ενδιαφέροντος για περαιτέρω λειτουργική ανάλυση μέσω qRT-PCR (Εικόνες 2 & 3). Για τη λειτουργική ανάλυση διαφορεικά εκφραζόμενων γονιδίων σε θηλυκά και αρσενικά άτομα μελετήθηκαν οι δώδεκα γενετικοί τόποι: *kl2* (*male fertility factor, kl2*), *kl3* (*male fertility factor, kl3*), *kl5* (*male fertility factor, kl5*), *ory* (*occludin-related Y protein*), *fem-1* (*sex-determining protein fem-1*), *gas8* (*growth arrest specific protein 8*), *lobo* (*lost boys*), *ix* (*intersex*), *pbl* (*pebble*) και *hcf* (*host cell factor C1*) που υπερεκφράζονται στα αρσενικά και τα δύο γονίδια *sox* και *pcp* (*pupal cuticle protein 78E*) που υπερεκφράζονται στα θηλυκά έντομα. Στα αποτελέσματα που προέκυψαν επιβεβαιώθηκε σημαντική διαφορά αυξημένης έκφρασης στα αρσενικά έντομα για τα γονίδια *kl2*, *kl3*, *kl5*, *ory*, *fem-1*, *gas8*, *lobo*, *pbl*, *hcf* και το γονίδιο *pcp* με υπερέκφραση στα θηλυκά έντομα ενώ ελάχιστες διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ των αρσενικών και θηλυκών εντόμων για το γονίδιο *ix*. Μόνο για το γονίδιο *sox* δεν διαπιστώθηκε το αναμενόμενο αποτέλεσμα (Εικ.4). Παράλληλα, για τη λειτουργική ανάλυση των γονιδίων που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα, συνολικά μελετήθηκαν δύο ανθεκτικοί και δύο ευαίσθητοι πληθυσμοί *B. oleae*. Οι ανθεκτικοί πληθυσμοί ήταν ο εργαστηριακός πληθυσμός (SPIN) που είχε επιλεγεί μέσω συνεχούς προσθήκης του εντομοκτόνου στη διατροφή του και ένας φυσικός πληθυσμός από την Καλιφόρνια (w-CAL) που εμφάνιζε 13 φορές αυξημένη ανθεκτικότητα σε σχέση με εργαστηριακό ευαίσθητο στέλεχος. Οι ευαίσθητοι πληθυσμοί ήταν ο εργαστηριακός (LAB) που εκτρέφεται σε εργαστηριακές συνθήκες τα τελευταία ~40 χρόνια και ένας πληθυσμός που προέκυψε από

ελαιόκαρπους της περιοχής Βόλου- Αγγιάς (w-GR) όπου δεν γίνεται χρήση εντομοκτόνων. Συνολικά μελετήθηκαν οι δεκαέξι γενετικοί τόποι που αρκετοί ανήκουν σε ομάδες μεταβολισμού ενέργειας: *Yolk protein 2 (Yp2)*, *ATP synthase FO subunit 6 (ATP synthase)*, *Low affinity cationic amino acid transporter 2 (CAT-2)*, *Serine protease 6 (SP6)*, *4-nitrophenylphosphatase (pNPPase)*, *Salivary Cys-rich secreted peptide-vWF (SalCys)*, *Cytochrome P450 6a23-like (Cyp6a23)* και *Antigen 5 precursor (Ant5)* που υπερεκφράζονται στα ανθεκτικά στο spinosad έντομα και *Heat-shock protein 70 (Hsp70)*, *Heat-shock protein 23 (Hsp23)*, *Larval serum protein 1 (LSP1)*, *Hexamerin L1 (HexL1)*, *Chitinase 5 (Cht5)*, *Oxidase/oxidase (oxidase)*, *Macrophage mannose receptor 1 (mmr1)* και *Cell division cycle-associated protein 7 (Cdc)* που υποεκφράζονται στα ανθεκτικά έντομα. Στα αποτελέσματα που προέκυψαν επιβεβαιώθηκε σημαντική διαφορά αυξημένης έκφρασης στα ανθεκτικά έντομα για τα γονίδια *Yp2*, *ATP synthase*, *CAT-2*, *SP6*, *pNPPase*, *SalCys* και *Cyp6a23* αλλά και των γονιδίων *Hsp70*, *Hsp23*, *LSP1*, *HexL1*, *Cht5* με υπερέκφραση στα ευαίσθητα έντομα. Για τα γονίδια *Ant5*, *oxidase*, *mmr1* και *Cdc* δεν διαπιστώθηκε το αναμενόμενο αποτέλεσμα (Εικ.5).

Πρωτεομική ανάλυση: Για την πρωτεομική ανάλυση, αρχικά πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2D-PAGE) σε κεφάλια από αρσενικά και θηλυκά έντομα για τη μελέτη της διαφορικής έκφρασης των πρωτεϊνών μεταξύ των δύο φύλων του δάκου (Εικ.6). Στη συνέχεια, οι διαφορετικές πρωτεΐνες εντοπίστηκαν, αποκόπηκαν, ακολούθησε πέψη με τρυψίνη και ανάλυση με φασματομετρία μάζας στο ινστιτούτο Αλέξανδρος Φλέμινγκ. Τέλος, τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης. Στον πίνακα II εμφανίζονται οι πρωτεΐνες που εκφράζονται με διαφορετικό τρόπο ανάμεσα σε θηλυκά και αρσενικά έντομα. Οι πρωτεΐνες αυτές ανήκουν σε διαφορετικές λειτουργικές ομάδες όπως κυττασκελετού, μεταβολισμού, συναπτοσωμικές, μεταγωγής σήματος και οξειδωτικού στρες. Επίσης, έγινε εφαρμογή μιας νέας προσέγγισης μέσω μελέτης των πεπτιδίων. Με σκοπό τη διερεύνηση μηχανισμών που εμπλέκονται σε συστήματα φυλοδιαχωρισμού, αρχικά συλλέχθηκαν όργανα αναπαραγωγής αρσενικών και θηλυκών εντόμων από το εργαστηριακό στέλεχος του δάκου. Στη συνέχεια, έγινε ομογενοποίηση των ιστών με κατάλληλο διάλυμα λύσης και απομόνωση των πεπτιδίων. Ακολούθησε η φασματομετρία μάζας με χρήση MALDI TOF-TOF, λήψη των αποτελεσμάτων των πεπτιδίων με τη χρήση του MASCOT και επεξεργασία των αποτελεσμάτων μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης. Με επιτυχία έγινε εντοπισμός πεπτιδίων που εμπλέκονται σε συστήματα διαχωρισμού των δύο φύλων καθώς παρατηρήθηκε υπερέκφραση τους σε αρσενικά και θηλυκά έντομα αντίστοιχα.