

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟ-ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ
ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΗΣ ΜΥΓΑΣ ΤΗΣ ΚΕΡΑΣΙΑΣ,
RHAGOLETIS CERASI (DIPTERA: TERHRITIDAE)

ΜΩΡΑΪΤΗ Α. ΚΛΕΟΠΑΤΡΑ
ΓΕΩΠΟΝΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ν. ΙΩΝΙΑ ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ, ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2013

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟ-ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ
ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΗΣ ΜΥΓΑΣ ΤΗΣ ΚΕΡΑΣΙΑΣ, *RHAGOLETIS CERASI*
(DIPTERA: TEPHRITIDAE)

ΜΩΡΑΪΤΗ Α. ΚΛΕΟΠΑΤΡΑ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Η διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας, του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Ν. Θ. Παπαδόπουλος	Αναπληρωτής Καθηγητής	Εισηγητής
Β. Ι. Κατσόγιαννος	Ομότιμος Καθηγητής	Μέλος
Κ. Μπούρτζης	Καθηγητής	Μέλος

Επταμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Ν. Θ. Παπαδόπουλος	Αναπληρωτής Καθηγητής	Εισηγητής
Β. Ι. Κατσόγιαννος	Ομότιμος Καθηγητής	Μέλος
Κ. Μπούρτζης	Καθηγητής	Μέλος
Χ. Αθανασίου	Επίκουρος Καθηγητής	Μέλος
Χ. Θ. Νάκας	Επίκουρος Καθηγητής	Μέλος
Μ. Σαββοπούλου-Σουλτάνη	Καθηγήτρια	Μέλος
Π. Μαυραγάνη-Τσιπίδου	Καθηγήτρια	Μέλος

Ν. ΙΩΝΙΑ ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ, 2013

Στους γονείς μου,
Απόστολο και Μάρθα

“We will now discuss in a little more detail the struggle for existence”
(Charles Darwin, *The Origin of Species*, p.49)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	6
ΟΡΟΛΟΓΙΑ.....	8
ΕΥΡΕΙΑ ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	10
SUMMARY.....	13
1. ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	15
1.1. Διαφοροποίηση γεωγραφικά απομονωμένων πληθυσμών.....	15
1.1.1. Κλιματική αλλαγή και προσαρμογή των πληθυσμών.....	16
1.2. Αναπαραγωγική απομόνωση και ειδογένεση.....	17
1.3. Εποχική αδράνεια	18
1.3.1. Είδη και στάδια διάπαυσης.....	19
1.3.1.1. Προετοιμασία και πρόκληση της διάπαυσης.....	20
1.3.1.2. Είσοδος, εξέλιξη και περάτωση της διάπαυσης.....	20
1.3.1.3. Εποχική μεταδιαπαυτική αδράνεια.....	21
1.3.2. Παρατεταμένη εποχική αδράνεια.....	22
1.4. Το ενδοσυμβιωτικό βακτήριο <i>Wolbachia</i>	24
1.4.1. Κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (ΚΑ).....	25
1.4.2. Διαφοροποίηση πληθυσμών-ξενιστών και ειδογένεση.....	27
1.5. Η ραγολέτιδα της κερασιάς, <i>Rhagoletis cerasi</i>	29
1.5.1. Συστηματική κατάταξη.....	29
1.5.2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	30
1.5.3. Φυτά-ξενιστές και γεωγραφική διασπορά.....	31
1.5.4. Βιολογία και συμπεριφορά.....	32
1.5.5. Μόλυνση πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς με <i>Wolbachia</i> ...36	
1.5.6. Γενετική και κυτταρογενετική ανάλυση πληθυσμών.....	37
1.5.7. Φυσικοί εχθροί.....	37
1.5.8. Οικονομική σημασία του εντόμου.....	38
1.5.8.1. Οικονομική σημασία του εντόμου για την Ελλάδα.....	41
1.5.9. Μέθοδοι αντιμετώπισης της ραγολέτιδας της κερασιάς.....	43
1.5.9.1. Προληπτικά μέτρα φυτο-υγείας.....	43
1.5.9.2. Μέθοδοι παρακολούθησης του πληθυσμού της ραγολέτιδας της κερασιάς.....	43
1.5.9.3. Χημική καταπολέμηση.....	44

1.5.9.4. Βιοτεχνικές μέθοδοι.....	45
1.5.9.5. Βιολογική καταπολέμηση.....	47
1.6. Σκοπός.....	48
Βιβλιογραφία.....	51
2. ΓΕΝΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	69
2.1. Περιοχές μελέτης.....	69
2.2. Συνθήκες Εργαστηρίου.....	69
2.3. Ατομικά κλουβιά ενηλίκων.....	70
2.4. Κλουβιά πειραμάτων προσυζευκτικής απομόνωσης.....	71
2.5. Συλλογή νυμφών από προσβεβλημένους καρπούς.....	72
2.6. Μέτρηση μεγέθους σώματος ενηλίκων.....	72
2.7. Απομόνωση DNA από ενήλικα <i>R. cerasi</i> με τη μέθοδο CTAB.....	73
2.8. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	74
2.9. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	75
2.10. Προετοιμασία προϊόντος PCR για ταυτοποίηση μέσω αλληλούχισης.....	76
2.11. Ανάλυση δεδομένων αλληλούχισης.....	77
Βιβλιογραφία.....	79
3. ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΗΣ ΡΑΓΟΛΕΤΙΔΑΣ ΤΗΣ ΚΕΡΑΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ ΚΑΙ ΜΟΛΥΝΣΗ ΜΕ ΤΟ ΕΝΔΟΣΥΜΒΙΩΤΙΚΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ <i>WOLBACHIA PIPIENTIS</i>	80
Περίληψη.....	80
3.1. Εισαγωγή.....	81
3.2. Υλικά και Μέθοδοι.....	82
3.2.1. Γεωγραφική διασπορά του εντόμου, φυτά-ξενιστές και ποσοστό προσβολής.....	82
3.2.2. Έλεγχος παρουσίας της <i>Wolbachia</i>	86
3.3. Αποτελέσματα.....	87
3.3.1. Γεωγραφική διασπορά του εντόμου, φυτά-ξενιστές και ποσοστό προσβολής.....	87
3.3.2. Έλεγχος παρουσίας της <i>Wolbachia</i>	87
3.4. Συζήτηση.....	91
Βιβλιογραφία.....	94
4. ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΗΝ ΠΕΡΑΤΩΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΠΑΥΣΗΣ ΚΑΙ ‘BET-HEDGING’ ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΩΣ ΜΕΣΟ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΤΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ	

5.4. Συζήτηση.....	142
Βιβλιογραφία.....	146
6. ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΣΤΑ ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΗΣ ΡΑΓΟΛΕΤΙΔΑΣ ΤΗΣ ΚΕΡΑΣΙΑΣ.....	148
Περίληψη.....	148
6.1. Εισαγωγή.....	149
6.2. Υλικά και Μέθοδοι.....	151
6.2.1. Πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς.....	151
6.2.2. Πειραματική διαδικασία.....	156
6.2.3. Στατιστική ανάλυση.....	157
6.3. Αποτελέσματα.....	158
6.3.1. Μέγεθος σώματος ενηλίκων.....	158
6.3.2. Επιβίωση.....	160
6.3.3. Αναπαραγωγή.....	163
6.4. Συζήτηση.....	169
Βιβλιογραφία.....	176
7. Η ΠΑΡΑΤΕΤΑΜΕΝΗ ΔΙΑΠΑΥΣΗ ΣΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΝΥΜΦΗΣ ΕΠΙΦΕΡΕΙ ΚΟΣΤΟΣ ΣΤΑ ΕΝΗΛΙΚΑ ΤΗΣ ΡΑΓΟΛΕΤΙΔΑΣ ΤΗΣ ΚΕΡΑΣΙΑΣ.....	183
Περίληψη.....	183
7.1. Εισαγωγή.....	183
7.2. Υλικά και Μέθοδοι.....	185
7.2.1. Πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς.....	185
7.2.2. Πειραματική διαδικασία.....	188
7.2.3. Στατιστική ανάλυση.....	188
7.3. Αποτελέσματα.....	189
7.3.1. Μέγεθος σώματος ενηλίκων.....	189
7.3.2. Επιβίωση.....	191
7.3.3. Αναπαραγωγή.....	193
7.4. Συζήτηση.....	199
Βιβλιογραφία.....	204
8. ΠΡΟΣΥΖΕΥΚΤΙΚΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΑ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΗΣ ΡΑΓΟΛΕΤΙΔΑΣ ΤΗΣ ΚΕΡΑΣΙΑΣ.....	210
Περίληψη.....	210
8.1. Εισαγωγή.....	211

8.2. Υλικά και Μέθοδοι.....	213
8.2.1. Πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς.....	213
8.2.2. Ημερήσιος ρυθμός σύζευξης.....	215
8.2.3. Πειράματα πολλαπλής επιλογής σύζευξης.....	216
8.2.4. Στατιστική ανάλυση.....	218
8.3. Αποτελέσματα.....	221
8.3.1. Ημερήσιος ρυθμός σύζευξης.....	221
8.3.2. Πειράματα πολλαπλής επιλογής σύζευξης.....	223
8.3.3. Διάστημα έως τη (πρώτη σύζευξη) και διάρκεια συζεύξεων.....	230
8.4. Συζήτηση.....	236
Βιβλιογραφία.....	243
9. ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ, ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ, ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ, ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....	248
9.1. Ανακεφαλαίωση συμπερασμάτων.....	248
9.2. Πρακτικές εφαρμογές των αποτελεσμάτων.....	251
9.3. Προοπτικές περαιτέρω έρευνας.....	254
Βιβλιογραφία.....	257
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	258
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	272

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε κατά τα έτη 2008-2013 στο Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της βιο-οικολογίας (διάπαυση, δημογραφία) και συμπεριφοράς (προσσυζευκτική απομόνωση) διαφορετικών πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς. Η πλειοψηφία των εξεταζόμενων πληθυσμών προέρχονταν από την Ελλάδα, όπου παράλληλα μελετήθηκε η κατανομή των πληθυσμών στις ηπειρωτικές και νησιωτικές περιοχές της χώρας και η προσβολή των πληθυσμών του εντόμου με τα ενδοκυτταρικά βακτήρια *Wolbachia pipientis*. Η διατριβή αποτελείται από ένα γενικό μέρος (εισαγωγή, γενικά υλικά και μέθοδοι, ανακεφαλαίωση) και ένα ειδικό μέρος που αναφέρεται σε έξι σχετικά αυτοτελή και αλληλοσχετιζόμενα κεφάλαια. Το κάθε κεφάλαιο περιλαμβάνει εισαγωγή, υλικά και μέθοδοι, αποτελέσματα και συζήτηση των αποτελεσμάτων και τη σχετική βιβλιογραφία. Σημειώνεται ότι κάποιες επαναλήψεις, που πηγάζουν από τη σχετική αυτοτέλεια των κεφαλαίων και απαντώνται συνήθως στην εισαγωγή ή στα υλικά και μέθοδοι του κάθε κεφαλαίου, κρίθηκαν απαραίτητες για την πληρέστερη κατανόηση του κάθε κεφαλαίου.

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου και τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ν.Θ. Παπαδόπουλο, επιβλέποντα της διδακτορικής μου διατριβής, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση αυτού του πολύ ενδιαφέροντος θέματος, τη συνεχή καθοδήγηση και τις χρήσιμες συμβουλές σε όλα τα στάδια της διατριβής (συλλογή κερασιών, σχεδιασμός πειραμάτων, ανάλυση και παρουσίαση αποτελεσμάτων, εξαγωγή συμπερασμάτων, διορθώσεις στο κείμενο της διατριβής, συγγραφή δημοσιευμάτων που προέκυψαν από την παρούσα διατριβή). Επίσης, ευχαριστώ τους Καθηγητές κ.κ. Β.Ι. Κατσόγιαννο και Κ. Μπούρτζη, μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, για τις υποδείξεις και τη συμβολή τους στην παρουσίαση του κειμένου της διατριβής. Θερμότερες ευχαριστίες οφείλω στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Χ.Θ. Νάκα για την καθοριστική του συμβολή στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Για τη συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Επίκουρους Καθηγητές κκ. Χ. Αθανασίου και Χ.Θ. Νάκα και τις Καθηγήτριες κκ. Μ. Σαββοπούλου-Σουλτάνη και Π. Μαυραγάνη-Τσιπίδου.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζονται στο Δρ. Αλέξανδρο Δ. Διαμαντίδη και στην υποψήφια Διδάκτωρ Στέλλα Α. Παπαναστασίου για τη συμπαράσταση και την πολύτιμη

βοήθεια κατά την εκτέλεση των πειραμάτων. Για τη βοήθεια κατά τη συλλογή κερασιών ή την αποστολή κερασιών από διάφορες περιοχές της Ελλάδας και της Γερμανίας, επιθυμώ να ευχαριστήσω τους κ.κ. Α. Διαμαντίδη, Χ. Γεροφώτη, Χ. Ιωάννου, Η. Κουνατίδη, Β. Κατσόγιαννο, Α. Χα και Α. Μαυρομάτη, καθώς και τις κ.κ. Σ. Παπαναστασίου, Α. Σαρακατσάνου, Π. Μαυραγάνη-Τσιπίδου, Η. Vogt και Κ. Körpler. Ειδικότερα τις κ.κ. Η. Vogt και Κ. Körpler, θα ήθελα να τις ευχαριστήσω και για τη διαθεσιμότητα των κλιματικών δεδομένων των περιοχών της Γερμανίας (Steckneberg, Dossenheim) από όπου προήλθαν οι πληθυσμοί που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επικεφαλή και το προσωπικό του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας, Γενετικής και Βιοχημείας του Τμήματος Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων του Πανεπιστημίου Πατρών, και ειδικότερα τον Καθηγητή κ. Κώστα Μπούρτζη, τους Δρες Παναγιώτη Σαπουντζή και Στέφανο Σιώζο καθώς και το Μάριο Σκαρβελάκη για την πολύτιμη καθοδήγηση, βοήθεια και συμπαράσταση κατά την εκτέλεση των πειραμάτων ανίχνευσης και ταυτοποίησης των στελεχών της *Wolbachia* στους πληθυσμούς της ραγολέτιδας της κερασιάς. Για τη φιλολογική επιμέλεια του κειμένου της διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Φιλόλογο Ε. Κ. Ξυπτερά.

Τέλος, επιθυμώ να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την αμέριστη, ηθική και οικονομική, συμπαράσταση και αγάπη που μου έδειξαν κατά την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής. Θερμότερες ευχαριστίες θέλω να εκφράσω και στο Νίκο Κ. Ξυπτερά για τη θερμή και διαρκή συμπαράσταση στην προσπάθειά μου αυτή.

ΟΡΟΛΟΓΙΑ

Αναπαραγωγική απομόνωση (reproductive isolation): εκφράζεται όταν οι απόγονοι που προκύπτουν από τη διασταύρωση δύο πληθυσμών είναι λιγότερο βιώσιμοι και γόνιμοι σε σχέση με αυτούς που προκύπτουν όταν διασταυρώνονται μεταξύ τους τα άτομα του ίδιου πληθυσμού.

Αρμοστικότητα (fitness): η μέση συνεισφορά ενός αλληλομόρφου ή ενός γονοτύπου στην επόμενη γενιά ή σε επιτυχημένες γενιές, σε σύγκριση με αυτήν άλλου αλληλομόρφου ή γονοτύπου. Παράμετροι σχετικοί με την αρμοστικότητα αναφέρονται στην ικανότητα επιβίωσης ή στη γονιμότητα (ποσότητα γαμετών, συνήθως αυγών, που παράγονται).

Αποκλίνουσα (φυσική) επιλογή (divergent natural selection): συστατικό της φυσικής επιλογής που εκφράζεται λόγω γεωγραφικής και οικολογικής παραλλακτικότητας των ενδιαιτημάτων.

Διάπαυση (diapause): μια προγραμματισμένη, νευροορμονικά ελεγχόμενη, αναστολή της ανάπτυξης ή αναπαραγωγής η έναρξη της οποίας προηγείται της εμφάνισης των δυσμενών περιβαλλοντικών συνθηκών και συμβαίνει κατά τη διάρκεια ορισμένου σταδίου ή σταδίων του βιολογικού κύκλου.

Ένταση διάπαυσης (diapause intensity): η διάρκεια της διάπαυσης υπό δεδομένες συνθήκες.

Εποχική αδράνεια (dormancy): μια εποχικά επαναλαμβανόμενη περίοδος κατά την οποία η ανάπτυξη και η αναπαραγωγή αναστέλλονται.

Κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (cytoplasmic incompatibility): εκφράζεται όταν ένα μολυσμένο με βακτήριο (π.χ. *Wolbachia*) αρσενικό διασταυρωθεί με ένα μη μολυσμένο ή διαφορετικά μολυσμένο θηλυκό και προκαλεί το θάνατο των εμβρύων (σε διπλοειδή έντομα).

Παρατεταμένη διάπαυση (prolonged diapause): παραμονή σε διάπαυση για διάστημα μεγαλύτερο του ενός έτους.

Προαιρετική διάπαυση (facultative diapause): διάπαυση που συμβαίνει στα άτομα ορισμένης μόνο γενεάς ή γενεών, όταν το έντομο, σε κατάλληλα στάδια της ζωής του, υποστεί την επίδραση συγκεκριμένων τιμών ορισμένων παραγόντων του περιβάλλοντος.

Σύζευξη ομοίων (assortative mating): μη τυχαίες συζεύξεις όπου τα άτομα με ίδιο γενότυπο ή/και φαινότυπο συζευγνύονται συχνότερα μεταξύ τους σε σχέση με το τι θα αναμενόταν αν οι συζεύξεις ήταν τυχαίες.

Τοπική προσαρμογή (local adaptation): γενότυποι ενός πληθυσμού έχουν μεγαλύτερη αρμοστικότητα στις τοπικές περιβαλλοντικές συνθήκες των ενδιαιτημάτων τους σε σχέση με τους γενότυπους που προέρχονται από άλλα ενδιαιτήματα.

Φαινοτυπική πλαστικότητα (phenotypic plasticity): η ικανότητα ενός οργανισμού να εκφράζει διαφορετικούς φαινότυπους ανάλογα με τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες.

Φυλετική απομόνωση (sexual isolation): μια μορφή αναπαραγωγικής απομόνωσης που απορρέει από την παραλλακτικότητα κατά την επιλογή σύζευξης.

Φυλετική επιλογή (sexual selection): μία από τις δυνάμεις επιλογής που σχετίζεται με την παραλλακτικότητα στα ποσοστά σύζευξης μεταξύ των ατόμων του ίδιου φύλου, που απορρέει από τον ανταγωνισμό των αρσενικών και την επιλογή σύζευξης των θηλυκών, ή/και μεταξύ των δύο φύλων ενός πληθυσμού.

Υποχρεωτική διάπαυση (obligate diapause): διάπαυση που συμβαίνει σε όλα τα άτομα κάθε γενεάς του εντόμου, ανεξαρτήτως των περιβαλλοντικών συνθηκών.

'Bet hedging': στρατηγική αποφυγής ή αντιστάθμισης του κινδύνου. Τα άτομα ενός πληθυσμού εκφράζουν ένα ευρύ φάσμα φαινοτύπων υπό τις ίδιες μη προβλέψιμες περιβαλλοντικές μεταβολές.

ΕΥΡΕΙΑ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ραγολέτιδα της κερασιάς, *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae), είναι ένα μονοκυκλικό, ολιγοφάγο είδος εντόμου που απαντάται στις εύκρατες περιοχές της Ευρώπης και της Δυτικής Ασίας, καθώς και στην περιοχή της δυτικής Σιβηρίας (Ρωσία). Διαπαύει υποχρεωτικά στο στάδιο της νύμφης για ένα ή περισσότερα έτη και τα ενήλικα εξέρχονται κατά την περίοδο όπου υπάρχουν διαθέσιμοι καρποί-ξενιστές των ειδών του γένους *Prunus* spp. (Rosaceae; *P. cerasus*, *P. avium*, *P. mahaleb*) και *Lonicera* spp. (Caprifoliaceae; *L. xylosteum* and *L. tartarica*). Παρά την οικονομική σημασία του εντόμου για τις ευρωπαϊκές χώρες και ειδικότερα για τη χώρα μας, η βιο-οικολογία και η συμπεριφορά διαφορετικών πληθυσμών του εντόμου δεν έχουν μελετηθεί σε βάθος. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή εξετάστηκε αρχικά η διασπορά των πληθυσμών του εντόμου στην Ελλάδα και η παρουσία του ενδοκυτταρικού βακτηρίου *Wolbachia pipientis*. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας κυρίως ελληνικούς πληθυσμούς αλλά και δύο γερμανικούς με ποικίλα επίπεδα γονιδιακής ροής, μελετήθηκαν οι γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες που καθορίζουν: α) την περάτωση της διάπαυσης και την έκφραση βιολογικών κύκλων μεγαλύτερων του ενός έτους, β) τη μεταδιαπαιτική εξέλιξη των νυμφών, γ) τις δημογραφικές παραμέτρους των ενηλίκων και δ) την ανάπτυξη μηχανισμών προσυζευκτικής απομόνωσης.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής (Κεφάλαιο 3) έδειξαν ότι πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς απαντώνται διάσπαρτα σε ηπειρωτικές και σε νησιωτικές περιοχές της Ελλάδας όπου υπάρχουν καλλιεργούμενες ή αυτοφυείς κερασιές, βυσσινιές, άγριες κερασιές, φυτά μαχαλεπίου και άλλα είδη *Prunus* spp., όπως άγριες κορομηλιές. Όμως, τα ποσοστά προσβολής των καρπών διέφεραν μεταξύ των περιοχών, φυτών-ξενιστών και ετών, ανεξάρτητα του χρόνου ωρίμανσης των καρπών (πρώιμες ή όψιμες ποικιλίες). Επίσης, επιβεβαιώθηκε η παρουσία της *Wolbachia* σε όλους τους ελληνικούς πληθυσμούς του εντόμου μέσω της ανίχνευσης και ταυτοποίησης του στελέχους wCer1.

Στο Κεφάλαιο 4, διαπιστώθηκε ότι οι νύμφες της ραγολέτιδας της κερασιάς μπορούν να περατώσουν τη διάπαυση μετά από έκθεση σε θερμοκρασίες έως 10°C. Η διάρκεια της διάπαυσης διέφερε μεταξύ πληθυσμών που απαντώνται σε περιοχές με διαφορετική φαινολογία καρπών-ξενιστών, υποδεικνύοντας τοπική προσαρμογή στα κλιματικά και γεωγραφικά χαρακτηριστικά των ενδιαιτημάτων. Όμως, η σύντομη διάρκεια έκθεσης ή οι σχετικά υψηλές θερμοκρασίες κατά την περίοδο διαχείμασης επιμήκυναν το

βιολογικό κύκλο ορισμένων ατόμων ενός πληθυσμού μέσω της παρατεταμένης διάπαυσης των νυμφών. Από την άλλη πλευρά, η παρατεταμένη έκθεση σε χαμηλές θερμοκρασίες (για διάστημα μεγαλύτερο από αυτό που απαιτείται για την περάτωση της διάπαυσης) προκάλεσε την ‘επιστροφή’ των νυμφών σε εποχική αδράνεια. Η δυνατότητα έκφρασης βιολογικών κύκλων μεγαλύτερων του έτους κατά το στάδιο της διάπαυσης των νυμφών αποτελεί μέρος των ‘bet-hedging’ στρατηγικών των πληθυσμών της ρακολέτιδας της κερασιάς, ενώ η στρατηγική της ‘επιστροφής’ σε εποχική αδράνεια περιγράφεται για πρώτη φορά σε μονοκυκλικά είδη εντόμων

Στο Κεφάλαιο 5 βρέθηκε ότι η διάρκεια της μεταδιαπαυτικής περιόδου των νυμφών διέφερε σημαντικά μεταξύ των ατόμων με διάπαυση ενός έτους που προέρχονταν είτε από όψιμους πληθυσμούς με χαμηλή γονιδιακή ροή είτε από πρώιμους πληθυσμούς με υψηλή γονιδιακή ροή. Επίσης, σημαντικές ήταν οι γεωγραφικές διαφορές στη μείωση της μεταδιαπαυτικής ανάπτυξης των νυμφών με την αύξηση της θερμοκρασίας. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε γεωγραφική παραλλακτικότητα στη μεταδιαπαυτική ανάπτυξη των νυμφών με παρατεταμένη διάπαυση που προέρχονταν από γενετικά απομονωμένους και οικολογικά διαφορετικούς πληθυσμούς. Σε επίπεδο πληθυσμού, η διάρκεια της μεταδιαπαυτικής περιόδου μειώνεται με τη μείωση της έντασης της διάπαυσης του πληθυσμού, αν και παρατηρήθηκε για πρώτη φορά αύξηση της διάρκειας της μεταδιαπαυτικής περιόδου για τα άτομα που ενηλικιώνονται μετά το μέγιστο της περάτωση της διάπαυσης του πληθυσμού.

Στα Κεφάλαιο 6 & 7 βρέθηκε ότι τα δημογραφικά χαρακτηριστικά και το μέγεθος σώματος των ενήλικων της ρακολέτιδας της κερασιάς που εξήλθαν κατά το πρώτο έτος της διάπαυσης των νυμφών διέφεραν μεταξύ των πληθυσμών που απαντώνται σε ενδιαιτήματα με διαφορετικά οικολογικά χαρακτηριστικά, ακόμα κι όταν οι πληθυσμοί συνδέονται με υψηλά επίπεδα γονιδιακής ροής. Τα ενήλικα που εξήλθαν από νύμφες με παρατεταμένη διάπαυση είχαν μεγαλύτερο μέγεθος σώματος σε σχέση με τα άτομα που ενηλικιώθηκαν κατά το πρώτο έτος διάπαυσης. Παρότι η παρατεταμένη διάπαυση δεν επηρέασε τη διάρκεια ζωής των ενηλίκων, η μείωση στην ωοπαραγωγή ήταν σημαντική ενώ παράλληλα αυξήθηκε η διάρκεια της περιόδου μετά την ωοτοκία.

Σχετικά με τη συμπεριφορά σύζευξης των ενηλίκων της ρακολέτιδας της κερασιάς, τα αποτελέσματα του Κεφαλαίου 8 δείχνουν ότι δεν υπάρχει: α) γεωγραφική παραλλακτικότητα στον ημερήσιο ρυθμό σύζευξης και β) φυλετική απομόνωση μεταξύ πληθυσμών με χαμηλή γονιδιακή ροή ή πληθυσμών με διαφορετική φαινολογία ενηλίκων στον αγρό. Ωστόσο, καταγράφηκαν σημαντικές επιδράσεις φυλετικής επιλογής

μεταξύ των θηλυκών και των αρσενικών ατόμων καθώς και διαφορές στη διάρκεια σύζευξης σε ορισμένες διασταυρώσεις πληθυσμών, ανεξάρτητα της γενετικής απόστασης και της παρουσίας οικολογικών διαφορών.

Συμπερασματικά, βρήκαμε ότι: α) οι πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς διαφέρουν ως προς τα βιολογικά τους χαρακτηριστικά, όπως είναι η διάπαυση και η μεταδιαπαυτική ανάπτυξη των νυμφών καθώς και η δημογραφία ενηλίκων λόγω τοπικής προσαρμογής στα οικολογικά χαρακτηριστικά των ενδιαιτημάτων, β) τα άτομα του κάθε πληθυσμού είναι σε θέση να ανταποκρίνονται λόγω πλαστικότητας σε συγκεκριμένα περιβαλλοντικά ερεθίσματα και να επιμηκύνουν το βιολογικό τους κύκλο στο στάδιο της νύμφης και γ) δεν υπάρχει αναπαραγωγική ασυμβατότητα λόγω επιλογής σύζευξης μεταξύ των πληθυσμών του εντόμου. Συνδυάζοντας την τοπική προσαρμογή με τη φαινοτυπική πλαστικότητα, οι πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς είναι σε θέση να ανταποκρίνονται στην οικολογική ετερογένεια των ενδιαιτημάτων τους καθώς και στις απρόβλεπτες μεταβολές των κλιματικών συνθηκών. Παρά την παραλλακτικότητα στα βιολογικά τους χαρακτηριστικά, οι συζεύξεις μεταξύ των ενηλίκων ατόμων διαφορετικών πληθυσμών παραμένουν τυχαίες.

SUMMARY

The European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae), is a univoltine, stenophagous species that is widely distributed in temperate regions of Europe and west Asia. It infests fruits of the genus *Prunus* spp. (Rosaceae; *P. cerasus*, *P. avium*, *P. mahaleb*) and *Lonicera* spp. (Caprifoliaceae; *L. xylosteum* and *L. tartarica*) and is considered major pest of sweet and sour cherries. *Rhagoletis cerasi* undergoes obligatory diapause at pupal stage for one or more years and adults emerge during the period of fruit-hosts availability. Despite the economic significance of *R. cerasi* for the European cherry production and particularly for the Greek one, variation in life history and behavioral traits among *R. cerasi* populations has not been studied. In the present PhD thesis, we studied the geographic distribution of *R. cerasi* populations in Greece as well as the *Wolbachia* infection status of the Greek populations. Then, we used several Greek as well as two German populations from ecological different habitats and with various levels of gene flow in order to determine genetic and environmental factors that affect: i) the diapause termination and the expression of long life cycles, ii) post-diapause development, iii) life-history traits of adults, and iv) the expression of premating isolation mechanisms.

In Chapter 3, we showed that *R. cerasi* populations are patchily distributed both in islands and continental areas of Greece where sweet cherry orchards or abandoned sweet cherry trees, sour cherry trees, wild growing cherry trees, *P. mahaleb* and other species of the genus *Prunus* spp. grow. However, fruit infestation levels differ among regions, hosts and years, regardless of the fruit maturation time (early-ripening vs late-ripening fruits). In addition, the presence of *Wolbachia* infection was confirmed in all populations tested.

In Chapter 4, we found that *R. cerasi* pupae were able to terminate diapause after being exposed for extended periods of time to low temperatures ranging from 0 to 10°C. Diapause intensity differed among populations located at habitats with different host fruit phenology, indicating local adaptation to climatic and geographical characteristics of their habitats. However, low chilling levels (short duration or warmer winter temperatures) regulate the expression of prolonged diapause. On the other hand, extended chilling (longer than required for terminating annual diapause) 'return' pupae to another (facultative) cycle of dormancy enabling adults to emerge during the next appropriate 'window of time'; a strategy first time reported for univoltine insects.

These findings suggest that long life cycles are expressed as a part of diapause bet-hedging strategies of *R. cerasi* populations.

In Chapter 5, we explored those factors affecting the post-diapause development of *R. cerasi* pupae and we demonstrated differences among individuals with annual diapause originated either from late-emerging populations with low gene flow rates or early-emerging populations with high gene flow rates. Geographic variation in post-diapause developmental time regardless of temperature was also recorded. In contrast, there was no geographical variation in post-diapause developmental time of pupae with prolonged diapause obtained from genetically isolated populations with different ecological characteristics. At population level, the duration of post-diapause development was generally decreased with decreasing diapause intensity, even though an increase in post-diapause developmental time of individuals emerged after diapause termination reported for the first time.

In Chapters 6 & 7, we found that life history traits and body size of *R. cerasi* adults emerged from pupae with annual diapause differed among populations from ecological different habitats, despite the presence of gene flow. Adults emerged from pupae with prolonged diapause had bigger body size than their counterparts emerged during the first year of diapause. Even though prolonged dormancy did not affect adult longevity, we found a significant decrease in female fecundity rates followed by an extended post-oviposition period.

As far as mating behavior is concerned, our results (Chapter 8) showed that there is neither geographical variation in daily mating rhythm nor sexual isolation among *R. cerasi* populations, regardless of their genetic distance and ecological characteristics (e.g. adult phenology). However, we effects of found sexual selection on bith sexes (females and males) as well as differences in mating duration in some mating cross combinations.

In Conclusion, we found that: i) diapause and post-diapause developmental time of pupae as well as life history traits of adults differ among *R. cerasi* populations with habitat heterogeneity due to effects of local adaptation, ii) pupae within populations plastically respond to specific environmental cues and extend their life cycle, and iii) there is no reproductive incompatibility among *R. cerasi* populations based on sexual isolation. Thus, *R. cerasi* populations are adapted to local conditions of their habitats and respond plastically to unpredictable environmental (climatic) conditions. However, there is no sexual isolation among the *R. cerasi* populations considered.

1. ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Διαφοροποίηση γεωγραφικά απομονωμένων πληθυσμών

Γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες καθορίζουν την προσαρμογή των πληθυσμών των εντόμων στα διαφορετικά οικολογικά χαρακτηριστικά των ενδιαιτημάτων τους (Liefting & Eilers, 2008). Στρατηγικές όπως η τοπική προσαρμογή (local adaptation) και η φαινοτυπική πλαστικότητα (phenotypic plasticity) συμβάλλουν στη γεωγραφική διαφοροποίηση των βιολογικών παραμέτρων ενός είδους, ενισχύοντας την προσαρμογή του στα διαφορετικά περιβάλλοντα (Via & Lande, 1985). Η τοπική προσαρμογή αναφέρεται γενικότερα στη γενετική διαφοροποίηση των πληθυσμών με αποτέλεσμα κάθε γενότυπος να είναι καλά προσαρμοσμένος σε ορισμένα μόνο ενδιαιτήματα (Kawecki & Ebert, 2004). Η προσαρμογή των πληθυσμών στις τοπικές περιβαλλοντικές συνθήκες ενισχύεται από τη μειωμένη γονιδιακή ροή και την περιορισμένη διασπορά των ατόμων μεταξύ των διαφορετικών ενδιαιτημάτων. Όμως, οι φαινοτυπικές διαφορές δεν είναι πάντα αποτέλεσμα έκφρασης γενετικών διαφορών μεταξύ των πληθυσμών. Η έκφραση από έναν και μόνο γενότυπο διαφορετικών φαινοτύπων βάσει των εκάστοτε περιβαλλοντικών συνθηκών οφείλεται στη φαινοτυπική πλαστικότητα (Nylin & Gotthard, 1998). Ωστόσο, δεν είναι απαραίτητο να είναι όλοι οι φαινότυποι που εκφράζονται μέσω της φαινοτυπικής πλαστικότητας καλά προσαρμοσμένοι στα τοπικά ενδιαιτήματα, καθώς η έκφρασή τους μπορεί να τροποποιηθεί κατά τρόπο μη προβλέψιμο εξαιτίας της γενετικής παρέκκλισης (genetic drift) ή της γονιδιακής ροής (gene flow) (Alleaume-Benharira, Pen & Ronce, 2006; Masel, King & Manghan, 2007; Crispo, 2008). Σε περίπτωση ύπαρξης γενετικής παραλλακτικότητας που υποστηρίζει την έκφραση της πλαστικότητας (σημαντική αλληλεπίδραση γενοτύπου και περιβάλλοντος), οι 'πλαστικοί' φαινότυποι μπορούν να εξελιχθούν και να προσαρμοστούν στα τοπικά περιβάλλοντα διασφαλίζοντας την προσαρμοστικότητα του γενότυπου (adaptive phenotypic plasticity) (Via & Lande, 1985). Θεωρητικές μελέτες (Via & Lande, 1985; Sultan & Spencer, 2002) και πειραματικά δεδομένα (Richter-Boix, Llorente & Montari, 2006; Lind & Johansson, 2007; Lind *et al.*, 2011) δείχνουν ότι η φαινοτυπική πλαστικότητα αποτελεί συχνή στρατηγική για την προσαρμογή των ειδών σε ετερογενή περιβάλλοντα (Scheiner & Holt, 2012). Σε επίπεδο οργανισμού, οι δύο στρατηγικές ενδέχεται να συνυπάρχουν έτσι ώστε να υπάρχει

γενετική διαφοροποίηση για ορισμένα χαρακτηριστικά και έκφραση πλαστικότητας για κάποια άλλα.

1.1.1. Κλιματική αλλαγή και προσαρμογή των πληθυσμών

Λαμβάνοντας υπόψη ότι η επιλογή των φαινότυπων ενός είδους εντόμου εξαρτάται από το περιβάλλον, σε περίπτωση μεταβολής των περιβαλλοντικών συνθηκών, π.χ. λόγω κλιματικής αλλαγής, αναμένεται να επιλεγούν διαφορετικοί φαινότυποι. Συνεπώς, όταν οι κλιματικές συνθήκες αλλάζουν, ένα είδος εντόμου για να μην εκλείψει οφείλει είτε να προσαρμοστεί, αυξάνοντας τη συχνότητα των γενοτύπων με δυνατότητα έκφρασης των καταλληλότερων φαινότυπων υπό τις επικρατούσες κλιματικές συνθήκες, είτε να εκφράσει διαφορετικούς φαινότυπους με δυνατότητα προσαρμογής μέσω φαινοτυπικής πλαστικότητας (Visser, 2008). Κατά συνέπεια, ο βαθμός προσαρμογής του κάθε είδους στις κλιματικές μεταβολές εξαρτάται από την προσαρμογή στις τοπικές συνθήκες και τη φαινοτυπική πλαστικότητα των βιολογικών του παραμέτρων και χαρακτηριστικών της συμπεριφοράς του (Chevin, Lande & Mace, 2010). Τα περισσότερα είδη διαθέτουν υψηλά επίπεδα γενετικής παραλλακτικότητας για χαρακτηριστικά σχετικά με τη φαινολογία και την αντοχή σε συνθήκες καταπόνησης, ευνοώντας την προσαρμογή τους στις κατά τόπους κλιματικές μεταβολές (Hoffmann & Sgrò, 2011). Ωστόσο, για να είναι επιτυχής η προσαρμογή, ο ρυθμός της δεν πρέπει να υπολείπεται του ρυθμού της κλιματικής αλλαγής (Jenouvrier & Visser, 2011).

Οι πληθυσμοί, που είναι γενετικά προσαρμοσμένοι στις τοπικές κλιματικές συνθήκες, φαίνεται να είναι περισσότερο εκτεθειμένοι στις κλιματικές μεταβολές σε σχέση με αυτούς που προσαρμόζονται μέσω φαινοτυπικής πλαστικότητας (Hoffmann & Sgrò, 2011). Ειδικότερα, τα είδη που προσβάλλουν ένα μόνο είδος ξενιστή (μονοφάγα είδη) ή έχουν στενό κύκλο ξενιστών (ολιγοφάγα ή στενοφάγα είδη) θεωρούνται αρκετά εκτεθειμένα στις κλιματικές μεταβολές, καθώς ο κίνδυνος εξαφάνισης των πληθυσμών τους σε τοπικό επίπεδο είναι υψηλός (Colles, Liow & Prinzing, 2009). Σε περίπτωση που οι κλιματικές συνθήκες μεταβάλλονται χρονικά κατά τρόπο μη προβλέψιμο, η επιβίωση των μονοφάγων ή ολιγοφάγων ειδών διασφαλίζεται είτε μέσω της γεωγραφικής διασποράς σε ευνοϊκότερα ενδιαιτήματα είτε μέσω της διασποράς στο χρόνο μέσω διαφόρων μορφών παρατεταμένης διάπαυσης, επαναποικιώντας τα υπάρχοντα ενδιαιτήματα σε μεταγενέστερο χρόνο (Poisot *et al.*, 2011).

1.2. Αναπαραγωγική απομόνωση και ειδογένεση

Η προσαρμογή των πληθυσμών ενός είδους σε ενδιαιτήματα με διαφορετικά γεωγραφικά και οικολογικά χαρακτηριστικά ενδέχεται να οδηγήσει στην έκφραση μηχανισμών αναπαραγωγικής απομόνωσης. Αναπαραγωγική απομόνωση εκδηλώνεται στο στάδιο πριν τη σύζευξη (προσυζευκτική απομόνωση) μέσω: α) της ισχυρής επιλογής ενδιαιτήματος ή ξενιστή, β) της αδυναμίας επιβίωσης των ατόμων που μεταναστεύουν σε διαφορετικά γι' αυτά ενδιαιτήματα και γ) της αδυναμίας σύζευξης των ατόμων που μεταναστεύουν με τα άτομα του τοπικού πληθυσμού. Επίσης, αναπαραγωγική απομόνωση εκδηλώνεται και στο στάδιο μετά τη σύζευξη (μετασυζευκτική απομόνωση) μέσω της αδυναμίας δημιουργίας ζυγωτού, επιβίωσης ή σύζευξης και προσαρμογής των υβριδίων στα οικολογικά χαρακτηριστικά του ενδιαιτήματος όπου αναπτύσσονται (Barton & de Cara, 2009).

Η έκφραση των μηχανισμών αναπαραγωγικής απομόνωσης μεταξύ γεωγραφικά και οικολογικά διαφοροποιημένων πληθυσμών, που έχουν προσαρμοστεί στα τοπικά τους ενδιαιτήματα, θεωρείται συχνά προθάλαμος ειδογένεσης (Maan & Seehaase, 2011). Για παράδειγμα, η θεωρία της οικολογικής ειδογένεσης προβλέπει ότι η παρουσία κάθε πιθανής μορφής αναπαραγωγικής απομόνωσης μεταξύ διαφοροποιημένων πληθυσμών ενισχύει τη δράση της αποκλίνουσας φυσικής επιλογής (divergent selection), οδηγώντας στη δημιουργία νέων ειδών (Nosil, 2007; Matsubayashi, Ohshima & Nosil, 2010). Όμως, η διαδικασία ειδογένεσης συχνά δεν ολοκληρώνεται στα φυτοφάγα έντομα, παραμένοντας στο στάδιο της τοπικής προσαρμογής των πληθυσμών ή της δημιουργίας βιοτύπων σχετικών με το φυτό-ξενιστή. Σε αυτές τις περιπτώσεις, ο τρόπος που αλληλεπιδρούν η φυσική και η φυλετική επιλογή είναι καθοριστικός για την πορεία της ειδογένεσης, καθώς πιθανή ανταγωνιστική σχέση αναχαιτίζει την ομαλή πορεία προς την ειδογένεση (Hine, McGuigan & Blows, 2011). Επίσης, ιδιαίτερη σημασία έχει και ο ρυθμός με τον οποίο εκφράζονται οι διάφοροι μηχανισμοί αναπαραγωγικής απομόνωσης (προσυζευκτικοί και μετασυζευκτικοί), καθώς οι μηχανισμοί που εκφράζονται κατά τα πρώτα στάδια της ειδογένεσης είναι καθοριστικοί για την επιτυχή ή όχι πορεία της ειδογένεσης (Sobel *et al.*, 2010). Συνεπώς, για να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς ειδογένεσης είναι απαραίτητο: α) να προσδιορίσουμε τις μορφές αναπαραγωγικής απομόνωσης που εκδηλώνονται στα πρώτα στάδια της ειδογένεσης και συμβάλλουν αποφασιστικά στον περιορισμό της γονιδιακής ροής μεταξύ των πληθυσμών και β) να καταλάβουμε τις εξελικτικές δυνάμεις που τις προωθούν και

πως αυτές αλληλεπιδρούν (Coyne & Orr, 2004). Για το σκοπό αυτό, κατάλληλα είδη εντόμων για τη μελέτη των διαδικασιών ειδογένεσης είναι εκείνα των οποίων οι πληθυσμοί διαφοροποιούνται ως προς τα βιολογικά τους χαρακτηριστικά και παρουσιάζουν τα πρώτα σημάδια αναπαραγωγικής απομόνωσης.

1.3. Εποχική αδράνεια

Τα έντομα των εύκρατων περιοχών όφειλαν να προσαρμόσουν τους βιολογικούς τους κύκλους στην προβλεπόμενη εποχικότητα των ενδαιτημάτων τους, χωρίς ωστόσο να περιορίσουν την ικανότητα τους να αντεπεξέρχονται στις απρόβλεπτες καιρικές συνθήκες. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τα έντομα να 'ενσωματώσουν' στο βιολογικό τους κύκλο τη φάση της εποχικής αδράνειας (dormancy), δηλ. μιας εποχικά επαναλαμβανόμενης περιόδου κατά τη διάρκεια της οποίας αναστέλλονται οι διαδικασίες της ανάπτυξης ή/και αναπαραγωγής (Tauber, Tauber & Masaki, 1986). Η εποχική αδράνεια διακρίνεται σε 'quiescence' και σε διάπαυση (diapause).

Στην πρώτη περίπτωση, τα έντομα ανταποκρίνονται άμεσα στις δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες και εισέρχονται, κατά το τρέχον στάδιο ανάπτυξης, σε 'quiescence' μέχρι το πέρας των δυσμενών περιβαλλοντικών συνθηκών. Πρόκειται για μια αντιστρεπτή κατάσταση, μειωμένης μεταβολικής δραστηριότητας, η έκφραση της οποίας καθορίζεται από εξωγενείς παράγοντες που περιορίζουν την ομαλή ανάπτυξη ή/και αναπαραγωγή, όπως η έλλειψη τροφής και οι ακραίες τιμές θερμοκρασίας και υγρασίας.

Αντίθετα, η διάπαυση είναι μια προγραμματισμένη, νευροορμονικά ελεγχόμενη, αναστολή της ανάπτυξης ή αναπαραγωγής, η έναρξη της οποίας προηγείται της εμφάνισης των δυσμενών περιβαλλοντικών συνθηκών καθώς εκδηλώνεται σε συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξης για κάθε είδος (Tauber *et al.*, 1986; Košťál, 2006). Η διάπαυση προκαλείται από συγκεκριμένες τιμές περιβαλλοντικών παραμέτρων, κυρίως φωτοπεριόδου και θερμοκρασίας, οι οποίες προμηνύουν την έλευση δυσμενών συνθηκών ενώ η περάτωσή της καθίσταται εφικτή μόνο μετά την ολοκλήρωση των προγραμματισμένων φυσιολογικών διεργασιών (Danks, 2004). Συνεπώς, η διάπαυση είναι ένα μέσο συγχρονισμού της εμφάνισης του εντόμου με την εποχή όπου επικρατούν ευνοϊκές για την ανάπτυξη και αναπαραγωγή συνθήκες και όχι ένα τρόπος αποφυγής των απρόβλεπτων δυσμενών συνθηκών. Ειδικότερα, η διάπαυση στα φυτοφάγα έντομα έχει διπλό ρόλο καθώς συγχρονίζει: α) την εμφάνιση των εντόμων με τη παρουσία του

κατάλληλου για προσβολή σταδίου του φυτού-ξενιστή και β) την ενηλικίωση των ατόμων εντός πληθυσμού, διασφαλίζοντας την ταυτόχρονη παρουσία των δύο φύλων στον αγρό, ώστε να καθίσταται εφικτή η σύζευξη.

Η διάπαυση μπορεί να χαρακτηριστεί ως φθινοπωρινοχειμερινή, θερινοφθινοπωρινοχειμερινή και θερινή, ανάλογα με την εποχή έναρξης και περάτωσης (Τζανακάκης, 1995). Εκδηλώνεται σε οποιοδήποτε από τα στάδια του βιολογικού κύκλου των εντόμων (αυγό, προνύμφη, νύμφη, ενήλικο), το οποίο όμως παραμένει χαρακτηριστικό για κάθε είδος. Στα ανήλικα στάδια, η διάπαυση εκφράζεται ως ανάσχεση της ανάπτυξης (*developmental diapause*) ενώ στα ενήλικα ως αναπαραγωγική ανωριμότητα (*reproductive diapause*, αναπαραγωγική διάπαυση) (Τζανακάκης, 1995). Τα άτομα που βρίσκονται σε διάπαυση χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένα μορφολογικά, φυσιολογικά και ηθολογικά χαρακτηριστικά, η έκφραση του συνόλου των οποίων είναι γνωστή ως σύνδρομο της διάπαυσης (*diapause syndrome*) (Tauber *et al.*, 1986). Ενδεικτικά αναφέρεται η παραμονή των ατόμων που βρίσκονται σε διάπαυση σε προφυλαγμένες θέσεις, η μειωμένη μεταβολική δραστηριότητα και η αδυναμία αντίδρασης σε τροφικά ή αναπαραγωγικά ερεθίσματα.

1.3.1. Είδη και στάδια διάπαυσης

Διακρίνονται δύο είδη διάπαυσης, η προαιρετική (*facultative diapause*) και η υποχρεωτική (*obligate diapause*). Η έκφραση της προαιρετικής διάπαυσης εξαρτάται από εξωγενή ερεθίσματα (θερμοκρασία, φωτοπερίοδος, υγρασία κ.α.), που σηματοδοτούν την έναρξη της περιόδου προετοιμασίας για την επερχόμενη διάπαυση. Το στάδιο λήψης των παραπάνω ερεθισμάτων προηγείται του σταδίου εκδήλωσης της διάπαυσης ενώ μόνο τα άτομα ορισμένων γενεών εισέρχονται σε προαιρετική διάπαυση (Tauber *et al.*, 1986). Αντίθετα, η υποχρεωτική διάπαυση αποτελεί σταθερό στοιχείο του προγράμματος οντογένεσης των εντόμων που εκδηλώνεται σε όλα τα άτομα της κάθε γενιάς, ανεξάρτητα από τις εκάστοτε περιβαλλοντικές συνθήκες (Košťál, 2006). Η υποχρεωτική διάπαυση είναι χαρακτηριστική του βιολογικού κύκλου των μονοκυκλικών ειδών (*univoltine species*).

Σύμφωνα με τον Košťál (2006), τρία στάδια διακρίνονται κατά την έκφραση των διαδικασιών που σχετίζονται με τη διάπαυση, γνωστά ως στάδιο πριν τη διάπαυση (*pre-diapause*), διάπαυση (*diapause*) και μεταδιάπαυση (*post-diapause*). Υποστάδια χαρακτηρίζουν το κάθε στάδιο, τα οποία σχετίζονται με α) την πρόκληση και την

προετοιμασία της διάπαυσης (diapause induction and preparation), β) την είσοδο, τη διαπαυτική εξέλιξη και την περάτωση της διάπαυσης (diapause initiation, maintenance and termination) και γ) την εποχική μεταδιαπαυτική αδράνεια (post-diapause quiescence) και την έναρξη της μορφογένεσης.

1.3.1.1. Προετοιμασία και πρόκληση της διάπαυσης

Το στάδιο πριν τη διάπαυση χαρακτηρίζεται από τη λήψη περιβαλλοντικών ερεθισμάτων-σημάτων (token stimuli) που προαναγγέλλουν τις επερχόμενες δυσμενείς για ανάπτυξη ή/και αναπαραγωγή συνθήκες και σηματοδοτούν την έναρξη μεταβολικών, φυσιολογικών και άλλων αλλαγών που είναι χαρακτηριστικές για κάθε είδος εντόμου. Ειδικότερα, για να προκληθεί διάπαυση απαιτείται: α) το άτομο (ή η μητέρα του) να υποστεί, για έναν ορισμένο αριθμό ημερών και σε ένα προγενέστερο στάδιο του διαπαύοντος σταδίου (ευαίσθητο στάδιο), την επίδραση του κατάλληλου συνδυασμού φωτοπεριόδου και θερμοκρασίας και β) μεταξύ του ευαίσθητου σταδίου και του διαπαύοντος, οι τιμές της φωτοπεριόδου και της θερμοκρασίας πρέπει να παραμείνουν σε επίπεδα που δεν επιτρέπουν την ανατροπή του αποτελέσματος της προηγούμενης επίδρασης (Τζανακάκης, 1995). Παράγοντες όπως η τροφή, η υγρασία και η πυκνότητα πληθυσμού του εντόμου ενδέχεται να αλληλεπιδρούν με τη φωτοπερίοδο και τη θερμοκρασία, ενισχύοντας τον ρόλο τους κατά την πρόκληση της διάπαυσης (Danks, 1987). Στο πλαίσιο της προετοιμασίας των εντόμων για τη διάπαυση, παρατηρούνται αλλαγές στην ταχύτητα της ανάπτυξης, μειώνεται η αντίδρασή τους σε τροφικά και αναπαραγωγικά ερεθίσματα, συσσωρεύονται ενεργειακά αποθέματα, γίνεται αναζήτηση καταφυγίων διαχείμασης (ή διαθέρισης), παρατηρούνται φαινόμενα μετανάστευσης κ.α. Το στάδιο αυτό δεν παρατηρείται στα μονοκυκλικά είδη εντόμων με υποχρεωτική διάπαυση.

1.3.1.2. Είσοδος, εξέλιξη και περάτωση της διάπαυσης

Κατά το στάδιο της διάπαυσης, το προφίλ των φυσιολογικών λειτουργιών διαφοροποιείται, καθώς αναστέλλονται οι αναπτυξιακές διαδικασίες και εκφράζονται κάποιες άλλες φυσιολογικές διαδικασίες, για τις οποίες λίγα είναι γνωστά. Η αντίδραση των εντόμων στη θερμοκρασία και τη φωτοπερίοδο επίσης αλλάζει κατά τη διάρκεια της διάπαυσης. Αμέσως μετά την είσοδο σε διάπαυση, ο μεταβολικός ρυθμός μειώνεται με

σχετικά ταχύ ρυθμό και η ένταση της διάπαυσης, δηλ. η διάρκεια της διάπαυσης υπό δεδομένες συνθήκες, αυξάνει. Παράλληλα, εκδηλώνονται συμπεριφορές σχετικές με την εύρεση του κατάλληλου για διαχείμαση μικροκλίματος και αύξηση των ενεργειακών αποθεμάτων. Η αναστολή της ανάπτυξης συνεχίζεται και κατά τη διαπαυτική εξέλιξη, όπου ο μεταβολικός ρυθμός παραμένει σταθερά χαμηλός και αυξάνεται η αντοχή σε συνθήκες καταπόνησης. Για την περάτωση της διάπαυσης είναι απαραίτητη η λήψη συγκεκριμένων περιβαλλοντικών ερεθισμάτων, όπως είναι η αλλαγή της φωτοπεριόδου και η αύξηση της θερμοκρασίας μετά από μια περίοδο ψύχους. Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένα είδη εντόμων που μπορούν και περατώνουν τη διάπαυση αυθόρμητα, δηλ. υπό σταθερές συνθήκες φωτοπεριόδου και σχετικά υψηλές θερμοκρασίες. Σε κάθε περίπτωση το πέρας της διάπαυσης συνδέεται με την πλήρη αποκατάσταση της ικανότητας για άμεση ανάπτυξη (Košťál, 2006).

1.3.1.3. Εποχική μεταδιαπαυτική αδράνεια

Η συνέχιση της ανάπτυξης μετά την περάτωση της διάπαυσης (μεταδιαπαυτική ανάπτυξη) είναι άμεσα εφικτή αν και μόνο αν οι επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες είναι ευνοϊκές. Ειδικότερα για τα έντομα της εύκρατης ζώνης, σημαντική προϋπόθεση είναι η θερμοκρασία να είναι μεγαλύτερη μιας κατώτερης θερμοκρασίας, που είναι γνωστή ως 'ουδός ανάπτυξης' και είναι χαρακτηριστική για κάθε είδος. Εκτός της θερμοκρασίας, άλλοι παράγοντες που μπορούν, μόνοι τους ή σε συνδυασμό με τη θερμοκρασία, να επηρεάσουν τη συνέχιση της ανάπτυξης είναι η παρουσία του ξενιστή και η φωτοπερίοδος. Σημειώνεται ότι η φωτοπερίοδος αποτελεί μια ιδιαίτερα αξιόπιστη περιβαλλοντική παράμετρο γιατί μεταβάλλεται σταθερά από τους πόλους προς τον ισημερινό και παραμένει αμετάβλητη από έτος σε έτος (Danks, 2007). Σε περίπτωση που οι περιβαλλοντικές συνθήκες δεν ευνοούν την άμεση ανάπτυξη, τα έντομα εισέρχονται σε μια εξωγενώς καθορισμένη φάση εποχικής μεταδιαπαυτικής αδράνειας (*post-diapause quiescence*), όπου συνεχίζεται η αναστολή της ανάπτυξης ενώ ο μεταβολισμός παραμένει χαμηλός και διαρκεί μέχρι να αρθούν οι περιβαλλοντικές συνθήκες που την επιβάλλουν (π.χ. αύξηση θερμοκρασίας πάνω από την κατώτερη θερμοκρασία-ουδός ανάπτυξης). Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι τα περισσότερα έντομα της εύκρατης ζώνης περατώνουν τη διάπαυση τον Δεκέμβριο και παραμένουν σε μεταδιαπαυτική εποχική αδράνεια για το υπόλοιπο της ψυχρής περιόδου (Hodková, 1982; Košťál, 2006). Συνεπώς, ο ρόλος της εποχικής μεταδιαπαυτικής αδράνειας είναι

διπτός: α) διασφαλίζει την επιβίωση των ατόμων που περάτωσαν τη διάπαυση στα μέσα του χειμώνα και δεν μπορούν άμεσα να συνεχίσουν την ανάπτυξή τους και β) συμβάλλει στον συγχρονισμό της ανάπτυξης μεταξύ των ατόμων ενός πληθυσμού (Belozeron, 2009).

Φαίνεται, λοιπόν, ότι η διάπαυση είναι μια δυναμική κατάσταση, η έκφραση και η διάρκεια της οποίας κατευθύνεται από περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες, οι οποίοι διαφοροποιούνται τόσο μεταξύ των ειδών όσο και μεταξύ των πληθυσμών ενός είδους εντόμου (Tauber *et al.*, 1986).

1.3.2. Παρατεταμένη εποχική αδράνεια

Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα έντομα περατώνουν τη διάπαυσή τους κατά τη διάρκεια ενός ημερολογιακού έτους (12 μήνες), μετά το πέρας του οποίου είτε εξέρχονται είτε πεθαίνουν (simple diapause) (Tauber *et al.*, 1986). Ωστόσο, σε κάποια είδη εντόμων, ορισμένα ή όλα τα άτομα ενός πληθυσμού, παραμένουν (μετά το πέρας των 12 μηνών) φυσιολογικά αδρανή για διάστημα δύο ή και αρκετά περισσότερων ετών. Τα παραπάνω άτομα θεωρείται ότι υφίστανται μια κατάσταση 'ληθάργου' γνωστή ως παρατεταμένη διάπαυση ή, γενικότερα, παρατεταμένη εποχική αδράνεια (prolonged diapause or prolonged dormancy), μετά το πέρας της οποίας συνεχίζουν την ανάπτυξη ή την αναπαραγωγική τους δραστηριότητα (Hanski, 1988). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα άτομα με περατεταμένη διάπαυση να συνυπάρχουν, σε συνθήκες υπαίθρου, με τα άτομα που περατώνουν τη διάπαυση σε λιγότερο από ένα έτος. Παρατεταμένη διάπαυση έχει καταγραφεί σε αρκετά είδη εντόμων, όπως σε φυτοφάγα είδη με περιοδικές εξάρσεις πληθυσμών και υδρόβια είδη της Αρκτικής ζώνης (Danks, 1987; 2004).

Η είσοδος των εντόμων σε παρατεταμένη διάπαυση καθορίζεται είτε από γενετικούς είτε από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Στην πρώτη περίπτωση, ορισμένα από τα άτομα ενός πληθυσμού είναι γενετικώς καθορισμένα να εισέλθουν σε παρατεταμένη διάπαυση καθορισμένης χρονικής διάρκειας (fixed prolonged diapause) ενώ τα υπόλοιπα άτομα περατώνουν τη διάπαυσή τους κατά τη διάρκεια ενός ημερολογιακού έτους (Menu & Debouzie, 1993). Η παραπάνω στρατηγική επηρεάζει συχνά αρνητικά την προσαρμογή των πληθυσμών στο περιβάλλον τους, καθώς τα άτομα με παρατεταμένη διάπαυση: α) έχουν αυξημένη πιθανότητα θνησιμότητας κατά το στάδιο της διάπαυσης και β) αντιμετωπίζουν την ίδια πιθανότητα επικράτησης μη

ευνοϊκών για την επιβίωση και αναπαραγωγή συνθηκών κατά την περίοδο δραστηριότητας των ενηλικών. Μια ιδιαίτερη περίπτωση καθορισμένης χρονικά παρατεταμένης διάπαυσης είναι ο διετής κύκλος ζωής ορισμένων ειδών σκαθαριών της οικογένειας Carabidae που απαντώνται είτε σε ψυχρές περιοχές (υψηλό υψόμετρο ή μεγάλο γεωγραφικό πλάτος) είτε σε ξηροθερμικές περιοχές (Matalin, 1997).

Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που σχετίζονται με την έκφραση της παρατεταμένης διάπαυσης είναι κυρίως η θερμοκρασία, η υγρασία, η φωτοπερίοδος και η έλλειψη τροφής (Saulich, 2010). Προβλήματα διαθεσιμότητας τροφής εκφράζονται στις περιπτώσεις των εφήμερων φυτών-ξενιστών (Sims, 1983), σε περίπτωση μειωμένης καρποφορίας κωνοφόρων δένδρων (Annala, 1982; Hedlin, Miller & Ruth, 1982) και σε φυτά με ακανόνιστη άνθιση ή καρποφορία εξαιτίας χαμηλών επιπέδων της ετήσιας βροχόπτωσης (Nakamura & Ae, 1977; Powell, 1989; 2001). Στις παραπάνω περιπτώσεις, το σύνολο του πληθυσμού των εντόμων ή έστω ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού εκδηλώνει παρατεταμένη διάπαυση, η οποία ελέγχεται από την έκφραση πλαστικότητας βάσει αξιόπιστων περιβαλλοντικών ερεθίσματων (predictive plasticity). Οι παράγοντες που καθορίζουν τη διάρκεια της διάπαυσης είναι άρρηκτα συνδεδεμένοι με αυτούς που ελέγχουν τη μεταδιαπαυτική ανάπτυξη, ευνοώντας τις περιοδικές εκρήξεις πληθυσμών (Powell, 1974).

Από την άλλη πλευρά, αρκετά είδη εντόμων καλούνται να επιβιώσουν σε περιβάλλοντα όπου οι επικρατούσες συνθήκες κατά το στάδιο της διάπαυσης δεν συνδέονται άμεσα με τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες κατά την περίοδο της αναπαραγωγικής τους δραστηριότητας. Σε αυτή την περίπτωση, ορισμένα από τα άτομα ενός πληθυσμού συνεχίζουν να διαπαύουν και μετά την επικράτηση ευνοϊκών συνθηκών για την περάτωση της ετήσιας διάπαυσης, μειώνοντας την πιθανότητα εξαφάνισης του πληθυσμού μετά από ένα δυσμενές για την ανάπτυξη και την επιβίωση έτος. Η παραπάνω στρατηγική είναι γνωστή ως 'bet-hedging' (Philippi & Seger, 1989; Hopper, 1999), 'coin-flipping plasticity' (Coopler & Kaplan, 1982) ή στοχαστικός πολυφαινισμός (stochastic polyphenism) (Walker, 1986). Η εκτεταμένη περίοδος ενηλικίωσης του συνολικού αριθμού των απογόνων ενός θηλυκού συμβάλλει στην αύξηση της αρμοστικότητας του θηλυκού σε ενδιαιτήματα όπου οι περιβαλλοντικές συνθήκες μεταβάλλονται κατά τρόπο μη προβλέψιμο, παρότι η παρατεταμένη διάπαυση συχνά σχετίζεται με μειωμένη αρμοστικότητα των απογόνων. Παραδείγματα εντόμων όπου η παρατεταμένη διάπαυση έχει αποδοθεί στην έκφραση της στρατηγικής 'bet-hedging' αποτελούν τα καρποφάγα είδη *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae) (Menu,

1993; Menu & Desouhant, 2002; Soula & Menu, 2003) και *C. sikkimensis* (Coleoptera, Curculionidae) (Higaki, 2005) καθώς και η μέλισσα της ερήμου *Perdita portalis* (Hymenoptera: Andrenidae) (Danforth, 1999).

Η διάρκεια της παρατεταμένης διάπαυσης καθορίζεται κυρίως από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία και η υγρασία (Higaki & Ando, 1999; Higaki, 2005) αλλά ενδέχεται να επηρεάζεται και από τη διαθεσιμότητα των ενεργειακών αποθεμάτων, κυρίως των λιπιδίων (Menu & Desouhant, 2002). Ειδικότερα για τα είδη της εύκρατης ζώνης, οι εποχιακές μεταβολές της θερμοκρασίας φαίνεται να είναι καθοριστικές για το χρόνο περάτωσης της παρατεταμένης διάπαυσης. Πράγματι, οι επαναλαμβανόμενοι εποχικοί κύκλοι των θερμών και ψυχρών περιόδων (καλοκαίρι-χειμώνας) αποτελούν αξιόπιστο ερέθισμα για την έγκαιρη περάτωση της παρατεταμένης διάπαυσης σε είδη όπως το *C. sikkimensis* (Coleoptera, Curculionidae), *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae), *Eobiana japonica* (Orthoptera: Tettigoniidae) κ.α, σε αντίθεση με την παρατεταμένη έκθεση σε χαμηλές θερμοκρασίες (Neilson, 1962; Dean & Hartley, 1977; Higaki & Ando, 2000; Higaki, 2006). Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι η παρατεταμένη διάπαυση του *C. sikkimensis* (Coleoptera, Curculionidae) είναι αντιστρέψιμη μέσω της επικράτησης μέτρια υψηλών θερμοκρασιών κατά τη θερμή περίοδο του έτους (Higaki *et al.*, 2010; Higaki & Toyama, 2012).

1.4. Το ενδοσυμβιωτικό βακτήριο *Wolbachia*

Το ενδοκυτταρικό βακτήριο *Wolbachia pipientis* (στο εξής *Wolbachia*) είναι ιδιαίτερα διαδεδομένα στα αρθρόποδα και τα έντομα. Περισσότερα από το 65% των ειδών των εντόμων που έχουν εξεταστεί έχουν βρεθεί μολυσμένα με κάποιο στέλεχος της *Wolbachia* (Jeyarakash & Hoy, 2000; Hilgenboecker *et al.*, 2008). Η *Wolbachia* εντοπίζεται κυρίως στους αναπαραγωγικούς ιστούς των ξενιστών της αλλά ενδέχεται να εντοπιστεί και σε άλλους ιστούς και όργανα, όπως στην αιμολέμφο, στον εγκέφαλο, στους σιελογόνους αδένες, στους μύες και στο στομάχι (Frydman *et al.*, 2006; Saridaki & Bourtzis, 2010).

Η *Wolbachia* θεωρείται αναπαραγωγικό παράσιτο (reproductive parasite) καθώς χρησιμοποιεί το αναπαραγωγικό σύστημα των ξενιστών της προς όφελος της δικής της διασποράς, ανεξαρτήτως του κόστους προσαρμογής που ενίοτε επιφέρει στους ξενιστές της (Werren, Baldo & Clark, 2008). Οι στρατηγικές που έχει υιοθετήσει για την αποτελεσματικότερη επιβίωση και ταχύτερη διασπορά μεταξύ των ξενιστών της είναι: α)

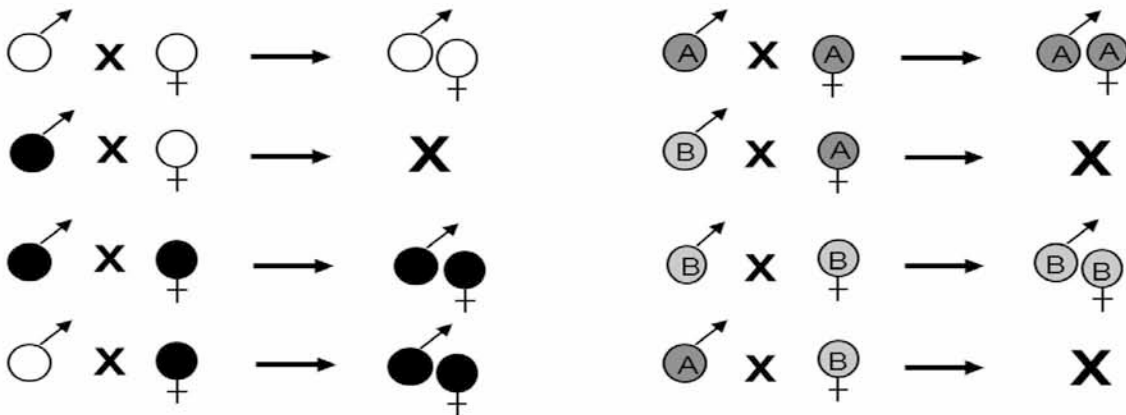
η θηλυκοποίηση (feminization, F), δηλαδή η μετατροπή των γενετικά καθορισμένων αρσενικών ατόμων σε θηλυκά, τα οποία είναι σε θέση να διασταυρωθούν με γενετικά καθορισμένα αρσενικά άτομα και να δώσουν βιώσιμους απογόνους (Cordaux *et al.*, 2004; Narita *et al.*, 2011), β) η παρθενογένεση (parthenogenesis, P), δηλ. η αποκλειστική παραγωγή θηλυκών απογόνων από μολυσμένα με *Wolbachia* θηλυκά (Arakaki, Noda & Yamagishi, 2000; Huigens *et al.*, 2000; Kageyama, Narita & Watanabe, 2012), γ) η θανάτωση των αρσενικών (male killing, M-K), που οφείλεται στην αναδιάρθρωση της χρωματίνης (chromatin remodelling) (Riparbelli *et al.*, 2012) κατά τη διάρκεια των πρώιμων εμβρυακών σταδίων (Fialho & Stevens, 2000; Huigens *et al.*, 2004; Dyson & Hurst, 2004; Charlat *et al.*, 2005; Vanthournout, Swaegers & Hendrickx, 2011) και δ) η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (cytoplasmic incompatibility, CI), που είναι ένα είδος στειρότητας των αρσενικών με ευρεία απήχηση σε όλες σχεδόν τις τάξεις των εντόμων αλλά και σε μερικά είδη χερσαίων ισόποδων (Werren *et al.*, 1995; Bourtzis, Braig & Karr, 2003; Gueguen, Onemola & Govind, 2012).

Σε ορισμένες περιπτώσεις η μόλυνση των πληθυσμών των εντόμων με στελέχη της *Wolbachia* έχει θετική επίδραση στη βιολογία τους (mutualism). Ειδικότερα, αποτρέπει την απόπτωση των κυττάρων στο παρασιτοειδές *Asobara tabida* (Hymenoptera: Braconidae) διασφαλίζοντας την ομαλή ωογένεση και αναπαραγωγή (Dedeine *et al.*, 2001; Pannebakker *et al.*, 2007) και συμβάλλει στην ομαλή θρέψη του ημιπτέρου *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae) (Hosokawa *et al.*, 2010). Επίσης, προστατεύει το είδος *Drosophila melanogaster* από μολύνσεις με ποικιλία RNA ιών (Teixeira, Ferreira & Ashburner, 2008; Hedges *et al.*, 2008), χωρίς ωστόσο η παραπάνω αντίδραση να εντάσσεται στο πλαίσιο μιας γενικευμένης προστασίας από ενδοκυττάρους παθογόνους οργανισμούς, όπως για παράδειγμα δευτερογενείς βακτηριακές μολύνσεις (Rottschaefer & Lazzaro, 2012).

1.4.1. Κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (KA)

Βάσει του αριθμού των διαφορετικών στελεχών *Wolbachia* που εμπλέκονται στην κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (KA) διακρίνονται δύο είδη KA, η μονόδρομη KA (unidirectional CI) και η αμφίδρομη KA (bidirectional CI). Στη μονόδρομη KA υπάρχει μόνο ένα στέλεχος ή μόνο ένα διαφορετικό στέλεχος μεταξύ δύο πληθυσμών ενός ξενιστή. Διασταυρώσεις μεταξύ των μολυσμένων αρσενικών και μη μολυσμένων ή μολυσμένων με ένα διαφορετικό στέλεχος θηλυκών ατόμων δίνουν μικρό αριθμό

απογόνων ή είναι άγονες, ενώ οι αντίστροφες διασταυρώσεις είναι γόνιμες (Εικόνα 1). Στην αμφίδρομη ΚΑ εμπλέκονται δύο διαφορετικά στελέχη *Wolbachia*. Άγονες είναι οι διασταυρώσεις θηλυκών και αρσενικών από πληθυσμούς που είναι μολυσμένοι με διαφορετικά στελέχη του βακτηρίου. Αμφίδρομη ΚΑ έχει παρατηρηθεί κυρίως μεταξύ γεωγραφικά απομονωμένων πληθυσμών, όπως στο είδος *Drosophila simulans* (O'Neill & Karr, 1990), αλλά και μεταξύ στενά συγγενικών ειδών, όπως στο γένος *Nasonia* (Breeuwer & Werren, 1990).



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση μονόδρομης (αριστερά) και αμφίδρομης (δεξιά) κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας (ΚΑ). Τα άτομα με άσπρο και μαύρο χρώμα είναι μη μολυσμένα και μολυσμένα με *Wolbachia*, αντίστοιχα. Τα άτομα με γκρι ανοιχτό και γκρι σκούρο χρώμα είναι μολυσμένα με το στέλεχος Α και το στέλεχος Β της *Wolbachia*, αντίστοιχα.

Οι μολύνσεις ενός πληθυσμού με πολλαπλά στελέχη των βακτηρίων *Wolbachia* που είναι σε θέση να προκαλέσουν ΚΑ έχουν θεωρητικά αθροιστικό αποτέλεσμα, δηλ. αρσενικά άτομα με πολλαπλές μολύνσεις παρουσιάζουν ασυμβατότητα τόσο με μη μολυσμένα θηλυκά όσο και με θηλυκά που είναι μολυσμένα με μόνο ένα στέλεχος. Ωστόσο, σε πρόσφατη μελέτη υπογραμμίζεται η μη αθροιστική δράση της διπλής μόλυνσης με στελέχη *Wolbachia* που προκαλούν ΚΑ σε φυσικούς πληθυσμούς του *Orius strigicollis* (Hemiptera: Antrocoridae). Συγκεκριμένα, το ένα στέλεχος του βακτηρίου (*wOus1*) βρέθηκε να επηρεάζει την ικανότητα πρόκλησης ΚΑ του δεύτερου στελέχους (*wOus2*) περιορίζοντας το μέγεθος του πληθυσμού του στελέχους *wOus2* στο μολυσμένο με τα δύο στελέχη άτομο του εντόμου (Watanabe *et al.*, 2011). Φαίνεται

λοιπόν ότι η KA είναι μια ιδιαίτερα δυναμική στρατηγική, καθώς τα στελέχη της *Wolbachia* με δυνατότητα KA είναι ικανά να αναπτύξουν πολύπλοκες σχέσεις KA στους πληθυσμούς των ξενιστών τους (Duron *et al.*, 2012).

Η δυναμική της μονόδρομης και αμφίδρομης KA μπορεί να αξιοποιηθεί μέσω της τεχνικής του ασύμβατου εντόμου (Incompatible Insect Technique, IIT) στη διαχείριση πληθυσμών εντόμων με γεωργική σημασία (Tagami *et al.*, 2006; Bourtzis, 2008; Brelsfoard & Dobson, 2009) και εντόμων-φορέων ασθενειών, όπως είναι η μύγα τσετσέ (Alam *et al.*, 2011; Doudoumis *et al.*, 2012) και τα κουνούπια (Iturbe-Ormaetxe, Walker & O' Neill, 2011; Atyame *et al.*, 2011). Η τεχνική του ασύμβατου εντόμου είναι ανάλογη της τεχνικής της εξαπόλυσης στειρωμένων εντόμων (Sterile Insect technique, SIT) και η παραγωγή μη βιώσιμων απογόνων βασίζεται και ενισχύεται με την αδιάλειπτη εξαπόλυση αρσενικών μολυσμένων με *Wolbachia* ή με στελέχη *Wolbachia* ικανά να προκαλέσουν KA κατά τη σύζευξή τους με τα θηλυκά του πληθυσμού-στόχου (Bourtzis, 2008). Σε περίπτωση που οι πληθυσμοί-στόχοι δεν είναι φυσικά μολυσμένοι με *Wolbachia*, είναι εφικτή η οριζόντια μεταφορά στελεχών των βακτηρίων *Wolbachia* από πληθυσμό-δότη φυσικά μολυσμένο με *Wolbachia*. Χαρακτηριστικά αναφέρονται οι περιπτώσεις των *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) (Zabalou *et al.*, 2004; 2009) και *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) (Apostolaki *et al.*, 2011), όπου εργαστηριακοί πληθυσμοί των παραπάνω ειδών μολύνθηκαν τεχνητά με στελέχη *Wolbachia* που είχαν την ικανότητα πρόκλησης KA και προέρχονταν από φυσικά μολυσμένους πληθυσμούς της ραγολέτιδας της κερασιάς, *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae).

1.4.2. Διαφοροποίηση πληθυσμών-ξενιστών και ειδογένεση

Τα συμβιωτικά βακτήρια είναι σε θέση να επηρεάσουν την έκφραση των βιολογικών παραμέτρων τόσο των ενήλικων όσο και των ανήλικων σταδίων των εντόμων επηρεάζοντας την προσαρμογή των πληθυσμών στο περιβάλλον τους. Συγκριτικές μελέτες μεταξύ μη μολυσμένων πληθυσμών εντόμων και φυσικά ή τεχνητά μολυσμένων πληθυσμών με ένα ή περισσότερα στελέχη των βακτηρίων *Wolbachia* υποστηρίζουν τόσο την παρουσία θετικών (Fry & Rand, 2002; Dobson, Marsland & Rattanadechakul, 2002; Dobson, Rattanadechakul & Marsland, 2004) όσο και αρνητικών επιπτώσεων στην επιβίωση και αναπαραγωγή των ενήλικων (Min & Benzer, 1997; Poinot & Mercot 1997; Fluery *et al.*, 2000; Perrot-Minnot *et al.*, 2002; McMeniman *et al.*,

2009; Sarakatsanou *et al.*, 2011; Vasquez *et al.*, 2011). Απουσία σημαντικής επίδρασης έχει επίσης αναφερθεί (Ankola, Brueckner & Pottaraju, 2011; Friberg *et al.*, 2011), ενώ πρόσφατα βρέθηκε ότι η παρουσία ή όχι επιπτώσεων στις βιολογικές παραμέτρους των ενηλικών λόγω μόλυνσης με *Wolbachia* καθορίζεται από το φύλο (Rasgon, 2012). Εντούτοις, συγκριτικά λιγότερες είναι οι μελέτες που εστιάζονταν στις επιδράσεις της μόλυνσης με *Wolbachia* στις βιολογικές παραμέτρους των ανήλικων σταδίων. Η παρουσία των βακτηρίων δεν επηρέασε σημαντικά τα ανήλικα στάδια του κουνουπιού *Aedes albopictus* (Islam & Dobson, 2006; Gavotte *et al.*, 2009), αν και παράγοντες όπως το φύλο και ο βαθμός συνωστισμού είναι καθοριστικοί για την έκφραση πιθανών επιπτώσεων (Gavotte *et al.*, 2010). Ωστόσο, θεωρητικές μελέτες υποστηρίζουν ότι η παρουσία των βακτηρίων *Wolbachia* επηρεάζει αρνητικά την επιβίωση των ανήλικων σταδίων των εντόμων (Crain *et al.*, 2011). Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι τόσο το γενετικό υπόβαθρο του ξενιστή όσο και το είδος του στελέχους *Wolbachia* είναι εξίσου σημαντικά για την ακριβή εκτίμηση των επιπτώσεων του κάθε τύπου μόλυνσης με *Wolbachia* στην αρμοστικότητα των πληθυσμών-ξενιστών (Fry, Palmer & Rand, 2004; Dean, 2006; Carrington, Hoffmann & Weeks, 2010; Sarakatsanou *et al.*, 2011; Xie, Chen & Hong, 2011).

Επιπρόσθετα, η μόλυνση των πληθυσμών των εντόμων με στελέχη *Wolbachia* που προκαλούν ΚΑ μπορεί να έχει επιπτώσεις στη σεξουαλική τους συμπεριφορά. Χαρακτηριστικά αναφέρεται η αύξηση της ανταγωνιστικότητας σπέρματος στα σκαθάρια του γένους *Tribolium* (Wade & Chang, 1995), οι αλλαγές στην σπερματοθήκη των θηλυκών γρύλων του γένους *Allonemobius* (Marshall, 2007), καθώς και η μείωση της παραγωγής σπέρματος στο είδος *Drosophila simulans* (Diptera: Drosophilidae) (Snook *et al.*, 2000) και της μεταφοράς γόνιμου σπέρματος στο μικρολεπιδόπτερο *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) (Lewis *et al.*, 2011).

Τα συμβιωτικά βακτήρια *Wolbachia* που μπορούν να προκαλέσουν ΚΑ είναι σε θέση να μειώσουν τη γενετική ροή μεταξύ των πληθυσμών, οδηγώντας σε αναπαραγωγική απομόνωση και πιθανότατα ειδογένεση (Engelstaedter & Hurst, 2009; Brucker & Bordenstein, 2012). Ειδικότερα, η ΚΑ μπορεί να θεωρηθεί ως η κύρια αιτία της αναπαραγωγικής απομόνωσης μέσω της αμφίδρομης ΚΑ ή ενδέχεται να έχει επικουρικό ρόλο στην εξελικτική διαδικασία είτε ως μονόδρομη είτε ως αμφίδρομη ΚΑ (O'Neill & Karr, 1990; Werren, 1998). Θεωρητικές μελέτες υποστηρίζουν το ρόλο των βακτηρίων *Wolbachia* στη διατήρηση της γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ παραπάτριων πληθυσμών (Telschow *et al.*, 2007; Telschow, Yamamura & Werren, 2005a; Flor,

Hammerstein & Telschow, 2007) και στην πρόκληση προσυζευκτικής απομόνωσης (Telschow, Hammerstein & Werren, 2005b). Ωστόσο, μόνο τρεις περιπτώσεις πειραματικών μελετών έχουν αναφερθεί (Shoemaker, Katju & Jaenike, 1999; Bordenstein, O'Hara & Werren, 2001; Miller, Ehrman & Schneider, 2010).

1.5. Η ραγολέτιδα της κερασιάς, *Rhagoletis cerasi*

Η ραγολέτιδα της κερασιάς ή ευρωπαϊκή μύγα των κερασιών, *Rhagoletis cerasi* (Linnaeus, 1758), είναι έντομο μεγάλης γεωργικής σημασίας με ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως προς τη μελέτη της βιολογίας, συμπεριφοράς και γενετικής των φυσικών πληθυσμών του. Παλαιότερες ονομασίες του *R. cerasi* αποτελούν τα *R. cerasorum* (Dufour), *R. liturata* (Robineau-Desvoidy), *R. signata* (Meigen), *Trypeta signata* (Meigen), *Musca cerasi* Linnaeus, *Urophora cerasorum* (Dufour) και *U. liturata* (Robineau - Desvoidy) (White & Elson-Harris, 1992).

1.5.1. Συστηματική κατάταξη

Η συστηματική κατάταξη της ραγολέτιδας της κερασιάς έχει ως εξής:

ΒΑΣΙΛΕΙΟ: Animalia

ΥΠΟΒΑΣΙΛΕΙΟ: Eumetazoa

ΦΥΛΟ: Arthropoda

ΥΠΟΦΥΛΟ: Hexapoda

ΚΛΑΣΗ: Insecta

ΥΠΟΚΛΑΣΗ: Neoptera

ΔΙΑΙΡΕΣΗ: Holometabola

ΤΑΞΗ: Diptera

ΥΠΟΤΑΞΗ: Brachycera

ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ: Tephritoidea

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ: Tephritidae

ΥΠΟΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ: Trypetinae

TRIBE: Carpomyini

SUBTRIBE: Carpomyina

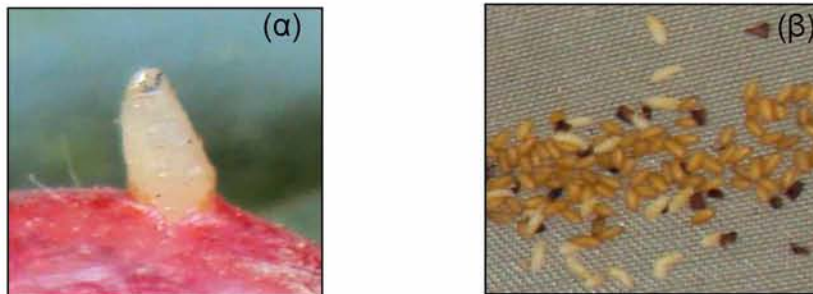
ΓΕΝΟΣ: *Rhagoletis*

ΕΙΔΟΣ: *cerasi*

Σύμφωνα με τους White και Elson-Harris (1992), υπάρχουν βιότυποι και υποείδη του *R. cerasi* που δύσκολα διαχωρίζονται, όπως τα *R. cerasi fasciata* Rohdendorf, *R. cerasi nigripes* Rohdendorf και *R. cerasi obsoleta* Hering.

1.5.2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Το αυγό είναι λευκό και έχει μήκος 0,75 χιλ και διάμετρο 0,25 χιλ. (Wiesmann, 1933). Το σχήμα του είναι στενόμακρο, ελλειψοειδές και ελαφρώς κυρτό. Η προνύμφη είναι άποδη και χωρίς κεφαλική κάψα με το πρόσθιο τμήμα του σώματος στενότερο από το εδραίο. Έχει χρώμα λευκό ή υπόλευκο και το μήκος κυμαίνεται από 0,6 χιλ. (νεαρή προνύμφη) έως 6 χιλ. (πλήρως αναπτυγμένη προνύμφη) με πλάτος 1,2 -1,5 χιλ. Διακρίνονται τρεις προνυμφικές ηλικίες (Εικόνα 2α). Η νύμφη βρίσκεται εντός νυμφικού περιβλήματος (ryparium) διαστάσεων 4x2 χιλ. και σχήματος ελλειψοειδούς με έμφαση στις μεσοδακτύλιες γραμμές. Έχει χρώμα κιτρινωπό έως ανοιχτό καστανό (Εικόνα 2α, 2β) (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος, 2003). Το ενήλικο έχει χρώμα σώματος μαύρο λαμπερό ενώ το πρόσθιο τμήμα της κεφαλής και οι κεραίες είναι κίτρινες ή κιτρινωπές. Το scutellum έχει έντονο κίτρινο χρώμα. Οι πτέρυγες φέρουν 4 μαύρες ζώνες σε χαρακτηριστική διάταξη. Συγκεκριμένα, οι 3 από αυτές εκτείνονται εγκάρσια στην πτέρυγα ενώ η τέταρτη καλύπτει, κατά μήκος, την κορυφή της πτέρυγας και ενώνεται με την τρίτη ζώνη σχηματίζοντας σχεδόν ορθή γωνία με αυτή. Στην πρόσθια παρυφή της πτέρυγας υπάρχει συνήθως μια μικρή μαύρη κηλίδα ανάμεσα στην δεύτερη και τρίτη εγκάρσια ζώνη. Το μέγεθος των αρσενικών ατόμων είναι 2,9-4 χιλ. ενώ τα θηλυκά έχουν μεγαλύτερο μέγεθος (3,8-5,3 χιλ.) και ωοθήτη που διακρίνεται ευκρινώς (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος, 2003).



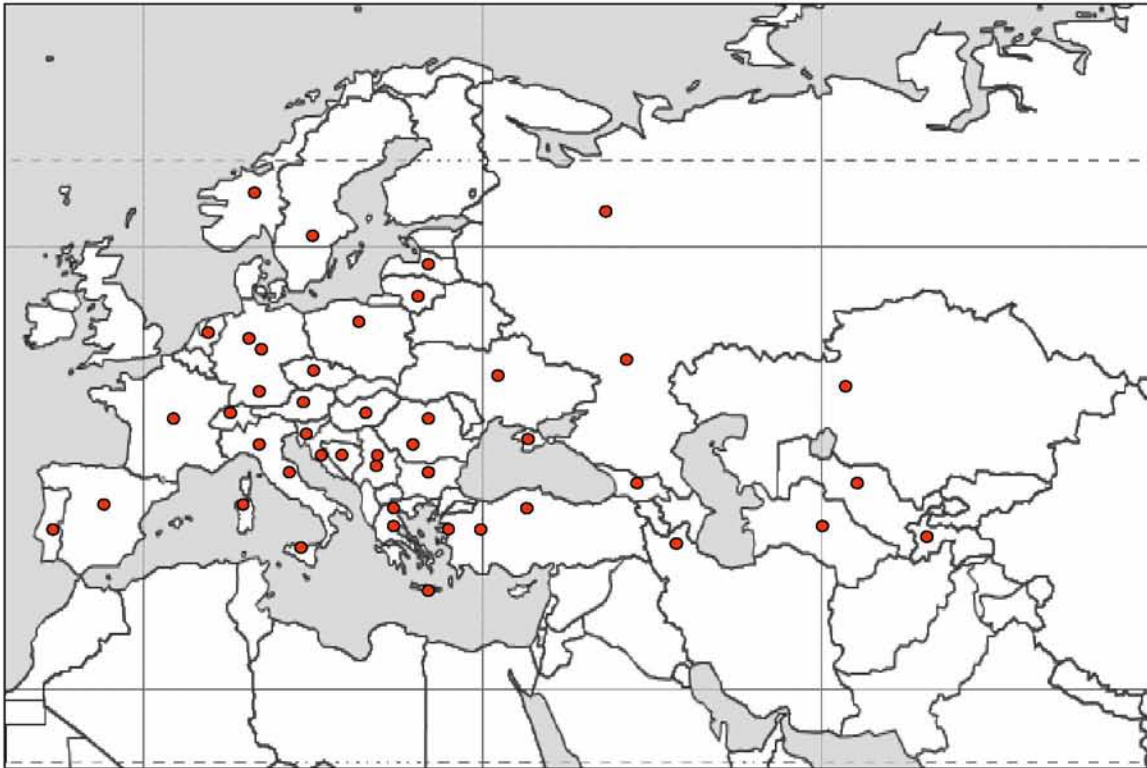
Εικόνα 2. Στάδια της ραγολέτιδας της κερασιάς. α) προνύμφη 3^{ου} σταδίου κατά την έξοδό της από το κεράσι, β) προνύμφες 3^{ου} σταδίου πριν τη νύμφωση και νύμφες.

1.5.3. Φυτά-ξενιστές και γεωγραφική διασπορά

Η ραγολέτιδα της κερασιάς θεωρείται είδος ολιγοφάγο (ή στενοφάγο) με πρωτεύοντες ξενιστές είδη του γένους *Prunus* spp. (οικ. Rosaceae) και δευτερεύοντες είδη του γένους *Lonicera* spp. (οικ. Caprifoliaceae). Συγκεκριμένα, προσβάλλει καρπούς κυρίως της κερασιάς (*P. avium* L.) αλλά και της βυσσινιάς (*P. cerasus*), καθώς και καρπούς των ειδών *P. serotina* και *P. mahaleb*. Ορισμένα άγρια είδη κερασιάς (*Prunus* spp.) λειτουργούν συνήθως ως καταφύγια για τους πληθυσμούς της ραγολέτιδας της κερασιάς (Thiem, 1934). Επίσης, η ραγολέτιδα της κερασιάς προσβάλλει και τα αυτοφυή ή καλλωπιστικά είδη *L. xylosteum* L. και *L. tartarica* L., τα οποία σπάνια απαντώνται στην Ελλάδα (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος, 2003).

Πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς απαντώνται σε όλες σχεδόν τις ευρωπαϊκές χώρες, στη Δυτική Σιβηρία και στις εύκρατες περιοχές της Δυτικής Ασίας (Fimiani, 1989; White & Elson-Harris, 1992; Jaastad, 1994; Mohamadzade Namin, Nozari & Rasouljan, 2010; EPPO, 2009) (Εικόνα 3). Ως αποτέλεσμα της έκφρασης κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας, διακρίνονται δύο φυλές μεταξύ των πληθυσμών του *R. cerasi*, η βόρεια και η νότια. Ειδικότερα, οι διασταυρώσεις μεταξύ θηλυκών της βόρειας φυλής και αρσενικών της νότιας φυλής δεν δίνουν απογόνους ενώ οι αντίστροφες διασταυρώσεις είναι γόνιμες (Boller *et al.*, 1976). Η νότια φυλή απαντάται στις ευρωπαϊκές περιοχές της Αυστρίας, νοτιοδυτικής Γαλλίας, νότιας Γερμανίας, Ιταλίας (συμπεριλαμβανομένων της Σαρδηνίας και Σικελίας), Πορτογαλίας, Ισπανίας και Ελβετίας. Η βόρεια φυλή απαντάται στις υπόλοιπες Ευρωπαϊκές χώρες (Βουλγαρία, Τσεχία, Σλοβακία, Γαλλία (εκτός νοτιοδυτικά), Γερμανία (εκτός νότια), Ελλάδα, Ουγγαρία, Λετονία, Λιθουανία, Κάτω Χώρες, Νορβηγία, Πολωνία, Ρουμανία, Σουηδία, Τουρκία (βόρεια και βορειο-δυτικά), Γεωργία, Ρωσία, Ουκρανία, Γιουγκοσλαβία) και στις περιοχές της Ασίας (Ιράν, Καζακστάν, Κιργισία, Τουρκμενιστάν, Τατζικιστάν). Παρότι η παρουσία 'Rickettsia Like Organisms' (RLOs) στις ωσθήκες των θηλυκών ατόμων ήταν γνωστή από τα τέλη του '90 (Blümel & Russ, 1989), η αιτία της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας προσδιορίστηκε σχετικά πρόσφατα και σχετίζεται με τη μόλυνση των πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς με διαφορετικά στελέχη των μητρικά κληρονομούμενων ενδοκυτταρικών βακτηρίων *Wolbachia* (Riegler & Stauffer, 2002). Ειδικότερα, τα στελέχη *wCer2* και *wCer4* της *Wolbachia* μπορούν τεκμηριωμένα πλέον να προκαλέσουν κυτταροπλασματική αναπαραγωγική ασυμβατότητα στους ξενιστές

τους (φυσικούς ή τεχνικά μολυσμένους πληθυσμούς εντόμων) (Riegler & Stauffer, 2002; Zabalou *et al.*, 2004, 2009; Apostolaki *et al.*, 2011).



Εικόνα 3. Χάρτης γεωγραφικής διασποράς πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς. Με κόκκινους κύκλους σημειώνονται οι περιοχές όπου απαντώνται πληθυσμοί του εντόμου (EPPO, 2009).

1.5.4. Βιολογία και συμπεριφορά

Η ραγολέτιδα της κερασιάς εισέρχεται σε υποχρεωτική διάπαυση στο στάδιο της νύμφης και απαιτεί μια περίοδο χαμηλών θερμοκρασιών για να περατώσει τη διάπαυση (Vallo, Remund & Boller, 1976). Ο χρόνος περάτωσης της διάπαυσης διαφοροποιείται μεταξύ των πληθυσμών και τοποθετείται μεταξύ του τέλους του χειμώνα έως νωρίς την άνοιξη (Ιανουάριο-Φεβρουάριο) (Papanastasiou *et al.*, 2011). Σε περίπτωση που η θερμοκρασία του περιβάλλοντος παραμένει, μετά την περάτωση της διάπαυσης, χαμηλότερη της θερμοκρασίας-ουδού (5°C), οι νύμφες παραμένουν σε εποχική μεταδιαπαυτική αδράνεια τύπου quiescence έως ότου επικρατήσουν θερμοκρασίες

υψηλότερες από τους 5°C. Η μεταδιαπauτική ανάπτυξη των νυμφών ολοκληρώνεται με την έξοδο των ενηλίκων και απαιτεί τη συμπλήρωση 430 ημεροβαθμών (DD) (Baker & Miller, 1978). Η διάρκεια της διάπauσης και η περίοδος ενηλικίωσης διαφέρει μεταξύ των πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς καθώς εξαρτάται από τα οικολογικά χαρακτηριστικά των ενδιαιτημάτων (φαινολογία φυτών-ξενιστών, υψόμετρο κ.α.) και τις επικρατούσες κλιματικές συνθήκες (Vallo *et al.*, 1976; Kovanci & Kovanci, 2006; Papanastasiou *et al.*, 2011). Ωστόσο, ένα ποσοστό των νυμφών, που ενδέχεται να αγγίξει και το 100% ανάλογα με την περιοχή και το έτος, παραμένει σε κατάσταση εποχικής αδράνειας για διάστημα μεγαλύτερο του ενός έτους (παρατεταμένη διάπauση, prolonged dormancy) (Wiesmann, 1950; Vallo *et al.*, 1976; Daniel & Grunder, 2012).

Στον αγρό, η έξοδος των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς παρατηρείται λίγο πριν την περίοδο όπου οι καρποί των φυτών-ξενιστών είναι επιδεκτικοί ωοτοκίας (έναρξη της ωρίμανσης). Η έναρξη των πτήσεων των ενηλίκων σε κερασεώνες της κεντρικής Ευρώπης (Ελβετία, Αυστρία, νότια Γερμανία, δυτική Ρουμανία και Σερβία) τοποθετείται στα μέσα Μαΐου έως μέσα Ιουνίου (Böhm, 1949; Stamenkovic, Milenkovic & Stamenkovic, 1996a; Mincă, Vîrteiu & Petanec, 2011) ενώ προηγείται ως και ένα μήνα (μέσα Απριλίου) στις παραθαλάσσιες περιοχές της Ν. Ευρώπης (Ελλάδα) (Κατσόγιαννος *et al.*, 1991; Papanastasiou *et al.*, 2011). Μοντέλα πρόβλεψης της εξόδου των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς που είναι άμεσα διαθέσιμα στους παραγωγούς μέσω της ηλεκτρονικής πλατφόρμας www.sopra-acw.admin.ch/ (Samietz *et al.*, 2007), έχουν αναπτυχθεί μόνο για περιοχές της Ελβετίας.

Η έξοδος των ενηλίκων από το νυμφικό περίβλημα πραγματοποιείται κυρίως τις πρωινές ώρες και τα ενήλικα καθίστανται ικανά για πτήση εντός των επόμενων 2 ωρών (Boller & Prokory, 1976). Τα ενήλικα αναζητούν αμέσως τροφή, ειδικότερα υδατανθρακούχες και πρωτεϊνούχες ουσίες που είναι απαραίτητες για την αναπαραγωγική ωρίμανση. Εκκρίσεις φυτικών χυμών και μελιπογόνων εντόμων, καθώς και σπόρια μυκήτων, ζύμες και αποικίες βακτηρίων, που απαντώνται στα φύλλα και στην επιφάνεια διαφόρων ειδών φρούτων της παρακείμενης βλάστησης, θεωρούνται ως οι κύριες πηγές τροφής των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς (Boller & Prokory, 1976). Η περίοδος της αναπαραγωγικής ωρίμανσης διαρκεί από 6 έως 13 ημέρες και επηρεάζεται άμεσα από τη θερμοκρασία, τη θρεπτική κατάσταση των θηλυκών και το στάδιο ωρίμανσης των καρπών των φυτών-ξενιστών (Daniel & Grunder, 2012).

Στη συνέχεια, τα ενήλικα μετακινούνται προς τα φυτά-ξενιστές για να συζευχθούν και να ωτοκήσουν. Το άρωμα του ημιώριμου-ώριμου καρπού και πιθανότατα οσμές του φυλλώματος προσελκύουν τα έντομα και ενδέχεται να διεγείρουν και την ωτοκία (Boller & Prokopy, 1976). Ιδανικά σημεία σύζευξης αποτελούν οι καρποί που βρίσκονται στο ηλιόλουστο μέρος της κόμης των φυτών-ξενιστών ενώ ευνοϊκές για σύζευξη θεωρούνται οι ηλιόλουστες μέρες με θερμοκρασία μεγαλύτερη των 15°C (Katsoyannos, 1979). Τα αρσενικά 'επιτηρούν' τις περιοχές ωτοκίας (καρποί-στόχοι) και η σύζευξη επέρχεται συνήθως μετά από βίαιη επίθεση στα θηλυκά που προσγειώνονται στους 'περιφρουρούμενους' καρπούς-στόχους κατά την αναζήτηση θέσεων ωτοκίας (Sivinski & Burk, 1989). Πειράματα σε συνθήκες εργαστηρίου έδειξαν ότι η σύζευξη των αρσενικών δεν είναι τυχαία, καθώς πολλά αρσενικά δεν καταφέρνουν να συζευχθούν ενώ ορισμένα άλλα συζευγνύονται αρκετές φορές. Η ικανότητα για σύζευξη των αρσενικών καθορίζεται από την επικράτηση στις μάχες μεταξύ των αρσενικών (male to male competition) χωρίς ωστόσο το μέγεθος σώματος να επηρεάζει σημαντικά το αποτέλεσμα (Jaastad, 1998). Εντούτοις, υπάρχουν ενδείξεις ότι τα θηλυκά είναι σε θέση να επιλέγουν ενεργά τα αρσενικά με τα οποία θα συζευχθούν (Jaastad, 1998). Περιβαλλοντικοί και οικολογικοί παράγοντες, όπως η αναλογία φύλου, η πυκνότητα πληθυσμού και η διαθεσιμότητα υποστρωμάτων ωτοκίας στο χώρο και το χρόνο, επηρεάζουν τη σεξουαλική συμπεριφορά της ραγολέπιδας της κερασιάς, υπογραμμίζοντας την πλαστικότητα στη σεξουαλική συμπεριφορά του εντόμου (Jaastad, 1998). Επιπρόσθετα, τα αρσενικά ελκύουν μια πολύ εξειδικευμένη φερομόνη φύλου (sex pheromone), η οποία προσελκύει κυρίως τα παρθένα θηλυκά που βρίσκονται σε κοντινή απόσταση (Katsoyannos, 1976). Φαίνεται ότι η φερομόνη των αρσενικών αρχικά λειτουργεί ως αφροδισιακό αλλά 1-2 εβδομάδες μετά τη σύζευξη τα θηλυκά δεν ανταποκρίνονται στην φερομόνη (Katsoyannos, 1982).

Η ωτοκία λαμβάνει χώρα το μεσημέρι καθώς και νωρίς το απόγευμα κατά τη διάρκεια των ηλιόλουστων ημερών, όπου η θερμοκρασία είναι μεγαλύτερη από 16°C (Katsoyannos, Boller & Benz, 1987). Η επιλογή των κατάλληλων για ωτοκία καρπών βασίζεται κυρίως σε οπτικά ερεθίσματα, όπως είναι το σχήμα (σφαιρικό ή ημισφαιρικό), το μέγεθος (διάμετρο 2,5-10,3 χιλ.) και η αντίθεση του σκούρου χρώματος σε φωτεινότερο φόντο (Prokopy, 1969). Τα θηλυκά εξετάζουν την καταλληλότητα των καρπών (υφή, σχήμα) περπατώντας σε κύκλους στην επιφάνεια του, χωρίς ωστόσο να αποκλείεται και η εμπλοκή χημικών ερεθισμάτων (Boller, 1989). Κεράσια στο στάδιο της αλλαγής του χρώματος από πράσινο σε κίτρινο με σκληροποιημένο πυρήνα και πάχους

μεσοκαρπίου τουλάχιστον 5 χιλ. θεωρούνται κατάλληλα για ωτοκία (Boller & Prokory, 1976).

Τα θηλυκά ωτοκοούν στους καρπούς των φυτών-ξενιστών ανοίγοντας μια οπή με τον ωθέτη τους και τοποθετώντας, ακριβώς κάτω από την επιδερμίδα, ένα μόνο αυγό σε κάθε καρπό (Boller & Prokory, 1976). Προκειμένου να αποφευχθεί ο συνωστισμός προνυμφών στους καρπούς, το θηλυκό αμέσως μετά την ωτοκία τοποθετεί στην επιφάνεια του καρπού με τον ωθέτη του μια υδατοδιαλυτή ουσία, γνωστή ως φερομόνη αποτροπής ωτοκίας, που αποτρέπει τα άλλα θηλυκά να ωτοκήσουν στον ίδιο καρπό (Katsoyannos, 1975). Ωστόσο, σε περιπτώσεις υψηλού πληθυσμού του εντόμου ενδέχεται να παρατηρηθούν παραπάνω από ένα αυγά ανά καρπό (Boller & Prokory, 1976). Στον αγρό, η μέση ωτοπαραγωγή κυμαίνεται από 30 έως 200 αυγά ανά θηλυκό, η γονιμότητα από 54 έως 100% και το προσδόκιμο ζωής από 4 έως 7 εβδομάδες (Wiesmann, 1933)

Οι προνύμφες εκκολάπτονται μετά από 6-12 μέρες και κατευθύνονται αμέσως προς τον πυρήνα του καρπού προκειμένου να αποφύγουν πιθανές επιθέσεις από παρασιτοειδή και αρπακτικά. Η προνύμφη τρέφεται στο μεσοκάρπιο ορύσσοντας στοά και καταστρέφοντας με αυτόν τον τρόπο τον καρπό. Η ανάπτυξη των προνυμφών ολοκληρώνεται μετά από 17 έως 30 ημέρες, ανάλογα με την επικρατούσα θερμοκρασία, το στάδιο ωρίμανσης και τη θρεπτική σύσταση των καρπών (Daniel & Grunder, 2012). Η ώριμη προνύμφη εξέρχεται του προσβεβλημένου καρπού μέσω οπής εξόδου που βρίσκεται πλησίον συνήθως του ποδίσκου του καρπού (Εικόνα 4) και πέφτει στο έδαφος, όπου και νυμφώνεται εντός 3 ωρών (Boller & Prokory, 1976). Οι νύμφες παραμένουν σε βάθος από 2 έως 5 εκ., ανάλογα με τον τύπο του εδάφους, και εισέρχονται σε υποχρεωτική διάπαυση (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος, 2003).



Εικόνα 4. Οπή εξόδου σε κεράσι που δημιουργήθηκε κατά την έξοδο της προνύμφης της ραγολέτιδας της κερασιάς.

Τα ενήλικα της ραγολέτιδας της κερασιάς έχουν στενό εύρος διασποράς λόγω μειωμένης πτητικής ικανότητας. Ωστόσο, παρατηρήσεις στο εργαστήριο έδειξαν πως τα ενήλικα είναι ικανά για πτήσεις αρκετών χιλιομέτρων στις περιπτώσεις όπου δεν υπάρχει διαθέσιμο μέρος για προσγείωση (Boller & Prokopy, 1976). Στον αγρό, το 95% των ενηλίκων πραγματοποιεί πτήσεις αρχικά στις γειτονικές ποικιλίες με μεταγενέστερο στάδιο ωρίμανσης και αργότερα σε θάμνους *Lonicera* spp., όπου αυτοί είναι διαθέσιμοι. Οι πτήσεις με σκοπό τη διασπορά του εντόμου καθίστανται αναγκαίες όταν υπάρχει έλλειψη κατάλληλων για ωοτοκία καρπών, όπως π.χ. μετά από μια φυσική καταστροφή (παγετός), πρώιμη συλλογή καρπών ή σήμανση όλων των διαθέσιμων καρπών με την ορμόνη αποτροπής ωοτοκίας (Katsoyannos, Boller & Benz, 1986).

1.5.5. Μόλυνση πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς με *Wolbachia*

Στην οικογένεια Tephritidae, μολύνσεις με *Wolbachia* καταγράφηκαν σε είδη του γένους *Anastrepha* (Coscrato *et al.*, 2009) και *Bactrocera* (Jamnongluk *et al.*, 2002; Sun, Cui & Li, 2007), καθώς και στα είδη *R. cingulata* (Drosopoulou *et al.*, 2011), *R. pomonella* (Schuler *et al.*, 2011) και σε ορισμένους πληθυσμούς του *R. completa* (Drosopoulou *et al.*, 2011; Schuler *et al.*, 2012). Αντίθετα, το είδος *Ceratitis capitata* (Zabalou *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2005) φαίνεται να είναι απαλλαγμένο από τέτοιου είδους μολύνσεις, με εξαίρεση έναν πληθυσμό του *C. capitata* από τη Βραζιλία (Coscrato *et al.*, 2009). Πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς βρέθηκαν μολυσμένοι με πέντε διαφορετικά στελέχη των ενδοκυτταρικών βακτηρίων *Wolbachia*, γνωστά ως wCer1 ως wCer5 (Riegler & Stauffer, 2002; Arthofer *et al.*, 2009). Η μονόδρομη ΚΑ που παρατηρήθηκε μεταξύ των θηλυκών της βόρειας και των αρσενικών της νότιας φυλής αποδόθηκε στο στέλεχος wCer2 της νότιας φυλής, καθώς όλοι οι ευρωπαϊκοί πληθυσμοί (νότια και βόρεια φυλή) είναι μολυσμένοι με το στέλεχος wCer1, συμπεριλαμβανομένων και των ελληνικών πληθυσμών (Boller *et al.*, 1976; Riegler & Stauffer, 2002; Kounatidis *et al.*, 2008, Augustinos *et al.*, 2013). Ωστόσο, πρόσφατα αποδείχτηκε ότι οι Ελληνικοί πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς είναι επί το πλείστον διπλά μολυσμένοι με τα στελέχη wCer1 και wCer4, αν και σε μικρότερο ποσοστό υπάρχουν συνδυασμοί του στελέχους wCer1 με το wCer5 ή πιο σπάνια με το στέλεχος wCer2 (Augustinos *et al.*, 2013).

1.5.6. Γενετική και κυτταρογενετική ανάλυση πληθυσμών

Παρότι η βιολογία και η συμπεριφορά της ραγολέτιδας της κερασιάς αποτέλεσε από πολύ νωρίς αντικείμενο πολλών ερευνών, η μελέτη της γενετικής δομής και η κυτταρογενετική ανάλυση των φυσικών πληθυσμών του εντόμου απασχόλησε τους ερευνητές πρόσφατα. Οι Augustinos και συνεργάτες (2011, 2013) χρησιμοποίησαν 13 μικροδορυφόρους, δηλ. πολυμορφικούς DNA δείκτες που υπάρχουν σε αφθονία στο γονιδίωμα, οι οποίοι είναι σε θέση να εντοπίσουν γενετικά διαφοροποιημένους πληθυσμούς. Η ανάλυση ελληνικών πληθυσμών του *R. cerasi*, ειδικότερα από περιοχές της Θεσσαλίας, την Πελοπόννησο και την Κρήτη, αποκάλυψε σημαντική γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών από τις τρεις περιφέρειες της χώρας. Η έντονη γενετική διαφοροποίηση των πληθυσμών εντός της χώρας έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της πληθυσμιακής ανάλυσης άλλων ειδών της οικογένειας Tephritidae, όπως είναι ο δάκος της ελιάς (Augustinos *et al.*, 2005). Επίσης, κυτταρογενετικές μελέτες σε Ελληνικούς πληθυσμούς του εντόμου αποκάλυψαν την παρουσία ασυνάψεων στα πολυταινικά χρωμοσώματα, η οποία πιθανόν να οφείλεται στη μόλυνση με *Wolbachia* (Kounatidis *et al.*, 2008). Παρομοίως, ασυνάψεις μεταξύ ομόλογων χρωμοσωμάτων έχουν παρατηρηθεί στα είδη *R. cingulata* (Drosopoulou *et al.*, 2011) και *Culex pipiens* (Zambetaki, Pasteur & Mavragani-Tsipidou, 1998; Hotopp *et al.*, 2007) που είναι μολυσμένα με *Wolbachia*. Αξίζει να σημειωθεί ότι στο είδος *Dacus ciliatus* και σε μη μολυσμένα άτομα του *R. completa* η απουσία των συμβιωτικών βακτηρίων *Wolbachia* συνοδεύεται από παράλληλη απουσία των σχετικών ασυνάψεων στα πολυταινικά χρωμοσώματα (Drosopoulou *et al.*, 2010; 2011).

1.5.7. Φυσικοί εχθροί

Εικοσιένα είδη παρασιτοειδών και αρπακτικών έχουν καταγραφεί για τη ραγολέτιδα της κερασιάς, κυρίως σε χώρες της κεντρικής Ευρώπης και στη Σιβηρία (Hoffmeister, 1992; Stibick, 2004). Τα παρασιτοειδή προσβάλλουν είτε τις προνύμφες (ενδοπαράσιτα και εκτοπαράσιτα) είτε τις νύμφες εντός του εδάφους.

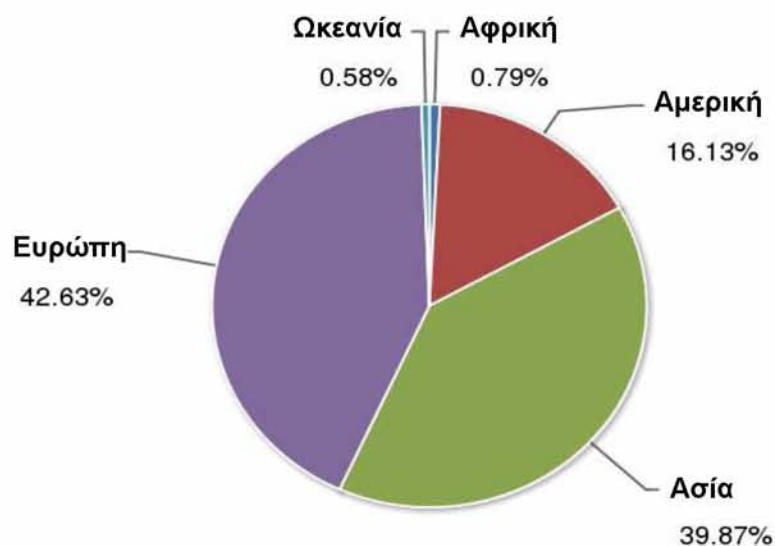
Τα είδη των παρασιτοειδών ανήκουν στην τάξη Υμενόπτερα με την πλειοψηφία να προέρχεται από πληθυσμούς του εντόμου που συλλέχθηκαν από προσβεβλημένους καρπούς του *L. xylosteum* στην Αυστρία, Ελβετία, Τσεχία και Σλοβακία. Χαρακτηριστικά αναφέρονται τα είδη *Phygadeuon elegans*, *P. scaposus* και *Cremnodes atricapillus*

(Hymenoptera: Ichneumonidae), καθώς και το είδος *Halticoptera laevigata* (Hymenoptera: Pteromalidae) (Fry, 1987). Το παρασιτοειδές *Opius magnus* (Hymenoptera: Braconidae) εξήλθε από ώριμες προνύμφες της ραγολέτιδας της κερασιάς που συλλέχθηκαν από καρπούς μαχαλεπίου (*P. maxaleb*) στην Ιταλία με ποσοστό παρασιτισμού 10-30%, ενώ το *O. rhagleticolus* (Hymenoptera: Braconidae) βρέθηκε να είναι το κύριο παρασιτοειδές στην Πολωνία με ποσοστό παρασιτισμού 22-32% (Narayanan & Chawla, 1962; Fry, 1987). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το είδος *Phygadeuon wiesmanni* Sachtl. (Hymenoptera: Ichneumonidae) που προσβάλλει προνύμφες 3^{ης} ηλικίας του εντόμου και έχει απομονωθεί από κερασεώνες της Αυστρίας, Γερμανίας και Ελβετίας, όπου το ποσοστό παρασιτισμού μπορεί να αγγίξει και το 72% (Boller, 1966). Επιπρόσθετα, τα είδη *Gelis bremeri* (Hymenoptera: Ichneumonidae), *Polypeza försteri* Kieff. (Hymenoptera: Diapriidae) και σε μικρότερο ποσοστό το είδος *Spilomicrus hemipterus* Marshall (Hymenoptera: Diapriidae) απομονώθηκαν από νύμφες ευρωπαϊκών πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς (Vogel, 1950; Narayanan & Chawla, 1962). Είδη του *Habrocytus* spp. (Hymenoptera: Pteromalidae) έχουν βρεθεί να παρασιτούν νύμφες πληθυσμών της Σιβηρίας (Stibick, 2004).

Σχετικά με τα αρπακτικά, δύο είδη του γένους *Odontothrips* (Thysanoptera: Thripidae) έχουν χαρακτηριστεί ως θηρευτές των αυγών της ραγολέτιδας της κερασιάς αλλά το ποσοστό θήρευσης παραμένει μικρό ($\approx 10\%$) (Wiesmann, 1933). Σύμφωνα με τον Boller (1966), τα μυρμήγκια του είδους *Myrmica laevinodis* (Hymenoptera: Formicidae) και τα σκαθάρια των ειδών *Anisodactylus binotatus* (Coleoptera: Carabidae) και *Paedrus litoralis* (Coleoptera: Staphylinidae) θηρεύουν προνύμφες 3^{ης} ηλικίας και νύμφες του εντόμου στο έδαφος κερασεώνων της Ελβετίας. Ειδικότερα, τα μυρμήγκια θεωρούνται αποτελεσματικοί θηρευτές κυρίως των προνυμφών 3^{ης} ηλικίας, καθώς το ποσοστό θήρευσης σε αυτό το στάδιο μπορεί να αγγίξει το 80%.

1.5.8. Οικονομική σημασία του εντόμου

Βάσει στοιχείων του FAO (Food and Agriculture Organization), την τελευταία δεκαετία (2000-2010) οι χώρες της Ευρώπης και της Ασίας παρήγαγαν συνολικά το 82% της παγκόσμιας παραγωγής κερασιού, η οποία αντιστοιχεί σε περίπου 1.640.000 τόνους (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Ποσοστιαία συμμετοχή των πέντε ηπείρων στην παγκόσμια παραγωγή κερασιού τη δεκαετία 2000-2010 (FAO, 2010).

Πρώτη παραγωγός χώρα είναι η Τουρκία με μέση παραγωγή 305.668 τόνους και με τάσεις ανόδου, ενώ ακολουθούν με σταθεροποιητικές τάσεις το Ιράν, η Ιταλία και η Ισπανία με μέση παραγωγή 216.421, 114.936 και 92.493 τόνους, αντίστοιχα. Το ποσοστό προσβολής των κερασιών από τη ραγολέπιδα της κερασιάς μπορεί να αγγίξει ακόμα και το 100%, απουσία λήψης κατάλληλων μέτρων αντιμετώπισης των πληθυσμών του εντόμου (Fimiani, 1983; Stamenkovic *et al.*, 1996b). Διαφοροποιήσεις στα ποσοστά προσβολής ανά περιοχή και έτος αποδίδονται στις φαινολογικές διαφορές μεταξύ των ξενιστών και των καλλιεργούμενων ποικιλιών των κερασιών, καθώς και στις καιρικές συνθήκες που επικρατούν κατά την περίοδο ωτοκίας (Boller & Prokopy, 1976). Δεδομένου ότι οι προνύμφες αναπτύσσονται ταχύτερα σε καρπούς με αυξημένα επίπεδα σακχάρων και χαμηλό βαθμό οξύτητας, οι προσβολές σε βύσσινα είναι λιγότερες σε σχέση με τα κεράσια (Κατσόγιαννος *et al.*, 1991). Επίσης, η παρουσία ώριμων αναπαραγωγικά ενηλίκων κατά την περίοδο όπου υπάρχουν διαθέσιμοι για ωτοκία καρποί έχει ως αποτέλεσμα να σημειώνονται υψηλά ποσοστά προσβολής σε καρπούς όψιμων και μέτρια όψιμων ποικιλιών κερασιάς (Stamenkovic *et al.*, 1996b). Κατά

συνέπεια, χαμηλότερα ποσοστά προσβολής αναμένονται στα ξινά κεράσια ή βύσσινα και στις πολύ πρώιμες ποικιλίες των γλυκών κερασιών (Κατσόγιαννος *et al.*, 1991). Ορισμένες ποικιλίες κερασιάς, όπως η Schattenmorelle, έχουν σχετικά σκληρό περίβλημα που δυσχεραίνει την ωτοκία, μειώνοντας την προσβολή από τη ραγολέτιδα της κερασιάς (Daniel & Grunder, 2012). Επιπρόσθετα, η επικράτηση ευνοϊκών καιρικών συνθηκών (θερμοκρασία μεγαλύτερη των 16 °C, ηλιόλουστες μέρες και απουσία βροχόπτωσης) για μεγάλο χρονικό διάστημα κατά την περίοδο ωτοκίας, και ειδικότερα στα πρώτα στάδια ωρίμανσης των καρπών, συμβάλλει στην αύξηση του πληθυσμού της ραγολέτιδας της κερασιάς και την προσβολή των κερασιών (Boller & Prokopy, 1976). Η μη συλλογή των δυνητικά προσβεβλημένων καρπών, όπως για παράδειγμα εκείνων με σχισίματα μετά από βροχόπτωση κατά τη διάρκεια της περιόδου συγκομιδής, αυξάνει το ποσοστό προσβολής της επόμενης καλλιεργητικής περιόδου. Αξίζει όμως να αναφερθεί ότι οι αυξομειώσεις των πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς παρουσιάζουν μια περιοδικότητα, η οποία χαρακτηρίζεται από μια περίοδο 4-5 χρόνων με πυκνούς πληθυσμούς που ακολουθείται από ένα διάστημα με χαμηλά επίπεδα πληθυσμών. Το παραπάνω φαινόμενο παρατηρήθηκε συστηματικά σε πληθυσμούς της βορειοδυτικής Ελβετίας κατά τα έτη 1929-1969 ενώ θεωρείται ότι οι αυξομειώσεις των πληθυσμών λαμβάνουν χώρα την ίδια περίοδο σε όλες τις χώρες της κεντρικής Ευρώπης (Boller *et al.*, 1970).

Το όριο ανεκτής προσβολής των κερασιών είναι εξαιρετικά χαμηλό και ορίζεται αυθαίρετα στο 2% για τα κεράσια που προορίζονται για νωπή κατανάλωση και κονσερβοποίηση, ενώ μεγαλύτερη προσβολή μπορεί να γίνει ανεκτή σε κεράσια που οδηγούνται σε απόσταξη. Η αδυναμία διαχωρισμού των προσβεβλημένων από τα υγιή κεράσια κατά την συγκομιδή αποτελεί ένα επιπλέον πρόβλημα στην εμπορία καρπών από περιοχές που ενδημεί το έντομο. Επιπλέον, οι προσβεβλημένοι καρποί είναι ευάλωτοι σε δευτερογενείς μολύνσεις από παθογόνους μικροοργανισμούς που εισέρχονται από την οπή ωτοκίας, υποβαθμίζοντας περαιτέρω την ποιότητα των καρπών (Boller & Prokopy, 1976). Συνεπώς, τα φορτία με ποσοστά προσβολής μεγαλύτερα του ανεκτού ορίου θα πρέπει να απορριφθούν ή να οδηγηθούν σε απόσταξη αμέσως μόλις εντοπιστούν, επιφέροντας σημαντικές οικονομικές απώλειες στους παραγωγούς. Το δυνητικά υψηλό ποσοστό προσβολής των κερασιών σε συνδυασμό με το χαμηλό όριο ανεκτής προσβολής καθιστούν αναγκαία την έγκαιρη και έγκυρη αντιμετώπιση των πληθυσμών του εντόμου.

1.5.8.1. Οικονομική σημασία του εντόμου για την Ελλάδα

Στην Ελλάδα, η μέση παραγωγή κερασιών την τελευταία δεκαετία υπολογίζεται στους 49.178 τόνους και η χώρα κατατάσσεται μεταξύ της 9^{ης} και 15^{ης} θέσης στην παγκόσμια παραγωγή. Ειδικότερα για τα έτη 2007-2009, η παραγωγή κερασιού άγγιξε τους 60.000 τόνους το χρόνο, τοποθετώντας τη χώρα μας μέσα στις 10 πρώτες θέσεις της παγκόσμιας κατάταξης (FAO, 2010). Την τελευταία δεκαετία οι καλλιεργούμενες εκτάσεις στην Ελλάδα αυξήθηκαν από τα 90.000 στρέμματα σε 100.000 στρέμματα. Οι περισσότεροι οπωρώνες κερασιάς εντοπίζονται σε ορεινές και ημιορεινές περιοχές (95% της έκτασης), χωρίς ωστόσο να αποκλείονται οι πεδινές περιοχές και τα νησιά. Ειδικότερα, το 80% περίπου των παραπάνω εκτάσεων βρίσκεται στη Μακεδονία, με επίκεντρο τους Νομούς Πέλλας και Ημαθίας, όπου βρίσκεται το 65%-70% περίπου των καλλιεργούμενων εκτάσεων κερασιάς της χώρας μας, και ακολουθούν η Θεσσαλία και η Πελοπόννησος (ΕΘΙΑΓΕ, 2011).

Οι καλλιεργούμενες ποικιλίες κερασιάς στη χώρα μας χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες. Στις κλασικές ποικιλίες, οι οποίες ακόμη καταλαμβάνουν τη μεγαλύτερη έκταση, όπως η Bigarreau Burlat, B.S. Hardy Giant, Ferrovia, Germersdorfer, Larian, Larins, η Van, Τραγανά Εδέσσης και τα Μπακιρτζέικα. Ειδικότερα, η πρώιμη ποικιλία Bigarreau Burlat, η όψιμη ποικιλία Τραγανά Εδέσσης και τα Μπακιρτζέικα έχουν μέχρι σήμερα σημαντική συμβολή στην παραγωγή κερασιών. Στις νέες, υποσχόμενες, μεγαλόκαρπες και πολλές από αυτές αυτογόνιμες ποικιλίες, οι οποίες παρουσιάζουν υψηλή δυναμική φυτεύσεων τα τελευταία χρόνια, όπως η Black Star, Blaze Star, Canada Giant, Early Star, Early Lory, Early BiGi, Giorgia, Grace Star, Kordia, Regina, Satin, Sabrina, Samba, Skeena, Sweet Early, Sweet Heart κ.ά. Στις τοπικές, μικρού ενδιαφέροντος αλλά καλά εγκλιματισμένες στις περιοχές όπου καλλιεργούνται, όπως η Γερβασίου, η Καραμέλα Τριπόλεως, η Κηφισιάς, τα Κόκκινα Αναστασιάς, το Μαύρο Πρώιμο Αχαΐας, το Μαύρο Τριπόλεως, το Μοσχάτο Ευβοίας, το Πετροκέρασο Αχαΐας, το Πρώιμο Κολυνδρού, το Τραγανό Κομοτηνής, η Φράουλα Βόλου κ.ά. που καλλιεργούνται σε μικρές εκτάσεις για την κάλυψη τοπικών κυρίως αναγκών. Ως υποκείμενα χρησιμοποιούνται τα σπορόφυτα αγριοκερασιάς και μαχαλεπίου, τα υβρίδια Colt, Gisela 5, Gisela 6 και Maxima 14 (MxM14) αλλά και το κλωνικό υποκείμενο CAB-6P που προέρχεται από γενότυπους βυσσινιάς, τα οποία προσδίδουν επιθυμητά χαρακτηριστικά, π.χ. πρωιμότητα, στις καλλιεργούμενες ποικιλίες (ΕΘΙΑΓΕ, 2011).

Η μέση στρεμματική απόδοση κυμαίνεται από 400 έως 650 κιλά περίπου και η μέση ετήσια σταθμισμένη τιμή παραγωγών από την πώληση του κερασιού είναι σχεδόν 1,50 € ανά κιλό, ποσό πολύ μεγαλύτερο από όλα σχεδόν τα νωπά φρούτα (ΕΘΙΑΓΕ, 2011). Το 20 με 25% της παραγωγής του κερασιού εξάγεται με σχεδόν αποκλειστικό προμηθευτή την κεντρική και δυτική Μακεδονία ενώ το 75 με 80% διατίθεται στην εγχώρια αγορά είτε σε νωπή μορφή είτε μεταποιημένο (Κουκουργιάννης, 2000). Ανταγωνίστριες χώρες της Ελλάδας, όσον αφορά την παραγωγή και εμπορία κερασιού, θεωρούνται η γειτονική Τουρκία, και ορισμένες χώρες της Ευρώπης, όπως είναι η Ιταλία, Ισπανία, Ρουμανία, Πολωνία και Γαλλία. Ωστόσο, η Ελλάδα έχει το συγκριτικό πλεονέκτημα, σε σχέση με τις υπόλοιπες Ευρωπαϊκές χώρες εκτός της Τουρκίας, της πρωιμότερης ωρίμανσης των ποικιλιών κερασιάς κατά 10-15 ημέρες. Πλεονέκτημα που διευρύνεται περισσότερο με την καλλιέργεια της κερασιάς σε περιοχές ακόμη πιο πρώιμες, όπως π.χ. η Φθιώτιδα, η Αιτωλοακαρνανία κ.ά. (ΕΘΙΑΓΕ, 2011). Δεδομένου ότι η Ευρώπη καταναλώνει μεγάλες ποσότητες νωπού κερασιού και η τιμή διάθεσης του προϊόντος είναι ιδιαίτερα υψηλή, υπάρχει ευνοϊκή προοπτική εξαγωγών κερασιών στην Ευρώπη με αποτέλεσμα η καλλιέργεια της κερασιάς να καθίσταται ιδιαίτερα προσοδοφόρα για τη χώρα μας.

Στην Ελλάδα και μέχρι το 1978, η παρουσία της ραγολέτιδας της κερασιάς καταγράφηκε μόνο σε οπωρώνες κερασιάς της ηπειρωτικής χώρας, ενώ για πρώτη φορά το 1978 αναφέρθηκαν προσβολές από το έντομο σε οπωρώνες της ανατολικής Κρήτης (Haniotakis *et al.*, 1989). Σήμερα, υπάρχουν ενδείξεις ότι πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς απαντώνται σχεδόν σε όλες τις κερασοπαραγωγικές περιοχές της Ελλάδας, χωρίς ωστόσο να υπάρχει συστηματική καταγραφή της παρουσίας του εντόμου στη χώρα. Αναφορές υπάρχουν για πληθυσμούς που προέρχονται από την κεντρική και δυτική Μακεδονία, καθώς κι από την ανατολική Θεσσαλία (Katsoyannos *et al.*, 2000; Papanastasiou *et al.*, 2011). Συνεπώς, η ραγολέτιδα της κερασιάς αποτελεί απειλή για την παραγωγή του κερασιού, και ειδικότερα υγιών κερασιών εξαγωγικού χαρακτήρα, και θεωρείται ο σημαντικότερος εχθρός της καλλιέργειας της κερασιάς στη χώρα μας.

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι μέχρι πρόσφατα η ραγολέτιδα της κερασιάς αποτελούσε και το μοναδικό σημαντικό εχθρό της κερασιάς σε ολόκληρη την Ευρώπη (Fimiani, 1989). Όμως, το 2009, εμφανίστηκε σε χώρες της Μεσογείου (Ισπανία, Ιταλία) το πολυφάγο είδος *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae), το οποίο μεταξύ των άλλων προσβάλλει και τους καρπούς της κερασιάς κατά το στάδιο της

ωρίμανσης (Grassi, Palmieri & Giongo, 2009; Calabria *et al.*, 2012). Το είδος *D. suzukii* έχει ήδη εξαπλωθεί σε χώρες της κεντρικής Ευρώπης όπου απαντώνται πληθυσμοί του *R. cerasi*, όπως είναι η Ελβετία, Αυστρία και Γερμανία, και πιστεύεται ότι δυνητικά μπορεί να εξελιχθεί σε σημαντικό εχθρό των κερασιών (Cini, Ioriatti & Anforo, 2012).

1.5.9. Μέθοδοι αντιμετώπισης της ραγολέτιδας της κερασιάς

1.5.9.1. Προληπτικά μέτρα φυτο-υγείας

Για την αποτελεσματικότερη διαχείριση των πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς είναι απαραίτητη η λήψη ορισμένων προληπτικών μέτρων που σχετίζονται με τη φυτο-υγεία των σπρωρώνων της κερασιάς. Τα μέτρα αυτά συνοψίζονται στις παρακάτω δράσεις: α) στην επιλογή πρώιμων ποικιλιών, όπου αυτό είναι εφικτό, ώστε να περιορίζεται η διαθεσιμότητα καρπών κατά την περίοδο ωστοκίας του εντόμου, β) στο σωστό κλάδεμα και ύψος των δένδρων (< 10 μ), το οποίο να ευνοεί την πρωιμότητα της παραγωγής και να διευκολύνει την πλήρη και μηχανική συγκομιδή των καρπών, καθώς και την πλήρη κάλυψη της κόμης με ψεκαστικό υγρό, γ) στη πρώιμη και πλήρη συλλογή των καρπών, ώστε να ελαχιστοποιείται ο αριθμός των προνυμφών που καταφέρνουν να νυμφωθούν, δ) στη μη απόρριψη των προσβεβλημένων καρπών στον σπρωώνα και ε) στην αποφυγή κοψίματος της βλάστησης κάτω από την κόμη του δένδρου μέχρι την περίοδο συγκομιδής. Με αυτόν τον τρόπο η θερμοκρασία του εδάφους παραμένει χαμηλή, καθυστερώντας την ενηλικίωση της ραγολέτιδας της κερασιάς μέχρι και 10 μέρες (Müller, 1970; Daniel & Grunder, 2012).

1.5.9.2. Μέθοδοι παρακολούθησης του πληθυσμού της ραγολέτιδας της κερασιάς

Σημαντικό στοιχείο για την εφαρμογή μέτρων καταπολέμησης της ραγολέτιδας της κερασιάς αποτελεί η ακριβής εκτίμηση της έναρξης πτήσης των ενήλικων στον αγρό. Η έναρξη και η παρακολούθηση της πορείας πτήσης των ενήλικων πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς βασίζεται στη χρήση χρωματικών κολλητικών παγίδων. Δεδομένου ότι τα ενήλικα της ραγολέτιδας της κερασιάς προσελκύονται έντονα από επιφάνειες που αντανakλούν στην περιοχή των 500 - 520 nm που αντιστοιχεί στο κίτρινο χρώμα (Prokopy & Boller, 1971; Agee *et al.*, 1982), κατασκευάστηκαν και χρησιμοποιούνται ευρέως κίτρινες κολλητικές παγίδες, γνωστές ως Rebell® Amarillo

(Remund & Boller, 1978). Πρόκειται για τρισδιάστατες παγίδες που αποτελούνται από δύο, σταυρωτά τοποθετημένες πλαστικές επιφάνειες, διαστάσεων 20,5 εκ. x 15 εκ. (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Κίτρινη κολλητική παγίδα Rebell® Amarillo αναρτημένη σε δένδρο κερασιάς στην περιοχή Καλών Νερών Μαγνησίας.

Οι παγίδες αναρτώνται στα δένδρα σε ύψος 1,8 – 2 μ. από το έδαφος και τοποθετούνται σε βάθος περίπου 50 εκ. εσωτερικά της περιφέρειας της κόμης αφαιρώντας παράλληλα τη γειτονική βλάστηση (φύλλα και κλαδάκια) που τις σκιάζει. Δεδομένου ότι τα ενήλικα της ραγολέτιδας της κερασιάς προτιμούν τις ηλιόλουστες πλευρές των δένδρων, οι παγίδες τοποθετούνται στη νοτιοανατολική πλευρά της κόμης (Prokopy, 1969; Russ *et al.*, 1973). Οι παγίδες ελέγχονται για συλλήψεις ενήλικων της ραγολέτιδας της κερασιάς σε εβδομαδιαία βάση ή δύο φορές την εβδομάδα. Τα όρια επέμβασης, δηλ. αριθμός ενήλικων / παγίδα / εβδομάδα, καθορίζονται από το επίπεδο προσβολής της προηγούμενης χρονιάς, την αναμενόμενη παραγωγή, την ποικιλία (πρώιμη ή όψιμη) και τις καιρικές συνθήκες (Daniel & Grunder, 2012). Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί ότι τα αποτελέσματα των συλλήψεων στις παγίδες δεν αποτελούν συνήθως αξιόπιστους δείκτες του επιπέδου προσβολής των κερασιών (Fimiani, 1989).

1.5.9.3. Χημική καταπολέμηση

Οι προληπτικές χημικές επεμβάσεις αποτελούν τη συνήθη και πιο οικονομική πρακτική διαχείρισης των πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς. Συνιστανται σε 1-2 ψεκασμούς καλύψεως ή σε 2-3 δολωματικούς ψεκασμούς, ανάλογα των καιρικών συνθηκών και των χαρακτηριστικών της καλλιέργειας (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος, 2003). Στόχος των ψεκασμών είναι τα ενήλικα, κυρίως κατά την έναρξη της πτήσης τους,

αλλά και οι αναπτυσσόμενες προνύμφες στον καρπό. Οι ψεκασμοί γίνονται σε επίπεδο παραγωγού και, στις περισσότερες περιπτώσεις, «ημερολογιακά» βάσει της αλλαγής του χρώματος του καρπού από πράσινο σε κίτρινο. Δεδομένου ότι η παραπάνω πρακτική δεν βασίζεται στην τεκμηριωμένη παρουσία του εντόμου στον αγρό, οδηγεί συχνά σε άκαιρες, μη αποτελεσματικές, επεμβάσεις που συνδέονται άμεσα με μια σειρά περιβαλλοντικών προβλημάτων και πιθανών κινδύνων για την υγεία των παραγωγών-ψεκαστών εξαιτίας της άσκοπης έκθεσης στις επικίνδυνες χημικές ουσίες των εντομοκτόνων. Επίσης, η αποτελεσματικότητα των ψεκασμών, και ειδικότερα των δολωματικών ψεκασμών, προϋποθέτει οργάνωση και συντονισμό των επεμβάσεων σε επίπεδο περιοχής και όχι εφαρμογή από μεμονωμένους παραγωγούς (Haniotakis *et al.*, 1991).

Τα εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται είναι κατά κύριο λόγο οργανοφωσφορικά, με συνηθέστερα μέχρι τώρα αυτά που έχουν ως δραστική ουσία το dimethoate. Όμως, προβλήματα οικοτοξικότητας και χημικών καταλοίπων στα κεράσια οδήγησαν στις 16 Νοεμβρίου του 2009 στην έκδοση του Κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1097/2009 σχετικά με τα ανώτατα όρια υπολειμμάτων διαφόρων δραστικών ουσιών μέσα ή πάνω σε ορισμένα προϊόντα, ο οποίος απαγορεύει από τις 7-6-2010 τη χρήση εντομοκτόνων με δραστική ουσία το dimethoate στην Ευρώπη. Ωστόσο, τα παραπάνω εντομοκτόνα χρησιμοποιούνται ακόμα με την κατά παρέκκλιση άδεια σε χώρες της Κ. Ευρώπης. Σήμερα, οι δραστικές ουσίες που είναι εγκεκριμένες για την αντιμετώπιση του *R. cerasi* στην καλλιέργεια της κερασιάς είναι τα συνθετικά πυρεθροειδή (επαφής και στομάχου) cypermethrin και deltamethrin (DECIS). Η χρήση του διασυστηματικού νεονικοτινοειδούς thiamethoxam (ACTARA) επιτρέπεται υπό την προϋπόθεση ότι εφαρμόζεται μετά το τέλος της ανθοφορίας της κερασιάς/βυσσινιάς και δεν υπάρχουν στην περιοχή εφαρμογής ανθισμένα φυτά (π.χ. ζιζάνια) λόγω υψηλού κινδύνου τοξικότητας σε μέλισσες (Εκτελεστικός Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 485/2013 της Επιτροπής της 24 Μαΐου 2013).

1.5.9.4. Βιοτεχνικές μέθοδοι

Από πολύ νωρίς αναπτύχθηκαν εναλλακτικές, βιοτεχνικές μέθοδοι για την μείωση των πληθυσμών της ραγολέπιδας της κερασιάς, οι οποίες αναφέρονται στη μαζική παγίδευση, στη τεχνική της προσέλκυσης και θανάτωσης (attract-and-kill), στη χρήση φυσικών ή συνθετικών φερομονών αποτροπής ωοτοκίας, στην τεχνική του στείρου

εντόμου και στην εξαπόλυση πληθυσμών των εντόμων που εκδηλώνουν κυτταροπλασματική-αναπαραγωγική ασυμβατότητα με τους γηγενείς πληθυσμούς. Σχετικά πρόσφατα προτάθηκε και η τεχνική της κάλυψης του εδάφους με δίχτυ. Οι παραπάνω μέθοδοι είναι σε θέση να εφαρμοστούν και σε βιολογικούς οπωρώνες κερασιάς, όταν αυτό κρίνεται οικονομικά συμφέρον (Daniel & Grunder, 2012).

Η μέθοδος της μαζικής παγίδευσης στηρίζεται στην ανάρτηση περισσότερων της μιας παγίδας τύπου *Rebell® Amarillo* ανά δένδρο κερασιάς, συνήθως μέχρι οχτώ, ανάλογα με το μέγεθος των δένδρων (Russ *et al.*, 1973). Η παραπάνω μέθοδος έχει αυξημένο κόστος εργασίας και προμήθειας υλικών (παγίδων) και προτείνεται σε επίπεδο μεμονωμένων δένδρων ή σε μικρού μεγέθους καλλιέργειες. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα της μεθόδου δεν είναι πάντα εγγυημένη ενώ συχνά καταγράφονται παράλληλες συλλήψεις ωφέλιμων εντόμων.

Στο πλαίσιο της τεχνικής της προσέλκυσης και θανάτωσης εντόμων (*attract-and-kill*), εξετάστηκε η χρήση διαφορετικού τύπου τροφικών δολωμάτων (*food baits*) σε συνδυασμό με κίτρινες κολλητικές παγίδες τύπου *Rebell® Amarillo* (Haniotakis *et al.*, 1989; 1991). Παρότι ορισμένοι συνδυασμοί δολωμάτων και παγίδων κατάφεραν να διπλασιάσουν τον αριθμό των συλλήψεων στην επιφάνεια των παγίδων, αποδείχτηκε ότι το κίτρινο χρώμα των παγίδων παραμένει ισχυρότερο προσελκυστικό των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς σε σχέση με τα δολώματα (Boller & Prokopy, 1976; Katsoyannos, Papadopoulos & Stavridis, 2000). Κατά συνέπεια, η παραπάνω μέθοδος κρίθηκε ανοικονομική ως προς την εφαρμογή της και δεν εξετάστηκε περαιτέρω.

Θεωρώντας ότι αλλαγές στο χημικό προφίλ της επιφάνειας των καρπών θα λειτουργούσαν αποτρεπτικά για την ωτοκία της ραγολέτιδας της κερασιάς, προτάθηκε από τους Katsoyannos και Boller (1976, 1980) ο ψεκασμός των δένδρων με την ορμόνη αποτροπής ωτοκίας του εντόμου. Πειράματα αγρού, χρησιμοποιώντας τόσο φυσική όσο και συνθετική ορμόνη, έδειξαν ότι η αποτελεσματικότητα της μεθόδου είναι ιδιαίτερα υψηλή, αν και μειώνεται σε περιπτώσεις υψηλών ποσοστών προσβολών και σε περιοχές με πολλές βροχοπτώσεις (Katsoyannos & Boller 1976; Katsoyannos & Boller 1980; Aluja & Boller, 1992; Boller & Aluja, 1992). Το υψηλό κόστος παρασκευής της συνθετικής ορμόνης καθίσταται, μέχρι και σήμερα, αποτρεπτικό για την εμπορική αξιοποίηση της μεθόδου.

Προκειμένου να μειωθεί το αναπαραγωγικό δυναμικό των φυσικών πληθυσμών της μύγας των κερασιών, εξετάστηκε η εφαρμογή των τεχνικών του στείρου εντόμου (SIT) και του (αναπαραγωγικά) ασύμβατου ατόμου (IIT). Συγκεκριμένα, πειράματα

εξαπόλυσης αρσενικών ατόμων τεχνητά στειρωμένων με ραδιενεργή ακτινοβολία έλαβαν χώρα σε κερασεώνες ποικίλου μεγέθους της βορειοδυτικής Ελβετίας (Boller & Remund, 1975). Παράλληλα, αξιοποιώντας την αναπαραγωγική ασυμβατότητα μεταξύ της νότιας και βόρειας φυλής των πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς, πραγματοποιήθηκαν στην Κρήτη εξαπολύσεις αρσενικών ατόμων της νότιας φυλής για τον έλεγχο του γηγενούς πληθυσμού (Neuenschwander *et al.*, 1983). Μέχρι σήμερα, και οι δύο μέθοδοι παραμένουν σε πειραματικό επίπεδο, καθώς για την εμπορική τους εφαρμογή απαιτείται η εκτροφή μεγάλου μεγέθους πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς, η οποία παραμένει προς το παρόν πρακτικά αδύνατη (Körppler, Kaffer & Vogt, 2009).

Τέλος, πρόσφατες έρευνες υποστηρίζουν την τοποθέτηση κατάλληλου συνθετικού δικτιού στο έδαφος, ακριβώς κάτω από την κόμη των δένδρων, που θα παρεμποδίζει την πτήση των ατόμων της ραγολέτιδας της κερασιάς αμέσως μετά την ενηλικίωσή τους. Αν και η αποτελεσματικότητα της μεθόδου μπορεί να αγγίξει το 90%, το κόστος είναι ιδιαίτερα υψηλό και η εφαρμογή της είναι εφικτή μόνο στους νέους, εντατικού τύπου, κερασεώνες (Daniel & Grunder, 2012).

1.5.9.5. Βιολογική καταπολέμηση

Στο πλαίσιο της βιολογικής καταπολέμησης της ραγολέτιδας της κερασιάς, οι έρευνες τις τελευταίες δύο δεκαετίες εστιάζονται στη δυνατότητα χρήσης σκευασμάτων με βάση εντομοπαθογόνους νηματώδεις (EPN) και μύκητες. Στόχος των εντομοπαθογόνων νηματωδών είναι η προνύμφη τρίτου σταδίου, μετά τη πτώση της στο έδαφος και λίγο πριν τη νύμφωση, ενώ το στάδιο της νύμφης θεωρείται ακατάλληλο για προσβολή (Körppler, Peters & Vogt, 2003; Susurluk, 2007). Αρχικά η εφαρμογή σκευασμάτων με εντομοπαθογόνους νηματώδεις, όπως το NeemAzal-T/S, έδωσε ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Körppler, Storch & Vogt, 2006). Όμως, άλλες μελέτες, κυρίως σε επίπεδο αγρού, έδειξαν μειωμένη αποτελεσματικότητα ελέγχου των πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς με νηματώδεις (Herz, 2006). Αντίθετα, η χρήση σκευασμάτων με βάση τα κονίδια του μύκητα *Beauveria bassiana*, και συγκεκριμένα του στελέχους *B. bassiana* ATCC 74040, αποδείχθηκε ιδιαίτερα αποτελεσματική κατά των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς τόσο στο εργαστήριο όσο και στον αγρό (Daniel & Wyss, 2009; 2010). Κατά την επαφή του μύκητα με τον εξωσκελετό του ενηλίκου, τα κονίδια βλαστάνουν και οι υφές εισέρχονται στο εσωτερικό

του εντόμου για να τραφούν, προκαλώντας αφυδάτωση ή/και έλλειψη θρεπτικών στοιχείων στον ξενιστή τους (Daniel & Wyss, 2009). Σήμερα, το βιολογικό σκεύασμα Naturalis-L (Intrachem Bio Italia) περιέχει ζωντανά κονίδια του μύκητα *B. bassiana* και η χρήση του ως βιολογικό μέσο για τον έλεγχο των πληθυσμών του *R. cerasi* έχει εγκριθεί στην Ιταλία και την Ελβετία. Δεδομένου ότι απαιτούνται συχνές εφαρμογές του σκευάσματος καθόλη τη διάρκεια της περιόδου πτήσης των ενηλίκων στον οπωρώνα, το κόστος καταπολέμησης είναι αυξημένο σε σχέση με αυτό της χρήσης οργανοφωσφωρικών εντομοκτόνων. Ωστόσο, η επαναλαμβανόμενη χρήση του βιολογικού σκευάσματος σε συνδυασμό με τη λήψη μέτρων σχετικών με την φυτοϋγεία των οπωρώνων θεωρείται μια πολλά υποσχόμενη πρακτική για τον έλεγχο των πληθυσμών του εντόμου τόσο σε συμβατικούς όσο και σε βιολογικούς οπωρώνες κερασιάς.

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι τα είδη και ο πληθυσμός των παρασιτοειδών και αρπακτικών που απαντώνται στα εκάστοτε ενδiciaήματα δεν θεωρούνται αρκετά για τον αποτελεσματικό έλεγχο της ραγολέτιδας της κερασιάς (Boller *et al.*, 1970). Εντούτοις, η δυνατότητα μαζικής εκτροφής και απελευθέρωσης του παρασιτοειδούς *P. wiesmanni* (Hymenoptera: Ichneumonidae) χρήζει επισταμένης μελέτης (Daniel & Grunder, 2012).

1.6. Σκοπός

Η βιολογία και η συμπεριφορά της ραγολέτιδας της κερασιάς έχει μελετηθεί διεξοδικά χρησιμοποιώντας πληθυσμούς από τη βόρεια και την κεντρική Ευρώπη. Ωστόσο, ελάχιστες μελέτες αναφέρονται σε πληθυσμούς της νότιας Ευρώπης ενώ απουσιάζουν συγκριτικές μελέτες σχετικά με τις βιολογικές παραμέτρους διαφορετικών πληθυσμών του εντόμου. Λαμβάνοντας υπόψη τη γεωγραφική και οικολογική ετερογένεια των ενδiciaημάτων των ευρωπαϊκών πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς και την οικονομική σημασία του εντόμου για τη χώρα μας, η παρούσα διατριβή αποσκοπεί στη μελέτη της βιο-οικολογίας και της συμπεριφοράς γεωγραφικά απομονωμένων πληθυσμών του εντόμου που προέρχονται κυρίως από την Ελλάδα καθώς και από δύο περιοχές της Γερμανίας. Αρχικά, κρίθηκε σκόπιμη η αποτύπωση της διασποράς των πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς στην Ελλάδα, καθώς μέχρι σήμερα η παρουσία του εντόμου είναι τεκμηριωμένη σε ελάχιστες περιοχές της χώρας. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η διάπαυση και η δημογραφία των ενηλίκων που καθορίζουν την προσαρμογή των πληθυσμών στα διαφορετικά ενδiciaήματα. Προκειμένου να

διαχωριστεί η επίδραση των γενετικών και των οικολογικών παραγόντων στα βιολογικά χαρακτηριστικά της ραγολέτιδας της κερασιάς, χρησιμοποιήθηκαν πληθυσμοί με ποικίλα επίπεδα γονιδιακής ροής που απαντώνται σε οικολογικά διαφορετικά ενδιαιτήματα. Οι στόχοι που τέθηκαν είναι οι εξής:

1. Πρώτος στόχος ήταν η αποτύπωση της γεωγραφικής κατανομής της ραγολέτιδας της κερασιάς στην Ελλάδα και ο έλεγχος της παρουσίας του βακτηρίου *Wolbachia ripientis* σε ελληνικούς πληθυσμούς. Σε αυτό το πλαίσιο, πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες καρπών από διάφορες ηπειρωτικές και νησιωτικές περιοχές της χώρας και προσδιορίστηκε το εύρος των ξενιστών του εντόμου και τα ποσοστά προσβολής των καρπών. Επίσης, επιβεβαιώθηκε η παρουσία της *Wolbachia* (με παράλληλη ταυτοποίηση του στελέχους wCer1) στους ελληνικούς πληθυσμούς της ραγολέτιδας της κερασιάς (Κεφάλαιο 3).
2. Δεύτερος στόχος ήταν η μελέτη της επίδρασης του πληθυσμού και της θερμοκρασίας στη διάρκεια της διάπαυσης γεωγραφικά απομονωμένων πληθυσμών με διαφορετικά επίπεδα γονιδιακής ροής που απαντώνται σε διαφορετικά οικολογικά ενδιαιτήματα. Σε αυτό το πλαίσιο, προσδιορίστηκε ο χρόνος περάτωσης της διάπαυσης των νυμφών δύο ελληνικών και ενός γερμανικού πληθυσμών μετά από έκθεσή τους σε ένα εύρος χαμηλών θερμοκρασιών (0 έως 12°C) για ποικίλα χρονικά διαστήματα (1 έως 9 μήνες). Σε κάθε μεταχείριση καταγράφηκε ο αριθμός των νυμφών που παρέμειναν ζωντανές. Τα αποτελέσματα συζητήθηκαν σε συνάρτηση με τις πιθανές επιπτώσεις της κλιματικής αλλαγής στη διάρκεια του βιολογικού κύκλου του εντόμου (Κεφάλαιο 4).
3. Τρίτος στόχος ήταν η μελέτη της επίδρασης του πληθυσμού στη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη των νυμφών σε ελληνικούς, κυρίως, πληθυσμούς που προέρχονται από περιοχές με πρώιμες και όψιμες ποικιλίες κερασιάς (πρώιμοι και όψιμοι πληθυσμοί) και συνδέονται μεταξύ τους με ποικίλα επίπεδα γονιδιακής ροής. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν διαπαύουσες κατά το πρώτο έτος νύμφες που προέρχονταν από: α) όψιμους πληθυσμούς με χαμηλά επίπεδα γονιδιακής ροής και β) πρώιμους πληθυσμούς με υψηλά επίπεδα γονιδιακής ροής. Επίσης, εκτιμήθηκε η επίδραση της επικρατούσας (κατά τη μεταδιαπαιτική περίοδο) θερμοκρασίας στη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη νυμφών που δίνουν ενήλικα κατά το πρώτο έτος διάπαυσης και προέρχονται από πρώιμους και όψιμους πληθυσμούς με ποικίλα επίπεδα γονιδιακής ροής. Επιπλέον, προσδιορίστηκε η επίδραση της

παρατεταμένης διάπαυσης στη διάρκεια της μεταδιαπαυτικής ανάπτυξης των νυμφών που προέρχονται από γενετικά απομονωμένους πληθυσμούς με διαφορετικά οικολογικά χαρακτηριστικά (Κεφάλαιο 5).

4. Τέταρτος στόχος ήταν η μελέτη των δημογραφικών χαρακτηριστικών των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς που εξήλθαν κατά το πρώτο έτος διάπαυσης των νυμφών και προέρχονται από πληθυσμούς της Ελλάδας και της Γερμανίας, οι οποίοι διαφέρουν ως προς τα οικολογικά και γεωγραφικά χαρακτηριστικά των ενδιαιτημάτων τους και συνδέονται είτε με χαμηλά είτε με υψηλά επίπεδα γονιδιακής ροής (Κεφάλαιο 6).
5. Πέμπτος στόχος ήταν η μελέτη της επίδρασης της παρατεταμένης διάπαυσης των νυμφών στα μορφολογικά και στα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ενηλίκων. Στο πλαίσιο αυτό, συγκρίθηκαν το μέγεθος του σώματος και οι βιολογικές παράμετροι των ατόμων που ενηλικιώθηκαν μετά από υποβολή των νυμφών σε ένα και δύο κύκλους θερμών-ψυχρών περιόδων (ενός έτους και παρατεταμένη διάπαυση, αντίστοιχα) και προέρχονταν από δύο γενετικά απομονωμένους ελληνικούς πληθυσμούς της ραγολέτιδας της κερασιάς. Σε κάθε περίπτωση, συνυπολογίστηκαν πιθανές επιδράσεις της παραλλακτικότητας του μεγέθους του σώματος των ενηλίκων στα δημογραφικά τους χαρακτηριστικά (Κεφάλαιο 7).
6. Έκτος στόχος ήταν η μελέτη της παρουσίας μηχανισμών προσυζευκτικής απομόνωσης μεταξύ γεωγραφικά απομονωμένων πληθυσμών του εντόμου που διαφέρουν ως προς τα οικολογικά τους χαρακτηριστικά και συνδέονται με ποικίλα επίπεδα γονιδιακής ροής. Σε αυτό το πλαίσιο, εκτιμήθηκε: α) η πιθανότητα των ετεροτυπικών και ομοτυπικών συζεύξεων για καθένα από τους πέντε συνδυασμούς πληθυσμών (έξι ελληνικών και ενός γερμανικού) που είτε παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα γονιδιακής ροής είτε έχουν διαφορετική φαινολογία ενηλίκων στον αγρό (πρώιμοι vs όψιμοι πληθυσμοί) και β) ο χρόνος που απαιτείται μέχρι την πρώτη σύζευξη καθώς και η διάρκεια όλων των τύπων συζεύξεων για κάθε συνδυασμό πληθυσμών. Παράλληλα εξετάστηκε ο ημερήσιος ρυθμός σύζευξης των ενηλίκων των εξεταζόμενων πληθυσμών (Κεφάλαιο 8).

Το τελευταίο κεφάλαιο της παρούσας διατριβής (Κεφάλαιο 9) αποτελεί μια ανακεφαλαίωση με παράλληλη εξαγωγή γενικών συμπερασμάτων, πρακτικών εφαρμογών και διατύπωσης προτάσεων για μελλοντική έρευνα.

Βιβλιογραφία

- Agee HR, Boller E, Remund U, Davis JC, Chambers DL. 1982. Spectral sensitivities and visual attractant studies on the mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann), olive fly, *Dacus oleae* (Gmelin), and the european cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi* (L.) (Diptera, Tephritidae). *Journal of Applied Entomology* **93**: 403-412.
- Alam U, Medlock J, Brelsfoard C, Pais R, Lohs C, Balmand S, Carnogursky J, Heddi A, Takac P, Galvani A, Aksoy S. 2011. *Wolbachia* symbiont infections induce strong cytoplasmic incompatibility in the tsetse fly *Glossina morsitans*. *PLoS Pathogens* **7**: e1002415.
- Alleaume-Benharira M, Pen IR, Ronce O. 2006. Geographical patterns of adaptation within a species' range: interactions between drift and gene flow. *Journal of Evolutionary Biology* **19**: 203–215.
- Aluja M, Boller EF. 1992. Host marking pheromone of *Rhagoletis cerasi*: Field deployment of synthetic pheromone as a novel cherry fruit fly management strategy. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **65**: 141-147.
- Ankola K, Brueckner D, Pottaraju HP. 2011. *Wolbachia* endosymbiont infection in two Indian butterflies and female-biased sex ratio in the Red Pierrot, *Talicauda nyseus*. *Journal of Biosciences* **36**: 845-850.
- Annala E. 1982. Diapause and population fluctuations in *Megastigmus specularis* Walley and *M. spermotrophus* Wachtl (Hymenoptera: Torymidae). *Annales Entomologici Fennici* **48**: 33-36.
- Apostolaki A, Livadaras I, Saridaki, A, Chrysargyris A, Savakis C, Bourtzis K. 2011. Transinfection of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* with *Wolbachia*: towards a symbiont-based population control strategy. *Journal of Applied Entomology* **135**: 546-553.
- Arakaki N, Noda H, Yamagishi K. 2000. *Wolbachia*-induced parthenogenesis in the egg parasitoid *Telenomus nawai*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **96**: 177-184.
- Arthofer W, Riegler M, Schneider D, Krammer M, Miller WJ, Stauffer C. 2009. Hidden *Wolbachia* diversity in field populations of the European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi* (Diptera, Tephritidae). *Molecular Ecology* **18**: 3816–3830.
- Atyame CM, Pasteur N, Dumas E, Tortosa P, Tantely ML, Pocquet N, Licciardi, S, Bheecarry A, Zumbo B, Weill M, Duron O. 2011. Cytoplasmic Incompatibility as a

Means of Controlling *Culex pipiens quinquefasciatus* Mosquito in the Islands of the South-Western Indian Ocean. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **5**: e1440.

Augustinos AA, Asimakopoulou AK, Moraiti CA, Mavragani-Tsipidou P, Papadopoulos NT, Bourtzis K. 2013. Microsatellite and *Wolbachia* analysis in *Rhagoletis cerasi* natural populations: population structuring and multiple infections. *Ecology and Evolution*, in press.

Augustinos AA, Asimakopoulou AK, Papadopoulos NT, Bourtzis K. 2011. Cross-amplified microsatellites in the European cherry fly, *Rhagoletis cerasi*: medium polymorphic-highly informative markers. *Bulletin of Entomological Research* **101**: 45-52.

Augustinos AA, Mamuris Z, Stratikopoulos E, D'Amelio S, Zacharopoulou A, Mathiopoulos KD. 2005. Microsatellite analysis of olive fly populations in the Mediterranean indicates a westward expansion of the species. *Genetica* **125**: 231–241.

Baker, CRB, Miller GW. 1978. Effect of temperature on postdiapause development of four geographical populations of european cherry fruit fly (*Rhagoletis cerasi*). *Entomologia Experimentalis et Applicata* **23**: 1-13.

Barton NH, de Cara MAR. 2009. The evolution of strong reproductive isolation. *Evolution* **63**: 1171–1190.

Belozarov VN. 2009. New aspects in investigations of diapause and non-diapause dormancy types in insects and other arthropods. *Entomological Review* **89**: 127-136.

Blümel S, Russ K. 1989. Manipulation of races. In: Robinson AS, Hooper G, eds. *Fruit flies: Their Biology, Natural Enemies and Control* Vol. 3B. Elsevier: Amsterdam, 387-389.

Böhm H. 1949. Untersuchungen über die lebensweise und bekämpfung der kirschfliege (*rhagoletis cerasi* l.). *Pflanzenschutzberichte* **3**: 177-185.

Boller EF. 1989. Rearing - *Rhagoletis* spp. In: Robinson AS, Hooper G, eds. *Fruit flies: Their Biology, Natural Enemies and Control* Vol. 3B. Elsevier: Amsterdam, 119-127.

Boller E, 1966. Der Einfluss natürlicher Reduktionfaktoren auf die Kirschenfliege *Rhagoletis cerasi* in der Nordwestschweiz, unter besonderer Berücksichtigung des Puppenstadiums. *Schweizerische Landwirtschaftliche Forschung* **5**: 154-210.

Boller E, Aluja M. 1992. Oviposition deterring pheromone in *Rhagoletis cerasi* L. *Journal of Applied Entomology* **113**: 113-119.

Boller EF, Prokopy RJ. 1976. Bionomics and management of *Rhagoletis*. *Annual Review of Entomology* **21**: 223-146.

- Boller EF, Russ K, Vallo V, Bush GL. 1976.** Incompatible races of European Cherry Fruit Fly *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae), their origin and potential use in biological control. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **20**: 237-247.
- Boller EF, Remund U. 1975.** Application of SIT on the European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi* in Northwest Switzerland. IAEA/FAO *Panel Proceedings Series. STI/PUB/ 392*: 77-82.
- Boller E, Haisch A, Russ K, Vallo V. 1970.** Economic importance of *Rhagoletis cerasi* L., the feasibility of genetic control and resulting research problems. *Entomophaga* **15**: 305-313.
- Bordenstein SR, O'Hara FP, Werren JH. 2001.** *Wolbachia*-induced incompatibility precedes other hybrid incompatibilities in *Nasonia*. *Nature* **409**: 707–710.
- Bourtzis K. 2008.** *Wolbachia*-based technologies for insect pest population control. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **627**: 104-113.
- Bourtzis K, Braig HR, Karr TL. 2003.** Cytoplasmic Incompatibility. In: Bourtzis K, Miller T, eds. *Insect Symbiosis*. Boca Raton: CRC Press, 217–246.
- Breeuwer JAJ, Werren JH. 1990.** Microorganism associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. *Nature* **346**: 558-560.
- Brelsfoard CL, Dobson SL. 2009.** *Wolbachia*-based strategies to control insect pests and disease vectors. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* **17**: 55–63.
- Brucker RM, Bordenstein SR. 2012.** Speciation by symbiosis. *Trends in Ecology & Evolution* **27**: 443-451.
- Calabria G, Maca J, Bachli G, Serra L, Pascual M, 2012.** First records of the potential pest species *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in Europe. *Journal of Applied Entomology* **136**: 139-147.
- Carrington LB, Hoffmann AA, Weeks AR. 2010.** Monitoring long-term evolutionary changes following *Wolbachia* introduction into a novel host: the *Wolbachia* popcorn infection in *Drosophila simulans*. *Proceedings of the Royal Society of London B* **277**: 2059–2068.
- Charlat S, Hornett EA, Dyson EA, Patrick PYH, Thiloc N, Schilthuizen M, Davies N, Roderick GK and Hurst GDD. 2005.** Prevalence and penetrance variation of male-killing *Wolbachia* across Indo-Pacific populations of the butterfly *Hypolimnas bolina*. *Molecular Ecology* **14**: 3525–3530.

- Chevin L-M, Lande R, Mace GM. 2010.** Adaptation, plasticity, and extinction in a changing environment: towards a predictive theory. *PLoS Biology* **8**: e1000357.
- Cini A, Ioriatti C, Anfora G. 2012.** A review of the invasion of *Drosophila suzukii* in Europe and a draft research agenda for integrated pest management. *Bulletin of Insectology* **65**: 149-160.
- Colles A, Liow LH, Prinzing A. 2009.** Are specialists at risk under environmental change? Neoecological, paleoecological and phylogenetic approaches. *Ecology Letters* **12**: 849–863.
- Cordaux R, Michel-Salzat A, Frelon-Raimond M, Rigand T, Bouchon, D. 2004.** Evidence for a new feminizing *Wolbachia* strain in the isopod *Armadillidium vulgare*: evolutionary implications. *Heredity* **93**: 78-84.
- Coscrato VE, Braz AS, P Perondini AL, Selivon D, Marino CL. 2009.** *Wolbachia* in *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Current Microbiology* **59**: 295-301.
- Cooper WS, Kaplan H. 1982.** Adaptive “coin-flipping”: a decision –theoretic examination of natural selection for random individual variation. *Journal of Theoretical Biology* **94**: 135-151.
- Coyne JA, Orr HA. 2004.** *Speciation*. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates.
- Crain PR, Mains JW, Suh E, Huang Y, Crowley PH, Dobson SL. 2011.** *Wolbachia* infections that reduce immature insect survival: predicted impacts on population replacement. *BMC Evolutionary Biology* **11**: 290.
- Crispo E. 2008.** Modifying effects of phenotypic plasticity on interactions among natural selection, adaptation and gene flow. *Journal of Evolutionary Biology* **21**: 1460–1469.
- Danforth BN. 1999.** Emergence dynamics and bet-hedging in a desert bee, *Perdita portalis*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **266**: 1985-1994.
- Daniel C, Grunder J. 2012.** Integrated management of European cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi* (L.): Situation in Switzerland and Europe. *Insects* **3**: 956-988.
- Daniel C, Wyss E. 2010.** Field applications of *Beauveria bassiana* to control the European cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi*. *Journal of Applied Entomology* **134**: 675-681.
- Daniel C, Wyss E. 2009.** Susceptibility of different life stages of the European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi*, to entomopathogenic fungi. *Journal of Applied Entomology* **133**: 473-483.
- Danks HV. 2007.** The elements of seasonal adaptations in insects. *Canadian Entomologist* **139**: 1–44.

- Danks HV. 2004.** Seasonal adaptations in Arctic insects. *Integrative and Comparative Biology* **44**: 85-94.
- Danks HV. 1987.** *Insect Dormancy: an Ecological Perspective*. Biological Survey on Canada (Terrestrial Arthropods), Ottawa.
- Dean MD, 2006.** A *Wolbachia*-associated fitness benefit depends on genetic background in *Drosophila simulans*. *Proceedings of the Royal Society of London B* **273**: 1415–1420.
- Dean RL, Hartley JC, 1977.** Egg diapause in *Ephippiger cruciger* (Orthoptera: Tettigoniidae). I. The incidence, variable duration, and elimination of the initial diapause. *The Journal of Experimental Biology* **66**: 173–183.
- Dedeine F, Vavre F, Fleury F, Loppin B, Hochberg ME, et al. 2001.** Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 6247–6252.
- Dobson SL, Rattanadechakul W, Marsland EJ. 2004.** Fitness advantage and cytoplasmic incompatibility in *Wolbachia* single- and superinfected *Aedes albopictus*. *Heredity* **93**:135-42.
- Dobson SL, Marsland EJ, Rattanadechakul W. 2002.** Mutualistic *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus*: accelerating cytoplasmic drive. *Genetics* **160**: 1087-1094.
- Doudoumis V, Tsiamis G, Wamwiri F, Brelsfoard C, Alam U, Aksoy E, Dalaperas S, Abd-Alla A, Ouma J, Takac P, Aksoy S, Bourtzis K. 2012.** Detection and characterization of *Wolbachia* infections in laboratory and natural populations of different species of tsetse (genus *Glossina*). *BMC Microbiology* **12**: S3.
- Drosopoulou E, Augustinos AA, Nakou I, Koepler K, Kounatidis I, Vogt H, Papadopoulos NT, Bourtzis K, Mavragani-Tsipidou P. 2011.** Genetic and cytogenetic analysis of the American cherry fruit fly, *Rhagoletis cingulata* (Diptera: Tephritidae). *Genetica* **139**: 1449-1464.
- Drosopoulou E, Koepler K, Kounatidis I, Nakou I, Papadopoulos NT, Bourtzis K, Mavragani-Tsipidou P. 2010.** Genetic and cytogenetic analysis of the walnut-husk fly (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America* **103**:1003–101.
- Duron O, Bernard J, Atyame CM, Dumas E, Weill M. 2012.** Rapid evolution of *Wolbachia* incompatibility types. *Proceedings of the Royal Society: biological sciences* **279**: 4473-4480.

- Dyson EA, Hurst GDD. 2004.** Persistence of an extreme sex-ratio bias in a natural population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 6520-6523.
- Engelstaedter J, Hurst GDD. 2009.** The ecology and evolution of microbes that manipulate host reproduction. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* **40**: 127–149.
- EPPO. 2009.** PQR database. Paris, France: European and Mediterranean Plant Protection Organization. www.eppo.org.
- FAO 2010.** *Faostat*. Available online: <http://faostat.fao.org>.
- Fialho RF, Stevens LR. 2000.** Male-killing *Wolbachia* in a flour beetle. *Proceedings of the Royal Society of London B* **267**: 1469-1474.
- Fimiani, P. 1989.** Pest status-Mediterranean region. In: Robinson AS, Hooper G, eds. *Fruit flies: their biology, natural enemies and control*. Amsterdam: Elsevier, 39-50.
- Fimiani P. 1983.** Multilarval infestations by *Rhagoletis cerasi* L. (Diptera: Trypetidae) in cherry fruits. In: Cavalloro R, ed. *Fruit flies of economic importance*. Balkema: Rotterdam, 52- 59.
- Fleury F, Vavre F, Ris N, Fouillet P, Bouletreau M. 2000.** Physiological cost induced by the maternally-transmitted endosymbiont *Wolbachia* in the *Drosophila* parasitoid *Leptopilina heterotoma*. *Parasitology* **121**: 493-500.
- Flor M, Hammerstein P, Telschow A. 2007.** *Wolbachia*-induced unidirectional cytoplasmic incompatibility and the stability of infection polymorphism in parapatric host populations. *Journal of Evolutionary Biology* **20**: 696–706.
- Friberg U, Miller PM, Stewart AD, Rice WR. 2011.** Mechanisms promoting the long-term persistence of a *Wolbachia* infection in a laboratory-adapted population of *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* **6**: e16448.
- Fry AJ, Palmer MR, Rand DM, 2004.** Variable fitness effects of *Wolbachia* infection in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* **93**: 379–389.
- Fry AJ, Rand DM, 2002.** *Wolbachia* interactions that determine *Drosophila melanogaster* survival. *Evolution* **56**: 1976–1981.
- Fry JM, 1987.** *Natural Enemy Databank. A catalogue of natural enemies of arthropods derived from records in the CIBC Natural Enemy Databank*. CAB International, 34-35.
- Frydman HM, Li JM, Robson DN, Wieschaus E. 2006.** Somatic stem cell niche tropism in *Wolbachia*. *Nature* **441**: 509-512.

- Gavotte L, Mercer DR, Stoeckle JJ, Dobson SL. 2010.** Costs and benefits of *Wolbachia* infection in immature *Aedes albopictus* depend upon sex and competition level. *Journal of Invertebrate Pathology* **105**: 341-346.
- Gavotte L, Mercer DR, Vandyke R, Mains JW, Dobson SL. 2009.** *Wolbachia* infection and resource competition effects on immature *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* **46**: 451–459.
- Grassi A, Palmieri L, Giongo L. 2012.** *Drosophila (Sophophora) suzukii* (Matsumura), new pest of soft fruits in Trentino (North-Italy) and in Europe. *IOBC/wprs Bulletin* **70**: 121-128.
- Gueguen G, Onemola B, Govind S. 2012.** Association of a new *Wolbachia* strain with, and its effect on, *Leptopilina victoriana*, a virulent wasp parasitic to *Drosophila spp.* *Applied and Environmental Microbiology* **78**: 5962-5966.
- Haniotakis G, Maliaros M, Kozyrakis M, Bonatsos K. 1991.** Experiments on the control of the cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi* L. in Crete. Results of the first year, In: *Proceedings of the 1st Panhellenic Entomological Congress*, 6-8 November 1985, Athens Greece. Greek Entomological Society, Athens, Greece (in Greek), 197-204.
- Haniotakis GE, Malliaros M, Koryzakis M. 1989.** Control of the European cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi* with bait sprays. In: Cavalloro R, ed. *Fruit flies of economic importance. Proceedings of the CEC/IOBC International Symposium*, Rome 7-10 April 1987, 487-493.
- Hanski I. 1988.** Four kinds of extra long diapause in insects: A review of theory and observations. *Annales Zoologici Fennici* **25**: 37-53.
- Hedges LM, Brownlie JC, O'Neill SL, Johnson KN. 2008.** *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science* **322**: 702.
- Hedlin AF, Miller GE, Ruth DS. 1982.** Induction of prolonged diapause in *Barbara colfaxiana* (Lepidoptera: Olethreutidae): correlations with cone crops and weather. *Canadian Entomologist* **114**: 465-471.
- Herz A, Köppler K, Vogt H, Elias E, Peters A, Katz P. 2006.** Biological control of the cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi* L. (Diptera, Tephritidae) by use of entomopathogenic nematodes: first experiences towards practical implementation. [Erste Erfahrungen bei der Anwendung entomopathogener Nematoden zur biologischen Bekämpfung der Kirschfruchtfliege in der Praxis.] In: Boos M, ed. *Ecofruit - 12th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing*:

Proceedings to the Conference from 31st January to 2nd February 2006 at Weinsberg/Germany, 67-72.

Higaki M. 2006. Repeated cycles of chilling and warming effectively terminate prolonged larval diapause in the chestnut weevil, *Curculio sikkimensis*. *Journal of Insect Physiology* **52**: 514–519.

Higaki M. 2005. Effect of temperature on the termination of prolonged larval diapause in the chestnut weevil *Curculio sikkimensis* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Insect Physiology* **51**: 1352–1358.

Higaki M, Toyama M. 2012. Evidence for reversible change in intensity of prolonged diapause in the chestnut weevil, *Curculio sikkimensis*. *Journal of Insect Physiology* **58**: 56-60.

Higaki M, Ihara F, Toyama M, Mishiro K, 2010. Thermal response and reversibility of prolonged larval diapause in the chestnut weevil, *Curculio sikkimensis*. *Journal of Insect Physiology* **56**: 616–621.

Higaki M, Ando Y, 2000. Effect of temperature on the termination of prolonged initial diapause in *Eobiana japonica* (Bolivar) (Orthoptera: Tettigoniidae). *Entomological Science* **3**: 219–226.

Higaki M, Ando Y. 1999. Seasonal and altitudinal adaptations in three katydid species: Ecological significance of initial diapause. *Entomological Science* **2**: 1-11.

Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A, Werren JH. 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? - a statistical analysis of current data. *FEMS Microbiology Letters* **281**: 215–220.

Hine E, McGuigan K, Blows MW. 2011. Natural selection stops the evolution of male attractiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* **108**: 3659-3664.

Hodková M, Hodek I. 2004. Photoperiod, diapause and cold-hardiness. *European Journal of Entomology* **101**: 445–458.

Hoffmann AA, Sgrò CM. 2011. Climate change and evolutionary adaptation. *Nature* **470**: 479-485.

Hoffmeister T. 1992. Factors determining the structure and diversity of parasitoid complexes in tephritid fruit flies. *Oecologia* **89**: 288-297.

Hopper KR. 1999. Risk-spreading and bet-hedging in insect population biology. *Annual Review of Entomology* **44**: 535–560.

- Hosokawa, T, Koga R, Kikuchi Y, Meng X-Y, Fukatsu T. 2010. *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 769–774.
- Hotopp JCD, Clark ME, Oliveira DCSG, Foster JM, Fischer P, Muñoz Torres MC, Giebel JD, Kumar N, Ishmael N, Wang S, Ingram J, Nene RV, Shepard J, Tomkins J, Richards S, Spiro DJ, Ghedin E, Slatko BE, Tettelin H, Werren JH. 2007. Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes. *Science* **317**: 1753–1756.
- Huigens ME, Hohmann CL, Luck RF, Gort G, Stouthamer R. 2004. Reduced competitive ability due to *Wolbachia* infection in the parasitoid wasp *Trichogramma kaykai*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **110**: 115–123.
- Huigens ME, Luck RF, Klaassen RHG, Maas MFPM, Timmermans MJTN, Stouthamer R. 2000. Infections Parthenogenesis. *Nature* **405**: 178-179.
- Jaastad G. 1998. Mating behavior and distribution of the European cherry fruit fly (*Rhagoletis cerasi* L.) in Norway; applied and evolutionary research aspects on an insect pest. Unpublished D. Phil. Thesis, Department of Zoology, University of Bergen, Norway. ISBN 82-992402-9-8.
- Jaastad G, 1994. First registration of the cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi* (L.) in western Norway; distribution, size and origin of the population. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences* **8**: 203-214.
- Jamnongluk W, Kittayapong P, Visut B, O'Neill SL. 2002. *Wolbachia* infections of Tephritid Fruit Flies: molecular evidence for five distinct strains in a single host species. *Current Microbiology* **45**: 255-260.
- Jenouvrier S, Visser ME. 2011. Climate change, phenological shifts, eco-evolutionary responses and population viability: toward a unifying predictive approach. *International Journal of Biometeorology* **55**: 905-919.
- Jeyaprakash A, Hoy MA. 2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Molecular Biology* **9**: 393–405.
- Islam MS, Dobson SL. 2006. *Wolbachia* effects on *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) immature survivorship and development. *Journal of Medical Entomology* **43**: 689–695.
- Iturbe-Ormaetxe I, Walker T, O'Neill SL. 2011. *Wolbachia* and the biological control of mosquito-borne disease. *EMBO reports* **12**: 508–518.

- Kageyama D, Narita S, Watanabe M. 2012.** Insect sex determination manipulated by their endosymbionts: Incidences, mechanisms and implications. *Insects* **3**: 161-199.
- Katsoyannos BI. 1982.** Male sex pheromone of *Rhagoletis cerasi* L. (Diptera, Tephritidae): Factors affecting release and response and its role in mating behavior. *Journal of Applied Entomology* **94**: 187-198.
- Katsoyannos BI. 1979.** Zum reproduktions und wirtswahlverhalten der kirschenfliege, *rhagoletis cerasi* L. (Diptera: Tephritidae). Unpublished D. Phil. Thesis. no. 6409, ETH, Zürich.
- Katsoyannos BI. 1976.** Female attraction to males in *Rhagoletis cerasi* (Diptera, Tephritidae). *Environmental Entomology* **5**: 474-476.
- Katsoyannos BI. 1975.** Oviposition-detering, male-arresting, fruit-marking pheromone in *Rhagoletis cerasi*. *Environmental Entomology* **4**: 801- 807.
- Katsoyannos BI, Papadopoulos NT, Stavridis D. 2000.** Evaluation trap types and food attractants for *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology* **93**: 1005-1010.
- Katsoyannos BI, Boller E, Benz G. 1987.** Zur reproduktionsbiologie der kirschenfliege *rhagoletis cerasi* L.: Präovipositionsperiode, tagesperiodizität und einfluss der kopulation auf die fekundität und fertilität einzeln oder in gruppen gehaltener weibchen (Diptera: Tephritidae). *Mitteilung der Schweizerischen entomologischen Gesellschaft* **60**: 3-13.
- Katsoyannos BI, Boller E, Benz G. 1986.** Das verhalten der kirschenfliege, *Rhagoletis cerasi*, L., bei der auswahl der wirtspflanzen und ihre dispersion. *Mitteilung der Schweizerischen entomologischen Gesellschaft* **59**: 315-335.
- Katsoyannos BI, Boller EF. 1980.** Second field application of oviposition-detering pheromone of the European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi* L. (Diptera, Tephritidae). *Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie-Journal of Applied Entomology* **89**: 278-281.
- Katsoyannos BI, Boller EF. 1976.** First field application in Switzerland of oviposition-detering marking pheromone of European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi*. *Environmental Entomology* **5**: 151-152.
- Kawecki TJ, Ebert D. 2004.** Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters* **7**: 1225–1241.
- Köppler K, Kaffer T, Vogt H. 2009.** Substantial progress made in the rearing of the European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* **132**: 283-288.

- Köppler K, Storch V, Vogt H. 2006.** Bait sprays – an alternative to control the European cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi*? In: Boos M, ed. *Proceedings of the 12th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing*. Weinsberg: FÖKO, 61-66.
- Köppler K, Peters A, Vogt H. 2003.** Initial results in the application of entomopathogenic nematodes against the European cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi* L. (Diptera: Tephritidae). *IOBC wprs Bulletin* **28**: 13-18.
- Košťál V. 2006.** Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of Insect Physiology* **52**: 113-127.
- Kounatidis I, Papadopoulos N, Bourtzis K, Mavragani-Tsipidou P. 2008.** Genetic and cytogenetic analysis of the fruit fly *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae). *Genome* **51**: 479–49.
- Kovanci OB, Kovanci B. 2006.** Effect of altitude on seasonal flight activity of *Rhagoletis cerasi* flies (Diptera: Tephritidae). *Bulletin of Entomological Research* **96**: 345-351.
- Lewis Z, Champion de Crespigny FE, Sait SM, Tregenza T, Wedell N. 2011.** *Wolbachia* infection lowers fertile sperm transfer in a moth. *Biology Letters* **7**: 187-189.
- Liefting M, Ellers J. 2008.** Habitat-specific differences in thermal plasticity in natural populations of a soil arthropod. *Biological Journal of the Linnean Society* **94**: 265–271.
- Lind MI, Ingvarsson PK, Johansson H, Hall D, Johansson F. 2011.** Gene flow and selection on phenotypic plasticity in an island system of *Rana temporaria*. *Evolution* **65**: 684–697.
- Lind MI, Johansson F. 2007.** The degree of phenotypic plasticity is correlated with the spatial environmental heterogeneity experienced by island populations of *Rana temporaria*. *Journal of Evolutionary Biology* **20**: 1288–1297.
- Linnaeus C. 1758.** *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Ed. 10, Tomus 1. Sweden: L. Salvii, Stockholm.
- Min KT, Benzer S, 1997.** *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 10792– 10796.
- Maan ME, Seehausen O. 2011.** Ecology, sexual selection and speciation. *Ecology Letters* **14**: 591-602.

- Marshall JL. 2007.** Rapid evolution of spermathecal duct length in the *Allonemobius socius* complex of crickets: species, population and *Wolbachia* effects. *PLoS ONE* **2**: e720.
- Masel J, King OD, Maughan H. 2007.** The loss of adaptive plasticity during long periods of environmental stasis. *The American Naturalist* **169**: 38–46.
- Matalin AV. 1997.** Life cycles of carabids of the genus *Stenolophus* (Coleoptera, Carabidae) in the steppe zone of Europe. *Entomological Review* **77**: 1181-1190.
- Matsubayashi KW, Ohshima I, Nosil P. 2010.** Ecological speciation in phytophagous insects. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **134**: 1-27.
- McMeniman CJ, Lane RV, Cass BN, Fong AWC, Sidhu M, Wang YF, O'Neill SL. 2009.** Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science* **323**: 141–144.
- Menu F. 1993.** Strategies of emergence in the chestnut weevil *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae). *Oecologia* **96**: 383-390.
- Menu F, Desouhant E. 2002.** Bet-hedging for variability in life-cycle duration: bigger and later-emerging chestnut weevils have increased probability of a prolonged diapause. *Oecologia* **132**: 167-174.
- Menu F, Debouzie D. 1993.** Coin-flipping plasticity and prolonged diapause in insects: example of the chestnut weevil *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae). *Oecologia* **93**: 367-373.
- Miller WJ, Ehrman L, Schneider D. 2010.** Infectious speciation revisited: Impact of symbiont-depletion on female fitness and mating behavior of *Drosophila paulistorum*. *PLOS Pathogens* **6**: e1001214.
- Mincă D, Vîrteiu A-M, Petanec D. 2011.** The dynamics of *Rhagoletis cerasi* populations in climatic conditions of Western Romania. *Research Journal of Agricultural Science* **43**: 92-98.
- Mohamadzade Namin S, Nozari J, Rasoulia Gh. 2010.** The fruit flies (Diptera, Tephritidae) in Tehran Province, with new records for Iranian fauna. *Vestnik zoologii* **44**: e-20-e-31.
- Müller W. 1970.** Agrarmeteorologische untersuchungen über das erstauftreten der kirschenfliege (*Rhagoletis cerasi* L.) in österreich. *Pflanzenschutzberichte* **41**:193-209.
- Nakamura I, Ae SA. 1977.** Prolonged pupal diapause of *Papilio alexanor*. Arid zone adaptation directed by larval host plant. *Annals of the Entomological Society of America* **70**: 481–484.

- Narayanan ES, Chawla SS. 1962.** Parasites of fruit fly pests of the world. *Beitrage zur Entomologie* **12**: 437-476.
- Narita S, Kageyama D, Hiroki M, Sanpei T, Hashimoto S, Kamitoh T, Kato Y. 2011.** *Wolbachia*-induced feminisation newly found in *Eurema hecabe*, a sibling species of *Eurema mandarina* (Lepidoptera: Pieridae). *Ecological Entomology* **36**: 309–317.
- Neilson WTA, 1962.** Effects of temperature on development of overwintering pupae of the apple maggot, *Rhagoletis pomonella* (Walsh). *The Canadian Entomologist* **94**: 924–928.
- Neuenschwander P, Michelakis S, Russ K, Hoblaus E. 1983.** Ecological studies on *Rhagoletis cerasi* L. in Crete for the use of the incompatible insect technique, In: Cavalloro R, ed. *Fruit Flies of Economic Importance. Proceedings CEC/IOBC International Symposium*, Athens, pp. 41-51.
- Nosil P. 2007.** Divergent host-plant adaptation and reproductive isolation between ecotypes of *Timema cristinae* walking-sticks. *The American Naturalist* **169**: 151–162.
- Nylin S, Gotthard K. 1998.** Plasticity in life-history traits. *Annual Review of Entomology* **43**: 63–83.
- O’Neill SL, Karr TL. 1990.** Bidirectional incompatibility between conspecific populations of *Drosophila simulans*. *Nature* **348**: 178-180.
- Pannebakker BA, Loppin B, Elemans CP, Humblot L, Vavre F. 2007.** Parasitic inhibition of cell death facilitates symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 213–215.
- Papanastasiou AS, Nestel D, Diamantidis AD, Nakas CT, Papadopoulos NT. 2011.** Physiological and biological patterns of a highland and a coastal population of the European cherry fruit fly during diapause. *Journal of Insect Physiology* **57**: 83-93.
- Perrot-Minnot MJ, Cheval B, Migeon A, Navajas M. 2002.** Contrasting effects of *Wolbachia* on cytoplasmic incompatibility and fecundity in the haplodiploid mite *Tetranychus urticae*. *Journal of Evolutionary Biology* **15**: 808–817.
- Philippi T, Seger J. 1989.** Hedging ones evolutionary bets, revisited. *Trends in Ecology & Evolution* **4**: 41-44.
- Poinsot D, Mercot H. 1997.** *Wolbachia* infection in *Drosophila simulans*: does the female host bear a physiological cost? *Evolution* **51**: 180–186.
- Poisot T, Bever JD, Nemri A, Thrall PH, Hochberg ME. 2011.** A conceptual framework for the evolution of ecological speciation. *Ecology Letters* **14**: 841-851.

- Powell JA. 2001.** Longest insect dormancy: Yucca moth larvae (Lepidoptera: Prodoxidae) metamorphose after 20, 25 and 30 years in diapause. *Annals of the Entomological Society of America* **94**: 677-680.
- Powell JA. 1989.** Synchronized, mass-emergences of a yucca moth, *Prodoxus y-inversus* (Lepidoptera: Prodoxidae) after 16 and 17 years in diapause. *Oecologia* **81**: 490– 493.
- Powell JA. 1974.** Occurrence of prolonged diapause in ethmiid moths (Lepidoptera: Gelechioidea). *Pan-Pacific Entomologist* **50**: 220-225.
- Prokopy RJ. 1969.** Visual responses of European cherry fruit flies - *Rhagoletis cerasi* L. (Diptera, Trypetidae). *Polskie Pismo Entomologiczne* **39**: 539-566.
- Prokopy RJ, Boller EF. 1971.** Response of European cherry fruit flies to colored rectangles. *Journal of Economic Entomology* **64**: 1444-1447.
- Rasgon JL. 2012.** *Wolbachia* induces male-specific mortality in the mosquito *Culex pipiens* (LIN Strain). *PLoS ONE* **7**: e30381.
- Remund U, Boller EF. 1978.** Entwicklung und Anwendungsmöglichkeiten einer neuen visuellen Falle für die Kirschenfliege, *Rhagoletis cerasi* L. *Z. Angewandte Entomologie* **77**: 348-353.
- Richter-Boix A, Llorente G.A, Montori A. 2006.** A comparative analysis of the adaptive developmental plasticity hypothesis in six Mediterranean anuran species along a pond permanency gradient. *Evolutionary Ecology Research* **8**:1139–1154.
- Riegler M, Stauffer C. 2002.** *Wolbachia* infections and superinfections in cytoplasmically incompatible populations of the European cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi* (Diptera, Tephritidae). *Molecular Ecology* **11**: 2425-2434.
- Riparbelli MG, Giordano R, Ueyama M, Callaini G. 2012.** *Wolbachia*-Mediated male killing is associated with defective chromatin remodeling. *PLoS ONE* **7**: e30045.
- Rottschaefter SM, Lazzaro BP. 2012.** No effect of *Wolbachia* on resistance to intracellular infection by pathogenic bacteria in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* **7**: e40500.
- Rocha LS, Mascarenhas RO, Perondini ALR, Selivon D. 2005.** Occurrence of *Wolbachia* in Brazilian samples of *Ceratitits capitata* (Wiedmann) (Diptera: Tephritidae). *Neotropical Entomology* **36**: 1013-1015.
- Russ K, Boller E, Vallo V, Haisch A, Sezer, S. 1973.** Development and application of visual traps for monitoring and control of populations of *Rhagoletis cerasi* L. *Entomophaga* **18**: 103-116.

- Samietz J, Graf B, Höhn H, Schaub L, Höpli HU. 2007.** Phenology modelling of major insect pests in fruit orchards from biological basics to decision support: The forecasting tool sopra. *EPPO Bulletin* **37**: 255-260.
- Sarakatsanou A, Diamantidis AD, Papanastasiou SA, Bourtzis K, Papadopoulos NT. 2011.** Effects of *Wolbachia* on fitness of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Journal of Applied Entomology* **135**: 554-563
- Saridaki A, Bourtzis K. 2010.** *Wolbachia*: more than just a bug in insects genitals. *Current Opinion in Microbiology* **13**: 67-72.
- Saulich AKh. 2010.** Long life cycles in insects. *Entomological Review* **90**: 1127-1152.
- Scheiner SM, Holt RD. 2012.** The genetics of phenotypic plasticity. X. Variation versus uncertainty. *Ecology and Evolution* **2**: 751-767.
- Schuler H, Arthofer W, Krumböck S, Bertheau C, Stauffer C. 2012.** *Wolbachia* infection in the walnut-husk fly *Rhagoletis completa* Cresson 1929 (Diptera: Tephritidae). *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Allgemeine und Angewandte Entomologie* **18**: 243-245.
- Schuler H, Arthofer W, Riegler M, Bertheau C, Krumböck S, Köppler K, Vogt H, Teixeira LAF, Stauffer C. 2011.** Multiple *Wolbachia* infections in *Rhagoletis pomonella*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **139**: 138–144.
- Shoemaker DD, Katju V, Jaenike J. 1999.** *Wolbachia* and the evolution of reproductive isolation between *Drosophila recens* and *Drosophila subquinaria*. *Evolution* **53**: 1157–1164.
- Sims SR. 1983.** Prolonged diapause and pupal survival of *Papilio zelicaon* Lucas (Lepidoptera: Papilionidae). *Journal of the Lepidopterists' Society* **37**: 29-31.
- Sivinski J, Burk T. 1989.** Reproductive and mating behavior. In: Robinson AS, Hooper G, eds. *Fruit flies their biology, natural enemies and control*. Amsterdam: Elsevier, Vol. 3A, 343-351.
- Snook RR, Cleland SY, Wolfner MF, Karr TL. 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**:167-178.
- Sobel MJ, Chen GF, Watt LR, Schemske DW. 2010.** The biology of speciation. *Evolution* **1**: 295-315.
- Soula B, Menu F. 2003.** Diapause duration variability in the chestnut weevil: mixed ESS, genetic polymorphism or bet-hedging? *Oikos* **100**: 574–580.

- Stamenkovic S, Milenkovic S, Stamenkovic T. 1996a.** Population dynamics of *Rhagoletis cerasi* L. (Diptera, Tephritidae) in western Serbia. Proceedings of the international cherry symposium, Budapest, Hungary, 14-18 June 1993. *Acta Horticulturae* **410**: 561-565.
- Stamenkovic S, Garic R, Stamenkovic T, Milenkovic S, Nolic M, 1996b.** Susceptibility of some sweet cherry cultivars to *Rhagoletis cerasi* L. (Diptera, Tephritidae). *Proceedings of the international cherry symposium*, Budapest, Hungary, 14-18 June 1993. *Acta Horticulturae* **410**: 555-560.
- Stibick JNL. 2004.** *Natural enemies of true fruit flies (Tephritidae)*. USDA: Plant Protection and Quarantine.
- Sultan SE, Spencer HG. 2002.** Metapopulation structure favours plasticity over local adaptation. *The American Naturalist* **160**: 271–283.
- Sun X, Cui L, Li Z. 2007.** Diversity and phylogeny of *Wolbachia* infecting *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) populations from China. *Environmental Entomology* **36**: 1283-1289.
- Susurluk İA. 2007.** A review on entomopathogenic nematodes in Turkey. *Journal of Environmental Sciences* **1**: 67-71.
- Tagami Y, Doi M, Sugiyama K, Tatara A, Saito T. 2006.** *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in *Liriomyza trifolii* and its possible use as a tool in insect pest control. *Biological control* **38**: 205–209.
- Tauber MJ, Tauber CA, Masaki S. 1986.** *Seasonal adaptations of insects*. Oxford: University Press.
- Telschow A, Yamamura N, Werren JH. 2005a.** Bidirectional cytoplasmic incompatibility and the stable coexistence of two *Wolbachia* strains in parapatric host populations. *Journal of Theoretical Biology* **235**: 265–274.
- Telschow A, Hammerstein P, Werren JH. 2005b.** The effect of *Wolbachia* versus genetic incompatibilities on reinforcement and speciation. *Evolution* **59**: 1607–1619.
- Telschow A, Flor M, Kobayashi Y, Hammerstein P, Werren J. 2007.** *Wolbachia*-induced unidirectional cytoplasmic incompatibility and speciation: mainland-island model. *PLoS ONE* **2**: e701.
- Teixeira L, Ferreira Á, Ashburner M. 2008.** The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biology* **6**: e1000002.

- Thiem von H. 1934.** BeitrSge zur Epidemiologie und BekSmpfung der Kirschfruchtfliege (*Rhagoletis cerasi* L.). *Arbeiten über Physiologische und Angewandte Entomologie aus Berlin-Dahlem* 1: 7-79.
- Vallo V, Remund U, Boller EF. 1976.** Storage conditions of stockpiled diapausing pupae of *Rhagoletis cerasi* for obtaining high emergence rates. *Entomophaga* 21: 251-256.
- Vanthournout B, Swaegers J, Hendrickx F. 2011.** Spiders do not escape reproductive manipulations by *Wolbachia*. *BMC Evolutionary Biology* 11: 15.
- Vasquez CJ, Stouthamer R, Jeong G, Morse JG. 2011.** Discovery of a CI inducing *Wolbachia* and its associated fitness costs in the biological control agent *Aphytis melinus* DeBach (Hymenoptera: Aphelinidae). *Biological Control* 58: 192–198.
- Via S, Lande R. 1985.** Genotype–environment interaction and the evolution of phenotypic plasticity. *Evolution* 39: 505–522.
- Visser ME. 2008.** Keeping up with a warming world; assessing the rate of adaptation to climate change. *Proceedings of the Royal Society B* 275: 649–659.
- Vogel W, 1950.** Untersuchungen über parasitische Hymenopteren der Kirschenfliege *Bulletin de la société entomologique Suisse* 23: 195-199.
- Wade MJ, Chang NW. 1995.** Increased male fertility in *Tribolium confusum* beetles after infection with the intracellular parasite *Wolbachia*. *Nature* 373: 72-74.
- Walker T. 1986.** Stochastic polyphenism: coping with uncertainty. *Florida Entomologist* 69: 46-62.
- Watanabe M, Miura K, Hunte MS, Wajnberg E. 2011.** Superinfection of cytoplasmic incompatibility-inducing *Wolbachia* is not additive in *Orius strigicollis* (Hemiptera: Anthocoridae). *Heredity* 106: 642-648.
- Werren JH. 1998.** *Wolbachia* and speciation. In: Howard D, Berlocher S, eds. *Endless Forms: Species and Speciation*. Oxford University Press, 245–260.
- Werren JH, Baldo L, Clark ME. 2008.** *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology* 6: 741–751.
- Werren JH, Zhang W, Guo LR. 1995.** Evolution and phylogeny of *W. pipientis*: reproductive parasites of arthropods. *Proceedings of the Royal Society B* 261: 55–71.
- White IM, Elson-Harris MM. 1992.** *Fruit flies of economic significance: Their identification and bionomics*. United Kingdom (Oxon): Commonwealth Agricultural Bureau International.

- Wiesmann R. 1950.** Untersuchungen über die diapause der puppe der kirschenfliege *rhagoletis cerasi* l. (dipt. Trypetid.). *Mitteilung der Schweizerischen entomologischen Gesellschaft* **23**: 207-225.
- Wiesmann R. 1933.** Untersuchungen über die lebensgeschichte und bekämpfung der kirschenfliege *rhagoletis cerasi* linné - i. Mitteilung. *Landwirtschaftliches Jahrbuch der Schweiz* **47**: 711- 760.
- Xie R-R, Chen X-L, Hong X-Y. 2011.** Variable fitness and reproductive effects of *Wolbachia* infection in populations of the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch in China. *Applied Entomology and Zoology* **46**: 95-102.
- Zabalou S, Apostolaki A, Livadaras I, Franz G, Robinson A, Savakis S, Bourtzis K. 2009.** Incompatible insect technique: incompatible males from a *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) genetic sexing strain. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **132**: 232–240.
- 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 United States of America* **101**: 15042–15045.
- Zambetaki A, Pasteur N, Mavragani-Tsipidou P. 1998.** Cytogenetic analysis of Malpighian tubule polytene chromosomes of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Genome* **41**: 751–755.
- Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικών Ερευνών (ΕΘΙΑΓΕ). 2011.** *Εγχειρίδιο καλλιέργειας κερασιάς*. Ινστιτούτο Φυλλοβόλων Δένδρων Νάουσας. www.pomologyinstitute.gr, www.nagref.gr
- Κατσόγιαννος ΒΙ, Κουλούσης Ν, Παπαδοπούλου Σ, Τάσκος Δ, Καραβαϊζίδης Α, Μανωλάκης Μ. 1991.** Παρακολούθηση του πληθυσμού του εντόμου *Rhagoletis cerasi* σε κερασιές και βουσσινιές στην περιοχή Μίκρας Θεσσαλονίκης και ύψος της προσβολής ορισμένων ποικιλιών. Πρακτικά Δ' Πανελληνίου Εντομολογικού Συνεδρίου, 14-17 Οκτωβρίου, Βόλος.
- Τζανακάκης ΜΕ. 1995.** Εντομολογία. University Studio Press, Θεσσαλονίκη.
- Τζανακάκης ΜΕ, Κατσόγιαννος ΒΙ. 2003.** Έντομα καρποφόρων δέντρων και αμπέλου. Αγρότυπος, Αθήνα.

2. ΓΕΝΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

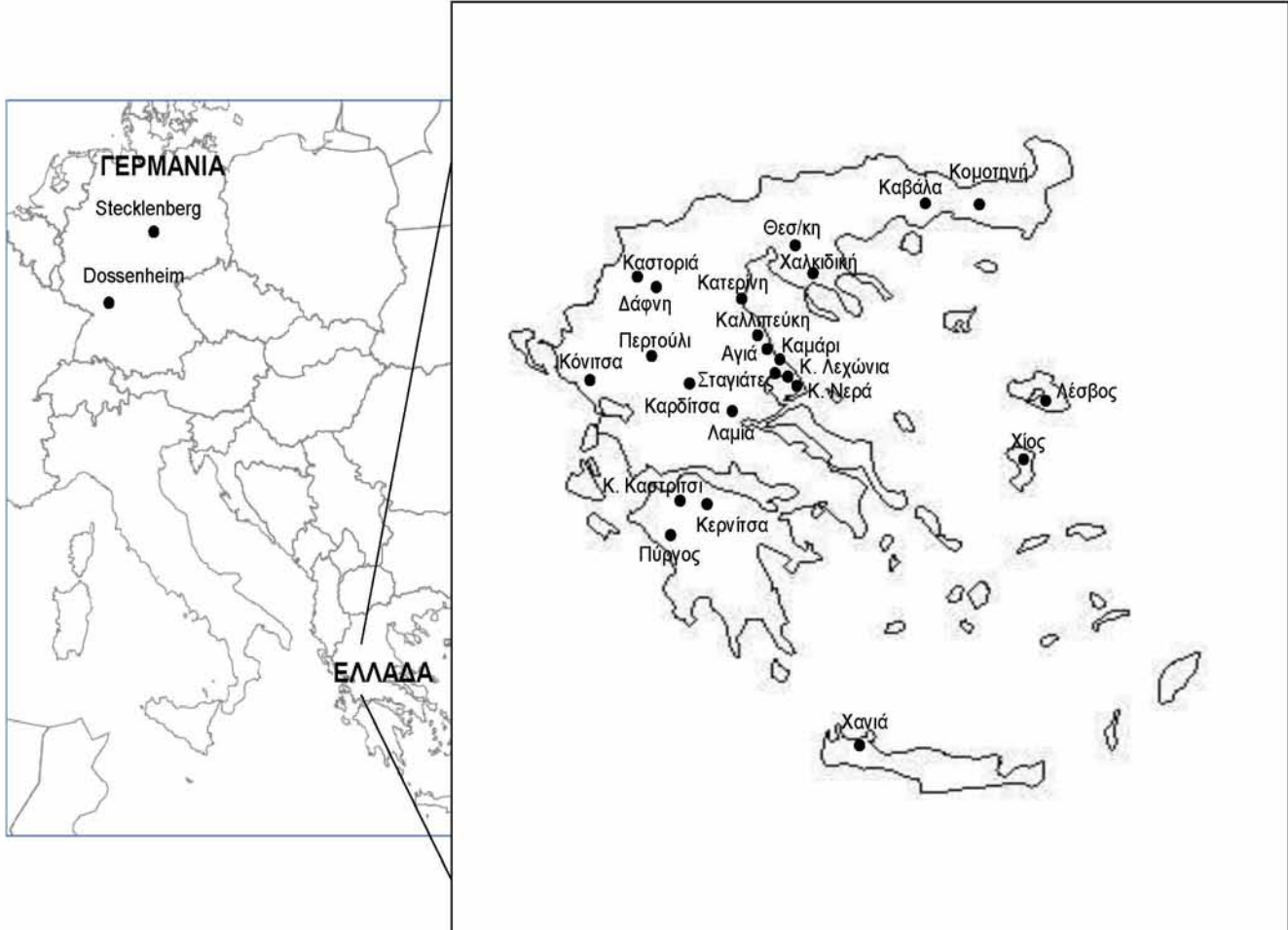
2.1. Περιοχές μελέτης

Οι πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή προήλθαν από ηπειρωτικές και νησιωτικές περιοχές της Ελλάδας και από δύο περιοχές της Γερμανίας. Συγκεκριμένα, οι ελληνικοί πληθυσμοί προήλθαν από περιοχές της Μακεδονίας (Κομοτηνή, Καβάλα, Χαλκιδική, Θεσσαλονίκη, Καστοριά, Δάφνη Κοζάνης, Ράχη Πιερίας), της Ηπείρου (Κόνιτσα), της Θεσσαλίας (Καλλιπεύκη και Αγιά Λάρισας, Καμάρι, Σταγιάτες, Καλά Νερά και Κάτω Λεχώνια Μαγνησίας, Περούλι Τρικάλων, Καρδίτσα), της Στερεάς Ελλάδας (Λαμία), της Πελοποννήσου (Κάτω Καστρίτσι και Κερνίτσα Αχαΐας, Πύργος Ηλείας), των νησιών του Βόρειου Αιγαίου (Λέσβος, Χίος) και της Κρήτης (Χανιά). Οι γερμανικοί πληθυσμοί προήλθαν από την περιοχή του Baden – Württemberg (Dossenheim, Karlsruhe) και το Stecklenberg (Harz) (Εικόνα 7). Στα αντίστοιχα Κεφάλαια της διατριβής περιγράφονται αναλυτικά τα χαρακτηριστικά των αντίστοιχων πληθυσμών.

2.2. Συνθήκες Εργαστηρίου

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Βόλο (στο εξής Εργαστήριο) από το Μάρτιο του 2008 έως το Μάιο του 2010. Οι συνθήκες στο Εργαστήριο ήταν σταθερές (θερμοκρασία στους 25 ± 1 °C, σχετική υγρασία στους $65 \pm 5\%$ και φωτοπερίοδο 14 ώρες φωτός και 10 ώρες σκότους (14 Φ : 10 Σ) με ώρα έναρξη της φωτοφάσης στις 07:00 πμ.). Η ένταση του φωτός στο εσωτερικό των κλουβιών κυμαινόταν από 1000 ως 2000 Lux και παρέχόταν από λαμπτήρες τύπου ‘daylight fluorescent tubes’ και φυσικό εξωτερικό φωτισμό από παράθυρα που βρίσκονται στην οροφή των εντομοδωματίων.

Οι μοριακές αναλύσεις ανίχνευσης και ταυτοποίησης των στελεχών του συμβιωτικού βακτηρίου *Wolbachia pipientis* στους πληθυσμούς της ραγολέτιδας της κερασιάς πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, Γενετικής και Βιοχημείας του Τμήματος Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων του Πανεπιστημίου Πατρών.



Εικόνα 7. Χάρτης γεωγραφικής κατανομής των πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της παρούσας Διατριβής.

2.3. Ατομικά κλουβιά ενηλίκων

Το ατομικό κλουβί που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα δημογραφίας κατασκευάστηκε από ένα διαφανές πλαστικό ποτήρι χωρητικότητας 400 ml (6.5 x 9 x 12 εκ.), που έφερε στη μία πλευρά οπή, καλυμμένη με οργαντίνια για τον καλύτερο αερισμό. Στο κάτω μέρος είχε προσαρτηθεί ένα πλαστικό τρυβλίο Petri διαμέτρου 9 εκ. Σε οπές αναλόγου διαμέτρου του τρυβλίου Petri εμφυτεύτηκαν πέντε κοίλα ημισφαίρια διαμέτρου 18 χιλ. κατασκευασμένα από κερεζίνη μαύρου χρώματος (domes), τα οποία αποτελούσαν τα υποστρώματα ωοτοκίας των θηλυκών της ραγολέτιδας της κερασιάς

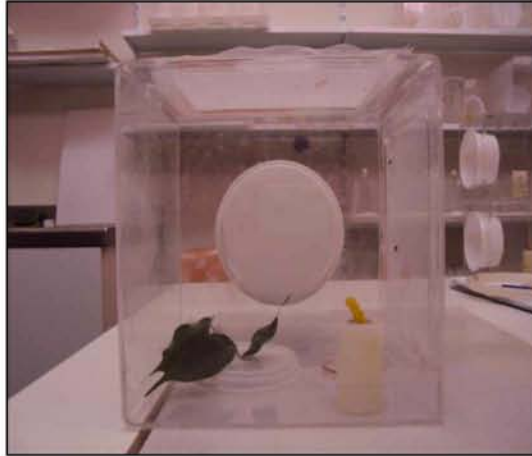
(Prokory & Boller, 1970) (Εικόνα 8). Τα ενήλικα είχαν *ad libitum* πρόσβαση σε τροφή ενηλίκων (μείγμα υδρολυμένης μαγιάς, ζάχαρης και νερού σε αναλογία κατά βάρος 1:4:5, αντίστοιχα) και νερό.



Εικόνα 8. Ατομικό κλουβί δημογραφίας ενηλίκων.

2.4. Κλουβιά πειραμάτων προσυζευκτικής απομόνωσης

Στα πειράματα προσυζευκτικής απομόνωσης χρησιμοποιήθηκαν διαφανή κυβικά κλουβιά από Plexiglas (20 x 20 x 20 εκ.). Η μια πλευρά του κλουβιού έφερε 'παράθυρο' διαστάσεων 15 x 15 x 15 εκ. καλυμμένο με οργανίνα που επέτρεπε τον αερισμό του χώρου. Τα ενήλικα είχαν πρόσβαση σε τροφή ενηλίκων (μείγμα υδρολυμένης μαγιάς, ζάχαρης και νερού σε αναλογία κατά βάρος 1:4:5, αντίστοιχα) και νερό, καθώς και σε 3-5 φρεσκοκομμένα φύλλα του φυτού *Ficus benzamina* (Moraceae). Τα φύλλα του φυτού *F. benzamina* χρησιμοποιήθηκαν ώστε να παρέχουν κατάλληλο 'υπόστρωμα' τόσο για τη σύζευξη όσο και την ανάπαυση των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Κλουβί πειράματος προσυζευκτικής απομόνωσης.

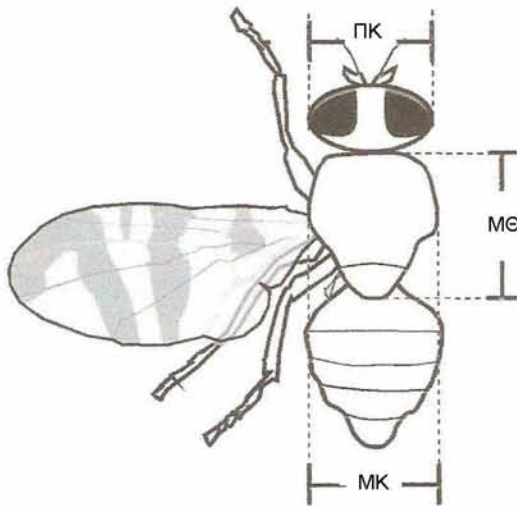
2.5. Συλλογή νυμφών από προσβεβλημένους καρπούς

Οι νύμφες της ρακολέτιδας της κερασιάς που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα που περιγράφονται λεπτομερώς στα αντίστοιχα Κεφάλαια προέρχονταν από προσβεβλημένους καρπούς φυτών-ξενιστών που συλλέχθηκαν από σπυρώνες ή μεμονωμένα δένδρα περιοχών της Ελλάδας και της Γερμανίας, όπου δεν είχαν πραγματοποιηθεί χημικές επεμβάσεις με εντομοκτόνα. Οι καρποί που συλλέχθηκαν από περιοχές της Ελλάδας μεταφέρθηκαν, αμέσως μετά τη συλλογή τους, στο Εργαστήριο και τοποθετήθηκαν σε πλαστικές λεκάνες που περιείχαν μια λεπτή στρώση στεγνής άμμου (\approx 1εκ. πάχος). Οι πλήρως αναπτυγμένες προνύμφες εξέρχονταν από τους καρπούς και νυμφώνονταν στην άμμο. Η συλλογή των νυμφών γινόταν μία ή δύο φορές την εβδομάδα. Οι νύμφες τοποθετούνταν σε πλαστικά τρυβλία Petri. Τα προσβεβλημένα κεράσια που συλλέχθηκαν από το Stecklenberg και το Dossenheim μεταφέρθηκαν, αμέσως μετά την συλλογή τους, στο Ινστιτούτο Julius Kühn που βρίσκεται στο Dossenheim της Γερμανίας, όπου δέχθηκαν τους ίδιους χειρισμούς μέχρι τη συλλογή των νυμφών και την αποστολή τους στο Εργαστήριο.

2.6. Μέτρηση μεγέθους σώματος ενηλίκων

Το μέγεθος του σώματος των ενηλίκων εκτιμήθηκε από τις διαστάσεις του μήκους και του πλάτους του θώρακα καθώς και από το πλάτος της κεφαλής. Το μήκος του θώρακα (ΜΘ) μετρήθηκε από το πρόσθιο τμήμα της ραχιαίας πλευράς του

προθώρακα έως το οπίσθιο τμήμα 'scutellum'. Το πλάτος του θώρακα (ΠΘ) και της κεφαλής (ΠΚ) μετρήθηκε στο πλατύτερο σημείο της νωτιαίας πλευράς του θώρακα και της κεφαλής, αντίστοιχα (Εικόνα 10). Όλες οι μετρήσεις έγιναν με τη χρήση στερεοσκοπίου (Leica MZ12) με ενσωματωμένη μικρομετρική κλίμακα (1 χιλ. = 2 μονάδες).



Εικόνα 10. Μέγεθος σώματος των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς. ΜΘ: Μήκος θώρακα, ΠΘ: Πλάτος θώρακα και ΠΚ: Πλάτος κεφαλής.

2.7. Απομόνωση DNA από ενήλικα *R. cerasi* με τη μέθοδο CTAB

Η απομόνωση DNA από ενήλικα άτομα της ραγολέτιδας της κερασιάς πραγματοποιήθηκε βάσει ενός τροποποιημένου πρωτοκόλλου της μεθόδου CTAB (CetylTrimethyl Ammonium Bromide) (Doyle & Doyle, 1990). Για τις ανάγκες της απομόνωσης, παρασκευάστηκε και αποστειρώθηκε διάλυμα (buffer) CTAB, όπου 5ml του διαλύματος περιείχαν 2ml CTAB 5%, 0.5ml TrisHCl 1M, pH 8.0, 0.2ml EDTA (Ethylene Diamine Tetra-Acetic acid solution) 0.5M, pH 8.0, 1.4ml NaCl 5M και 0.9ml αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Πριν τη χρήση του παραπάνω διαλύματος, γινόταν προσθήκη κατάλληλης ποσότητας β-μερκαπτοαιθανόλης (β- mercaptoethanol, BME) (4 μl β-μερκαπτοαιθανόλης για κάθε 1ml διαλύματος CTAB).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε κατά την απομόνωση του DNA ήταν η εξής:

- Τοποθετήθηκε ένα ενήλικο της ραγολέτιδας της κερασιάς σε ένα σωληνάκι

erpendorf των 1.5ml, προστέθηκαν 50μl buffer CTAB (με β-μερκαπτοαιθανόλη επωασμένο στους 60°C) και το δείγμα ομογενοποιήθηκε χρησιμοποιώντας έμβολο πολυτροπυλενίου.

- Το έμβολο ξεπλύθηκε με 50 μl buffer CTAB.
- Το διάλυμα επώαστηκε στους 60°C στο υδατόλουτρο για 30 λεπτά.
- Προστέθηκε ίσος όγκος (100 μl) διαλύματος χλωροφορμίου – ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1).
- Πραγματοποιήθηκε ανάδευση για 5 λεπτά (χωρίς vortex).
- Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 8000 rpm για 10 λεπτά.
- Η υδατική φάση του διαλύματος μεταφέρθηκε σε ένα καινούργιο σωληνάκι erpendorf των 1.5ml και προστέθηκε ίσος όγκος ισοπροπανόλης (100μl).
- Πραγματοποιήθηκε ανάδευση με vortex.
- Πραγματοποιήθηκε επώαση στους -20°C για τουλάχιστον 30 λεπτά.
- Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 14000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C.
- Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα ξεπλύθηκε με 1ml 70% αιθανόλης.
- Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 14000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C.
- Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και ακολούθησε ξήρανση σε κενό αέρος για 5 λεπτά.
- Το ίζημα που προέκυψε επαναδιαλύθηκε σε 50μl αποστειρωμένου απιονισμένου νερού.

2.8. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR τελικού όγκου 20μl χρησιμοποιώντας 1μl δείγματος DNA, όπως αυτό προέκυψε από την απομόνωση. Οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων ήταν:

- 1x NH_4^+ buffer (75mM Tris–Cl, pH 8.8, 20mM $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 0.1 % Tween 20)
- MgCl_2 (25mM)
- dNTPS (25mM το καθένα)
- Forward εκκινήτης (25μM)
- Reverse εκκινήτης (25μM)
- Ταq Πολυμεράση 1 unit/μl (Promega)

Προσθήκη απιονισμένου και αποστειρωμένου νερού μέχρι συμπλήρωσης τελικού όγκου 20 μl.

Πίνακας 1. Συγκεντρωτικός πίνακας εκκινητών. Η κατεύθυνση των εκκινητών είναι 5' → 3'.

Γονίδιο	Εκκινητές	Αλληλουχία εκκινητών	Μέγεθος προϊόντος	Αναφορές
<i>Wolbachia</i>	99F	TTGTAGCCTGCTATGGTATAACT	896 bp	O'Neill <i>et al.</i> , (1992)
	994R	GAATAGGTATGATTTTCATGT		
16S rRNA	Wspec F	CATACCTATTTCGAAGGGATAG	438 bp	Werren & Windsor (2000)
	Wspec R	AGCTTCGAGTGAAACCAATTC		
<i>Wolbachia</i> <i>wsp</i>	81F	TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC	600 bp	Braig <i>et al.</i> , (1998)
	691R	AAAAATTAACGCTACTCCA		

Για το πρόγραμμα αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο των Zhou, Rousset & O'Neil (1998), το οποίο έχει ως εξής:

- ένας κύκλος στους 94°C για 5 λεπτά για την αποδιάταξη του DNA
- 35 κύκλοι
 - 94°C για 1 λεπτό (Αποδιάταξη)
 - 55 °C για 1 λεπτό (Υβριδοποίηση)
 - 72°C για 1 λεπτό (Πολυμερισμός)
- ένας κύκλος στους 72°C για 10 λεπτά (τελικό στάδιο πολυμερισμού)

Οι αντιδράσεις PCR έλαβαν χώρα σε μηχανήμα PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research).

2.9. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- Σε κωνική φιάλη διαλύθηκαν 1.2g αγαρόζης σε 120ml διαλύματος 1xTAE (Tris-Acetate-EDTA) (40mM Tris acetate και 1mM EDTA) με θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων.
- Προστέθηκαν 3ml διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου, όταν η θερμοκρασία του

διαλύματος αγαρόζης ήταν περίπου 50°C, και ακολούθησε ανάμιξη του διαλύματος.

- Το διάλυμα αγαρόζης μεταφέρθηκε στη μήτρα της συσκευής ηλεκτροφόρησης και αμέσως τοποθετήθηκε το κενάκι, όπου παρέμεινε στη μήτρα μέχρι να πήξει το πήκτωμα της αγαρόζης (περίπου 30 λεπτά).
- Προστέθηκε διάλυμα 1xTAE στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και τοποθετήθηκε κατάλληλα η μήτρα με το πήκτωμα.

Πριν τη 'φόρτωση' των δειγμάτων στο πήκτωμα αγαρόζης, προστέθηκαν 4μl διαλύματος φόρτωσης (χρωστική Orange) σε 20μl προϊόντος PCR. Τα δείγματα (περίπου 20 μl) καθώς και ένα δείγμα που περιείχε τμήματα DNA γνωστού μοριακού μεγέθους (λ PstI), ένα θετικό δείγμα wMel και ένα αρνητικό σε DNA δείγμα (απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό) 'φορτώθηκαν' κατάλληλα στις υποδοχές που είχαν σχηματιστεί από το κενάκι και ηλεκτροφορήθηκαν για 20-30 λεπτά σε σταθερή τάση 120-125 volts. Η παρατήρηση των ζωνών του DNA στο πήκτωμα ήταν εφικτή με τη χρήση U.V. ακτινοβολίας. Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης φωτογραφήθηκε με τη βοήθεια κατάλληλα ενσωματωμένης φωτογραφικής μηχανής (Canon PowerShot G3).

2.10. Προετοιμασία προϊόντος PCR για ταυτοποίηση μέσω αλληλούχισης

Προκειμένου να ταυτοποιηθεί μέσω αλληλούχισης (sequencing) το γονίδιο *wsp*, προηγήθηκε καθαρισμός και ποσοτικοποίηση των προϊόντων PCR. Για το σκοπό αυτό ετοιμάστηκαν αντιδράσεις PCR τελικού όγκου 50μl για κάθε δείγμα και εκκινητή (81F-691R). Η επιτυχία της κάθε αντίδρασης επιβεβαιώθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης μικρής ποσότητας (5μl) του προϊόντος PCR.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον καθαρισμό του DNA ήταν η εξής:

- Σε ένα σωληνάκι erpendorf των 1.5ml προστέθηκαν 50μl διαλύματος PEG (20% PEG, 2.5M NaCl, 80% EtOH) και η υπόλοιπη ποσότητα του προϊόντος PCR (45μl) και πραγματοποιήθηκε ανάδευση με χρήση πιπέτας.
- Το μίγμα (προϊόν PCR με διάλυμα PEG) επωάστηκε στους 37°C για 15 λεπτά.
- Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε σε υψηλή ταχύτητα (15.000x g) για 15 λεπτά (θερμοκρασία δωματίου) και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε.
- Προστέθηκαν 125μl αιθανόλης Et-OH 80%, που βρισκόταν τοποθετημένη σε πάγο. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε σε υψηλή ταχύτητα (15.000x g) για 2 λεπτά

(θερμοκρασία δωματίου) και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε. Πραγματοποιήθηκε επανάληψη του βήματος.

- Τα σωληνάκια παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να εξατμιστεί η αιθανόλη.
- Η πελέτα (το ίζημα) διαλύθηκε σε 25μl διαλύματος TLE (10mM Tris, 0.1mM EDTA) με τη βοήθεια πιπέτας. Το διάλυμα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για λίγα λεπτά ώστε να μεγιστοποιηθεί η επαναδιάλυση.

Η ποσοτικοποίηση του καθαρισμένου προϊόντος PCR έγινε με τη βοήθεια πλασμιδίου-φορέα, του pUC18, γνωστής συγκέντρωσης (ng/μl). Συγκεκριμένη ποσότητα από κάθε δείγμα (συνήθως 1-2μl) ηλεκτροφορήθηκε και, βάσει της φωτεινότητας που εμφάνισαν οι ζώνες των δειγμάτων, υπολογίστηκε κατ' εκτίμηση η συγκέντρωση του DNA στα δείγματα (ng/μl), συγκρίνοντας με αυτή της ζώνης του pUC18. Για κάθε δείγμα και για κάθε εκκινήτη, τοποθετήθηκε η απαιτούμενη ποσότητα του καθαρισμένου προϊόντος PCR σε καινούργιο σωληνάκι erpendorf των 1.5ml και παρέμεινε όλη τη νύχτα για να εξατμιστεί. Οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν για την αλληλούχιση των δειγμάτων είχαν συγκέντρωση 5 pmoles/μl. Η αλληλούχιση (sequencing) των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στην εταιρεία Macrogen (Κορέα) χρησιμοποιώντας το BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems) και τα μονόκλωνα αλληλουχισμένα γονιδιακά τμήματα παραδόθηκαν σε αρχεία μορφής χρωματογραφήματος.

2.11. Ανάλυση δεδομένων αλληλούχισης

Τα μονόκλωνα αλληλουχισμένα γονιδιακά τμήματα ελέγχθηκαν για τυχόν λάθη (π.χ. πολλαπλές κορυφές, λάθη αλληλούχισης) και με τη βοήθεια του προγράμματος SeqManII v. 5.0.5. (DNAStar Inc., Madison, WI, USA) προσδιορίστηκε η τελική αμφίκλινη αλληλουχία, ενώνοντας τα διαφορετικής κατεύθυνσης (forward-reverse) γονιδιακά τμήματα. Η πολλαπλή εναρμόνιση (ευθυγράμμιση) των νουκλεοτιδικών τμημάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα ClustalW (Thompson, Higgins & Gibson, 1994) του προγράμματος BIOEDIT 7.0.4.1 (Hall, 1999). Οι ευθυγραμμισμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες επιβεβαιώθηκαν οπτικά και διορθώθηκαν, όπου ήταν απαραίτητο, βάσει των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του *wsp*. Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα MEGA, έκδοση 3.1 (Kumar, Tamura & Nei, 2004). Τα γονιδιακά τμήματα

μετατράπηκαν σε μεταφρασμένη πρωτεϊνική αλληλουχία και ελέγχθηκαν για παρουσία κωδικονίων λήξης. Η ταυτοποίηση του στελέχους του γονιδίου *wsp* σε κάθε δείγμα έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος BLAST (Altschul *et al.*, 1997).

Βιβλιογραφία

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389-3402.

Braig HR, Zhou W, Dobson S, O'Neill SL. 1998. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia*. *Journal of Bacteriology* **180**: 2373–2378.

Doyle JJ, Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13–15.

Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95–98.

Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* **5**: 150-163.

O'Neill SL, Giordano R, Colbert AM, Karr TL, Robertson HM. 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 2699-2702.

Prokopy RJ, Boller EF. 1970. Artificial eggng system for European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi* L. *Journal of Economic Entomology* **63**: 1413-1417.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673–4680.

Werren JH, Windsor DM. 2000. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **267**: 1277–1285.

Zhou W, Rousset F, O'Neill SL. 1998. Phylogeny and PCR based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences. *Proceedings of the Royal Society of London B* **265**: 509-515.

3. ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΗΣ ΡΑΓΟΛΕΤΙΔΑΣ ΤΗΣ ΚΕΡΑΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ ΚΑΙ ΜΟΛΥΝΣΗ ΜΕ ΤΟ ΕΝΔΟΣΥΜΒΙΩΤΙΚΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *WOLBACHIA PIPIENTIS*

Περίληψη

Στην Ελλάδα έχουν αναφερθεί προσβολές από τη ραγολέτιδα της κερασιάς σε κεράσια και βύσσινα σε περιοχές της Μακεδονίας, Θεσσαλίας και Κρήτης. Εντούτοις, η γεωγραφική διασπορά και το εύρος των ξενιστών του εντόμου στο ευρύτερο ηπειρωτικό τμήμα και στα νησιά της χώρας δεν έχει τεκμηριωθεί επαρκώς. Στο παρόν Κεφάλαιο, εξετάστηκε η παρουσία του εντόμου σε 23 περιοχές της ηπειρωτικής και νησιωτικής χώρας συλλέγοντας πιθανά προσβεβλημένους καρπούς από γνωστά φυτά-ξενιστές (κερασιά, βυσσινιά, άγρια κερασιά, μαχαλέπι) καθώς και από άλλα δένδρα *Prunus* spp. Σε 10 περιοχές πραγματοποιήθηκαν συστηματικές δειγματοληψίες 2-3 ετών και καταγράφηκαν τα επίπεδα προσβολής των καρπών τόσο σε πρώιμες όσο και σε όψιμες ποικιλίες κερασιάς. Επιπρόσθετα, εξετάστηκε η παρουσία του ενδοσυμβιωτικού βακτηρίου *Wolbachia* σε πληθυσμούς της ραγολέτιδας της κερασιάς από 10 περιοχές και έγινε ταυτοποίηση των στελεχών *wCer1* και *wCer2* του βακτηρίου με απευθείας αλληλούχιση του γονιδίου *wsp*. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι πληθυσμοί του εντόμου απαντώνται σε όλες τις περιοχές της χώρας μας όπου καλλιεργούνται ή υπάρχουν αυτοφυείς κερασιές και άλλοι ξενιστές του εντόμου. Η ραγολέτιδα της κερασιάς στη χώρα μας προσβάλλει εκτός από κερασιές και βυσσινιές, άγριες κερασιές, φυτά μαχαλεπίου και άλλα είδη *Prunus* spp., όπως οι άγριες κορομηλιές. Ωστόσο, τα ποσοστά προσβολής των καρπών διέφεραν μεταξύ των περιοχών και των φυτών-ξενιστών. Υψηλότερα ποσοστά προσβολής καταγράφηκαν σε κερασιές και άγριες κερασιές ενώ συστηματικά υψηλά ήταν τα ποσοστά προσβολής των κερασιών που συλλέχτηκαν από τα Κ. Νερά, την Καρδίτσα και τη Δάφνη Κοζάνης. Υψηλά ποσοστά προσβολής (>70%) βρέθηκαν τόσο σε πρώιμες όσο και σε όψιμες ποικιλίες κερασιάς, καταδεικνύοντας τη μεγάλη οικονομική σημασία του εντόμου για τη χώρα μας. Επίσης, όλοι οι πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς που εξετάστηκαν βρέθηκαν προσβεβλημένοι με *Wolbachia*, και συγκεκριμένα με το στέλεχος *wCer1*.

3.1. Εισαγωγή

Πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς, *Rhagoletis cerasi*, απαντώνται σχεδόν σε όλες τις ευρωπαϊκές χώρες (συμπεριλαμβανομένου το ευρωπαϊκό τμήμα της Ρωσίας αλλά και την περιοχή της δυτικής Σιβηρίας) καθώς και στις εύκρατες περιοχές της δυτικής Ασίας (Fimiani, 1989; White & Elson-Harris, 1992; Mohamadzade Namin & Rasouljan, 2009). Ξενιστές του εντόμου αποτελούν οι καρποί των ειδών του γένους *Prunus* (Rosaceae; *P. cerasus*, *P. avium*, *P. mahaleb*) καθώς και του γένους *Lonicera* (Caprifoliaceae; *L. xylosteum* and *L. tartarica*) (White & Elson-Harris, 1992). Μέχρι σήμερα, πέντε στελέχη του συμβιωτικού βακτηρίου *Wolbachia* (*wCer1* to *wCer5*) έχουν ανιχνευθεί σε ευρωπαϊκούς πληθυσμούς της ραγολέτιδας της κερασιάς (Arthofer *et al.*, 2009, 2011; Augustinos *et al.*, 2013). Βάσει της Ανάλυσης Εισαγωγής Αλληλομόρφου (Allelic Insertion Analysis, AIA), τα στελέχη *wCer1*, *wCer2* και *wCer4* ανήκουν στην Υπερομάδα Α, το στέλεχος *wCer5* ανήκει στην Υπερομάδα Β ενώ το στέλεχος *wCer3* θεωρείται ανασυνδυασμός των Α/Β στελεχών (Arthofer *et al.*, 2009, 2011). Όλοι οι εξεταζόμενοι ευρωπαϊκοί πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς έχουν βρεθεί προσβεβλημένοι με το στέλεχος *wCer1*, οι πληθυσμοί της νότιας και κεντρικής Ευρώπης φέρουν διπλή μόλυνση (*wCer1* και *wCer2*) ενώ μολύνσεις τριών στελεχών έχουν καταγραφεί σε πληθυσμούς της βορειο-κεντρικής Ευρώπης (Riegler & Stauffer, 2002; Arthofer *et al.*, 2009, 2011). Η παρουσία του στελέχους *wCer1* έχει αναφερθεί και στους ελληνικούς πληθυσμούς της ραγολέτιδας της κερασιάς που προέρχονταν από τη Καβάλα, Θεσσαλονίκη, Κατερίνη, Κ. Νερά Μαγνησίας και τα Χανιά (Riegler & Stauffer, 2002; Kounatidis *et al.*, 2008). Επιπρόσθετα, τα στελέχη *wCer2* και *wCer4* είναι σε θέση να προκαλέσουν κυτταροπλασματική αναπαραγωγική ασυμβατότητα στους ξενιστές τους (φυσικούς ή τεχνικά μολυσμένους πληθυσμούς εντόμων) (Riegler & Stauffer, 2002; Zabalou *et al.*, 2004). Για παράδειγμα, το στέλεχος *wCer2* της *Wolbachia* αποτελεί την κύρια αιτία μονόδρομης κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας (ΚΑ) μεταξύ των αρσενικών της νότιας φυλής των ευρωπαϊκών πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς και των θηλυκών της βόρειας φυλής (Boller *et al.*, 1976; Riegler & Stauffer, 2002).

Όπως αναφέρεται εκτενώς στο Κεφάλαιο 1, η καλλιέργεια της κερασιάς έχει ιδιαίτερη οικονομική σημασία για την Ελλάδα. Την δεκαετία 2000-2010, η μέση παραγωγή κερασιών στη χώρα εκτιμήθηκε στους 49.178 τόνους με αποτέλεσμα η Ελλάδα να καταταγεί μέσα στις πρώτες 15 θέσεις της παγκόσμιας παραγωγής κερασιών (FAO, 2010). Οι οπωρώνες κερασιάς καλύπτουν περίπου 100.000 στρ. με συνεχώς

αυξανόμενη τάση ενώ η Μακεδονία θεωρείται παραδοσιακά κερασοπαραγωγική περιφέρεια, και ειδικότερα οι περιοχές της Ημαθίας και της Πέλλας, και ακολουθούν η Θεσσαλία και η Πελοπόννησος (ΕΘΙΑΓΕ, 2011). Μέχρι σήμερα, πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς έχουν αναφερθεί στη Μακεδονία (Καβάλα, Θεσσαλονίκη, Δάφνη Κοζάνης, Κατερίνη), στη Θεσσαλία (Καλά Νερά Μαγνησίας) και στην Κρήτη (Χανιά) (Haniotakis, Malliaros & Koryzakis, 1989; Κατσόγιαννος *et al.*, 1991; Katsoyannos, Papadopoulos & Stavridis, 2000; Kounatidis *et al.*, 2008; Papanastasiou *et al.*, 2011) με βασικούς ξενιστές τις κερασιές και βουσσινιές. Η ζημιά που μπορεί να προκαλέσει η ραγολέτιδα της κερασιάς στην παραγωγή των καλλιεργούμενων ποικιλιών κερασιάς είναι ιδιαίτερα σημαντική (>80%), αν δεν ελεγχθούν έγκαιρα οι πληθυσμοί του εντόμου (Stamenkovic *et al.*, 1996). Παράγοντες όπως οι επικρατούσες κλιματικές συνθήκες κατά τη διάρκεια της περιόδου ωοτοκίας (θερμοκρασία, βροχόπτωση), ο χρόνος ωρίμασης των καρπών και τα γεωγραφικά χαρακτηριστικά των ενδιαιτημάτων των πληθυσμών του εντόμου είναι καθοριστικοί του ύψους της ετήσιας προσβολής σε μια περιοχή (Boller & Prokopy, 1976). Εντούτοις, δεν υπάρχουν τεκμηριωμένα στοιχεία σχετικά με την ευρύτερη γεωγραφική διασπορά της ραγολέτιδας της κερασιάς στη χώρα μας ούτε και για το ύψος της προσβολής καρπών-ξενιστών του εντόμου.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι η ραγολέτιδα της κερασιάς αποτελεί τον εχθρό-κλειδί για τις καλλιέργειες της κερασιάς και βουσσινιάς στην Ελλάδα τη στιγμή που οι εν λόγω καλλιέργειες αποκτούν συνεχώς μεγαλύτερη οικονομική σημασία για τη χώρα μας, το παρόν Κεφάλαιο ασχολείται με: α) την αποτύπωση της γεωγραφικής κατανομής της ραγολέτιδας της κερασιάς στην Ελλάδα, β) τον προσδιορισμό του εύρους των φυτών-ξενιστών και του ύψους της προσβολής τους σε ορισμένες περιοχές και γ) την καταγραφή της παρουσίας της *Wolbachia* σε ελληνικούς πληθυσμούς του εντόμου.

3.2. Υλικά και Μέθοδοι

3.2.1. Γεωγραφική διασπορά του εντόμου, φυτά-ξενιστές και ποσοστό προσβολής

Κατά τα έτη 2005-2010, πραγματοποιήθηκαν συστηματικές δειγματοληψίες καρπών σε 23 περιοχές της Ελλάδας, συμπεριλαμβανομένου τόσο της ηπειρωτικής όσο και της νησιωτικής χώρας. Συγκεκριμένα, συλλέχθηκαν καρποί τόσο από γνωστά φυτά-ξενιστές όσο και από φυτά που θα μπορούσαν να αποτελέσουν ξενιστές του εντόμου από περιοχές της Μακεδονίας (Κομοτηνή, Καβάλα, Χαλκιδική, Θεσσαλονίκη, Καστοριά,

Δάφνη Κοζάνης, Ράχη Πιερίας), της Ηπείρου (Κόνιτσα), της Θεσσαλίας (Καλλιπεύκη και Αγιά Λάρισας, Καμάρι, Σταγιάτες, Καλά Νερά και Κάτω Λεχώνια Μαγνησίας, Περούλι Τρικάλων, Καρδίτσα), της Στερεάς Ελλάδας (Λαμία), της Πελοποννήσου (Κάτω Καστρίτσι και Κερνίτσα Αχαΐας, Πύργος Ηλείας), των νησιών του βορείου Αιγαίου (Λέσβος, Χίος) και της Κρήτης (Χανιά) (Εικόνα 11). Εξετάστηκαν καρποί των παρακάτω φυτών : α) κερασιάς (*Prunus avium*), β) άγριας κερασιάς (*P. avium*), γ) βυσσινιάς (*P. cerasus*), δ) μαχαλέπι (*P. mahaleb*) και ε) άγριας κορομηλιάς (Πίνακας 2). Η συλλογή των καρπών έγινε στο στάδιο συγκομιδής είτε από εμπορικούς οπωρώνες είτε από διάσπαρτα δένδρα φυτών-ξενιστών σε αγροτικές ή δασικές εκτάσεις, όπου δεν είχε γίνει προηγουμένως χρήση εντομοκτόνων (Πίνακας 2). Οι καρποί μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο, όπου έγινε η συλλογή των νυμφών (Κεφάλαιο 2) και ο έλεγχος της προσβολής. Οι νύμφες παρέμειναν στους $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ για 2-3 μήνες και έπειτα τοποθετήθηκαν στους $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ για διάστημα τουλάχιστον 5 μηνών προκειμένου να περατώσουν τη διάπασή τους. Στη συνέχεια, οι νύμφες μεταφέρθηκαν εκ νέου στους $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ προκειμένου να ολοκληρωθεί η ανάπτυξη των ανήλικων σταδίων. Η έξοδος του ενηλικού αποτελούσε την τεκμηρίωση της παρουσίας του εντόμου σε κάθε δείγμα καρπών. Επιπρόσθετα, υπολογίστηκαν βάσει του αριθμού των καρπών που συλλέχθηκαν και των νυμφών που προέκυψαν τα 'ποσοστά προσβολής' (= νύμφες ανά 100 καρπούς) των κερασιών και αγριοκέρασων σε 10 ηπειρωτικές περιοχές της Ελλάδας για τα έτη 2007-2009 (Πίνακας 3).



Εικόνα 11. Χάρτης της Ελλάδας όπου σημειώνονται οι 23 περιοχές συλλογής καρπών για έλεγχο προσβολής από τη ρακολέτιδα της κερασιάς και παρουσίας του βακτηρίου *Wolbachia* σε 10 πληθυσμούς. Οι άσπροι κύκλοι ορίζουν τις περιοχές όπου έγινε μόνο έλεγχος της παρουσίας της ρακολέτιδας της κερασιάς. Οι γκρι κύκλοι ορίζουν τις περιοχές όπου έγινε εκτίμηση του ποσοστού προσβολής των καρπών. Οι μαύροι κύκλοι ορίζουν τις περιοχές όπου οι πληθυσμοί του εντόμου ελέγχθηκαν για την παρουσία της *Wolbachia*. Σε όλες τις περιοχές σημειώθηκε προσβολή των συλλεχθέντων καρπών από τη ρακολέτιδα της κερασιάς.

Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά των 23 περιοχών στην Ελλάδα, όπου πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες καρπών-ξενιστών της ραγολέτιδας της κερασιάς.

Περιφέρεια	Περιοχή	Γεωγραφικό πλάτος	Γεωγραφικό μήκος	Υψόμετρο (m)	Τοποθεσία		Καρποί-ξενιστές					
					αγροτική περιοχή		δα σι κή	κεράσια	αγριο κέρα σα	βύσσινα	<i>P. mahaleb</i>	<i>Prunus</i> spp. (άγρια κορόμηλα)
					κερασεύνας	μεμονωμέ νο δένδρο						
Μακεδονία	Κομοτηνή	41°07' 22" N	25°24' 38" E	44		√		√				
	Καβάλα	40°56' 32" N	24°23' 45" E	145		√		√				
	Χαλκιδική	40°23' 18" N	23°17' 10" E	262		√		√				
	Θεσ/κη	40°28' 02" N	22°58' 60" E	132	√			√		√		
	Καστοριά	40°31' 13" N	21°16' 09" E	679		√		√				
	Δάφνη Κοζάνης	40°17' 06" N	21°08' 55" E	1040		√		√				√
	Ράχη Πιερίας	40°14' 33" N	22°21' 33" E	247	√			√				
Ήπειρος	Κόνιτσα	40°2' 54" N	20°45' 10" E	626		√		√				
Θεσσαλία	Καλλιπεύκη Λάρισας	39°58' 0" N	22°27' 37" E	1054		√		√				
	Αγιά Λάρισας	39°43' 04" N	22°45' 49" E	152		√		√				
	Περτούλι Τρικάλων	39°32' 19" N	21°27' 58" E	1121			√	√	√		√	
	Καμάρι Μαγνησίας	39°34' 47" N	22°55' 40" E	100			√	√				
	Σταγιάτες Μαγνησίας	39°23' 19" N	22°59' 02" E	389		√		√				
	Κ. Νερά Μαγνησίας	39°18' 24" N	23°07' 10" E	64		√		√				
	Κ. Λεχώνια											
	Μαγνησίας	39°19' 49" N	23°02' 17" E	41	√			√				
Καρδίτσα	39°36' 01" N	21°92' 01" E	127	√			√					
Στερεά Ελλάδα	Λαμία	38°53' 46" N	22°26' 05" E	60		√		√				
Πελοπόννησος	Κ. Καστρίτσι Αχαΐας	38°17' 26" N	21°48' 56" E	164	√			√				
	Κερνίτσα Αχαΐας	38°07' 33" N	22°12' 55" E	729	√			√				
	Πύργος Ηλείας	37°40' 18" N	21°26' 35" E	31	√			√				
Βόρειο Αιγαίο	Λέσβος	39°06' 13" N	26°31' 59" E	88		√		√				
	Χίος	38°21' 06" N	26°08' 30" E	88		√		√				
Κρήτη	Χανιά	35°51'0" N	24°01' 0" E	450		√		√				

3.2.2. Έλεγχος παρουσίας της *Wolbachia*

Δέκα πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς από περιοχές της Μακεδονίας (Κομοτηνή, Καβάλα, Θεσσαλονίκη, Χαλκιδική, Δάφνη Κοζάνης, Ράχη Πιερίας), της Θεσσαλίας (Καλλιπεύκη Λάρισας, Καλά Νερά Μαγνησίας) και της Πελοποννήσου (Κ. Καστρίτσι Αχαΐας, Πύργος Ηλείας) εξετάστηκαν για την παρουσία της *Wolbachia* (Εικόνα 11). Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν ενήλικα άτομα (αρσενικά και θηλυκά) που προέκυψαν από νύμφες προσβεβλημένων κερασιών που συλλέχθηκαν κατά τα έτη 2005 και 2006. Τα άτομα, αμέσως μετά την ενηλικίωση τους, τοποθετήθηκαν σε αιθυλική αλκοόλη (96%) και αποθηκεύτηκαν στους -20°C .

Συνολικά, 265 ενήλικα της ραγολέτιδας της κερασιάς (119 αρσενικά και 146 θηλυκά) ελέγχθηκαν για την παρουσία του βακτηρίου *Wolbachia* (Πίνακας 4). Για την απομόνωση γενωματικού DNA ατομικά από κάθε εξεταζόμενο ενήλικο της ραγολέτιδας της κερασιάς χρησιμοποιήθηκε ένα κατάλληλα τροποποιημένο πρωτόκολλο της μεθόδου CTAB (Doyle & Doyle, 1990) (Κεφάλαιο 2). Προκειμένου να προσδιοριστεί η παρουσία της *Wolbachia*, πραγματοποιήθηκαν για κάθε πληθυσμό αντιδράσεις PCR χρησιμοποιώντας τους εξής εκκινητές: α) 99F - 996R και wspecF – wspecR που ενισχύουν το 16S rRNA γονίδιο και δίνουν προϊόν 896 bp (O'Neill *et al.*, 1992) και 438 bp (Werren & Windsor, 2000), αντίστοιχα και β) 81F και 691R που ενισχύουν το γονίδιο *wsp* (*Wolbachia* surface protein) και δίνουν προϊόν μεγέθους περίπου 600 bp (Braig *et al.*, 1998) (Κεφάλαιο 2). Όλα τα ενήλικα της ραγολέτιδας της κερασιάς εξετάστηκαν για προσβολή από *Wolbachia* χρησιμοποιώντας αρχικά τους εκκινητές 99F / 994R, και τα άτομα που βρέθηκαν αρνητικά ελέγχθηκαν περαιτέρω χρησιμοποιώντας τους εκκινητές wspecF / wspecR. Στη συνέχεια, επαναπροσδιορίστηκε η παρουσία του βακτηρίου βάσει του *wsp* γονιδίου σε όλα ή σε μέρος των ατόμων ενός πληθυσμού (ανάλογα με τον πληθυσμό) που βρέθηκαν θετικά στη παρουσία της *Wolbachia* χρησιμοποιώντας τους προηγούμενους εκκινητές. Η παρατήρηση κατάλληλου μεγέθους ζώνης DNA σε πήκτωμα αγαρόζης τεκμηρίωνε την παρουσία των βακτηρίων στο εξεταζόμενο ενήλικο άτομο της ραγολέτιδας της κερασιάς (Κεφάλαιο 2).

Η ταυτοποίηση των στελεχών wCer1 και wCer2 των βακτηρίων *Wolbachia* στους παραπάνω πληθυσμούς πραγματοποιήθηκε μέσω της αλληλούχισης (sequencing) του γονιδίου *wsp*. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν: α) ένα θηλυκό και ένα αρσενικό άτομο από τους πληθυσμούς της Χαλκιδικής, Δάφνης, Ράχης, Καλλιπεύκης, Κ. Καστρισιού και Πύργου, β) ένα αρσενικό από την Κομοτηνή και την Καβάλα και γ) ένα

θηλικό από τη Θεσσαλονίκη και τα Κ. Νερά. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί απευθείας αλληλούχιση του γονιδίου *wsp*, προηγήθηκε καθαρισμός και ποσοτικοποίηση του ενισχυμένου (με 81F / 691R εκκινητές) προϊόντος PCR και τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση (Κεφάλαιο 2). Η ανάλυση των προϊόντων των αντιδράσεων αλληλούχισης έγινε βάσει του ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems). Τα μονόκλωνα αλληλουχισμένα γονιδιακά τμήματα των βακτηρίων *Wolbachia* αναλύθηκαν κατάλληλα για την ταυτοποίηση του στελέχους του γονιδίου *wsp* για κάθε δείγμα (Κεφάλαιο 2).

3.3. Αποτελέσματα

3.3.1. Γεωγραφική διασπορά του εντόμου, φυτά-ξενιστές και ποσοστό προσβολής

Η παρουσία της ραγολέτιδας της κερασιάς επιβεβαιώθηκε σε όλους τους καρπούς των εξεταζόμενων ξενιστών (κερασιές, βουσσινιές, άγριες κερασιές, μαχαλέπι, άγριες κορομηλιές) και σε όλες τις ηπειρωτικές και νησιωτικές περιοχές της Ελλάδας. Όμως, τα ποσοστά προσβολής διέφεραν ανά έτος μεταξύ των φυτών-ξενιστών και περιοχών (Πίνακας 3). Υψηλά ποσοστά προσβολής (>60%) καταγράφηκαν σε κεράσια που συλλέχτηκαν από τα Κ. Νερά, την Καρδίτσα, τη Δάφνη και την Αγιά. Αντίθετα, σε χαμηλά επίπεδα κυμάνθηκε η προσβολή στα κεράσια από τη Θεσσαλονίκη, το Περούλι και τα Κ. Λεχώνια. Όμως, το ποσοστό προσβολής στα αγριοκέρασα που συλλέχτηκαν από το Περούλι ήταν υψηλότερο (52.5%) σε σχέση με τα κεράσια (21.9%) και τους καρπούς του *P. mahaleb* (7.7%). Το ποσοστό προσβολής στα κεράσια από τα Κ. Νερά, την Καρδίτσα και τη Δάφνη ήταν σταθερά υψηλό κατά τα έτη των δειγματοληψιών ενώ σημαντική ήταν η διακύμανση του αντίστοιχου ποσοστού για τα κεράσια από την Αγιά και τη Ράχη (Πίνακας 3).

3.3.2. Έλεγχος παρουσίας της *Wolbachia*

Όλα τα ενήλικα των πληθυσμών που εξετάστηκαν βρέθηκαν προσβεβλημένα με *Wolbachia* (Πίνακας 4, Εικόνα 12). Η αλληλούχιση του γονιδίου *wsp* επιβεβαίωσε την παρουσία του στελέχους *wCer1* σε κάθε δείγμα. Αντίθετα, δεν βρέθηκαν ενήλικα άτομα προσβεβλημένα με το στέλεχος *wCer2*.

Πίνακας 3. Ποσοστά προσβολής καρπών-ξενιστών που συλλέχθηκαν από 10 περιοχές της Ελλάδας κατά τα έτη 2007-2009.

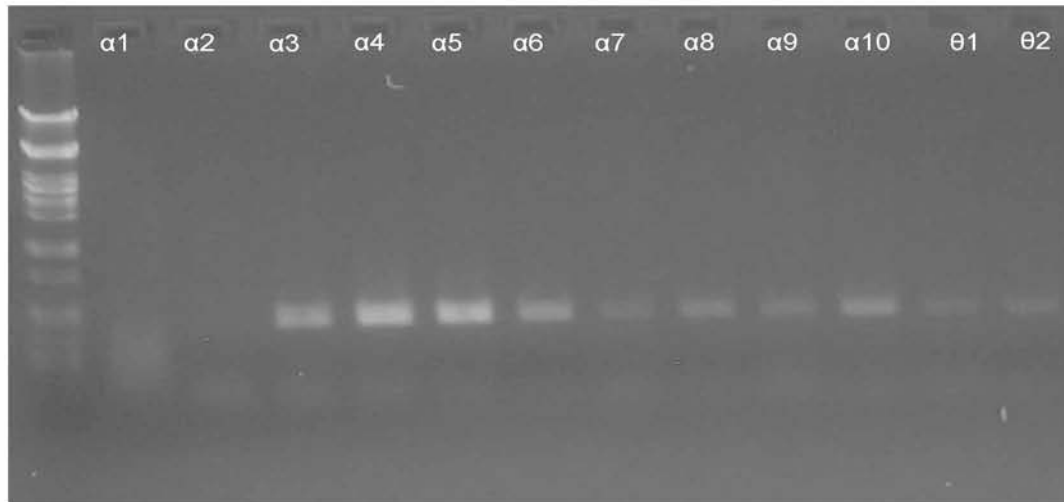
Καρποί-ξενιστές	Περιφέρεια	Περιοχή	Ημερ/νία συλλογής	Αριθμός καρπών	Ποσοστό προσβολής* (%)	
Κεράσια	Μακεδονία	Θεσσαλονίκη	5/2007	3420	12.2	
			26/5/2008	2826	42.6	
		Δάφνη Κοζάνης	8/7/2007	7900	68.3	
			27/6/2008	6142	73.8	
		Ράχη Πιερίας	12/6/2007	2390	11.0	
			2/6/2008	1100	89.0	
	Κεράσια	Θεσσαλία	Καλλιπεύκη Λάρισας	11/7/2007	3860	50.6
				8/7/2008	3946	20.8
			Αγιά Λάρισας	13/6/2007	2080	39.4
				28/5/2008	3752	90.3
			Περτούλι Τρικάλων	11/7/2007	2440	11.5
				14/7/2008	630	21.9
			Καλά Νερά Μαγνησίας	8/6/2007	3120	73.5
				30/5/2008	3677	>100
Κάτω Λεχώνια Μαγνησίας	3/6/2009	2976	72.5			
	23/5/2007	1080	27.5			
Καρδίτσα	21/5/2008	2012	17.7			
	23/5/2008	1543	86.3			
Αγριοκέρασα	Θεσσαλία	Καμάρι Μαγνησίας	11/6/2009	860	69.5	
			2/6/2007	1750	69.5	
			6/6/2008	2526	41.2	
			8/6/2009	2100	26.2	

* Νύμφες ανά 100 καρπούς

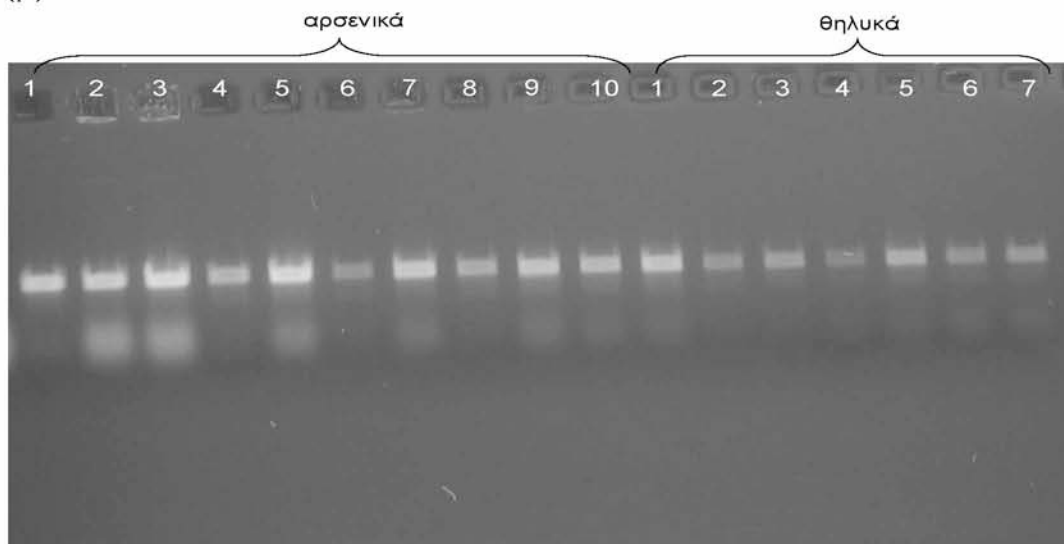
Πίνακας 4. Παρουσία της *Wolbachia* σε 10 ελληνικούς πληθυσμούς της ραγολέτιδας της κερασιάς βάσει των 16S rRNA και *wsp* γονιδίων.

Περιοχή	N		16S rRNA				<i>wsp</i>		Ποσοστό μόλυνσης (%)
			99F / 994R		wspecF / wspecR		81F / 691R		
	Αρσενικά	Θηλυκά	Αρσενικά	Θηλυκά	Αρσενικά	Θηλυκά	Αρσενικά	Θηλυκά	
Κομοτηνή	15	19	13/15	10/19	2/2	9/9	11/11	13/13	100
Καβάλα	15	4	8/15	2/4	7/7	2/2	10/10	4/4	100
Χαλκιδική	24	28	22/24	23/28	2/2	5/5	12/19	8/18	100
Θεσσαλονίκη	9	7	0/9	2/7	9/9	5/5	9/9	9/9	100
Δάφνη Κοζάνης	10	30	7/10	16/30	3/3	14/14	10/10	30/30	100
Ράχη Πιερίας	4	10	2/4	7/10	2/2	3/3	4/4	6/6	100
Καλλιπεύκη Λάρισας	18	18	15/18	16/18	3/4	2/2	10/10	9/9	100
Κ. Νερά Μαγνησίας	10	3	2/10	1/3	8/10	2/2	10/10	3/3	100
Κ. Καστρίτσι Αχαΐας	9	11	2/9	8/11	7/7	3/3	8/8	9/9	100
Πύργος Ηλείας	5	16	5/5	13/16		3/3	5/5	16/16	100

(α)



(β)



Εικόνα 12. Ανίχνευση του βακτηρίου *Wolbachia pipientis* πραγματοποιώντας PCR αντιδράσεις με χρήση: α) των εξειδικευμένων για *Wolbachia* εκκινητών (*wspecF* / *wspecR*) του 16S rRNA γονιδίου σε 10 αρσενικά (α1-α10) και 2 θηλυκά (θ1-θ2) άτομα της ραγολέτιδας της κερασιάς από τα Καλά Νερά (α, αρσενικά άτομα; θ, θηλυκά άτομα) και β) των εκκινητών 81F/691R για την ανίχνευση του *wsp* γονιδίου σε αρσενικά και θηλυκά άτομα από την Κομοτηνή (1), Καβάλα (2), Χαλκιδική (3), Θεσσαλονίκη (4), Δάφνη (5), Ράχη (6), Καλλιπεύκη (7), Καλά Νερά (8), Κάτω Καστρίτσι (9) και Πύργο (10).

3.3. Συζήτηση

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης επιβεβαιώνουν την παρουσία της ραγολέτιδας της κερασιάς τόσο σε ηπειρωτικές όσο και σε νησιωτικές περιοχές της Ελλάδας. Εκτός από τα κεράσια και τα βύσσινα, νύμφες του εντόμου συλλέχθηκαν και από αγριοκέρασα και καρπούς του *P. mahaleb*, καθώς και από ένα είδος άγριας κορομηλιάς (πιθανότατα του *P. domestica*) που αναφέρεται πρώτη φορά ως ξενιστής του εντόμου. Παρότι τα ποσοστά προσβολής διέφεραν μεταξύ των καρπών-ξενιστών, των περιοχών συλλογής των καρπών και του έτους δειγματοληψίας, ήταν σε όλες τις δειγματοληψίες υψηλά για κεράσια ορισμένων περιοχών της χώρας. Όλοι οι εξεταζόμενοι ελληνικοί πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς βρέθηκαν μολυσμένοι με το στέλεχος *wCer1* του βακτηρίου *Wolbachia* σε ποσοστό 100%.

Σε όλες τις περιοχές της ελληνικής επικράτειας υπάρχουν φυτά-ξενιστές της ραγολέτιδας της κερασιάς και συνεπώς μπορούν να αποτελέσουν ενδiciaιτήματα των πληθυσμών του εντόμου, ανεξαρτήτως γεωγραφικών ή οικολογικών χαρακτηριστικών. Καταλληλότεροι καρποί-ξενιστές για τη ραγολέτιδα της κερασιάς φαίνεται ότι είναι τα κεράσια και, κατά δεύτερο λόγο, τα αγριοκέρασα. Πράγματι, το ποσοστό προσβολής των κερασιών που συλλέχθηκαν από τα Κ. Νερά Μαγνησίας έφθασε το 2008 το 100% και η προσβολή στα αγριοκέρασα από το Περούλι και το Καμάρι κυμάνθηκε γενικά σε υψηλά επίπεδα (<70%). Αξίζει να σημειωθεί ότι καταγράφηκαν περιπτώσεις όπου αναπτύσσονταν παραπάνω από μία προνύμφη ανά καρπό (έως 2-3) για τους πληθυσμούς από το Καμάρι και τα Κ. Νερά Μαγνησίας, αν και είναι γνωστό ότι τα θηλυκά αποθέτουν μετά την ωτοκία μια ισχυρή φερομόνη αποτροπής ωτοκίας στην επιφάνεια του καρπού (Katsoyannos, 1975). Αντίστοιχη παρατήρηση με δύο ή και παραπάνω προνύμφες σε κάθε καρπό έχει ήδη αναφερθεί σε κεράσια και συνδεθεί με τα εκάστοτε υψηλά ποσοστά προσβολής (Fimiani, 1983). Στην περιοχή της Θεσσαλονίκης (Μίκρα), εκτός από τα κεράσια, και τα βύσσινα τοποθετούνται μεταξύ των διαθέσιμων καρπών-ξενιστών του εντόμου, επιβεβαιώνοντας προηγούμενη σχετική εργασία των Κατσόγιαννος και συνεργάτες (1991). Βάσει των αποτελεσμάτων μας, κι άλλα είδη *Prunus* spp. και πιθανότατα τα άγρια κορόμηλα πρέπει να συγκαταλέγονται μεταξύ των ξενιστών της ραγολέτιδας της κερασιάς. Οι δευτερεύοντες αυτοί ξενιστές δρουν πιθανότατα ως 'εναλλακτικοί' ξενιστές σε περιοχές ή και περιόδους όπου δεν υπάρχουν διαθέσιμα για ωτοκία κεράσια ή άλλοι περισσότερο επιθυμητοί καρποί. Επιπλέον, εκτός από τη Δάφνη Κοζάνης, ενήλικα του *R. cerasi* προέκυψαν πρόσφατα και από νύμφες που προέρχονταν από άγρια κορόμηλα της περιοχής Φιλιππαιοί Γρεβενών

(Παπαδόπουλος Ν., προσωπική επικοινωνία). Ωστόσο, τα ποσοστά προσβολής των άγριων κορόμηλων κυμαίνονται, βάσει των πρώτων εκτιμήσεων, σε πολύ χαμηλά επίπεδα και στις δύο περιοχές. Φαίνεται λοιπόν ότι τα κεράσια, τα αγριοκέρασα, τα βύσσина, οι καρποί του *P. mahaleb* αλλά και οι καρποί από άλλα είδη *Prunus*, όπως είναι τα άγρια κορόμηλα, αποτελούν ξενιστές της ραγολέτιδας της κερασιάς στη χώρα μας.

Η παραλλακτικότητα στα ποσοστά προσβολής μεταξύ των περιοχών και ετών δειγματοληψίας μπορεί να αποδοθεί στη διαφορετική φαινολογία των φυτών-ξενιστών και στις επικρατούσες κλιματικές συνθήκες (θερμοκρασία, βροχόπτωση) κατά τη διάρκεια της περιόδου ωοτοκίας της ραγολέτιδας της κερασιάς (Boller & Prokory, 1976). Λαμβάνοντας υπόψη ότι η περίοδος όπου οι καρποί των πρώιμων ποικιλιών της κερασιάς είναι διαθέσιμοι για ωοτοκία προηγείται συνήθως της αντίστοιχης περιόδου πτήσης των αναπαραγωγικά ώριμων ενηλίκων, χαμηλότερα επίπεδα προσβολής αναμένονται στις πρώιμες ποικιλίες συγκριτικά με τις όψιμες ποικιλίες της κερασιάς (Κατσόγιαννος *et al.*, 1991; Stamenkovic *et al.*, 1996; Daniel & Grunder, 2012). Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη καταγράφηκαν συστηματικά υψηλά ποσοστά προσβολής στις πρώιμες ποικιλίες κερασιάς από τα Κ. Νερά Μαγνησίας, Καρδίτσα και Αγιά Λάρισας. Αντίθετα, σχετικά χαμηλά ήταν τα ποσοστά προσβολής που καταγράφηκαν στα κεράσια των όψιμων ποικιλιών της Καλλιπεύκης Λάρισας και του Περτουλίου Τρικάλων. Η υψηλή συγκέντρωση σακχάρων στα κεράσια ευνοεί την ανάπτυξη των προνυμφών της ραγολέτιδας της κερασιάς (Boller, 1966), οπότε η γεωγραφική παραλλακτικότητα στα ποσοστά προσβολής θα μπορούσε να αποδοθεί και στην πιθανή διαφορετική θρεπτική σύσταση των καρπών των τοπικών ποικιλιών των φυτών-ξενιστών. Ωστόσο, δεν υπάρχουν διαθέσιμες μελέτες σχετικές με τη θρεπτική σύσταση των κερασιών των εξεταζόμενων τουλάχιστον τοπικών ποικιλιών της Ελλάδας. Επίσης, οι ετήσιες διακυμάνσεις των ποσοστών προσβολής στα κεράσια που συλλέχθηκαν από τη Ράχη Πιερίας και την Αγιά Λάρισας αποδίδονται πιθανότατα στη διαφορετική ανά έτος ημερομηνία δειγματοληψίας. Ειδικότερα, πιθανή καθυστέρηση στη συλλογή των κερασιών (σε σχέση με την περίοδο φαινολογίας των καρπών) συμβάλλει πιθανότατα στην εκτίμηση χαμηλότερων των πραγματικών ποσοστών προσβολής, καθώς οι προνύμφες προλαβαίνουν να ωριμάσουν και να εγκαταλείψουν τον καρπό πέφτοντας στο έδαφος. Βάσει των στοιχείων των συλλήψεων ενηλίκων σε παγίδες τύπου Rebel® στις περιοχές των Κ. Νερών Μαγνησίας και της Δάφνης Κοζάνης που καταγράψαμε κατά την περίοδο 2007-2010, προκύπτει ότι τα κεράσια που συλλέγονται μετά το μέγιστο της περιόδου πτήσης του εντόμου σε κάθε περιοχή είναι εκείνα που έχουν υψηλά ποσοστά προσβολής (Διάγραμμα 1Π & 2Π του Παραρτήματος). Συνεπώς, τα χαμηλά ποσοστά

προσβολής των κερασιών από τη Ράχη και την Αγιά κατά τα έτη 2007 και 2009, αντίστοιχα, είναι πιθανόν να οφείλονται στη σχετικά καθυστερημένη συλλογή των καρπών. Συστηματικότερες μακροχρόνιες μελέτες χρειάζονται για να καθοριστούν οι παράγοντες που επηρεάζουν την ένταση της προσβολής σε περιοχές της Ελλάδας. Σχετικά με την παρουσία της *Wolbachia* στους πληθυσμούς της ραγολέτιδας της κερασιάς, τα αποτελέσματά μας αναφέρουν την μόλυνση και των 10 Ελληνικών πληθυσμών με το στέλεχος *wCer1*, και είναι σε συμφωνία με τις προηγούμενες μελέτες (Riegler & Stauffer, 2002; Kounatidis *et al.*, 2008). Όμως, οι Augustinos *et al.* (2013) αποκάλυψαν πρόσφατα ότι οι ελληνικοί πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς είναι επί το πλείστον διπλά μολυσμένοι με τα στελέχη *wCer1* και *wCer4*, αν και σε μικρότερο ποσοστό υπάρχουν συνδυασμοί του στελέχους *wCer1* με το *wCer5* ή πιο σπάνια με το στέλεχος *wCer2*. Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα στελέχη των ενδοκυτταρικών βακτηρίων *Wolbachia* χαρακτηρίζονται από σημαντική γενεοτυπική παραλλακτικότητα (Ishmael *et al.*, 2009), είναι αναγκαίο να επανελεγχτούν περισσότεροι Ελληνικοί πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς χρησιμοποιώντας πιο εξελιγμένες μεθόδους ταυτοποίησης για το σύνολο των στελεχών *Wolbachia* σε κάθε εξεταζόμενο άτομο. Για παράδειγμα, φαινόμενα ανασυνδυασμού μεταξύ των στελεχών των βακτηρίων *Wolbachia* μπορούν να ανιχνευθούν με την ανάλυση εισαγωγής αλληλομόρφου (AIA) (Arthofer *et al.*, 2011).

Συνοψίζοντας, η ραγολέτιδα της κερασιάς βρέθηκε σε όλες τις εξεταζόμενες ηπειρωτικές και νησιωτικές περιοχές της Ελλάδας, προσβάλλοντας κεράσια, βύσσινα, αγριοκέρασα, καρπούς του *P. mahaleb* και σε μικρότερο ποσοστό καρπούς από άλλα είδη *Prunus* spp. (άγρια κορομηλιά). Αν και υπάρχει παραλλακτικότητα στα ποσοστά προσβολής των κερασιών μεταξύ των εξεταζόμενων περιοχών ανά έτος, τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν ότι η ζημιά στην ελληνική παραγωγή των κερασιών είναι δυνητικά πολύ μεγάλη, υπογραμμίζοντας την οικονομική σημασία του εντόμου για τη χώρα μας. Όλα τα άτομα των Ελληνικών πληθυσμών του εντόμου βρέθηκαν να είναι μολυσμένα με το στέλεχος *wCer1* των βακτηρίων *Wolbachia*, αν και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την ταυτοποίηση όλων των πιθανών στελεχών στα άτομα του κάθε πληθυσμού. Από την παρούσα μελέτη προκύπτει η ανάγκη για περαιτέρω μελέτη της βιο-οικολογίας και της συμπεριφοράς των ελληνικών πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς προκειμένου να είναι εφικτή η λήψη έγκυρων αποφάσεων για την αποτελεσματική και περιβαλλοντικά συμβατή διαχείριση των τοπικών πληθυσμών του εντόμου.

Βιβλιογραφία

- Arthofer W, Riegler M, Schuler H, Schneider D, Moder K, Miller WJ, Stauffer C. 2011. Allele Intersection Analysis: A novel tool for multi locus sequence assignment in multiply infected hosts. *PLoS ONE* 6: e22198.
- Arthofer W, Riegler M, Schneider D, Krammer M, Miller WJ, Stauffer C. 2009. Hidden *Wolbachia* diversity in field populations of the European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi* (Diptera, Tephritidae). *Molecular Ecology* 18: 3816–3830.
- Augustinos AA, Asimakopoulou AK, Moraiti CA, Mavragani-Tsipidou P, Papadopoulos NT, Bourtzis K. 2013. Microsatellite and *Wolbachia* analysis in *Rhagoletis cerasi* natural populations: population structuring and multiple infections. *Ecology and Evolution*, in press.
- Augustinos AA, Asimakopoulou AK, Papadopoulos NT, Bourtzis K. 2011. Cross-amplified microsatellites in the European cherry fly, *Rhagoletis cerasi*: medium polymorphic-highly informative markers. *Bulletin of Entomological Research* 101: 45-52.
- Boller E. 1966. Der Einfluss natürlicher Reduktionsfaktoren auf die Kirschenfliege *Rhagoletis cerasi* in der Nordwestschweiz, unter besonderer Berücksichtigung des Puppenstadiums. *Schweizerische Landwirtschaftliche Forschung* 5: 154-210.
- Boller E, Prokopy RJ. 1976. Bionomics and management of *Rhagoletis*. *Annual Review of Entomology* 21: 223-246.
- Boller EF, Russ K, Vallo V, Bush GL. 1976. Incompatible races of European Cherry Fruit Fly *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae), their origin and potential use in biological control. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 20: 237-247.
- Braig HR, Zhou W, Dobson S, O'Neill SL. 1998. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia*. *Journal of Bacteriology* 180: 2373–2378.
- Daniel C, Grunder J. 2012. Integrated management of European cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi* (L.): Situation in Switzerland and Europe. *Insects* 3: 956-988.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13–15.
- FAO 2010. *Faostat*. Available online: <http://faostat.fao.org>.
- Fimiani, P. 1989. Pest status-Mediterranean region. In: Robinson AS, Hooper G, eds. *Fruit flies: their biology, natural enemies and control*. Amsterdam: Elsevier, 39-50.

- Fimiani P. 1983.** Multilarval infestations by *Rhagoletis cerasi* L. (Diptera: Trypetidae) in cherry fruits. In: Cavalloro R, ed. *Fruit flies of economic importance*. Balkema: Rotterdam, 52- 59.
- Haniotakis GE, Malliaros M, Koryzakis M. 1989.** Control of the European cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi* with bait sprays. In: Cavalloro R, ed. *Fruit flies of economic importance. Proceedings of the CEC/IOBC International Symposium*, Rome 7-10 April 1987, 487-493.
- Ishmael N, Hotopp JCD, Ioannidis P, Biber S, Sakamoto J, Siozios S, Nene V, Werren J, Bourtzis K, Bordenstein SR, Tettelin H. 2009.** Extensive genomic diversity of closely related *Wolbachia* strains. *Microbiology* **155**: 2211-2222.
- Katsoyannos BI. 1975.** Oviposition-detering, male-arresting, fruit-marking pheromone in *Rhagoletis cerasi*. *Environmental Entomology* **4**: 801- 807.
- Katsoyannos BI, Papadopoulos NT, Stavridis D. 2000.** Evaluation trap types and food attractants for *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology* **93** :1005-1010.
- Kounatidis I, Papadopoulos N, Bourtzis K, Mavragani-Tsipidou P. 2008.** Genetic and cytogenetic analysis of the fruit fly *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae). *Genome* **51**: 479–49.
- Mohamadzade Namin S, Rasouljan GR. 2009.** A review of fruit flies of the genus *Rhagoletis* (Diptera, Tephritidae) of Iran and bordering countries, with the key to species. *Vestnik Zoologii* **43**: e-25-e-30.
- O'Neill SL, Giordano R, Colbert AM, Karr TL, Robertson HM. 1992.** 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 2699-2702.
- Papanastasiou AS, Nestel D, Diamantidis AD, Nakas CT, Papadopoulos NT. 2011.** Physiological and biological patterns of a highland and a coastal population of the European cherry fruit fly during diapause. *Journal of Insect Physiology* **57**: 83-93.
- Riegler M, Stauffer C. 2002.** *Wolbachia* infections and superinfections in cytoplasmically incompatible populations of the European cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi* (Diptera, Tephritidae). *Molecular Ecology* **11**: 2425-2434.
- Stamenkovic S, Garic R, Stamenkovic T, Milenkovic S, Nolic M. 1996.** Susceptibility of some sweet cherry cultivars to *Rhagoletis cerasi* L. (Diptera, Tephritidae). *Acta Horticulturae* **410**: 555-560.

Werren JH, Windsor DM. 2000. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **267**: 1277–1285.

White IM, Elson-Harris MM. 1992. *Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics*. London: CAB International, 1–601.

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 United States of America* **101**: 15042–15045.

Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικών Ερευνών (ΕΘΙΑΓΕ). 2011. *Εγχειρίδιο καλλιέργειας κερασιάς*. Ινστιτούτο Φυλλοβόλων Δένδρων Νάουσας. www.pomologyinstitute.gr, www.nagref.gr

Κατσόγιαννος ΒΙ, Κουλούσης Ν, Παπαδοπούλου Σ, Τάσκος Δ, Καραβαϊζίδης Α, Μανωλάκης Μ. 1991. Παρακολούθηση του πληθυσμού του εντόμου *Rhagoletis cerasi* σε κερασιές και βυσσινιές στην περιοχή Μίκρας Θεσσαλονίκης και ύψος της προσβολής ορισμένων ποικιλιών. Πρακτικά Δ' Πανελληνίου Εντομολογικού Συνεδρίου, 14-17 Οκτωβρίου, Βόλος.

4. ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΗΝ ΠΕΡΑΤΩΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΠΑΥΣΗΣ ΚΑΙ 'ΒΕΤ-HEDGING' ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΩΣ ΜΕΣΟ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΤΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΗΣ ΡΑΓΟΛΕΤΙΔΑΣ ΤΗΣ ΚΕΡΑΣΙΑΣ ΣΤΙΣ ΟΙΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΤΩΝ ΕΝΔΙΑΙΤΗΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΚΛΙΜΑΤΙΚΗ ΑΛΛΑΓΗ

Περίληψη

Η προσαρμογή στο περιβάλλον των μονοκυκλικών φυτοφάγων εντόμων των εύκρατων περιοχών βασίζεται κυρίως στην υποχρεωτική διάπαυση βάσει της οποίας διασφαλίζεται η επιβίωση κατά τη διάρκεια του χειμώνα και ο πλήρης συγχρονισμός των αναπαραγωγικών μορφών των εντόμων με τη φαινολογία των φυτών-ξενιστών. Στο παρόν Κεφάλαιο, μελετήθηκαν οι γενετικές και περιβαλλοντικές επιδράσεις στην περάτωση της διάπαυσης γεωγραφικά απομονωμένων πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς που διαφέρουν ως προς τα οικολογικά χαρακτηριστικά των ενδαιτημάτων τους. Νύμφες από δύο ελληνικούς και ένα γερμανικό πληθυσμό που χαρακτηρίζονται από διαφορετικά επίπεδα γονιδιακής ροής παρέμειναν σε πέντε διαφορετικές (σταθερές) χαμηλές θερμοκρασίες (0 - 12°C) για ποικίλα χρονικά διαστήματα (1-9 μήνες) και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε υψηλές θερμοκρασίες μέχρι να ολοκληρωθεί η έξοδος των ενηλίκων. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η ένταση της διάπαυσης διέφερε μεταξύ των τριών πληθυσμών, υποστηρίζοντας ότι η προσαρμογή στα διαφορετικά ενδαιτήματα απορρέει κυρίως από τη διαφορετική φαινολογία των τοπικών ποικιλιών των φυτών-ξενιστών. Μέτρια υψηλές θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια του χειμώνα (8°C) ευνοούν την περάτωση της διάπαυσης και στους τρεις πληθυσμούς. Επιπλέον, η ανεπαρκής έκθεση σε χαμηλές θερμοκρασίες (σύντομη διάρκεια έκθεσης ή σχετικά υψηλές θερμοκρασίες) ευνοεί την έκφραση της παρατεταμένης διάπαυσης. Η παρατεταμένη έκθεση σε χαμηλές θερμοκρασίες (για διάστημα μεγαλύτερο από αυτό που απαιτείται για την περάτωση της διάπαυσης) προκαλεί 'επιστροφή' των νυμφών σε εποχική αδράνεια. Η υποβολή σε έναν επιπλέον (προαιρετικό αυτή τη φορά) κύκλο διαχείμασης στο στάδιο της νύμφης δίνει τη δυνατότητα στα αντίστοιχα άτομα να ενηλικιωθούν κατά τη διάρκεια του επόμενου 'εποχικού παραθύρου' που συμπίπτει με τη φαινολογία των καρπών-ξενιστών. Η παραπάνω στρατηγική για τα μονοκυκλικά έντομα περιγράφεται πρώτη φορά. Συνεπώς, η διάρκεια της διάπαυσης διαφορετικών πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς καθορίζεται από: α) τη δυνατότητα τοπικής προσαρμογής στα κλιματικά και γεωγραφικά χαρακτηριστικά των ενδαιτημάτων τους (διάπαυση ενός έτους) και β) τη δυνατότητα εκδήλωσης διαφορετικών φαινότυπων ως

αποτέλεσμα των ετήσιων κλιματικών μεταβολών, επιτρέποντας την επιμήκυνση του βιολογικού τους κύκλου. Ειδικότερα, οι νύμφες είτε εισέρχονται σε παρατεταμένη διάπαυση είτε 'επιστρέφουν' σε εποχική αδράνεια εξαιτίας της ανεπαρκούς ή παρατεταμένης έκθεσης σε χαμηλές θερμοκρασίες, αντίστοιχα. Η δυνατότητα έκφρασης βιολογικών κύκλων μεγαλύτερων του έτους αποτελεί μέρος των 'bet-hedging' στρατηγικών που εκδηλώνονται κατά το στάδιο της διάπαυσης των νυμφών στους διάφορους πληθυσμούς της ραγολέτιδας της κερασιάς.

4.1. Εισαγωγή

Σε εύκρατα περιβάλλοντα που χαρακτηρίζονται από εναλλαγές εποχών, η εποχική αδράνεια (διάπαυση ή quiescence) αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα βιολογικά χαρακτηριστικά των φυτοφάγων εντόμων μέσω του οποίου επιτυγχάνεται ο συγχρονισμός τους με τη φαινολογία των απαραίτητων για την επιβίωση και αναπαραγωγή σταδίων των φυτών-ξενιστών, όπως είναι το στάδιο έκπτυξης νέου φυλλώματος και το στάδιο ωρίμανσης των καρπών (Tauber, Tauber & Masaki, 1986). Για τα είδη των εύκρατων περιοχών του βόρειου ημισφαιρίου, η περάτωση της διάπαυσης (για την πλειοψηφία των ατόμων ενός πληθυσμού) πραγματοποιείται το Δεκέμβριο ή και νωρίτερα (Santiago-Alvarez, Quesada-Moraga & Hernández-Crespo, 2003; Košťál, 2006; Papanastasiou *et al.*, 2011). Ακολουθεί η περίοδος της μεταδιαπαυτικής εποχικής αδράνειας, όπου διασφαλίζεται η επιβίωση των ατόμων που περάτωσαν τη διάπαυση και ταυτόχρονα επιτρέπεται και στα υπόλοιπα άτομα του πληθυσμού να περατώσουν τη διάπαυσή τους πριν την άνοδο της θερμοκρασίας την ερχόμενη άνοιξη (Tauber *et al.*, 1986; Hodek, 1996; Košťál, 2006; Belozeron, 2009). Εντούτοις, μερικά άτομα είναι πιθανό να παραμείνουν σε διάπαυση για ένα επιπλέον έτος (ή και περισσότερα) (παρατεταμένη διάπαυση), ανταποκρινόμενα σε συγκεκριμένα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, όπως είναι η θερμοκρασία, η υγρασία και τα διαθέσιμα ενεργειακά αποθέματα (Neilson, 1962; Dean & Hartley, 1977; Higaki & Ando, 2000; Menu & Desouhant, 2002; Higaki, 2005). Η παρατεταμένη διάπαυση έχει συχνά αρνητικές επιπτώσεις στα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ενηλίκων (Lyons, 1970; Κεφάλαιο 7), παρά τις εξαιρέσεις (Soula & Menu, 2005; Wei *et al.*, 2010). Η περίοδος διαχείμασης είναι καθοριστική για την προσαρμογή των εντόμων στα εκάστοτε περιβάλλοντα. Η τοπική προσαρμογή και η φαινοτυπική πλαστικότητα αποτελούν τους κύριους μηχανισμούς που έχουν αναπτύξει τα έντομα προκειμένου να αντεπεξέλθουν στις τοπικές και χρονικές μεταβολές των περιβαλλοντικών συνθηκών (Hereford, 2009; Scheiner & Holt, 2012). Για παράδειγμα, η ένταση της

διάπαυσης είναι συνήθως μεγαλύτερη σε έντομα που απαντώνται σε μεγαλύτερα γεωγραφικά πλάτη (Rank & Rank, 1989; Hodkinson, 2005; Demont & Blanckenhorn, 2008, αλλά επίσης βλέπε Zhao, Zhu & Liu, 2010) ενώ ο χρόνος ή η ικανότητα εισόδου σε διάπαυση καθορίζεται συχνά κυρίως από τη φωτοπερίοδο και τη θερμοκρασία (Wang *et al.*, 2009; Fischer & Karl, 2010). Συνεπώς, τα φυτοφάγα έντομα της εύκρατης ζώνης χαρακτηρίζονται από υψηλή παραλλακτικότητα στην ένταση της διάπαυσης τόσο μεταξύ των πληθυσμών όσο και σε επίπεδο πληθυσμού λόγω των μεταβολών των περιβαλλοντικών συνθηκών στα εκάστοτε ενδιαιτήματα.

Η αύξηση της θερμοκρασίας του πλανήτη είναι αδιαμφισβήτητη. Όπως υποστηρίζει η επιτροπή για την κλιματική αλλαγή United Nations Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) τα 11 έτη της περιόδου 1995-2006 ήταν μεταξύ των 12 πιο θερμών ετών που καταγράφηκαν ποτέ από το 1850. Ωστόσο, η παγκόσμια αύξηση της θερμοκρασίας δεν κατανέμεται ισομερώς ούτε σε τοπικό ούτε και σε εποχικό επίπεδο. Ταχύτερη αύξηση παρατηρείται στη θερμοκρασία του φθινοπώρου και του χειμώνα σε σχέση με της άνοιξης και του καλοκαιριού (Christensen *et al.*, 2007). Έως το τέλος του αιώνα, η θερμοκρασία κατά τη χειμερινή περίοδο προβλέπεται να αυξηθεί από 2.6°C έως 8.2°C στη βόρεια Ευρώπη και από 1.7°C έως 4.6°C στη λεκάνη της Μεσογείου (Christensen *et al.*, 2007). Οι ηπειρωτικές περιοχές της λεκάνης της Μεσογείου, και ειδικότερα περιοχές της Ελλάδας, φαίνεται να είναι περισσότερο ευάλωτες στην αύξηση της θερμοκρασίας σε σχέση με τις αντίστοιχες παραθαλάσσιες (Giorgi & Lionello, 2008; Giannakopoulos *et al.*, 2009; Tolika, Zanis & Anagnostopoulou, 2012). Οι μεταβολές στη θερμοκρασία του φθινοπώρου προβλέπεται ότι θα κυμανθούν από 2.0 έως 5.3°C με σχετικά ομοιόμορφη κατανομή μεταξύ των περιοχών της Ευρώπης (Christensen *et al.*, 2007). Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι τιμές των βιολογικών παραμέτρων των εντόμων είναι αλληλένδετες με τα οικολογικά χαρακτηριστικά των ενδιαιτημάτων τους, οι αλλαγές στις κλιματικές συνθήκες αναμένεται να οδηγήσουν στην έκφραση διαφορετικών φαινοτύπων σε ένα πληθυσμό (Jenouvrier & Visser, 2011). Κατά συνέπεια, η δυνατότητα τοπικής προσαρμογής του κάθε πληθυσμού και η έκφραση φαινοτυπικής πλαστικότητας καθορίζουν την ευαισθησία του στην κλιματική αλλαγή. Βέβαια, η παρουσία γενετικής παραλλακτικότητας σε χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τη φαινολογία των εντόμων αποτελεί προϋπόθεση για την επιτυχή προσαρμογή των πληθυσμών στις επικρατούσες κλιματικές μεταβολές (Hoffmann & Sgrò, 2011). Λαμβάνοντας υπόψη τις προβλέψεις για άνοδο της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια του χειμώνα, τα διαχειμάζοντα μονοκυκλικά είδη εντόμων των εύκρατων περιοχών είναι αναγκασμένα να διαφοροποιήσουν την υπάρχουσα στρατηγική διαχείμασης (Bale & Hayward, 2010). Πράγματι, η διάρκεια της διάπαυσης έχει βρεθεί ότι για

ορισμένα είδη εντόμων γίνεται μικρότερη (Maeta, 1978) και για άλλα μεγαλύτερη (Vanhanen *et al.*, 2007; Bosch & Kemp, 2004; Gray, Ravlin & Briane, 2001) λόγω των θερμότερων συνθηκών κατά το χειμώνα. Ωστόσο, η διάρκεια της περιόδου διαχείμασης παραμένει αμετάβλητη για ορισμένα έντομα των οποίων η διάπαυση δεν επηρεάζεται από την θερμοκρασία (Bosch & Blas, 1994; Fielding *et al.*, 1999). Φαίνεται λοιπόν ότι τα μονοκυκλικά έντομα των εύκρατων περιοχών ανταποκρίνονται με διαφορετικό τρόπο στην αύξηση της θερμοκρασίας κατά τη διαχείμαση, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολο να προβλεφθεί η επίδραση της κλιματικής αλλαγής στη διάρκεια του βιολογικού τους κύκλου (Robinet & Roques, 2010).

Η ραγολέτιδα της κερασιάς φαίνεται να συγκεντρώνει όλα εκείνα τα χαρακτηριστικά που την καθιστούν περισσότερο εκτεθειμένη στην παγκόσμια αύξηση της θερμοκρασίας. Πρώτον, τα έντομα με μικρό κύκλο ξενιστών θεωρούνται περισσότερο εκτεθειμένα στην κλιματική αλλαγή και η ραγολέτιδα της κερασιάς είναι ένα ολιγοφάγο είδος εντόμου που προσβάλλει καρπούς με περιορισμένη εποχική διαθεσιμότητα (McKinney, 1997; Colles, Liow & Prinzing, 2009). Επιπρόσθετα, η ανθοφορία και η καρπόδεση της κερασιάς είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στις θερμοκρασίες που επικρατούν κατά τη διάρκεια του χειμώνα και στις αρχές της άνοιξης. Για τις περισσότερες κερασοπαραγωγικές περιοχές που βρίσκονται γύρω από τη λεκάνη της Μεσογείου προβλέπεται ότι θα χάσουν τις περισσότερες από τις 'αναγκαίες ώρες χαμηλών θερμοκρασιών' για την περάτωση του λήθαργου και την ομαλή παραγωγή καρπών, ενώ οι αντίστοιχες περιοχές στη βόρεια Ευρώπη, και ιδιαίτερα στη Γερμανία, δεν φαίνεται να επηρεάζονται ιδιαίτερα (οι λιγότερες ώρες χαμηλών θερμοκρασιών αναμένεται να αναπληρωθούν από τη μικρότερη συχνότητα παγετών) (Luedeling *et al.*, 2011; Chung *et al.*, 2011). Οι πρώιμες ποικιλίες κερασιάς προβλέπεται να επηρεαστούν περισσότερο από την αύξηση της θερμοκρασίας σε σχέση με τις όψιμες ποικιλίες (Miller-Rushing *et al.*, 2007). Κατά συνέπεια, φαινόμενα που απορρέουν από τον ακανόνιστο τερματισμό του λήθαργου, όπως είναι η άκαιρη ανθοφορία και οι ανωμαλίες κατά την έκπτυξη των οφθαλμών, θα παρουσιάζονται συχνότερα στις κερασιές λόγω κλιματικής αλλαγής (Oukabli & Mahhou, 2007; Luedeling, Zhang & Girvetz, 2009). Δεύτερον, η ραγολέτιδα της κερασιάς είναι ένα μονοκυκλικό είδος εντόμου που περνάει περισσότερο από τα $\frac{3}{4}$ της ζωής του ως νύμφη εντός του εδάφους, δεδομένου ότι απαιτείται μια μακρά περίοδος έκθεσης σε χαμηλές θερμοκρασίες για να μπορέσουν να εξέλθουν τα ενήλικα την επόμενη άνοιξη ή τα επόμενα έτη για τις νύμφες με παρατεταμένη εποχική αδράνεια (Boller & Prokopy, 1976; Vallo, Remund & Boller, 1976). Συνεπώς, οι νύμφες της ραγολέτιδας της κερασιάς φαίνεται να είναι ιδιαίτερα εκτεθειμένες στην αύξηση των θερμοκρασιών που επικρατούν κατά τη διάρκεια του χειμώνα (Bale *et al.*, 2002). Τρίτον, οι

διαπαύουσες νύμφες είναι περισσότερο πιθανό να εξαντλήσουν τα ενεργειακά τους αποθέματα κατά τη διάρκεια θερμών χειμώνων, καθώς δεν έχουν τη δυνατότητα να τραφούν στο στάδιο της νύμφης. Παρότι η εξάντληση των ενεργειακών αποθεμάτων υπό την αύξηση της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια του χειμώνα δεν είναι ένα γενικό φαινόμενο (Mercader & Scriber, 2008), υπάρχουν αναφορές για αυξημένη θνησιμότητα σε ολοκυκλικά είδη εντόμων (Williams, Shorthouse & Lee, 2003; Bosch & Kemp, 2004; Košťál *et al.*, 2011, Sorvari, Haatanen & Verterlund, 2011). Τέταρτον, τα ενήλικα της ραγολέτιδας της κερασιάς έχουν περιορισμένη πτητική ικανότητα ενώ πληθυσμοί του εντόμου απαντώνται διάσπαρτοι στις περιοχές με φυτά-ξενιστές (Fletcher, 1989; Kneifl, Paprštei & Kňourková, 1997). Δεδομένου ότι η μετανάστευση και η αποίκιση περιοχών με ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης και αναπαραγωγής αποτελεί συνήθη στρατηγική επιβίωσης των εντόμων με μικρό αριθμό ξενιστών, η περιορισμένη ικανότητα διασποράς των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς επηρεάζει αρνητικά την αποίκιση νέων περιοχών και την αντιμετώπιση των επιπτώσεων της κλιματικής αλλαγής (Poisot *et al.*, 2011). Συνεπώς, η ραγολέτιδα της κερασιάς αποτελεί ένα εξαιρετικό οργανισμό-μοντέλο για τη μελέτη των επιπτώσεων της αύξησης της θερμοκρασίας του χειμώνα στα μονοκυκλικά είδη εντόμων των εύκρατων περιοχών.

Παρότι υπάρχουν διαθέσιμες αρκετές μελέτες σχετικά με τη διάπαυση των νυμφών της ραγολέτιδας της κερασιάς (Boller & Bush, 1974; Vallo *et al.*, 1976; Baker & Miller, 1978; Papanastasiou *et al.*, 2011), ο τρόπος με τον οποίο η αλληλεπίδραση των γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων επηρεάζουν την περάτωση της διάπαυσης ή/και την έκφραση της παρατεταμένης διάπαυσης δεν έχει μελετηθεί σε βάθος. Στο παρόν Κεφάλαιο εξετάζεται κατά πόσο γεωγραφικά απομονωμένοι πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς που απαντώνται σε διαφορετικά οικολογικά ενδιαιτήματα ανταποκρίνονται με τον ίδιο τρόπο σε ένα εύρος χαμηλών θερμοκρασιών προκειμένου να περατώσουν τη διάπαυσή τους. Ειδικότερα, οι νύμφες των εξεταζόμενων πληθυσμών εκτέθηκαν για ποικίλα χρονικά διαστήματα σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες 'χειμώνα'. Η αρχική μας υπόθεση είναι ότι η ένταση της διάπαυσης των νυμφών διαφέρει μεταξύ των πληθυσμών του εντόμου που απαντώνται σε ενδιαιτήματα που διαφέρουν ως προς τα κλιματικά τους δεδομένα. Σε μια προσπάθεια να διαχωριστούν οι γενετικοί από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν διαφοροποίηση της έντασης της διάπαυσης, επιλέχθηκαν πληθυσμοί που συνδέονται μεταξύ τους με διαφορετικά επίπεδα γονιδιακής ροής (Augustinos *et al.*, 2013). Ειδικότερα, νύμφες από δύο ελληνικούς πληθυσμούς και ένα γερμανικό πληθυσμό εκτέθηκαν σε πέντε σταθερές χαμηλές θερμοκρασίες (0, 5, 8, 10 και 12°C) για ποικίλα χρονικά διαστήματα και

έπειτα μεταφέρθηκαν σε υψηλές θερμοκρασίες μέχρι να ολοκληρωθεί η έξοδος των ενηλίκων. Προκειμένου να προσδιοριστεί εάν οι χαμηλές θερμοκρασίες και η σχετική διάρκεια έκθεσης συνδέονται με την έκφραση της παρατεταμένης διάπαυσης, καταγράφηκαν (μετά το πέρας της εξόδου των ενηλίκων) οι νύμφες που παρέμειναν σε ζωντανές (overlapping pupae). Εξετάστηκε η υπόθεση ότι οι αυξημένες θερμοκρασίες κατά τη χειμερινή περίοδο αδυνατούν να ικανοποιήσουν τις ανάγκες σε ψύχος για την επιτυχή περάτωση της διάπαυσης. Επιπλέον, η σύντομη έκθεση σε χαμηλές θερμοκρασίες καθώς και η παρατεταμένη έκθεση σε χαμηλές θερμοκρασίες έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη θνησιμότητα των νυμφών.

4.2. Υλικά και Μέθοδοι

4.2.1. Πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς

Χρησιμοποιήθηκαν δύο Ελληνικοί και ένας Γερμανικός πληθυσμός της ραγολέτιδας της κερασιάς που προέρχονταν από τη Δάφνη Κοζάνης και τα Καλά Νερά Μαγνησίας και την περιοχή του Baden – Württemberg (Dossenheim, Karlsruhe) (Εικόνα 13). Οι παραπάνω πληθυσμοί απαντώνται σε ενδιαιτήματα με διαφορετικά γεωγραφικά και κλιματικά χαρακτηριστικά (θερμοκρασία, βροχοπτώσεις) (Πίνακας 5). Ο πληθυσμός από τα Κ. Νερά θεωρείται πρώιμος ενώ οι άλλοι δύο όψιμοι. Προκειμένου να διαχωριστούν οι γενετικές από τις περιβαλλοντικές επιδράσεις στην ένταση της διάπαυσης για τους τρεις πληθυσμούς, θα πρέπει να συνεκτιμηθεί η γενετική δομή των εξεταζόμενων πληθυσμών. Χρησιμοποιώντας ουδέτερους μοριακούς δείκτες, αποδείχτηκε πρόσφατα ότι οι δύο ελληνικοί πληθυσμοί (Δάφνη και Κ. Νερά) ανήκουν στην ίδια ομάδα και συνδέονται μεταξύ τους με γονιδιακή ροή, ενώ η γενετική απόσταση μεταξύ του γερμανικού (Dossenheim) και των δύο ελληνικών πληθυσμών είναι μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή μεταξύ των δύο ελληνικών πληθυσμών (Augustinos *et al.*, 2011; 2013).



Εικόνα 13. Χάρτης της γεωγραφικής κατανομής των πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν Κεφάλαιο.

Πίνακας 5. Κλιματικά δεδομένα για τις τρεις περιοχές προέλευσης των εξεταζόμενων πληθυσμών της ραγολέπιδας της κερασιάς.

Μήνας	Θερμοκρασία (μέσος όρος, °C) ¹			Μέση βροχόπτωση (χιλ.)		
	Dossenheim	Δάφνη ²	Κ. Νερά ³	Dossenheim	Δάφνη	Κ. Νερά
Ιαν.	2.4	4.5	8.7	35	36	40
Φεβρ.	4.1	4.0	9.9	64	21	29
Μάρτ.	7.8	7.0	12.9	77	56	23
Απρ.	12.7	11	15.9	45	42	17
Μάιος	15.9	15.8	21.3	100	45	31
Ιούν.	18.7	18.9	25.9	71	40	25
Ιούλ.	20.2	23.3	28.5	97	0	7
Αύγ.	19.4	23.2	28.3	79	4	28
Σεπτ.	14.6	17.5	22.6	49	44	35
Οκτ.	10.2	15.5	18.0	45	77	66
Νοέμβρ.	6.9	13.0	14.4	58	146	47
Δεκ.	1.6	3.3	10.3	85	62	100

¹Περίοδος αναφοράς: 2007-2010.

²Τα κλιματικά δεδομένα για την περιοχή της Δάφνης προέρχονται από μετεωρολογικό σταθμό του αεροδρομίου της Καστοριάς (Άργος Ορεστικού) (υψόμετρο: 669μ) σε απόσταση περίπου 20 χμ. από τη Δάφνη.

³Τα κλιματικά δεδομένα για την περιοχή των Καλών Νερών προέρχονται από μετεωρολογικό σταθμό του Βόλου (υψόμετρο: 52μ) σε απόσταση περίπου 18 χμ. από τα Κ. Νερά.

4.2.2. Πειραματική διαδικασία

Νύμφες της ραγολέτιδας της κερασιάς συλλέχθηκαν από προσβεβλημένα κεράσια που προέρχονταν από μεμονωμένα δένδρα (*P. avium* L.) στην Ελλάδα και από τον σπρωώνα κερασιάς του Julius Kühn Ινστιτούτου στο Dossenheim (Κεφάλαιο 2). Οι νύμφες, αμέσως μετά το σχηματισμό τους, παρέμειναν στους $25 \pm 1^\circ\text{C}$ για δύο μήνες και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε πέντε σταθερές θερμοκρασίες ($0, 5, 8, 10, 12 \pm 1^\circ\text{C}$) για διάστημα που κυμαινόταν από 1 έως 9 μήνες. Δείγμα 100 νυμφών για κάθε μεταχείριση μεταφερόταν κάθε μήνα στους $25 \pm 1^\circ\text{C}$ και καταγραφόταν καθημερινά η πορεία ενηλικίωσης. Όταν ολοκληρώθηκε η έξοδος των ενηλίκων, καταγράφηκαν οι νεκρές νύμφες καθώς και οι νύμφες που παρέμειναν ζωντανές. Ζωντανές θεωρήθηκαν οι νύμφες με βάρος >3 mg.

4.2.3. Στατιστική ανάλυση

Χρησιμοποιήθηκε η πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση (Multinomial logistic regression) για να εκτιμηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας, του πληθυσμού και της διάρκειας έκθεσης σε χαμηλές θερμοκρασίες (περίοδος ψύξης) στο ποσοστό των νυμφών που έδωσαν ενήλικα, πέθαιναν και παρέμειναν ζωντανές. Εξαιρώντας τις νεκρές νύμφες από την ανάλυση, η λογιστική παλινδρόμηση (Binary logistic regression) χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας, του πληθυσμού και της περιόδου ψύξης: α) στο ποσοστό των νυμφών που δίνουν ενήλικα και β) στο ποσοστό των νυμφών που παραμένουν σε διάπαυση/εποχική αδράνεια. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το στατιστικό πακέτο SPSS 17.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, U.S.A.).

4.3. Αποτελέσματα

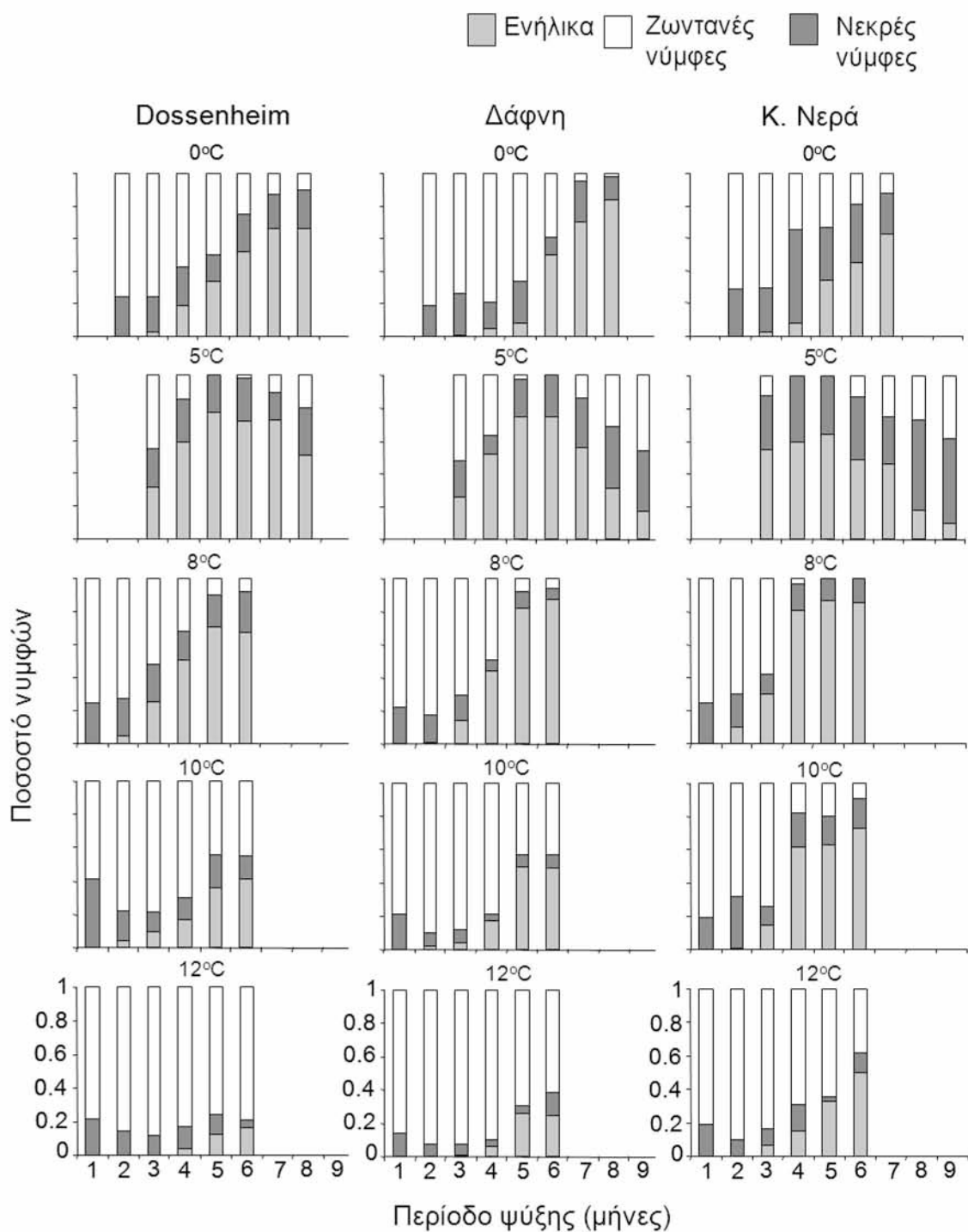
Το ποσοστό των νυμφών που έδωσαν ενήλικα, πέθαιναν ή παρέμειναν ζωντανές μετά από κάθε μεταχείριση για τους τρεις πληθυσμούς της ραγολέτιδας της κερασιάς δίνεται στο Διάγραμμα 1. Σε κάθε πληθυσμό, ένα συνολικό ποσοστό 30-35% των νυμφών ενηλικιώθηκε, ένα 15-25% πέθανε και οι υπόλοιπες νύμφες (40-55%) παρέμειναν ζωντανές. Το ποσοστό ενηλικίωσης ήταν ιδιαίτερα υψηλό ($> 60\%$) για τις νύμφες που εκτέθηκαν σε θερμοκρασίες που κυμαίνονταν από 5°C έως 8°C . Στους 5°C , η αναλογία των νυμφών που έδωσαν ενήλικα ως προς αυτές που παρέμειναν ζωντανές ήταν μεγάλη και για τους τρεις πληθυσμούς, αλλά ειδικότερα για τις νύμφες από το Dossenheim. Ο αριθμός των νυμφών που κατάφεραν να

περατώσουν τη διάπαυση στους 12°C μειώθηκε σημαντικά (< 60%) ενώ καθυστέρησε η περάτωση της διάπαυσης (≥ 7 μήνες) μετά από έκθεση στους 0°C και για τους τρεις πληθυσμούς. Η αναλογία των νυμφών που έδωσαν ενήλικα ως προς τις νύμφες που παρέμειναν ζωντανές ήταν χαμηλή μετά από έκθεση στους 0°C και σε θερμοκρασίες $\geq 10^\circ\text{C}$, υποδεικνύοντας αδυναμία ικανοποίησης των αναγκών σε χαμηλές θερμοκρασίες για περάτωση της διάπαυσης. Οι νύμφες από τα Κ. Νερά περάτωσαν τη διάπαυσή τους σχεδόν ένα μήνα νωρίτερα από αυτές από τη Δάφνη και το Dossenheim όταν εκτέθηκαν σε θερμοκρασίες που κυμαίνονταν από 5 έως 10°C. Η αναλογία των νυμφών που έδωσαν ενήλικα ως προς τις νύμφες που παρέμειναν ζωντανές αυξήθηκε σταδιακά μέχρι το μέγιστο της εξόδου των ενηλίκων σε όλες τις μεταχειρίσεις. Στο μέγιστο της εξόδου των ενηλίκων στους 5°C, δεν καταγράφηκαν νύμφες που να παραμένουν ζωντανές. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι η παρατεταμένη έκθεση στους 5°C είχε ως αποτέλεσμα τη σταδιακή αύξηση του αριθμού των νυμφών που παραμένουν ζωντανές και για τους τρεις πληθυσμούς. Ειδικότερα, η αναλογία των νυμφών που έδωσαν ενήλικα ως προς τις νύμφες που παρέμειναν ζωντανές αυξήθηκε μετά από έκθεση 4 έως 6 μηνών για τις νύμφες από τα Κ. Νερά και 6 έως 7 μηνών για τις νύμφες από τη Δάφνη και το Dossenheim, και στη συνέχεια μειώθηκε για κάθε επιπλέον χρόνο έκθεσης μέχρι το συνολικό χρόνο 9 μηνών. Σημειώνεται ότι οι νύμφες που παρέμειναν ζωντανές (τόσο πριν όσο και μετά το μέγιστο της εξόδου των ενηλίκων) δίνουν εύρωστα ενήλικα μετά από ένα ή και περισσότερα έτη, ανάλογα με τον πληθυσμό και τη μεταχείριση της θερμοκρασίας των θερμών-ψυχρών περιόδων έκθεσης (Κεφάλαιο 7, Διάγραμμα 3Π & 4Π του Παραρτήματος).

Η αναλογία των νεκρών νυμφών ως προς τις νύμφες που δίνουν ενήλικα ήταν χαμηλή ανεξαρτήτως της θερμοκρασιακής μεταχείρισης στους ελληνικούς πληθυσμούς, αλλά αυξήθηκε για τις νύμφες του γερμανικού πληθυσμού μετά από έκθεση στους 12°C. Οι νύμφες που έδωσαν ενήλικα ήταν πολύ περισσότερες σε σχέση με τις νεκρές μετά από έκθεση έξι έως επτά μηνών για τις νύμφες από τα Κ. Νερά και τριών έως οχτώ μηνών για τις νύμφες από τη Δάφνη και το Dossenheim. Αντίθετα, καταγράφηκαν περισσότερες νεκρές νύμφες από ενήλικα όταν η έκθεση στις χαμηλές θερμοκρασίες διήρκεσε λιγότερο από τρεις μήνες. Συνοψίζοντας, το ποσοστό των νυμφών που δεν κατάφεραν να δώσουν ενήλικα και παρέμειναν ζωντανές ήταν μεγαλύτερο για τον πληθυσμό της Δάφνης σε σχέση με τον πληθυσμό των Κ. Νερών. Ο αριθμός των νυμφών που παρέμειναν ζωντανές ήταν μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο των νεκρών μετά από έκθεση τόσο στους 0°C όσο και στις υψηλότερες θερμοκρασίες ($\geq 8^\circ\text{C}$) και για τους τρεις πληθυσμούς. Η αναλογία των νεκρών νυμφών ως προς τις νύμφες που παρέμειναν ζωντανές ήταν χαμηλή για τους

πρώτους 4 και 6 μήνες έκθεσης σε χαμηλές θερμοκρασίες για τις νύμφες από τα Κ. Νερά και γι' αυτές από τη Δάφνη και το Dossenheim, αντίστοιχα. Ωστόσο, η παραπάνω αναλογία αυξήθηκε μετά από επιπλέον 2-4 μήνες έκθεσης στις χαμηλές θερμοκρασίες (Διάγραμμα 5Π του Παραρτήματος).

Η πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση έδειξε ότι: α) ο πληθυσμός, η θερμοκρασία, η διάρκεια έκθεσης στις χαμηλές θερμοκρασίες (περίοδος ψύξης) και όλες οι αλληλεπιδράσεις τους είχαν σημαντική επίδραση στην αναλογία των νυμφών που έδωσαν ενήλικα ως προς αυτές που παρέμειναν ζωντανές, β) ο πληθυσμός, η διάρκεια έκθεσης στις χαμηλές θερμοκρασίες (περίοδος ψύξης) και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πληθυσμού και θερμοκρασίας καθώς και μεταξύ θερμοκρασίας και περιόδου ψύξης είχαν σημαντική επίδραση στην αναλογία των νεκρών νυμφών ως προς τις νύμφες που παρέμειναν ζωντανές και γ) ο πληθυσμός, η θερμοκρασία, η διάρκεια έκθεσης στις χαμηλές θερμοκρασίες (περίοδος ψύξης) και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πληθυσμού και περιόδου ψύξης καθώς και μεταξύ θερμοκρασίας και περιόδου ψύξης είχαν σημαντική επίδραση στην αναλογία των νεκρών νυμφών ως προς τις νύμφες που δίνουν ενήλικα (Πίνακας 1Π, Διάγραμμα 5Π του Παραρτήματος). Εστιάζοντας στο ρυθμό ενηλικίωσης και στις νύμφες που παρέμειναν ζωντανές, οι αναλύσεις της λογιστικής παλινδρόμησης έδειξαν ότι: α) ο πληθυσμός, η θερμοκρασία, η διάρκεια έκθεσης στις χαμηλές θερμοκρασίες (περίοδος ψύξης) και οι αλληλεπιδράσεις τους έχουν σημαντική επίδραση στο ποσοστό των νυμφών που έδωσαν ενήλικα (Πίνακας 6) και β) ο πληθυσμός, η θερμοκρασία, η διάρκεια έκθεσης στις χαμηλές θερμοκρασίες (περίοδος ψύξης) και η αλληλεπίδραση μεταξύ πληθυσμού και περιόδου έκθεσης επηρέασαν σημαντικά το ποσοστό των νυμφών που παρέμειναν ζωντανές (Πίνακας 7).



Διάγραμμα 1. Επίδραση της θερμοκρασίας και της περιόδου έκθεσης στο ποσοστό των νυμφών της ρακολέτιδας της κερασιάς που έδωσαν ενήλικα, πέθαναν ή παρέμειναν ζωντανές και προέρχονταν από πληθυσμούς των περιοχών του Dossenheim, της Δάφνης Κοζάνης και των Κ. Νερών Μαγνησίας.

Πίνακας 6. Μεταβλητές της λογιστικής παλινδρόμησης για την επίδραση της θερμοκρασίας, του πληθυσμού και της περιόδου ψύξης στο ποσοστό ενηλικίωσης των νυμφών της ρακολέτιδας της κερασιάς. Ο πληθυσμός του Dossenheim αποτελεί τον πληθυσμό αναφοράς.

Πηγή παραλλακτικότητας	β	Τυπικό σφάλμα	Exp (B)	P
Θερμοκρασία	0.192	0.019	1.211	P<0.001
Πληθυσμός				P<0.001
Δάφνη	0.648	0.216	1.912	P=0.003
Καλά Νερά	-0.241	0.201	0.785	P=0.229
Περίοδος ψύξης	-0.293	0.029	0.746	P<0.001
Πληθυσμός * θερμοκρασία				P<0.001
Δάφνη * θερμοκρασία	-0.050	0.014	0.951	P<0.001
Καλά Νερά * θερμοκρασία	-0.107	0.014	0.899	P<0.001
Πληθυσμός * περίοδος ψύξης				P<0.001
Δάφνη * περίοδος ψύξης	-0.057	0.034	0.945	P=0.091
Καλά Νερά * περίοδος ψύξης	0.150	0.031	1.161	P<0.001
Θερμοκρασία * περίοδος ψύξης	-0.028	0.003	0.973	P<0.001

Πίνακας 7. Μεταβλητές της λογιστικής παλινδρόμησης για την επίδραση της θερμοκρασίας, του πληθυσμού και της περιόδου ψύξης στο ποσοστό των νυμφών της ραγολέτιδας της κερασιάς που παραμένουν ζωντανές. Ο πληθυσμός του Dossenheim αποτελεί τον πληθυσμό αναφοράς.

Πηγή παραλλακτικότητας	β	Τυπικό σφάλμα	Exp (B)	P
Θερμοκρασία	0.067	0.006	1.070	P<0.001
Πληθυσμός				P<0.001
Δάφνη	0.727	0.144	2.068	P<0.001
Καλά Νερά	-0.300	0.136	0.741	P=0.027
Περίοδος ψύξης	-0.381	0.021	0.683	P<0.001
Πληθυσμός * περίοδος ψύξης				P=0.004
Δάφνη * περίοδος ψύξης	-0.099	0.030	0.906	P<0.001
Καλά Νερά * περίοδος ψύξης	-0.028	0.030	0.972	P=0.351

4.4. Συζήτηση

Εξετάζοντας ένα μεγάλο εύρος χαμηλών θερμοκρασιών, τα αποτελέσματά μας υποστηρίζουν την παρουσία γεωγραφικής παραλλακτικότητας στην ένταση της διάπαυσης των νυμφών της ραγολέτιδας της κερασιάς. Ωστόσο, οι παρατηρούμενες διαφορές στην ένταση της διάπαυσης μεταξύ των πληθυσμών ελαχιστοποιούνται μετά από έκθεση των νυμφών τόσο στη χαμηλότερη (0°C) όσο και στην υψηλότερη (12°C) εξεταζόμενη θερμοκρασία διαχείμασης. Η έκφραση βιολογικών κύκλων μεγαλύτερων του έτους απορρέει από την 'πλαστική' έκφραση διαφορετικών φαινοτύπων ως αποτέλεσμα της αντίδρασης στις διαφορετικές χαμηλές θερμοκρασίες και στη διάρκεια της περιόδου έκθεσης στις ευνοϊκές χαμηλές θερμοκρασίες. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι η διάρκεια της περιόδου έκθεσης στις εκάστοτε χαμηλές θερμοκρασίες καθορίζει με διπλό τρόπο το ποσοστό των νυμφών που παραμένουν ζωντανές: α) η ανεπαρκής για την περάτωση της διάπαυσης έκθεση σε χαμηλές θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους προάγει την είσοδο των νυμφών σε παρατεταμένη διάπαυση και β) η παρατεταμένη έκθεση σε χαμηλές θερμοκρασίες (για περίοδο μεγαλύτερη από εκείνη που απαιτείται για την περάτωση της διάπαυσης κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους) προκαλεί την 'επιστροφή' των νυμφών σε εποχική αδράνεια. Σε αντίθεση με τις αρνητικές επιδράσεις των υψηλών θερμοκρασιών διαχείμασης, οι μέτρια υψηλές θερμοκρασίες, όπως είναι οι 8°C, ευνοούν την περάτωση της διάπαυσης και στους τρεις πληθυσμούς. Συνεπώς, πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων καθορίζουν την περάτωση της διάπαυσης και την έκφραση βιολογικών κύκλων μεγαλύτερων του έτους στους πληθυσμούς της ραγολέτιδας της κερασιάς.

Γεωγραφική παραλλακτικότητα στην ένταση της διάπαυσης

Η ένταση της διάπαυσης μετά από έκθεση των νυμφών σε ευνοϊκές χαμηλές θερμοκρασίες διαφέρει μεταξύ των τριών πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς. Ειδικότερα, οι νύμφες από τα Κ. Νερά περάτωσαν τη διάπαυσή τους σχεδόν ένα μήνα νωρίτερα σε σχέση με αυτές από τη Δάφνη και το Dossenheim, σύμφωνα και με τη φαινολογία των καρπών των τοπικών ποικιλιών της κερασιάς. Φαίνεται ότι οι νύμφες της ραγολέτιδας της κερασιάς 'μετρούν χρόνο στο ψύχος' κατά τη διάρκεια της περιόδου διαχείμασης (υπό ευνοϊκές χαμηλές θερμοκρασίες) προκειμένου να προσαρμόσουν την πρόοδο των διαδικασιών για την περάτωση της διάπαυσης στην εποχικότητα των καρπών των τοπικών φυτών-ξενιστών. Θεωρητικά, ο χρόνος που 'ξοδεύουν' οι διαχειμάζουσες μορφές των εντόμων κάτω από κάποιο όριο χαμηλών

θερμοκρασιών είναι συγκρίσιμος με την αντίστοιχη περίοδο φωτοφάσης που απαιτείται από ορισμένα είδη εντόμων για να τερματίσουν την περίοδο διαχείμασης, όπως είναι αυτά που ανταποκρίνονται μόνο στο ερέθισμα της φωτοπερίοδου ή αυτά που απαντώνται σε ενδαιτήματα όπου η μεταβολή της θερμοκρασίας δεν αποτελεί αξιόπιστο ερέθισμα της εποχικότητας του περιβάλλοντος (π.χ. αλπικές περιοχές) (Bradshaw & Holzapfel, 2007). Ειδικότερα στην περίπτωση των νυμφών της ραγολέτιδας της κερασιάς, η φωτοπερίοδος δεν μπορεί να αποτελέσει αξιόπιστο ερέθισμα περάτωσης της διάπαυσης καθώς οι νύμφες διαχειμάζουν στο εσωτερικό του εδάφους. Επομένως, η διάρκεια της περιόδου ψύξης μπορεί να αποτελέσει, κατά αντιστοιχία με την φωτοφάση κατά τη διάρκεια του χειμώνα, ένα επιπλέον 'αξιόπιστο' κριτήριο περάτωσης της διάπαυσης σε κάθε περιοχή.

Επιπρόσθετα, η έναρξη της περιόδου πτήσης των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς τοποθετείται ένα μήνα νωρίτερα στην περιοχή των Κ. Νερών σε σχέση με τη Δάφνη (Papanastasiou *et al.*, 2011; Διάγραμμα 1Π & 2Π του Παρατήματος) ενώ πειράματα ανταλλαγής πληθυσμών μεταξύ των δύο αυτών περιοχών σε συνθήκες αγρού (reciprocal transplant experiments) υπέδειξαν την παρουσία γενετικών επιδράσεων στη διαφοροποίηση της έντασης της διάπαυσης μεταξύ των πληθυσμών του εντόμου (Papanastasiou *et al.*, 2011). Συνδυάζοντας τα παραπάνω προκύπτει ότι οι πληθυσμοί των Κ. Νερών και της Δάφνης δεν είναι οικολογικά συμβατοί (ecologically exchangeable), παρότι συνδέονται με γονιδιακή ροή (Rader *et al.*, 2005). Η προσαρμογή του χρόνου περάτωσης της διάπαυσης των νυμφών στις τοπικές συνθήκες των ενδαιτημάτων των διαφόρων πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς, ακόμη και υπό την παρουσία γονιδιακής ροής, είναι σε συμφωνία με πρόσφατα ευρήματα για τα είδη *Scathophaga stercoraria* και *Drosophila montana* (Demont *et al.*, 2008; Tyukmaeva *et al.*, 2011). Ωστόσο, η απουσία γεωγραφικής παραλλακτικότητας στην ένταση της διάπαυσης μετά από έκθεση των νυμφών σε λιγότερο ευνοϊκές για την περάτωση της διάπαυσης θερμοκρασίες διαχείμασης (τόσο χαμηλότερες όσο και υψηλότερες) υπογραμμίζει την έκφραση φαινοτυπικής 'ευρωστίας' (phenotypic robustness) υπό συνθήκες θερμοκρασιακής καταπόνησης (Wagner, 2012; Stewart, Parsons & Plotkin, 2012).

Βιολογικοί κύκλοι μεγαλύτεροι του έτους ως αποτέλεσμα έκφρασης 'bet-hedging' στρατηγικών

Το ποσοστό των νυμφών που παραμένουν σε διάπαυση σταδιακά μειώνεται μέχρι τη στιγμή που εκδηλώνεται το μέγιστο της εξόδου των ενηλίκων σε όλες τις μεταχειρίσεις, υποδεικνύοντας ότι ένας συνεχώς αυξανόμενος αριθμός ατόμων

ικανοποιεί τις ανάγκες του σε χαμηλές θερμοκρασίες (για την περάτωση της διάπαυσης) με την αύξηση της διάρκειας έκθεσης στις χαμηλές θερμοκρασίες (Vallo *et al.*, 1976). Κατά το μέγιστο της εξόδου των ενηλίκων δεν καταγράφηκαν νύμφες που να παραμένουν ζωντανές στους 5°C, υποδεικνύοντας ότι η παρατεταμένη διάπαυση δεν είναι υποχρεωτική. Σε αντίθεση με προηγούμενες προβλέψεις (Vallo *et al.*, 1976), η σταδιακή μείωση του ρυθμού ενηλικίωσης δεν σχετίζεται με την αύξηση του ρυθμού θνησιμότητας αλλά με μια βαθμιαία αύξηση του ποσοστού των νυμφών που παραμένουν σε εποχική αδράνεια και για τους τρεις πληθυσμούς. Φαίνεται ότι οι νύμφες της ραγολέτιδας της κερασιάς, κατά το στάδιο της διαχείμασης, διατηρούν την ικανότητα 'επιστροφής' σε εποχική αδράνεια όταν 'αποτύχουν' να γίνουν δέκτες των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων που προκαλούν την έναρξη των διαδικασιών της μορφογένεσης και τη συνέχιση της ανάπτυξης κατά τη χρονική εκείνη περίοδο όπου η περάτωση της διάπαυσης και η έξοδος των ενηλίκων διασφαλίζει την προσαρμογή του πληθυσμού στις τοπικές συνθήκες. 'Επαναλαμβανόμενη διάπαυση' έχει καταγραφεί σε λιβελλούλες (Corbet, 1956; Norling, 1971), σε Λεπιδόπτερα (West, Snellings & Herbek, 1972) και σε έντομα της οικογένειας Myrmeleontidae (antlions) (Furunishi & Masaki, 1982) εξαιτίας μη προβλέψιμων μεταβολών σε περιβαλλοντικές παραμέτρους, όπως η διαθεσιμότητα τροφής και η θερμοκρασία. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η προαιρετικά 'επαναλαμβανόμενη' διάπαυση λαμβάνει χώρα σε ένα επόμενο αναπτυξιακό στάδιο από αυτό της υποχρεωτικής ή προαιρετικής διαχείμασης, όπως για παράδειγμα σε ένα μεταγενέστερο στάδιο της προνυμφικής ανάπτυξης (Saulich, 2010). Αντίθετα, οι νύμφες της ραγολέτιδας της κερασιάς έχουν την ικανότητα να 'επιστρέφουν' σε εποχική αδράνεια *στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο (νύμφη), και ενώ έχουν ήδη ικανοποιηθεί οι ανάγκες σε χαμηλές θερμοκρασίες για την επιτυχή περάτωση της διάπαυσης διάρκειας ενός έτους*. Από την άλλη πλευρά, στις περιπτώσεις όπου δεν ικανοποιούνται οι απαιτήσεις σε χαμηλές θερμοκρασίες για περάτωση της διάπαυσης αναμένεται είσοδος των νυμφών σε παρατεταμένη διάπαυση. Η δυνατότητα των ατόμων ενός πληθυσμού να ανταποκρίνονται σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα που προκαλούν την έκφραση φαινότυπων πέρα από τους αναμενόμενους αποτελεί απόρροια της έκφρασης των στρατηγικών 'bet-hedging' (Scheiner & Holt, 2012).

Η έκφραση των 'bet-hedging' στρατηγικών ευνοείται στις περιπτώσεις όπου οι περιβαλλοντικές συνθήκες αλλάζουν κατά τρόπο μη προβλέψιμο (Simons, 2011). Σε αυτό το πλαίσιο, οι ετήσιες μεταβολές των κλιματικών συνθηκών, όπως αυτές εκφράζονται κυρίως από την εκτός εποχής αύξηση της θερμοκρασίας αλλά και την αύξηση των θερμοκρασιών του χειμώνα, φαίνεται ότι αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες έκφρασης στρατηγικών 'bet-hedging' κατά τη διάρκεια της διάπαυσης

της ραγολέτιδας της κερασιάς. Στις περιπτώσεις όπου οι νύμφες του εντόμου διαχειμάζουν υπό ευνοϊκές για την περάτωση της διάπαυσης θερμοκρασίες, οποιαδήποτε πρόωρη (πριν την απαιτούμενη για την επιτυχή περάτωση της διάπαυσης διάρκεια έκθεσης στις χαμηλές θερμοκρασίες) αύξηση της θερμοκρασίας είναι σε θέση να επιμηκύνει τον βιολογικό κύκλο ορισμένων ατόμων ενός πληθυσμού, επιτρέποντας την ενηλικίωση τους μετά από έναν επιπλέον κύκλο έκθεσης σε χαμηλές-υψηλές θερμοκρασίες, ανάλογα με τον πληθυσμό και τη θερμοκρασία των θερμών-ψυχρών περιόδων έκθεσης (Κεφάλαιο 7, Διάγραμμα 3Π του Παραρτήματος). Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα φυτά που εισέρχονται σε (χειμερινό) λήθαργο απαιτούν συγκεκριμένο ελάχιστο αριθμό μονάδων ψύχους (cold units) για την επιτυχή έκπτυξη των οφθαλμών κατά την ερχόμενη άνοιξη, ανεξάρτητα αν ο μετέπειτα χρόνος έκθεσης σε υψηλές θερμοκρασίες είναι ικανοποιητικός (Harrington, Gould & St. Clair, 2010), υποθέτουμε ότι τα άτομα της ραγολέτιδας της κερασιάς που δρουν ως 'bet hedgers' (και ενηλικιώνονται τα επόμενα χρόνια) αποτελούν 'ασφαλιστική δικλείδα' για την επιβίωση του εκάστοτε πληθυσμού. Ομοίως, η παρατεταμένη έκθεση των νυμφών στις χαμηλές θερμοκρασίες (ή εναλλακτικά η καθυστερημένη αύξηση της θερμοκρασίας κατά την περίοδο της διαχείμασης) προτρέπει ορισμένα από τα άτομα ενός πληθυσμού να 'επιστρέψουν' σε εποχική αδράνεια, αποφεύγοντας πιθανότατα να ενηλικιωθούν 'εκτός εποχής', δεδομένου ότι η διαθεσιμότητα καρπών των φυτών-ξενιστών είναι χρονικά και τοπικά περιορισμένη. Τα παραπάνω άτομα που 'επιστρέφουν', κατά το στάδιο της νύμφης, σε εποχική αδράνεια έχουν τη δυνατότητα να εξέλθουν ως ενήλικα έπειτα από μια τουλάχιστον επιπλέον περίοδο έκθεσης σε χαμηλές θερμοκρασίες (Διάγραμμα 4Π του Παραρτήματος). Στις περιπτώσεις όπου απαραίτητοι για την επιβίωση και αναπαραγωγή πόροι, όπως η παρουσία κατάλληλων για ωτοκία καρπών, ενδέχεται να εκλείψουν λόγω της κλιματικής αλλαγής, η ραγολέτιδα της κερασιάς είναι σε θέση να διασπείρει τον κίνδυνο της εξόδου ενηλίκων 'εκτός εποχής' μέσω της έκφρασης μιας σειράς φαινοτύπων που διαφοροποιούνται ως προς το χρόνο περάτωσης της διάπαυσης βάσει των διαφοροποιημένων μηχανισμών 'bet-hedging' (diversified bet-hedging) (Simons, 2011).

Διάπαυση της ραγολέτιδας της κερασιάς και άνοδος της θερμοκρασίας κατά την ερ'ιοδο διαχείμασης

Η φαινολογία των φυτών-ξενιστών και αυτή των φυτοφάγων εντόμων είναι άμεσα συνδεδεμένες και επηρεάζονται συνήθως με τον ίδιο τρόπο από τις μεταβολές στη θερμοκρασία (Forrest & Thomson, 2011). Για παράδειγμα, χαμηλές θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 3 έως 5°C ικανοποιούν τις απαιτήσεις σε ψύχος

για την διακοπή του υποχρεωτικού λήθαργου των φυτών αλλά, παράλληλα, ικανοποιούν και τις απαιτήσεις σε χαμηλές θερμοκρασίες για την περάτωση της διάπαυσης των νυμφών της ραγολέτιδας της κερασιάς που προέρχονται από πληθυσμούς της κεντρικής Ευρώπης (Vallo *et al.*, 1976). Στο παρόν Κεφάλαιο, εστιάζοντας για πρώτη φορά σε θερμοκρασίες διαχείμασης υψηλότερες των 6°C, βρήκαμε ότι οι νύμφες της ραγολέτιδας της κερασιάς είναι σε θέση να περατώσουν επιτυχώς τη διάπαυσή τους κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους (δηλ. σε ένα κύκλο θερμών-ψυχρών περιόδων) μετά από έκθεση σε θερμοκρασίες $\leq 10^{\circ}\text{C}$. Ακόμα και οι νύμφες από τις σχετικά ψυχρές περιοχές της Δάφνης και του Dossenheim είναι σε θέση να περατώσουν επιτυχώς τη διάπαυσή τους μετά από έκθεση στους 8°C, δηλ. σε θερμοκρασία σχετικά υψηλή σε σχέση με τις επικρατούσες χειμερινές θερμοκρασίες στις δύο περιοχές. Οι υψηλότερες θερμοκρασίες διαχείμασης (που κυμαίνονται μεταξύ 5 και 10°C) είναι περισσότερο ευνοϊκές για την περάτωση της διάπαυσης των νυμφών που προέρχονται από τη θερμή, πεδινή περιοχή των Κ. Νερών σε σχέση με τις νύμφες των δύο άλλων ψυχρότερων περιοχών, υπογραμμίζοντας την προσαρμογή των πληθυσμών του εντόμου στις τοπικές κλιματικές συνθήκες. Μελετώντας με ανάλογο τρόπο νύμφες από την περιοχή της Αγιάς (Θεσσαλία), που είναι μια επίσης θερμή, πεδινή περιοχή σε γεωγραφική εγγύτητα με την περιοχή των Κ. Νερών, επιβεβαιώσαμε την επιτυχή περάτωση της διάπαυσης των νυμφών μετά από έκθεσή τους σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες (8 - 10°C) (Διάγραμμα 6Π του Παραρτήματος). Συνεπώς, οι θερμοκρασίες μέχρι 10°C δεν είναι περιοριστικές για την περάτωση της διάπαυσης των νυμφών που προέρχονται από πληθυσμούς της ραγολέτιδας της κερασιάς που απαντώνται σε σχετικά θερμές περιοχές. Αξίζει να αναφερθεί ότι θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 10°C (που περιορίζουν την περάτωση της διάπαυσης των νυμφών του εντόμου), θεωρούνται λιγότερες αποτελεσματικές και για την διακοπή του λήθαργου των περισσότερων φυτών (Raulier & Bernier, 2000). Η παραπάνω στρατηγική μπορεί να θεωρηθεί ως ένας μηχανισμός αποφυγής μιας πιθανής έλλειψης καρπών-ξενιστών για τα ενήλικα εξαιτίας της μειωμένης καρποφορίας ή της καθυστερημένης ωρίμανσης των καρπών, τα οποία αποτελούν συμπτώματα του παρατεταμένου λήθαργου των δένδρων της κερασιάς που απορρέει από τη μη ικανοποίηση των αναγκών σε ψύχος (Oukabli & Mahhou, 2007; Luedeling *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2011). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το χαμηλό ποσοστό των νυμφών που έδωσαν ενήλικα στους 12°C δεν συνδέεται με αντίστοιχη αύξηση του ποσοστού θνησιμότητας των νυμφών κατά τη περίοδο της διαχείμασης, όπως συμβαίνει σε ορισμένα μονοκυκλικά είδη εντόμων εξαιτίας της εξάντλησης των ενεργειακών αποθεμάτων αλλά το ποσοστό αυτό ήταν αντιστρόφως ανάλογο του ποσοστού των νυμφών που εισέρχονται σε παρατεταμένη

διάπαυση. Θεωρούμε, επομένως, ότι τα άτομα της ραγολέτιδας της κερασιάς θα ανταποκριθούν στην αύξηση της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της περιόδου διαχείμασης μεταβάλλοντας τη διάρκεια του βιολογικού τους κύκλου, μειώνοντας τις πιθανότητες εξαφάνιση των πληθυσμών από τις επηρεαζόμενες περιοχές. Από την άλλη πλευρά, οι πολύ χαμηλές θερμοκρασίες, όπως οι 0°C, βρέθηκαν να είναι λιγότερο αποτελεσματικές σε σχέση με τις σχετικά υψηλότερες θερμοκρασίες για την ικανοποίηση των αναγκών σε ψύχος των φυτών (Harrington *et al.*, 2010). Στην περίπτωση αυτή, οι νύμφες της ραγολέτιδας της κερασιάς ανταποκρίνονται κατ' ανάλογο τρόπο στις τόσο χαμηλές θερμοκρασίες (καθυστερώντας την περάτωση της διάπαυσης), αποφεύγοντας φαινόμενα έλλειψης συγχρονισμού με τη φαινολογία των καρπών των φυτών-ξενιστών. Συνεπώς, από τα αποτελέσματά μας προκύπτει ότι θερμοκρασίες διαχείμασης που κυμαίνονται από 3 έως 10°C μπορούν να θεωρηθούν ευνοϊκές για την περάτωση της διάπαυσης των νυμφών της ραγολέτιδας της κερασιάς. Ωστόσο, οι τρεις εξεταζόμενοι πληθυσμοί ανταποκρίνονται διαφορετικά στις χαμηλότερες και υψηλότερες θερμοκρασίες, εναρμονιζόμενοι με την αντίδραση των φυτών στις αντίστοιχες ακραίες θερμοκρασίες.

Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας, η ραγολέτιδα της κερασιάς φαίνεται να έχει αναπτύξει μια ιδιαίτερα πολύπλοκη και δυναμική στρατηγική διάπαυσης προκειμένου να αντιμετωπίσει τις περιβαλλοντικές μεταβολές στο χώρο και το χρόνο, η οποία συνδυάζει τη δυνατότητα για τοπική προσαρμογή στα εκάστοτε ενδαιτήματα των πληθυσμών της και την έκφραση (διαφοροποιημένων) στρατηγικών 'bet-hedging'. Σε αυτό το πλαίσιο, οι πληθυσμοί του εντόμου προσαρμόζονται στις τοπικές περιβαλλοντικές συνθήκες διαχείμασης των ενδαιτημάτων τους, ενώ οι 'bet-hedging' στρατηγικές είναι απαραίτητες για την αντιμετώπιση των απρόβλεπτων ετήσιων μεταβολών της θερμοκρασίας 'μεταφέροντας' στο επόμενο έτος (έτη) όλα εκείνα τα άτομα ενός πληθυσμού που 'απέτυχαν' να ενηλικιωθούν ή 'επέλεξαν' να μη δώσουν ενήλικα κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους. Κατά συνέπεια, η γεωγραφική παραλλακτικότητα στην περάτωση της διάπαυσης αλλά και η διαφοροποίηση της διάρκειας του βιολογικού κύκλου σε επίπεδο πληθυσμό απορρέουν από την προσαρμογή των πληθυσμών και την ανταπόκριση των ατόμων του κάθε πληθυσμού στα γενετικά και περιβαλλοντικά ερεθίσματα (Leimar, 2009; Shea, 2012). Επιπλέον, οι σχετικά υψηλές θερμοκρασίες, σε αντίθεση με τις χαμηλές, αποδείχθηκαν ευνοϊκές για την περάτωση της διάπαυσης. Χρειάζονται περαιτέρω μελέτες, όπου θα χρησιμοποιηθούν πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς από ένα ευρύτερο φάσμα ενδαιτημάτων για να διαφωτίσουν περισσότερες πτυχές της

υποχρεωτικής διάπαυσης των ολοκυκλικών εντόμων, ειδικότερα υπό συνθήκες ανόδου της θερμοκρασίας κατά την περίοδο διαχείμασης.

Βιβλιογραφία

- Augustinos AA, Asimakopoulou AK, Moraiti CA, Mavragani-Tsipidou P, Papadopoulos NT, Bourtzis, K. 2013.** Microsatellite and *Wolbachia* analysis in *Rhagoletis cerasi* natural populations: population structuring and multiple infections. *Ecology and Evolution* in press.
- Augustinos AA, Asimakopoulou AK, Papadopoulos NT, Bourtzis, K. 2011.** Cross-amplified microsatellites in the European cherry fly, *Rhagoletis cerasi*: medium polymorphic-highly informative markers. *Bulletin of Entomological Research* **101**: 45-52.
- Baker CRB, Miller GW. 1978.** The effect of temperature on the post-diapause development on four geographical populations of the European cherry fruit fly (*Rhagoletis cerasi*). *Entomologia Experimentalis et Applicata* **23**: 1-13.
- Bale JS, Hayward SAL. 2010.** Insect overwintering in a changing climate. *The Journal of Experimental Biology* **213**: 980-994.
- Bale JS, Masters GJ, Hodkinson ID, Awmack C, Bezemer TM, Brown VK. et al. 2002.** Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect herbivores. *Global Change Biology* **8**: 1–16.
- Belozarov VN. 2009.** New aspects in investigations of diapause and non-diapause dormancy types in insects and other arthropods. *Entomological Review* **89**: 127-136.
- Boller EF, Prokopy RJ. 1976.** Bionomics and management of *Rhagoletis*. *Annual Review of Entomology* **21**: 223-246.
- Boller EF, Bush GL. 1974.** Evidence for genetic variation in populations of the European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae) based on physiological parameters and hybridization experiments. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **17**: 279-293.
- Bosch J, Kemp WP. 2004.** Effect of pre-wintering and wintering temperature regimes on weight loss, survival, and emergence time in the mason bee *Osmia cornuta* (Hymenoptera: Megachilidae). *Apidologie* **35**: 469–479.
- Bosch J, Blas M. 1994.** Effect of over-wintering and incubation temperatures on adult emergence in *Osmia cornuta* Latr (Hymenoptera: Megachilidae). *Apidologie* **25**: 265-277.
- Bradshaw WE, Holzapfel CM. 2007.** Evolution of animal photoperiodism. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **38**: 1–25.
- Christensen JH, Hewitson B, Busuioac A, Chen A, Gao X, Held I, Jones R, Kolli RK, Kwon W-T, Laprise R, Magaña Rueda V, Mearns L, Menéndez CG, Räisänen J, Rinke A, Sarr A, Whetton P. 2007.** Regional Climate Projections. In: Solomon S,

Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL, eds. *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge, United Kingdom and New York, USA: Cambridge University Press, 848-940.

Chung U, Mack L, Yun JI, Kim S-H. 2011. Predicting the timing of cherry blossoms in Washington, DC and Mid-Atlantic States in response to climate change. *PLoS ONE* **6**: e27439.

Colles A, Liow LH, Prinzing A. 2009. Are specialists at risk under environmental change? Neocological, paleoecological and phylogenetic approaches. *Ecology Letters* **12**: 849-863.

Corbet PS. 1956. Environmental factors influencing the induction and termination of diapause in the Emperor Dragonfly, *Anax imperator* Leach (Odonata; Aeshnidae). *Journal of Experimental Biology* **33**: 1–14.

Dean RL, Hartley JC. 1977. Egg diapause in *Ephippiger* (Orthoptera: Tettigoniidae). I. The incidence, variable duration, and elimination of the initial diapause. *The Journal of Experimental Biology* **66**: 173-183.

Demont M, Blanckenhorn WU. 2008. Genetic differentiation in diapause response along a latitudinal cline in European yellow dung fly populations. *Ecological Entomology* **33**: 197–201.

Demont M, Blanckenhorn WU, Hisken DJ, Garner TWJ. 2008. Molecular and quantitative genetic differentiation across Europe in yellow dung flies. *Journal of Evolutionary Biology* **21**: 1492-1503.

Fielding CA, Whittaker JB, Butterfield JEL, Coulson JC. 1999. Predicting responses to climate change: the effects of altitude and latitude on the phenology of the Spittlebug *Neophilaenus lineatus*. *Functional Ecology* **13**: 65-73.

Fischer K, Karl I. 2010. Exploring plastic and genetic responses to temperature variation using copper butterflies. *Climate Research* **43**: 17-30.

Fletcher BS. 1989. Life history strategies of Tephritid fruit flies. In: Robinson S, Hooper G, eds. *Fruit flies, their biology, natural enemies and control. World crop pests*. Amsterdam: Elsevier, 195–208.

Forrest JRK, Thomson JD. 2011. An examination of synchrony between insect emergence and flowering in Rocky Mountain meadows. *Ecological Monographs* **81**: 469-491.

Furunishi S, Masaki S. 1982. Seasonal life cycle in two species of ant-lion (Neuroptera: Myrmeleontidae). *Japanese Journal of Ecology* **32**: 7–13.

- Giannakopoulos C, Le Sager P, Bindi M, Moriondo M, Kostopoulou E, Goodess CM. 2009.** Climatic changes and associated impacts in the Mediterranean resulting from a 2 °C global warming. *Global and Planetary Change* **68**: 209-224.
- Giorgi F, Lionello P. 2008.** Climate change projections for the Mediterranean region. *Global and Planetary Change* **63**: 90-104.
- Gray DR, Ravlin FW, Briane JA. 2001.** Diapause in the gypsy moth: a model of inhibition and development. *Journal of Insect Physiology* **47**: 173-184.
- Harrington CA, Gould PJ, St. Clair JB. 2010.** Modelling the effects of winter environment on dormancy release of Douglas-fir. *Forest Ecology and Management* **259**: 798-808.
- Hereford J. 2009.** A quantitative survey of local adaptation and fitness trade-offs. *American Naturalist* **173**: 579–588.
- Higaki M. 2005.** Effect of temperature on the termination of prolonged larval diapause in the chestnut weevil *Curculio sikkimensis* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Insect Physiology* **51**: 1352–1358
- Higaki M, Ando Y. 2000.** Effect of temperature on the termination of prolonged initial diapause in *Eobiana japonioca* (Bolivar) (Orthoptera: Tettigoniidae). *Entomological Science* **3**: 219-226.
- Hodek I. 1996.** Diapause development, diapause termination and the end of diapause. *European Journal of Entomology* **93**: 475-487.
- Hodkinson ID. 2005.** Terrestrial insects along elevation gradients: species and community responses to altitude. *Biological Reviews* **80**: 489-513.
- Hoffmann AA, Sgrò CM. 2011.** Climate change and evolutionary adaptation. *Nature* **470**: 479-485.
- Jenouvrier S, Visser ME. 2011.** Climate change, phenological shifts, eco-evolutionary responses and population viability: toward a unifying predictive approach *International Journal of Biometeorology* **55**: 905-919.
- Kneifl V, Paprštei, F, Kňourková J. 1997.** Dispersion of cherry fruit fly (*Rhagoletis cerasi* L.). *Vedecke Prace Ovocnarsk* **15**: 89–92.
- Košťál V. 2006.** Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of Insect Physiology* **52**: 113–127.
- Košťál V, Doležal P, Rozsypal J, Moravcová M, Zahradníčková H, Šimek P. 2011.** Physiological and biochemical analysis of overwintering and cold tolerance in two Central European populations of the spruce bark beetle, *Ips typographus*. *Journal of Insect Physiology* **57**: 1136-1146.
- Leimar O. 2009.** Environmental and genetic cues in the evolution of phenotypic polymorphism. *Evolutionary Ecology* **23**: 125-135.

- Luedeling E, Girvetz EH, Semenov MA, Brown PH. 2011.** Climate change affects winter chill for temperate fruit and nut trees. *PLoS ONE* **6**: e20155.
- Luedeling E, Zhang M, Girvetz EH. 2009.** Climatic changes lead to declining winter chill for fruit and nut trees in California during 1950–2099. *PLoS ONE* **4**: e6166.
- Lyons LA. 1970.** Some population features of reproductive capacity in *Neodiprion swainei* (Hymenoptera, Diprionidae). *Canadian Entomologist* **102**: 68–84.
- Maeta Y. 1978.** Comparative studies on the biology of the bees of the genus *Osmia* in Japan, with special reference to their management for pollination of crops (Hymenoptera, Megachilidae). *Bulletin of the Tohoku National Agricultural Experimental Station* **57**: 1-221.
- McKinney M. 1997.** Extinction vulnerability and selectivity: combining ecological and paleontological views. *Annual Review of Ecology and Systematics* **28**: 495–516.
- Menu F, Desouhant E. 2002.** Bet-hedging for variability in life-cycle duration: bigger and later-emerging chestnut weevils have increased probability of a prolonged diapause. *Oecologia* **132**: 167-174.
- Mercader RJ, Scriber JM. 2008.** Asymmetrical thermal constraints on the parapatric species boundaries of two widespread generalist butterflies. *Ecological Entomology* **33**: 537-545.
- Miller-Rushing AJ, Katsuki T, Primack RB, Ishii Y, Lee SD, Higuchi H. 2007.** Impact of global warming on a group of related species and their hybrids: cherry tree (Rosaceae) flowering at Mt. Takao, Japan. *American Journal of Botany* **94**: 1470-1478.
- Neilson WTA. 1962.** Effects of temperature on development of overwintering pupae of the apple maggot, *Rhagoletis pomonella* (Walsh). *Canadian Entomologist* **94**: 924–928.
- Norling U. 1971.** The life history and seasonal regulation of *Aeshna viridis* Eversm. in Southern Sweden (Odonata). *Scandinavian Entomology* **2**: 170–190.
- Oukabli A, Mahhou A. 2007.** Dormancy in sweet cherry (*Prunus savium* L.) under Mediterranean climatic conditions. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* **11**: 133-139.
- Papanastasiou AS, Nestel D, Diamantidis AD, Nakas CT, Papadopoulos NT. 2011.** Physiological and biological patterns of a highland and a coastal population of the European cherry fruit fly during diapause. *Journal of Insect Physiology* **57**: 83-93.
- Poisot T, Bever JD, Nemri A, Thrall PH, Hochberg ME. 2011.** A conceptual framework for the evolution of ecological specialisation. *Ecology Letters* **14**: 841–851.

- Rader RB, Belk MC, Shiozawa DK, Crandall KA. 2005. Empirical tests for ecological exchangeability. *Animal Conservation* 8: 239-247.
- Rank GH, Rank FP. 1989. Diapause intensity in a French univoltine and a Saskatchewan commercial strain of *Megachile rotundata* (Fab.). *Canadian Entomologist* 121: 141-148.
- Raulier F, Bernier PY. 2000. Predicting the date of leaf emergence for sugar maple across its native range. *Canadian Journal of Forest Research* 30: 1429–1435.
- Robinet C, Roques A. 2010. Direct impact of recent climate warming on insect populations. *Integrative Zoology* 5: 132-142.
- Santiago-Alvarez C, Quesada-Moraga E, Hernández-Crespo P. 2003. Diapause termination and post-diapause development in the Mediterranean locust *Dociostaurus maroccanus*. *Journal of Applied Entomology* 127: 369-373.
- Saulich AKh. 2010. Long life cycles in insects. *Entomological Review* 90: 1127-1152.
- Scheiner SM, Holt RD. 2012. The genetics of phenotypic plasticity. X. Variation versus uncertainty. *Ecology and Evolution* 2: 751-765.
- Shea N. 2012. Inherited representations are read in development. *The British Journal for the Philosophy of Science* 0: 1-31.
- Simons AM. 2011. Modes of response to environmental change and the elusive empirical evidence for bet-hedging. *Proceedings of the Royal Society B* 278: 1601-1609.
- Sorvari J, Haatanen M-K, Verterlund S-R. 2011. Combined effects of overwintering temperature and habitat degradation on survival of boreal wood ant. *Journal of Insect Conservation* 15: 727-731.
- Soula B, Menu F. 2005. Extended life cycle in the chestnut weevil: prolonged or repeated diapause? *Entomologia Experimentalis et Applicata* 115: 333–340.
- Stewart A, Parsons TL, Plotkin JB. 2012. Environmental robustness and the adaptability of populations. *Evolution* 66: 1598-1612.
- Tauber MJ, Tauber CA, Masaki S. 1986. *Seasonal adaptations of insects*. Oxford: Oxford University Press.
- Tolika CK, Zanis P, Anagnostopoulou C. 2012. Regional climate change scenarios for Greece: future temperature and precipitation projections from ensembles of RMCs. *Global NEST Journal* 14: 407-421.
- Tyukmaeva VI, Salminen TS, Kankare M, Knott KE, Hoikkala A. 2011. Adaptation to a seasonally varying environment: a strong latitudinal cline in reproductive diapause combined with high gene flow in *Drosophila montana*. *Ecology and Evolution* 1: 160-168.

- Vallo V, Remund U, Boller EF. 1976.** Storage conditions of stock-piled diapausing pupae of *Rhagoletis cerasi* for obtaining high emergence rates. *Entomophaga* **21**: 251-256.
- Vanhanen H, Veteli TO, Pailvinen S, Kellomaki S, Niemala P. 2007.** Climate change and range shifts in two insect defoliators: Gypsy moth and nun moth – A model study. *Silva Fennica* **41**: 621–38.
- Wagner A. 2012.** The role of robustness in phenotypic adaptation and innovation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **279**: 1249-1258.
- Wang X-P, Yang Q-S, Zhou X-M, Xu S, Lei C-L. 2009.** Effects of photoperiod and temperature on diapause induction and termination in the swallowtail, *Sericinus montelus*. *Physiological Entomology* **34**: 158–162.
- Wei X-T, Zhou Y-C, Xiao H-J, Wang X-P, Bao Z-M, Xue F-S. 2010.** Relationship between the natural duration of diapause and post-diapause reproduction in the cabbage beetle, *Colaphellus bowringi* (Coleoptera: Chrysomelidae). *European Journal of Entomology* **107**: 337–340.
- West DA, Snellings WM, Herbek TA. 1972.** Pupal color dimorphism and its environmental control in *Papilio polyxenesasterius* Stoll (Lepidoptera: Papilionidae). *Journal of the New York Entomological Society* **80**: 205– 211.
- Williams JB, Shorthouse JD, Lee RE. 2003.** Deleterious effects of mild simulated overwintering temperatures on survival and potential fecundity of rose-galling *Diplolepis* wasps (Hymenoptera: Cynipidae). *Journal of Experimental Zoology* **298**: 23-31.
- Zhao L-Q, Zhu D-H, Liu Z-w. 2010.** Geographical variation in diapause intensity and threshold temperature in the eggs of a cricket, *Telogyllus emma* (Orthoptera: Gryllidae). *Entomological News* **121**: 236-242.

5. ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΗ ΜΕΤΑΔΙΑΠΑΥΤΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΝΥΜΦΩΝ ΤΗΣ ΡΑΓΟΛΕΤΙΔΑΣ ΤΗΣ ΚΕΡΑΣΙΑΣ

Περίληψη

Στο παρόν κεφάλαιο εξετάστηκε η παρουσία γεωγραφικής παραλλακτικότητας στη μεταδιαπαυτική ανάπτυξη των νυμφών της ραγολετίδας της κερασιάς. Συγκεκριμένα, εκτιμήθηκε η μεταδιαπαυτική ανάπτυξη αρσενικών και θηλυκών ατόμων που εξήλθαν κατά το πρώτο έτος της διάπαυσης και προέρχονταν από: α) όψιμους πληθυσμούς με χαμηλά επίπεδα γονιδιακής ροής, β) πρώιμους πληθυσμούς με υψηλά επίπεδα γονιδιακής ροής και γ) πρώιμους και όψιμους πληθυσμούς με ποικίλα επίπεδα γονιδιακής ροής που εκτέθηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες κατά τη μεταδιαπαυτική περίοδο. Επίσης, εξετάστηκε η επίδραση της παρατεταμένης διάπαυσης στη μεταδιαπαυτική ανάπτυξη γενετικά απομονωμένων και με διαφορετικά οικολογικά χαρακτηριστικά πληθυσμών. Βρέθηκε ότι ο πληθυσμός είναι σημαντικός εκτιμητής της διάρκειας της μεταδιαπαυτικής ανάπτυξης των ατόμων της ραγολετίδας της κερασιάς που ενηλικιώνονται κατά το πρώτο έτος διάπαυσης, ανεξαρτήτως της γενετικής απόστασης και της παρουσίας οικολογικών διαφορών μεταξύ των πληθυσμών. Η μεταδιαπαυτική ανάπτυξη των νυμφών επιταχύνεται με τη μείωση της έντασης της διάπαυσης, αν και η παρατεταμένη έκθεση σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι πιθανό να αυξήσει τη διάρκεια της μεταδιαπαυτικής περιόδου των ατόμων ενός πληθυσμού. Επίσης, ο ρυθμός μείωσης της διάρκειας της μεταδιαπαυτικής περιόδου με την αύξηση της θερμοκρασίας κατά τη μεταδιαπαυτική περίοδο διέφερε μεταξύ των πληθυσμών. Αντίθετα, ο πληθυσμός δεν αποτελεί σημαντικό εκτιμητή του χρόνου που απαιτείται για την έξοδο των ενηλίκων μετά από την έκθεση νυμφών με παρατεταμένη διάπαυση στις υψηλές θερμοκρασίες.

5.1. Εισαγωγή

Η μεταδιαπαυτική ανάπτυξη χαρακτηρίζεται από τη μορφογένεση των ατόμων και αποτελεί σημαντικό στάδιο της αναπτυξιακής διάπαυσης των εντόμων (Tauber, Tauber & Masaki, 1986; Košťál, 2006). Προκειμένου να ξεκινήσει η μεταδιαπαυτική δραστηριότητα και ανάπτυξη των εντόμων, η θερμοκρασία του περιβάλλοντος πρέπει να ξεπεράσει τη θερμοκρασία-ουδό ανάπτυξης που είναι χαρακτηριστική για κάθε είδος. Η ταχύτητα της μεταδιαπαυτικής ανάπτυξης εξαρτάται τόσο από την ένταση της διάπαυσης όσο και από τις επικρατούσες θερμοκρασίες κατά τη

μεταδιαπαιτική δραστηριότητα των εντόμων (Hodek, 1966; Hodek & Hodková, 1988; AliNiasee, 1988). Παράγοντες που επιταχύνουν την περάτωση της διάπαυσης στα άτομα ενός πληθυσμού, όπως οι σχετικά υψηλές θερμοκρασίες κατά την περίοδο διαχείμασης και η παρατεταμένη έκθεση σε χαμηλές θερμοκρασίες, μειώνουν τη διάρκεια της μεταδιαπαιτικής περιόδου. Σχετικά υψηλές θερμοκρασίες κατά τη μεταδιαπαιτική περίοδο επίσης επιταχύνουν την έξοδο των ενηλίκων (Baker & Miller, 1978; van Zoelen & Kusters, 1986; Bosch & Kemp, 2003; 2004; Sgolastra *et al.*, 2010). Διαφορές στη διάρκεια της μεταδιαπαιτικής ανάπτυξης έχουν αναφερθεί μεταξύ των πληθυσμών που προέρχονται από διάφορες γεωγραφικές περιοχές της εύκρατης ζώνης (Tauber & Tauber, 1976; Danks, 1987; Teixeira & Polavarapu, 2002; Smith 1988, αλλά βλέπε Régnière, 1990). Επιπλέον, φυλετικές διαφορές στη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη απαντώνται συστηματικά σε είδη των Υμενοπτέρων και των Λεπιδοπτέρων, όπου η έξοδος των αρσενικών προηγείται της αντίστοιχης των θηλυκών, ένα φαινόμενο γνωστό ως 'πρωτανδρία' (Wiklund & Fagerstrom, 1977; Eller, Tumlinson & Lewis, 1990; Buhl *et al.*, 2008; Forbes, Pelz-Stelinski & Isaacs, 2010). Στην περίπτωση αυτή, τα βραχύβια αρσενικά που εμφανίζονται νωρίτερα στον αγρό πλεονεκτούν κατά τη σύζευξη, καθώς τα θηλυκά ζευγαρώνουν μόνο μία φορά στη ζωή τους, σχεδόν αμέσως μετά την ενηλικίωσή τους (Hastings, 1989). Συνεπώς, η μεταδιαπαιτική ανάπτυξη των εντόμων εξαρτάται τόσο από ενδογενείς (φύλο, πληθυσμός) όσο και από εξωγενείς (θερμοκρασία) παράγοντες και σχετίζεται άμεσα με την ένταση της διάπαυσης των ατόμων ενός πληθυσμού.

Η περάτωση της διάπαυσης των νυμφών της ραγολέτιδας της κερασιάς πραγματοποιείται το χειμώνα (Ιανουάριο-Φεβρουάριο) (Papanastasiou *et al.*, 2011) και οι νύμφες εισέρχονται στο στάδιο της εποχικής μεταδιαπαιτικής αδράνειας μέχρι η θερμοκρασία να ξεπεράσει τους 5°C (θερμοκρασία-ουδός ανάπτυξης), επιτρέποντας τη μεταδιαπαιτική δραστηριότητα (Baker & Miller, 1978). Ωστόσο, ένα ποσοστό των νυμφών που καθορίζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες (θερμοκρασία και διάρκεια έκθεσης σε χαμηλές θερμοκρασίες) είναι δυνατόν να παρατείνει την περίοδο εποχικής αδράνειας (παρατεταμένη διάπαυση ή 'επιστροφή' σε εποχική αδράνεια) (Baker & Miller, 1978; Vallo, Remund & Boller, 1976; Κεφάλαιο 4). Για τις νύμφες που δίνουν ενήλικα κατά το πρώτο έτος διάπαυσης, η διάρκεια της μεταδιαπαιτικής περιόδου μειώνεται σταδιακά όσο αυξάνεται η διάρκεια έκθεσης στις χαμηλές θερμοκρασίες, αν και ο ρυθμός επιτάχυνσης της μεταδιαπαιτικής ανάπτυξης μειώνεται κατά την περάτωση της διάπαυσης (Baker & Miller, 1978). Διαφορές στη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη έχουν παρατηρηθεί μεταξύ των Ευρωπαϊκών πληθυσμών του εντόμου, οι οποίες έχουν αποδοθεί είτε στη γενετική παραλλακτικότητα (Boller & Bush, 1974) είτε στην παραλλακτικότητα στην ένταση

της διάπαυσης μεταξύ των πρώιμων και όψιμων πληθυσμών (Baker & Miller, 1978). Επιπλέον, οι Baker & Miller (1978) αναφέρουν ότι για τα ενήλικα που εξέρχονται από νύμφες με παρατεταμένη διάπαυση αναμένεται 'πρωιμότερη της αναμενόμενης' έξοδος στον αγρό. Ωστόσο, η επίδραση της παρατεταμένης διάπαυσης των νυμφών στη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη διαφορετικών πληθυσμών του εντόμου δεν έχει μέχρι σήμερα μελετηθεί.

Στο παρόν Κεφάλαιο διερευνήθηκαν οι παράγοντες που επηρεάζουν τη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη των νυμφών της ραγολέτιδας της κερασιάς. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν: α) η επίδραση της γενετικής απόστασης και των οικολογικών χαρακτηριστικών των πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς και της επικρατούσας (κατά τη μεταδιαπαιτική δραστηριότητα) θερμοκρασίας στη διάρκεια της μεταδιαπαιτικής ανάπτυξης των νυμφών που δίνουν ενήλικα κατά το πρώτο έτος της διάπαυσης και β) η επίδραση της παρατεταμένης διάπαυσης στη διάρκεια της μεταδιαπαιτικής ανάπτυξης των νυμφών γεωγραφικά απομονωμένων πληθυσμών του εντόμου. Υποθέσαμε ότι: α) υπάρχει γεωγραφική παραλλακτικότητα στη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη των νυμφών με διάπαυση ενός έτους που προέρχονται τόσο από όψιμους πληθυσμούς με χαμηλή γονιδιακή ροή όσο και από πρώιμους πληθυσμούς με υψηλή γονιδιακή ροή, β) η μείωση της διάρκειας της μεταδιαπαιτικής περιόδου των νυμφών με την αύξηση της σχετικής θερμοκρασίας (κατά τη μεταδιαπαιτική περίοδο) διαφέρει μεταξύ των πρώιμων και όψιμων πληθυσμών του εντόμου με διαφορετικά επίπεδα γονιδιακής ροής και γ) η μεταδιαπαιτική ανάπτυξη των νυμφών με παρατεταμένη διάπαυση διαφέρει μεταξύ των γενετικά απομονωμένων και οικολογικά διαφορετικών πληθυσμών του εντόμου. Σε κάθε περίπτωση, οι νύμφες των εξεταζόμενων πληθυσμών δεν διαφέρουν ως προς την ένταση της διάπαυσής τους, δηλαδή δεν υπήρχαν διαφορές στα ποσοστά περάτωσης της διάπαυσης μεταξύ των εξεταζόμενων πληθυσμών.

5.2. Υλικά και Μέθοδοι

5.2.1. Πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς

Χρησιμοποιήθηκαν δέκα πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς, εννέα από την Ελλάδα και ένας από τη Γερμανία. Οι ελληνικοί πληθυσμοί προέρχονταν από: α) τη Μακεδονία (Μίκρα Θεσσαλονίκης, Δάφνη Κοζάνης, Ράχη Πιερίας), β) τη Θεσσαλία (Καμάρι Μαγνησίας, Καλλιπεύκη και Αγία Λάρισας, Περούλι Τρικάλων, Καρδίτσα) και γ) την Πελοπόννησο (Κερνίτσα Αχαΐας). Ο γερμανικός πληθυσμός προέρχονταν από την επαρχία Baden-Württemberg (Dossenheim, Karlsruhe) (Εικόνα 14, Πίνακας

8). Η φαινολογία των καρπών (κεράσια, αγριοκέρασα) διαφέρει μεταξύ των παραπάνω περιοχών. Όψιμη ωρίμανση (μέσα Ιουνίου-μέσα Ιουλίου) παρατηρείται στις περιοχές του Dossenheim, της Δάφνης, της Καλλιπεύκης και του Περτουλίου, ενώ η ωρίμανση των καρπών στις υπόλοιπες περιοχές σημειώνεται περίπου ένα μήνα νωρίτερα.

Πρόσφατα, μελετήθηκε η γενετική δομή των εξεταζόμενων πληθυσμών χρησιμοποιώντας ουδέτερους μοριακούς δείκτες και προέκυψε ότι όλοι οι εξεταζόμενοι ελληνικοί πληθυσμοί ανήκουν σε μία ομάδα και συνδέονται μεταξύ τους με γονιδιακή ροή ενώ ο γερμανικός πληθυσμός συνδέεται με χαμηλότερα επίπεδα γονιδιακής ροής με τους ελληνικούς πληθυσμούς. Ο πληθυσμός της Κερνίτσας θεωρείται γενετικά απομονωμένος σε σχέση με τους υπόλοιπους ελληνικούς και το γερμανικό πληθυσμό (Augustinos *et al.*, 2011;2013).



Εικόνα 14. Χάρτης των περιοχών από όπου προέρχονται οι πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν Κεφάλαιο.

Πίνακας 8. Γεωγραφικά και οικολογικά (φαινολογία καρπών-ξενιστών) χαρακτηριστικά των ενδιαιτημάτων των πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν Κεφάλαιο.

Πληθυσμός	Γεωγραφικό πλάτος	Γεωγραφικό μήκος	Υψόμετρο (μ.)	Φαινολογία καρπών-ξενιστών
Dossenheim (Karlsruhe)	N 49°27'0''	E 8°40'0''	153	όψιμοι
Μίκρα (Θεσσαλονίκη)	N 40°38'19''	E 22°56'43''	43	πρώιμοι
Δάφνη (Κοζάνη)	N 40°17'8''	E 21°8'53''	1.050	όψιμοι
Ράχη (Πιερία)	N 40°14'33''	E 22°21'33''	247	πρώιμοι
Καλλιπεύκη (Λάρισα)	N 39°58'0''	E 22°27'37''	1.054	όψιμοι
Αγιά (Λάρισα)	N 39°43'04''	E 22°45'49''	152	πρώιμοι
Καρδίτσα	N 39°36'0''	E 21°92'0''	127	πρώιμοι
Καμάρι (Μαγνησία)	N 39°34'47''	E 22°55'40''	99	πρώιμοι
Περτούλι (Τρίκαλα)	N 39°32'20''	E 21°27'58''	1.120	όψιμοι
Κερνίτσα (Αχαΐα)	N 38°07'60''	E 22°13'0''	592	πρώιμοι

5.2.2. Πειραματική διαδικασία

Νύμφες της ραγολέτιδας της κερασιάς συλλέχθηκαν από προσβεβλημένα κεράσια και αγριοκέρασα των περιοχών από όπου προέρχονται οι εξεταζόμενοι πληθυσμοί του εντόμου (Κεφάλαιο 2). Οι νύμφες εκτέθηκαν σε χαμηλές θερμοκρασίες (3 - 5°C) προκειμένου να περατώσουν τη διάπαυση.

5.2.2.1. Γεωγραφική παραλλακτικότητα στη μεταδιαπαυτική ανάπτυξη νυμφών με διάπαυση ενός έτους

Για κάθε πληθυσμό, η ένταση της (υποχρεωτικής) διάπαυσης (διάπαυση ≤ 1 έτος) εκφράστηκε ως τρεις διακριτές περιόδους βάσει του ποσοστού των νυμφών που περάτωσαν τη διάπαυση. Συγκεκριμένα, η πρώτη περίοδος αναφέρεται στο χρόνο που απαιτείται μέχρι ένα ποσοστό 20-40% των νυμφών ενός πληθυσμού να δώσει ενήλικα πριν την περάτωση της διάπαυσης του πληθυσμού (πριν το μέγιστο της εξόδου των ενήλικων) (νύμφες 1^{ης} περιόδου), η δεύτερη περίοδος αντιπροσωπεύει το χρόνο που απαιτείται μέχρι ένα ποσοστό 60-80% των νυμφών να δώσει ενήλικα

(νύμφες 2^{ης} περιόδου), η οποία συμπίπτει με την περάτωση της διάπαυσης και το μέγιστο της εξόδου των ενηλίκων ενός πληθυσμού και η τρίτη περίοδος αναφέρεται στο χρόνο που απαιτείται ώστε ένα ποσοστό $\leq 40\%$ των νυμφών να δώσει ενήλικα μετά την περάτωση της διάπαυσης του πληθυσμού, δηλ. μετά το μέγιστο της εξόδου των ενηλίκων (νύμφες 3^{ης} περιόδου). Σημειώνεται ότι ο χρόνος έκθεσης των νυμφών στις χαμηλές θερμοκρασίες για να επιτευχθεί το ποσοστό περάτωσης της διάπαυσης που αντιστοιχεί σε καθεμία από τις τρεις περιόδους αναμένεται να διαφέρει μεταξύ των πληθυσμών με διαφορετική ένταση διάπαυσης, όπως π.χ. μεταξύ αυτών που προέρχονται από οικολογικά διαφορετικά ενδιαιτήματα, λόγω της προσαρμογής στα τοπικά ενδιαιτήματα (Κεφάλαιο 4).

Για να εξεταστεί η γεωγραφική παραλλακτικότητα στη διάρκεια της μεταδιαπαυτικής περιόδου των νυμφών που δίνουν ενήλικα κατά το πρώτο έτος, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα νυμφών που προέρχονταν από πληθυσμούς του εντόμου που βρίσκονταν στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο περάτωσης της διάπαυσης, δηλ. δεν διέφεραν ως προς το ποσοστό περάτωσης της διάπαυσης (1^η περίοδο, 2^η περίοδο ή 3^η περίοδο). Σε αυτό το πλαίσιο, πιθανή γεωγραφική παραλλακτικότητα στη διάρκεια της μεταδιαπαυτικής ανάπτυξης δεν θα μπορεί να αποδοθεί στο διαφορετικό χρόνο περάτωσης της διάπαυσης των εξεταζόμενων πληθυσμών. Οι μεταχειρίσεις που πραγματοποιήθηκαν είναι οι παρακάτω:

Όψιμοι πληθυσμοί με χαμηλή γονιδιακή ροή

Προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση της γενετικής απόστασης στη διάρκεια της μεταδιαπαυτικής ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκαν νύμφες από τους πληθυσμούς της Δάφνης (Κοζάνη) και του Dossenheim (Karlsruhe). Οι πληθυσμοί της Δάφνης και του Dossenheim είναι γεωγραφικά απομονωμένοι και η γονιδιακή ροή μεταξύ τους είναι σχετικά περιορισμένη. Ωστόσο, οι νύμφες των παραπάνω πληθυσμών έχουν τις ίδιες απαιτήσεις σε χαμηλές θερμοκρασίες για την περάτωση της διάπαυσης, δηλ. οι πληθυσμοί έχουν ίδιας έντασης διάπαυση (Κεφάλαιο 4). Οι νύμφες παρέμειναν στους 25 ± 1 °C για 2 μήνες και στη συνέχεια εκτέθηκαν στους 5 ± 1 °C για διάστημα ικανό ώστε η περάτωση της διάπαυσης να κυμανθεί σε ποσοστό 20-40% πριν το μέγιστο της εξόδου των ενηλίκων (1^η περίοδος), 60-80% κατά το μέγιστο της ενηλικίωσης (2^η περίοδος) και $\leq 40\%$ μετά το μέγιστο της εξόδου των ενηλίκων (3^η περίοδος). Συγκεκριμένα, οι νύμφες από τη Δάφνη παρέμειναν στους 5 ± 1 °C για 3-3.5 μήνες, 4.5-6.5 μήνες και 7.5-8.5 μήνες προκειμένου να επιτευχθούν τα ποσοστά ενηλικίωσης που αντιστοιχούν στη 1^η, 2^η και 3^η περίοδο, αντίστοιχα. Για τις νύμφες από το Dossenheim χρειάστηκαν 3-3.5 μήνες, 4.5-7 μήνες και 8.5-9 μήνες για την 1^η,

2^η και 3^η περίοδο, αντίστοιχα. Δείγμα από 200-600 νύμφες από κάθε ομάδα μεταφέρθηκαν πίσω στους 25 ± 1 °C μέχρι να ολοκληρωθεί η έξοδος των ενηλίκων.

Πρώιμοι πληθυσμοί με υψηλή γονιδιακή ροή

Χρησιμοποιήθηκαν νύμφες από τους πρώιμους πληθυσμούς της Θεσσαλονίκης, της Αγιάς, του Καμαρίου και της Καρδίτσας (έξοδος ενηλίκων στον αγρό το τελευταίο δεκαπενθήμερο του Μαΐου) που συνδέονται μεταξύ τους με υψηλά επίπεδα γονιδιακής ροής. Σε αυτή την περίπτωση, δεν αναμένονται διαφορές στη διάρκεια της μεταδιαπαιτικής περιόδου μεταξύ των νυμφών 2^{ης} περιόδου. Δείγμα 200-360 νυμφών από τους παραπάνω πληθυσμούς παρέμεινε αρχικά στους 25 ± 1 °C για 2 μήνες και έπειτα μεταφέρθηκε στους 5 ± 1 °C για διάστημα ικανό να περατώσει τη διάπαυση το 60-80% των νυμφών (6 μήνες για τις νύμφες από την Αγιά, το Καμάρι και την Καρδίτσα και 6-7 μήνες για τις νύμφες από τη Θεσσαλονίκη). Στη συνέχεια, μεταφέρθηκε στους 25 ± 1 °C για να πραγματοποιηθεί η έξοδος των ενηλίκων. Παρότι δεν έχει μελετηθεί η μεταδιαπαιτική ανάπτυξη των νυμφών της ραγολέτιδας της κερασιάς που δίνουν ενήλικα μετά το μέγιστο της εξόδου των ενηλίκων όπου τα ποσοστά ενηλικίωσης των νυμφών μειώνονται (παρότι έχει ολοκληρωθεί η περάτωση της διάπαυση του πληθυσμού), υποθέτουμε ότι δεν θα υπάρχει παραλλακτικότητα στη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη πληθυσμών με ίδια φαινολογία ενηλίκων στον αγρό και με υψηλή γονιδιακή ροή. Για το σκοπό αυτό, δείγμα 500-890 νυμφών από τους παραπάνω πληθυσμούς παρέμεινε στους 25 ± 1 °C για 2 μήνες και έπειτα μεταφέρθηκε στους 5 ± 1 °C για διάστημα: α) 8-9 μηνών για τις νύμφες από τη Θεσσαλονίκη, β) 7-8 μηνών για τις νύμφες από την Αγιά και το Καμάρι και γ) 7-9 μηνών για τις νύμφες από την Καρδίτσα. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στους 25 ± 1 °C για να πραγματοποιηθεί η έξοδος των ενηλίκων που προέρχονται από νύμφες 3^{ης} περιόδου.

5.2.2.2. Επίδραση θερμοκρασίας στη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη όψιμων και πρώιμων πληθυσμών με διαφορετικά επίπεδα γονιδιακής ροής

Προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση της θερμοκρασίας (κατά τη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη) στη διάρκεια της μεταδιαπαιτικής ανάπτυξης οικολογικά διαφορετικών πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς με υψηλά έως χαμηλά επίπεδα γονιδιακής ροής, χρησιμοποιήθηκαν νύμφες 2^{ης} περιόδου από τη Θεσσαλονίκη, τη Δάφνη, τη Ράχη, την Καλλιπεύκη και το Dossenheim. Η περίοδος πτήσης των ενηλίκων από τη Θεσσαλονίκη και τη Ράχη (πρώιμοι πληθυσμοί) προηγείται της αντίστοιχης των ατόμων από τη Δάφνη, την Καλλιπεύκη και το Dossenheim (όψιμοι πληθυσμοί), ενώ

ο πληθυσμός του Dossenheim συνδέεται με χαμηλά επίπεδα γονιδιακής ροής με τους ελληνικούς πληθυσμούς. Δείγμα 150-200 νυμφών των παραπάνω πληθυσμών παρέμεινε στους 25 ± 1 °C για περίπου 3 μήνες και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στους 3 ± 1 °C για 6 μήνες. Ακολούθως, οι νύμφες μεταφέρθηκαν στους 15, 20 και 25 ± 1 °C μέχρι να ολοκληρωθεί η έξοδος των ενηλίκων.

5.2.2.3. Γεωγραφική παραλλακτικότητα στη μεταδιαπαυτική ανάπτυξη νυμφών με παρατεταμένη διάπαυση

Προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση του πληθυσμού στο χρόνο που απαιτείται από την έκθεση των νυμφών με παρατεταμένη διάπαυση σε υψηλή θερμοκρασία μέχρι την έξοδο των ενηλίκων, χρησιμοποιήθηκαν νύμφες από τη Θεσσαλονίκη, το Περούλι, το Καμάρι και την Κερνίτσα. Ο πληθυσμός από την Κερνίτσα είναι γενετικά απομονωμένος από τους υπόλοιπους τρεις πληθυσμούς και η περίοδο πτήσης των ενηλίκων συμπίπτει χρονικά με αυτή των ατόμων από τη Θεσσαλονίκη και το Καμάρι (πρώιμοι πληθυσμοί) και προηγείται της αντίστοιχης των ατόμων από το Περούλι (όψιμος πληθυσμός). Δείγμα 260 – 400 νυμφών από τον κάθε πληθυσμό παρέμεινε αρχικά στους 25 ± 1 °C για περίπου 3 μήνες, τοποθετήθηκε στους 3 ± 1 °C για 6 μήνες και στη συνέχεια μεταφέρθηκε πίσω στους 25 ± 1 °C μέχρι να ολοκληρωθεί η έξοδος των ενηλίκων που περάτωσαν τη διάπαυση κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους. Οι νύμφες που εισήλθαν σε παρατεταμένη εποχική αδράνεια παρέμειναν στους 25 ± 1 °C για 3 μήνες και έπειτα τοποθετήθηκαν ξανά στους 3 ± 1 °C για επιπλέον 6 μήνες. Στη συνέχεια, οι νύμφες μεταφέρθηκαν στους 25 ± 1 °C μέχρι να ολοκληρωθεί η έξοδος των ενηλίκων. Το ποσοστό ενηλικίωσης κυμάνθηκε από 60 έως 80% των νυμφών που εισήλθαν σε παρατεταμένη διάπαυση.

Για κάθε πληθυσμό, καταγράφονταν καθημερινά ο αριθμός των αρσενικών και θηλυκών ατόμων που ενηλικιώνονταν προκειμένου να υπολογιστεί η διάρκεια της μεταδιαπαυτικής περιόδου, δηλ. ο χρόνος που απαιτείται από την έκθεση των νυμφών σε θερμοκρασία που επιτρέπει τη μεταδιαπαυτική ανάπτυξη ($15 - 25^{\circ}\text{C}$) μέχρι την έξοδο των αρσενικών και θηλυκών ατόμων από το νυμφικό περίβλημα.

5.2.3. Στατιστική ανάλυση

Χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο ανάλογων κινδύνων (μοντέλο Cox) για να εκτιμηθεί η επίδραση του πληθυσμού, του φύλου, της θερμοκρασίας και της έντασης της διάπαυσης στη διάρκεια της μεταδιαπαυτικής περιόδου των νυμφών. Οι μη σημαντικοί παράγοντες εξαιρέθηκαν από περαιτέρω ανάλυση ενώ οι παράγοντες με

σημαντική επίδραση εισήχθησαν σε πολυ-παραγοντικό μοντέλο ανάλογων κινδύνων (μοντέλο Cox). Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε σταδιακή διαδικασία επιλογής (forward stepwise) για την κατασκευή του τελικού μοντέλου. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το στατιστικό πακέτο SPSS 17.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, U.S.A.).

5.3. Αποτελέσματα

5.3.1. Γεωγραφική παραλλακτικότητα στη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη νυμφών με διάπαυση ενός έτους

Οψιμοί πληθυσμοί με χαμηλή γονιδιακή ροή

Η μέση διάρκεια της μεταδιαπαιτικής περιόδου κυμάνθηκε από 35.4 έως 16.3 ημέρες και από 33.8 έως 15 ημέρες για τα αρσενικά και θηλυκά της Δάφνης, αντίστοιχα. Για τον πληθυσμό του Dossenheim, η μέση διάρκεια της μεταδιαπαιτικής περιόδου κυμάνθηκε από 29.9 έως 16.9 ημέρες και από 29.5 έως 16.3 ημέρες για τα αρσενικά και θηλυκά, αντίστοιχα (Διάγραμμα 2, Πίνακας 2Π του Παραρτήματος). Η μεταδιαπαιτική ανάπτυξη των νυμφών από το Dossenheim ήταν ταχύτερη από αυτή των νυμφών της Δάφνης μέχρι το μέγιστο της περάτωσης της διάπαυσης των πληθυσμών. Όμως, ο ρυθμός μείωσης της διάρκειας της μεταδιαπαιτικής περιόδου είναι μεγαλύτερος για τις νύμφες από το πληθυσμό της Δάφνης. Η μεταδιαπαιτική ανάπτυξη των αρσενικών και θηλυκών του Dossenheim δεν διέφερε, ενώ τα θηλυκά της Δάφνης φαίνεται να εξέρχονται νωρίτερα των αρσενικών κατά την 1^η και την 3^η περίοδο. Εξετάζοντας τον κάθε παράγοντα χωριστά, το μοντέλο Cox έδειξε ότι ο πληθυσμός ($\chi^2 = 18.046$, $df = 1$, $P < 0.001$) και η ένταση διάπαυσης ($\chi^2 = 638.700$, $df = 2$, $P < 0.001$) επηρεάζουν σημαντικά τη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη, σε αντίθεση με το φύλο ($\chi^2 = 2.539$, $df = 1$, $P = 0.111$). Χρησιμοποιώντας τη σταδιακή διαδικασία επιλογής κατασκευάστηκε το τελικό μοντέλο Cox που έδειξε ότι ο πληθυσμός, η ένταση διάπαυσης και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση είναι σημαντικοί εκτιμητές της διάρκειας της μεταδιαπαιτικής περιόδου των νυμφών της ραγολέτιδας της κερασιάς (Πίνακας 9).

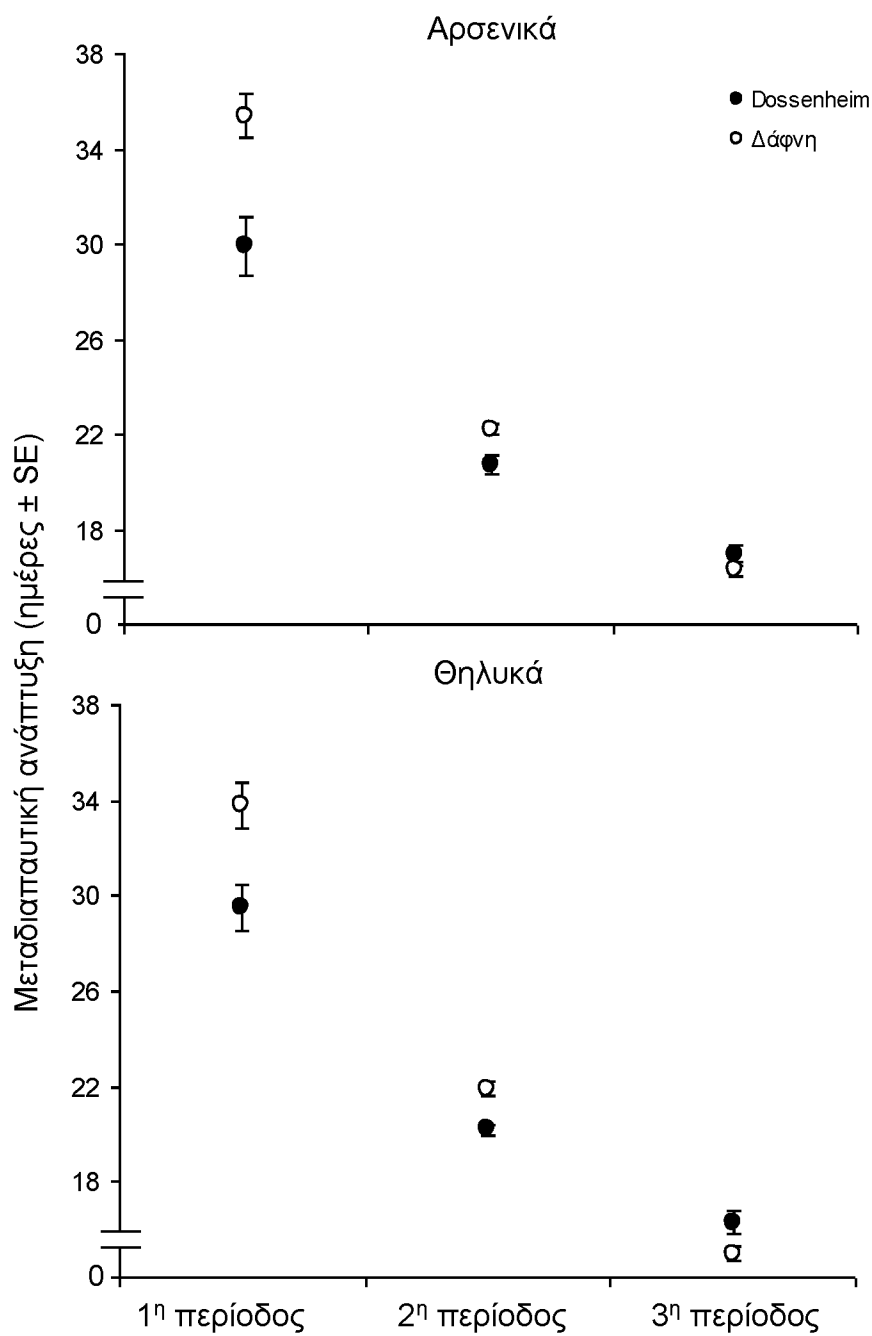
Πρώιμοι πληθυσμοί με υψηλή γονιδιακή ροή

Η μέση διάρκεια της μεταδιαπαιτικής περιόδου των νυμφών 2^{ης} και 3^{ης} περιόδου που προέρχονταν από πρώιμους πληθυσμούς της ραγολέτιδας της κερασιάς κυμάνθηκε από 12.8 έως 21 ημέρες και από 14.6 έως 17 ημέρες, αντίστοιχα (Διάγραμμα 3, Πίνακας 2Π του Παραρτήματος). Οι νύμφες 2^{ης} περιόδου και 3^{ης} περιόδου από την

Καρδίτσα χρειάζονταν λιγότερο χρόνο για να δώσουν ενήλικα συγκριτικά με τις νύμφες από το Καμάρι. Ωστόσο, οι διαφορές μεταξύ των πληθυσμών στη διάρκεια της μεταδιαπαυτικής ανάπτυξης ήταν λιγότερο έντονες για τις νύμφες 3^{ης} περιόδου. Στον πληθυσμό της Καρδίτσας, παρατηρήθηκε αύξηση της διάρκειας της μεταδιαπαυτικής περιόδου των νυμφών 3^{ης} περιόδου σε σχέση με αυτή των νυμφών τις 2^{ης} περιόδου, σε αντίθεση με τους υπόλοιπους πληθυσμούς του εντόμου. Τα θηλυκά φαίνεται να εξέρχονται νωρίτερα από τα αρσενικά στους εξεταζόμενους πληθυσμούς και των δύο περιόδων. Η ανάλυση Cox έδειξε ότι ο πληθυσμός, το φύλο, η ένταση διάπαυσης και η αλληλεπίδραση μεταξύ του πληθυσμού και της έντασης της διάπαυσης είναι σημαντικοί εκτιμητές της διάρκειας της μεταδιαπαυτικής περιόδου των νυμφών που προέρχονται από πρώιμους πληθυσμούς με υψηλά επίπεδα γονιδιακής ροής (Πίνακας 10).

5.3.2. Επίδραση θερμοκρασίας στη μεταδιαπαυτική ανάπτυξη όψιμων και πρώιμων πληθυσμών με διαφορετικά επίπεδα γονιδιακής ροής

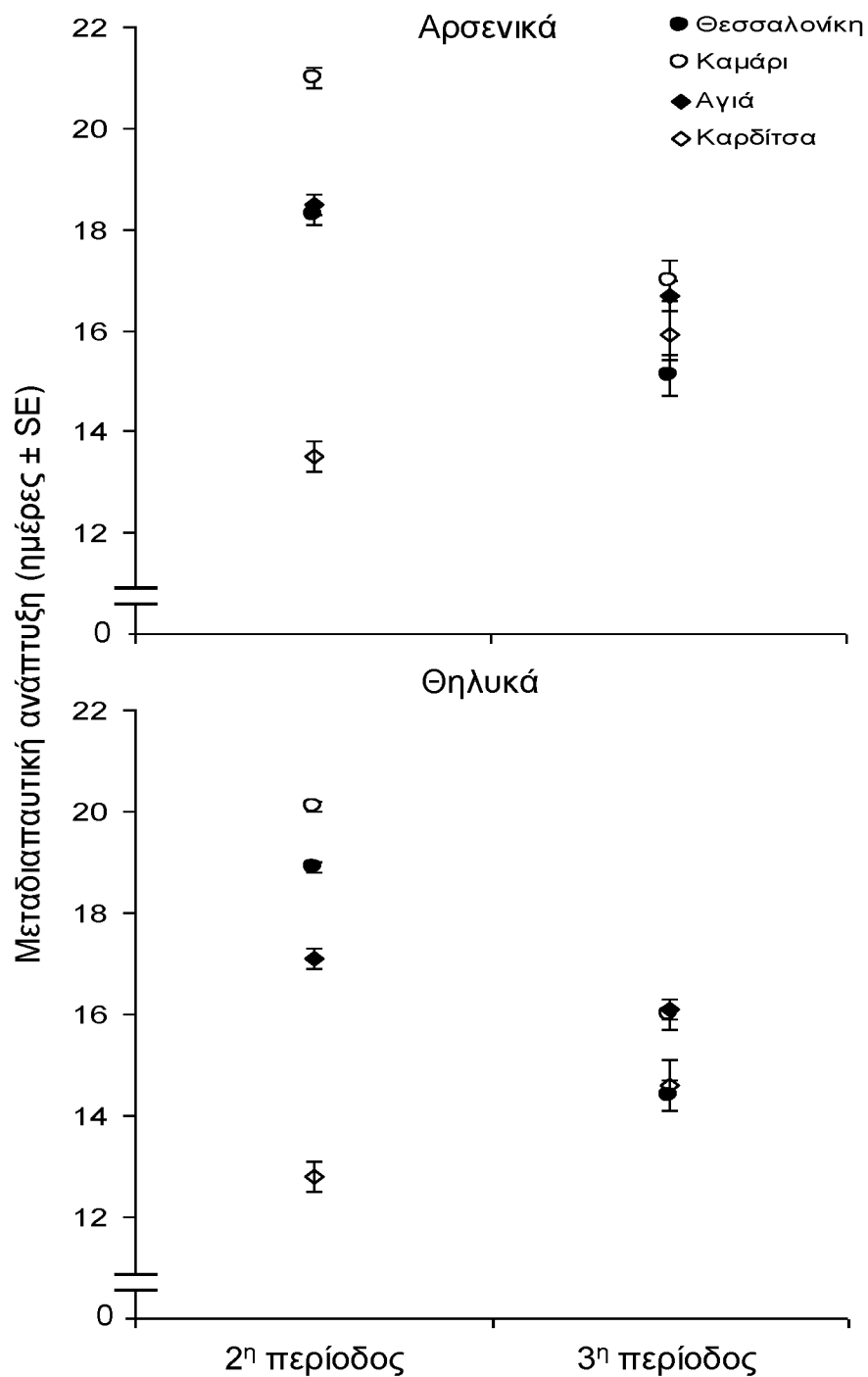
Η μέση διάρκεια της μεταδιαπαυτικής ανάπτυξης των νυμφών της ραγολέτιδας της κερασιάς μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας από 15°C σε 25°C σε όλους τους εξεταζόμενους πληθυσμούς (Διάγραμμα 4, Πίνακας 3Π, Διάγραμμα 7Π & 8Π του Παραρτήματος). Η μείωση της διάρκειας της μεταδιαπαυτικής περιόδου είναι μεγαλύτερη κατά την αύξηση της θερμοκρασίας από 15°C σε 20°C, σε σχέση με την αντίστοιχη κατά την αύξηση από 20°C σε 25°C. Επίσης, οι νύμφες από το Dossenheim και τη Ράχη χρειάζονται περισσότερο χρόνο μέχρι να δώσουν ενήλικα σε σχέση με αυτές από την Καλλιπεύκη και τη Θεσσαλονίκη και στις τρεις θερμοκρασίες. Η μείωση της διάρκειας της μεταδιαπαυτικής περιόδου με την αύξηση της θερμοκρασίας είναι μεγαλύτερη για τις νύμφες από το Dossenheim σε σχέση με αυτές της Δάφνης. Η έξοδος των θηλυκών προηγείται της αντίστοιχης των αρσενικών σε όλους τους εξεταζόμενους πληθυσμούς μετά από έκθεση σε θερμοκρασίες ≤ 20°C. Στους 25°C, αντίστοιχες φυλετικές διαφορές παρατηρούνται στους πληθυσμούς του Dossenheim και της Ράχης. Το μοντέλο Cox έδειξε ότι η θερμοκρασία (κατά τη μεταδιαπαυτική περίοδο), ο πληθυσμός, το φύλο και η αλληλεπίδραση μεταξύ θερμοκρασίας και πληθυσμού ήταν σημαντικοί εκτιμητές του χρόνου που απαιτείται μέχρι την ενηλικίωση μετά τη μεταφορά των νυμφών στις υψηλές θερμοκρασίες (Πίνακας 11).



Διάγραμμα 2. Μεταδιαπαιτική ανάπτυξη (ημέρες ± SE) αρσενικών και θηλυκών ατόμων της ραγολέτιδας της κερασιάς που προέρχονταν από τους όψιμους πληθυσμούς της Δάφνης και του Dossenheim που συνδέονται με χαμηλά επίπεδα γονιδιακής ροής. Τα ενήλικα εξήλθαν από νύμφες 1^{ης}, 2^{ης} και 3^{ης} περιόδου.

Πίνακας 9. Μεταβλητές του τελικού μοντέλου ανάλογων κινδύνων (μοντέλο Cox) για την επίδραση του πληθυσμού και της έντασης της διάπαυσης των ατόμων ενός πληθυσμού στη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη των νυμφών της ραγολέτιδας της κερασίας που προέρχονταν από όψιμους πληθυσμούς με χαμηλή γονιδιακή ροή (Dossenheim, Δάφνη). Χρησιμοποιήθηκαν νύμφες 1^{ης}, 2^{ης} και 3^{ης} περιόδου. Οι νύμφες 3^{ης} περιόδου αποτελούν τις νύμφες αναφοράς.

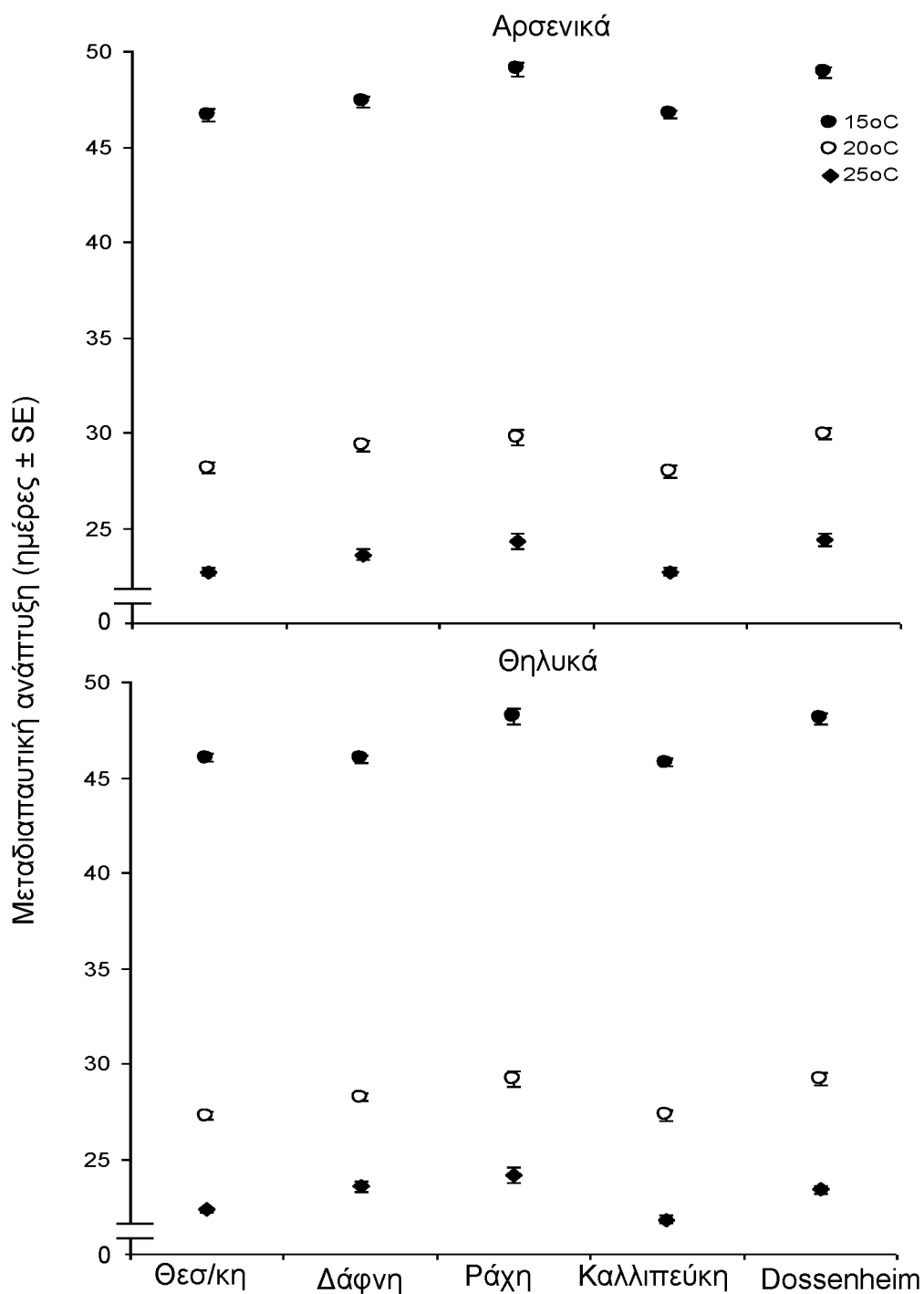
Πηγή παραλλακτικότητας	β	Τυπικό σφάλμα	Exp (B)	P
Πληθυσμός	0.823	0.167	2.277	<0.001
Ένταση διάπαυσης				<0.001
1 ^η περίοδος	-3.110	0.194	0.045	<0.001
2 ^η περίοδος	-1.416	0.139	0.243	<0.001
Ένταση διάπαυσης * πληθυσμός				<0.001
1 ^η περίοδος * πληθυσμός	-1.365	0.246	0.255	<0.001
2 ^η περίοδος * πληθυσμός	-1.189	0.182	0.305	<0.001



Διάγραμμα 3. Μεταδιαπαιτική ανάπτυξη (ημέρες ± SE) αρσενικών και θηλυκών ατόμων της ραγολέτιδας της κερασιάς που προέρχονταν από πρώιμους πληθυσμούς με υψηλά επίπεδα γονιδιακής ροής. Χρησιμοποιήθηκαν νύμφες 2^{ης} και 3^{ης} περιόδου.

Πίνακας 10. Μεταβλητές του μοντέλου ανάλογων κινδύνων (μοντέλο Cox) για την επίδραση του πληθυσμού, του φύλου και της έντασης της διάπαυσης στη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη των νυμφών της ραγολέτιδας της κερασιάς που προέρχονταν από πρώιμους πληθυσμούς (Θεσσαλονίκη, Καμάρι, Αγιά, Καρδίτσα) με υψηλά επίπεδα γονιδιακής ροής. Χρησιμοποιήθηκαν νύμφες 2^{ης} και 3^{ης} περιόδου. Ο πληθυσμός από τη Θεσσαλονίκη αποτελεί τον πληθυσμό αναφοράς.

Πηγή παραλλακτικότητας	β	Τυπικό σφάλμα	Exp (B)	P
Πληθυσμός				<0.001
Καμάρι	-0.485	0.134	0.615	<0.001
Αγιά	-0.559	0.110	0.572	<0.001
Καρδίτσα	-0.754	0.117	0.471	<0.001
Φύλο	0.240	0.058	1.271	<0.001
Ένταση διάπαυσης	-0.863	0.110	0.422	<0.001
Ένταση διάπαυσης * πληθυσμός				<0.001
Ένταση διάπαυσης * Καμάρι	-0.285	0.176	0.752	0.105
Ένταση διάπαυσης * Αγιά	0.619	0.154	1.858	<0.001
Ένταση διάπαυσης * Καρδίτσα	2.117	0.165	8.302	<0.001



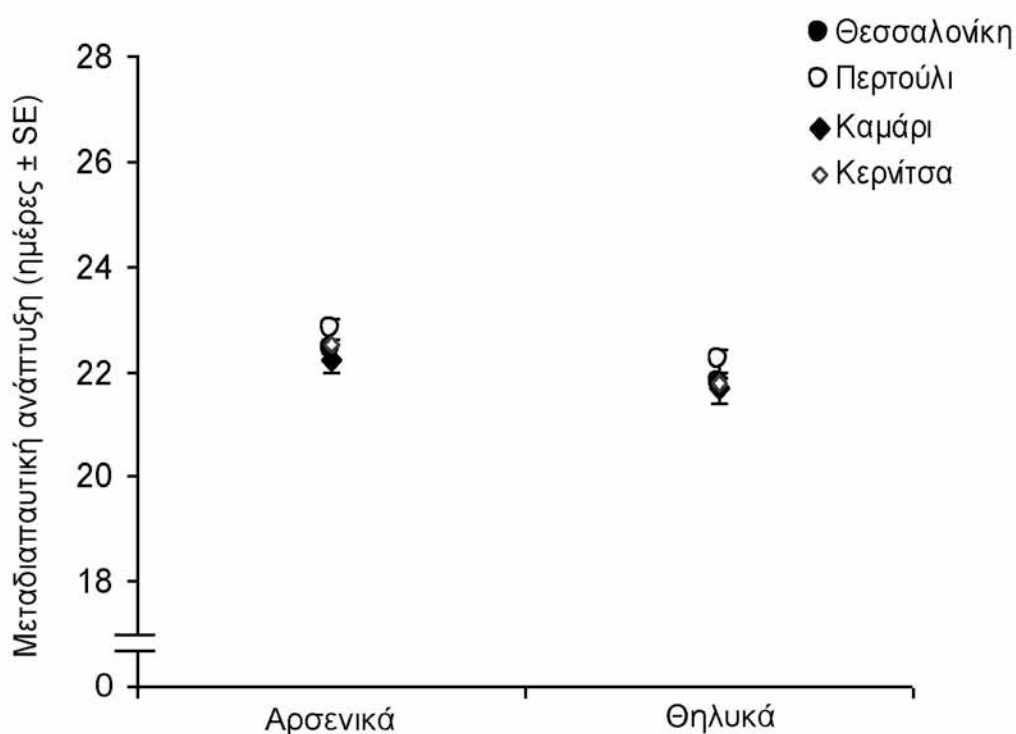
Διάγραμμα 4. Μεταδιασπαστική ανάπτυξη (ημέρες \pm SE) αρσενικών και θηλυκών ατόμων της ραγολέτιδας της κερασιάς που προέρχονταν από πρώιμους και όψιμους πληθυσμούς με διαφορετικά επίπεδα γονιδιακής ροής και εξήλθαν από νύμφες με διάπαυση ενός έτους. Οι νύμφες 2^{ης} περιόδου εκτέθηκαν στους 15°C, 20°C ή 25°C για να ολοκληρώσουν τη μεταδιασπαστική τους ανάπτυξη.

Πίνακας 11. Μεταβλητές του μοντέλου ανάλογων κινδύνων (μοντέλο Cox) για την επίδραση του πληθυσμού, του φύλου και της θερμοκρασίας στη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη των νυμφών της ραγολέτιδας της κερασιάς που προέρχονταν από πρώιμους και όψιμους πληθυσμούς με διαφορετικά επίπεδα γονιδιακής ροής (Dossenheim, Δάφνη, Θεσσαλονίκη, Ράχη, Καλλιπεύκη). Νύμφες 2^{ης} περιόδου εκτέθηκαν σε τρεις σταθερές θερμοκρασίες μεταδιαπαιτικής ανάπτυξης (15°C, 20°C, 25°C) προκειμένου να δώσουν ενήλικα. Ο πληθυσμός από το Dossenheim αποτελεί τον πληθυσμό αναφοράς.

Πηγή παραλλακτικότητας	β	Τυπικό σφάλμα	Exp (B)	P
Θερμοκρασία	0.476	0.014	1.609	<0.001
Πληθυσμός				<0.001
Δάφνη	1.102	0.305	3.010	<0.001
Θεσσαλονίκη	0.059	0.351	1.061	0.867
Ράχη	0.132	0.326	1.142	0.685
Καλλιπεύκη	0.644	0.310	1.903	0.038
Φύλο	0.252	0.045	1.286	<0.001
Θερμοκρασία * πληθυσμός				<0.001
Θερμοκρασία * Δάφνη	-0.042	0.015	0.959	0.005
Θερμοκρασία * Θεσσαλονίκη	0.034	0.017	1,034	0.053
Θερμοκρασία * Ράχη	-0.011	0.016	0.989	0.483
Θερμοκρασία * Καλλιπεύκη	0.002	0.015	1.002	0.884

5.3.3. Γεωγραφική παραλλακτικότητα στη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη νυμφών με παρατεταμένη διάπαυση

Η μέση διάρκεια της μεταδιαπαιτικής περιόδου των νυμφών με παρατεταμένη διάπαυση υπολογίστηκε στις 22 ημέρες και δεν διέφερε μεταξύ των πληθυσμών (Διάγραμμα 5, Πίνακας 4Π του Παραρτήματος). Τα θηλυκά ενηλικιώνονται περίπου μία ημέρα νωρίτερα από τα αρσενικά. Το μοντέλο Cox έδειξε ότι το φύλο ($\chi^2 = 11.857$, $df = 1$, $P = 0.001$) είναι σημαντικός εκτιμητής του χρόνου που απαιτείται μέχρι την ενηλικίωση των νυμφών με παρατεταμένη διάπαυση, σε αντίθεση με τον πληθυσμό ($\chi^2 = 5.007$, $df = 3$, $P = 0.171$).



Διάγραμμα 5. Μεταδιαπαιτική ανάπτυξη (ημέρες \pm SE) αρσενικών και θηλυκών ατόμων της ραγολέτιδας της κερασιάς που προέρχονταν από γενετικά απομονωμένους πληθυσμούς με διαφορετική οικολογικά χαρακτηριστικά. Οι νύμφες έδωσαν ενήλικα μετά από παρατεταμένη διάπαυση.

5.4. Συζήτηση

Στο παρόν Κεφάλαιο μελετήθηκαν οι παράγοντες που προκαλούν γεωγραφική παραλλακτικότητα στη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη των νυμφών της ραγολέτιδας της κερασιάς. Καταγράφηκαν διαφορές στη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη τόσο μεταξύ των νυμφών που προέρχονταν από όψιμους πληθυσμούς με χαμηλή γονιδιακή ροή όσο και μεταξύ των νυμφών πρώιμων πληθυσμών με γονιδιακή ροή, επιβεβαιώνοντας την πρώτη υπόθεση. Η αύξηση της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της μεταδιαπαιτικής περιόδου επιτάχυνε τη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη αλλά η μείωση της διάρκειας της μεταδιαπαιτικής περιόδου διέφερε μεταξύ των πληθυσμών του εντόμου, επιβεβαιώνοντας τη δεύτερη υπόθεση. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η μεταδιαπαιτική ανάπτυξη επιταχύνεται με σχετικά υψηλούς ρυθμούς μεταξύ των νυμφών της 1^{ης} και 2^{ης} περιόδου και με σχετικά χαμηλότερο ρυθμό μεταξύ των νυμφών της 2^{ης} και 3^{ης} περιόδου. Ωστόσο, παραμένει πιθανή η αύξηση της διάρκειας της μεταδιαπαιτικής περιόδου μετά από παρατεταμένη έκθεση στις χαμηλές θερμοκρασίες. Φαίνεται ότι τόσο οι γενετικοί και περιβαλλοντικοί (θερμοκρασία) παράγοντες όσο και η ένταση της διάπαυσης των πληθυσμών που σχετίζεται άμεσα με τη φαινολογία των ενηλίκων στον αγρό καθορίζουν τη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη των νυμφών της ραγολέτιδας της κερασιάς που δίνουν ενήλικα κατά το πρώτο έτος διάπαυσης. Αντίθετα, η παρατεταμένη διάπαυση των νυμφών άμβλυνε τις γεωγραφικές διαφορές στη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη των νυμφών που προέρχονταν από γενετικά απομονωμένους και οικολογικά διαφορετικούς πληθυσμούς, απορρίπτοντας την τρίτη υπόθεση. Η έξοδος των θηλυκών προηγήθηκε της αντίστοιχης των αρσενικών για τις νύμφες 3^{ης} περιόδου και γι' αυτές με παρατεταμένη διάπαυση.

Γεωγραφική παραλλακτικότητα στη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη νυμφών με διάπαυση ενός έτους

Η διάρκεια της μεταδιαπαιτικής περιόδου των νυμφών της ραγολέτιδας της κερασιάς διέφερε μεταξύ των πληθυσμών του εντόμου με το ίδιο ποσοστό περάτωσης της διάπαυσης. Στην περίπτωση της Δάφνης και του Dossenheim, όπου δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη φαινολογία των ενηλίκων στον αγρό (όψιμοι πληθυσμοί), η γεωγραφική παραλλακτικότητα στη διάρκεια της μεταδιαπαιτικής ανάπτυξης, η οποία είναι ιδιαίτερα έντονη για τις νύμφες 1^{ης} περιόδου, θα μπορούσε να αποδοθεί σε γενετικά αίτια. Ωστόσο, η διάρκεια της μεταδιαπαιτικής περιόδου βρέθηκε να διαφέρει μεταξύ των πληθυσμών του εντόμου, ακόμα κι όταν αυτοί συνδέονται με υψηλά επίπεδα γονιδιακής ροής. Ειδικότερα, οι νύμφες των πρώιμων πληθυσμών

από την Καρδίτσα και το Καμάρι παρουσίασαν τη μικρότερη και τη μεγαλύτερη μεταδιαπαιτική περίοδο, αντίστοιχα. Ωστόσο, οι διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ των νυμφών 2^{ης} περιόδου είναι μεγαλύτερες σε σχέση με αυτές μεταξύ των νυμφών 3^{ης} περιόδου. Επίσης, γεωγραφική παραλλακτικότητα παρατηρήθηκε και στη μείωση της διάρκειας της μεταδιαπαιτικής περιόδου των νυμφών 2^{ης} περιόδου με την αύξηση της θερμοκρασίας (κατά τη μεταδιαπαιτική περίοδο). Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι η αύξηση της θερμοκρασίας είχε διαφορετική επίδραση στους όψιμους πληθυσμούς. Ειδικότερα, μεγαλύτερη ήταν η επίδραση στη μείωση της μεταδιαπαιτικής ανάπτυξης των νυμφών από τη Δάφνη σε σχέση με αυτές από το Dossenheim. Αντίθετα, δεν βρέθηκαν ανάλογες διαφορές μεταξύ των νυμφών του Dossenheim και της Καλλιπεύκης, παρότι η διάρκεια της μεταδιαπαιτικής περιόδου των νυμφών των δύο παραπάνω πληθυσμών διαφέρει και στις τρεις θερμοκρασίες (15°C – 25°C). Φαίνεται, επομένως, ότι οι γενετικοί παράγοντες και η θερμοκρασία επηρεάζουν εν μέρει τη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη όψιμων πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς που δεν διαφέρουν ως προς την ένταση της διάπαυσης. Ωστόσο, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση των αιτιών που προκαλούν γεωγραφική παραλλακτικότητα στη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη των νυμφών, καθώς η γενετική απόσταση και η θερμοκρασία που εξετάσαμε δεν μπορούν να ερμηνεύσουν την παραλλακτικότητα στους πρώιμους εξεταζόμενους πληθυσμούς.

Απουσία γεωγραφικής παραλλακτικότητας στη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη νυμφών με παρατεταμένη διάπαυση

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι η μεταδιαπαιτική ανάπτυξη των νυμφών που εισήλθαν σε παρατεταμένη διάπαυση δεν διέφερε μεταξύ των πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς, παρότι η διάρκεια της μεταδιαπαιτικής περιόδου των νυμφών 1^{ης} περιόδου διέφερε μεταξύ των εξεταζόμενων πληθυσμών (Πίνακας 5Π του Παραρτήματος). Φαίνεται, επομένως, ότι ο πληθυσμός είναι σημαντικός εκτιμητής της μεταδιαπαιτικής ανάπτυξης των νυμφών της ραγολέτιδας της κερασιάς με διάπαυση ενός έτους, αλλά δεν ισχύει το ίδιο όταν τα ενήλικα εξέρχονται από νύμφες με παρατεταμένη διάπαυση. Η ομοιόμορφη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη των νυμφών με παρατεταμένη διάπαυση θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι αποτελεί χαρακτηριστικό του φαινοτύπου των 'bet-hedgers' ατόμων της ραγολέτιδας της κερασιάς. Ωστόσο, περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για τον προσδιορισμό των αιτιών άμβλυνσης των γεωγραφικών διαφορών στη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη των νυμφών με παρατεταμένη διάπαυση.

Επίδραση της έντασης της διάπαυσης στη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη

Η μεταδιαπαιτική ανάπτυξη επιταχύνεται με τη διάρκεια της έκθεσης στις χαμηλές θερμοκρασίες, η οποία προκαλεί μείωση της έντασης της διάπαυσης των πληθυσμών των εντόμων των εύκρατων περιοχών (διάπαυση ≤ 1 έτους). Η διάρκεια της μεταδιαπαιτικής περιόδου αναμένεται να έχει τη μικρότερη δυνατή τιμή κατά το μέγιστο της περάτωσης της διάπαυσης ενός πληθυσμού (Hodek & Hodková, 1988; AliNiaze, 1988). Στην περίπτωση της ραγολέτιδας της κερασιάς, η μεταδιαπαιτική ανάπτυξη των νυμφών 2^{ης} περιόδου είναι σημαντικά μικρότερη σε σχέση με αυτή των νυμφών 3^{ης} περιόδου λόγω της μείωσης της έντασης της διάπαυσης, σύμφωνα και με τα υπόλοιπα είδη των εύκρατων περιοχών. Οι νύμφες 3^{ης} περιόδου εισέρχονται σε μια σχετικά συντομότερη μεταδιαπαιτική περίοδο σε σχέση με τις νύμφες 2^{ης} περιόδου. Ωστόσο, μετά από παρατεταμένη έκθεση στις χαμηλές θερμοκρασίες, οι νύμφες 3^{ης} περιόδου από την Καρδίτσα, αύξησαν τη διάρκεια της μεταδιαπαιτικής τους περιόδου σε σχέση με αυτές της 2^{ης} περιόδου, αντίθετα με τους υπόλοιπους πρώιμους πληθυσμούς (Θεσσαλονίκη, Αγιά, Καμάρι). Ανάλογο φαινόμενο παρατηρήθηκε στις νύμφες του εξίσου πρώιμου πληθυσμού των Κ. Νερών, ο οποίος συνδέεται με υψηλά επίπεδα γονιδιακής ροής με τους υπόλοιπους πρώιμους πληθυσμούς (Διάγραμμα 9Π του Παραρτήματος). Η δυνατότητα αύξησης της διάρκειας της μεταδιαπαιτικής ανάπτυξης των ατόμων ενός πληθυσμού, παρά τη μείωση της έντασης της διάπαυσης, αναφέρεται πρώτη φορά στη ραγολέτιδα της κερασιάς και γενικότερα στα μονοκυκλικά έντομα. Στην περίπτωση της ραγολέτιδας της κερασιάς, θεωρούμε ότι σχετίζεται πιθανότητα με την ικανότητα των νυμφών της ραγολέτιδας της κερασιάς να 'επιστρέφουν' σε εποχική αδράνεια μετά από παρατεταμένη έκθεση στις χαμηλές θερμοκρασίες (Κεφάλαιο 4).

Φυλετικές διαφορές στη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη

Παρότι προηγούμενη μελέτη υποστηρίζει ότι τα θηλυκά της ραγολέτιδας της κερασιάς ενηλικιώνονται νωρίτερα από τα αρσενικά (Baker & Miller, 1978), τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η έκφραση φυλετικών διαφορών στη διάρκεια της μεταδιαπαιτικής περιόδου εξαρτάται από την ένταση της διάπαυσης των νυμφών και τον τύπο διάπαυσης των νυμφών ενός πληθυσμού. Ειδικότερα, τα θηλυκά χρειάστηκαν λιγότερο χρόνο από τα αρσενικά για να ενηλικιωθούν όταν εξέρχονται από: α) νύμφες 3^{ης} περιόδου και β) νύμφες που εισήλθαν σε παρατεταμένη διάπαυση και την περάτωσαν επιτυχώς (ποσοστό ενηλικίωσης $>70\%$). Φυλετικές διαφορές στη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη παρατηρήθηκαν και στις περιπτώσεις όπου η μεταδιαπαιτική δραστηριότητα έλαβε χώρα σε θερμοκρασίες $\leq 20^{\circ}\text{C}$. Ωστόσο, οι φυλετικές διαφορές αμβλύθηκαν: α) κατά τη μείωση της έντασης της διάπαυσης

(νύμφες 2^{ης} περιόδου), η οποία αναμένεται να συμπίπτει χρονικά με τη φαινολογία των τοπικών καρπών-ξενιστών λόγω τοπικής προσαρμογής και β) όταν η μεταδιαπαιτική δραστηριότητα έλαβε χώρα στους 25°C, όπου μειώνεται σημαντικά η διάρκεια της μεταδιαπαιτικής περιόδου. Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα θηλυκά (αμέσως μετά την ενηλικίωση τους) χρειάζονται πρωτεϊνούχες τροφές για να ωριμάσουν αναπαραγωγικά, υποθέτουμε ότι η πρόωμη έξοδος των θηλυκών στις περιπτώσεις όπου οι συνθήκες αναπαραγωγικής δραστηριότητας σε μια περιοχή αναμένονται να είναι λιγότερο ευνοϊκές δίνει στα θηλυκά το χρονικό πλεονέκτημα της αναπαραγωγικής ωρίμανσης.

Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας, η παρούσα μελέτη εστιάστηκε σε μια λιγότερο μελετημένη πτυχή της βιολογίας των εντόμων, τη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη, και τεκμηρίωσε την παρουσία γεωγραφικής παραλλακτικότητας στους πληθυσμούς της ραγολέτιδας της κερασιάς που δεν διαφέρουν ως προς την ένταση της διάπαυσης. Ωστόσο, η παρατεταμένη διάπαυση βρέθηκε να αμβλύνει τις γεωγραφικές διαφορές στη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη των νυμφών του εντόμου. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι, παρότι η μεταδιαπαιτική ανάπτυξη των νυμφών επιταχύνεται με τη μείωση της έντασης της διάπαυσης ενός πληθυσμού, η παρατεταμένη έκθεση σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι πιθανό να προκαλέσει αύξηση της διάρκειας της μεταδιαπαιτικής ανάπτυξης. Φυλετικές διαφορές στη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη παρατηρήθηκαν στις νύμφες 3^{ης} περιόδου και σε αυτές με παρατεταμένη διάπαυση, όπου η έξοδος των θηλυκών προηγήθηκε της αντίστοιχης των αρσενικών.

Βιβλιογραφία

- AliNiazee MT. 1988.** Diapause modalities in some *Rhagoletis* species. In: AliNiazee MT, ed. *Ecology and management of economically important fruit flies*. Corvallis, OR, Agricultural Experimental Station Special Rep. 830, Oregon State University, 13-25.
- Augustinos AA, Asimakopoulou AK, Moraiti CA, Mavragani-Tsipidou P, Papadopoulos NT, Bourtzis K. 2013.** Microsatellite and *Wolbachia* analysis in *Rhagoletis cerasi* natural populations: population structuring and multiple infections. *Ecology and Evolution*, in press.
- Augustinos AA, Asimakopoulou AK, Papadopoulos NT, Bourtzis K. 2011.** Cross-amplified microsatellites in the European cherry fly, *Rhagoletis cerasi*: medium polymorphic-highly informative markers. *Bulletin of Entomological Research* **101**: 45–52.
- Baker CRB, Miller GW. 1978.** The effect of temperature on the post-diapause development on four geographical populations of the European cherry fruit fly (*Rhagoletis cerasi*). *Entomologia Experimentalis et Applicata* **23**: 1-13.
- Boller EF, Bush GL. 1974.** Evidence for genetic variation in populations of the European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae) based on physiological parameters and hybridization experiments. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **17**: 279-293.
- Bosch J, Kemp WP, 2004.** Effect of pre-wintering and wintering temperature regimes on weight loss, survival, and emergence time in the mason bee *Osmia cornuta* (Hymenoptera: Megachilidae). *Apidologie* **35**: 469–479.
- Bosch J, Kemp WP, 2003.** Effect of wintering duration and temperature on survival and emergence time in males of the orchard pollinator *Osmia lignaria* (Hymenoptera: Megachilidae). *Environmental Entomology* **32**: 711–716.
- Buhl PN, Sarfati MS, Brockerhoff EG, Kelly D. 2008.** Description, phenology and biology of *Zelostemma chionochloae* Buhl sp. nov., a platygastriid parasitoid of *Eucalyptodiplosis chionochloae* (Diptera: Cecidomyiidae) in New Zealand. *New Zealand Journal of Zoology* **35**: 255-264.
- Danks HV, 1987.** *Insect dormancy: an ecological perspective*. Biological Survey of Canada (Terrestrial Arthropods), Ottawa.
- Eller FJ, Tumlinson JH, Lewis WJ. 1990.** Intraspecific competition in *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of *Heliothis* species (Lepidoptera: Noctuidea). *Annals of the Entomological Society of America* **83**: 504-508.

- Forbes AA, Pelz-Stelinski KS, Isaacs R. 2010.** Transfer of life-history phenology from mothers to progeny in a solitary univoltine parasitoid. *Physiological Entomology* **35**: 192-195.
- Hodek I. 1996.** Diapause development, diapause termination and the end of diapause. *European Journal of Entomology* **93**: 475-487.
- Hodek I, Hodková M. 1988.** Multiple role of temperature during insect diapause: a review. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **49**: 153–165.
- Košťál V, 2006.** Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of Insect Physiology* **52**: 113–127.
- Papanastasiou AS, Nestel D, Diamantidis AD, Nakas CT, Papadopoulos NT. 2011.** Physiological and biological patterns of a highland and a coastal population of the European cherry fruit fly during diapause. *Journal of Insect Physiology* **57**: 83-93.
- Sgolastra F, Bosch J, Molowny-Horas R, Maini S, Kemp WP. 2010.** Effect of temperature regime on diapause intensity in an adult-wintering Hymenopteran with obligate diapause. *Journal of Insect Physiology* **56**: 185-194.
- Régnière J. 1990.** Diapause termination and changes in thermal responses during postdiapause development in larvae of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Journal of Insect Physiology* **36**: 727-735.
- Smith DC. 1988.** Heritable divergence of *Rhagoletis pomonella* host races by seasonal asynchrony. *Nature* **336**: 66-67.
- Tauber MJ, Tauber CA. 2002.** Prolonged dormancy in *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae): A ten-year field study with implication fro crop rotation. *Environmental Entomology* **31**: 499-504.
- Tauber MJ, Tauber CA, Masaki S. 1986.** *Seasonal adaptations of insects*. Oxford: University Press.
- Teixeira LAF, Polavarapu S. 2002.** Phenological differences between populations of *Rhagoletis mendax* (Diptera: Tephritidae). *Environmental Entomology* **31**: 1103-1109.
- Vallo V, Remund U, Boller EF. 1976.** Storage conditions of stock-piled diapausing pupae of *Rhagoletis cerasi* for obtaining high emergence rates. *Entomophaga* **21**: 251-256.
- van Zoelen AM, Kusters GJ. 1986.** Termination of diapause in the Cinnabar moth (*Tyria jacobaeae*) by chilling. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **41**: 185-192.
- Wiklund C, Fagerstrom T. 1977.** Why do males emerge before females – hypothesis to explain incidence of protandry in butterflies. *Oecologia* **31**: 153-158.

6. ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΣΤΑ ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΗΣ ΡΑΓΟΛΕΤΙΔΑΣ ΤΗΣ ΚΕΡΑΣΙΑΣ

Περίληψη

Προκειμένου να κατανοηθεί η διαδικασία της προσαρμογής των πληθυσμών στις τοπικές συνθήκες των ενδιαιτημάτων τους, είναι απαραίτητο να εξεταστεί η αλληλεπίδραση της φυσικής επιλογής με τη γονιδιακή ροή. Η ραγολέτιδα της κερασιάς, *Rhagoletis cerasi* L. (Diptera: Tephritidae), θεωρείται ολιγοφάγο είδος της εύκρατης ζώνης και οι πληθυσμοί της απαντώνται διάσπαρτοι σε διαφορετικά ενδιαιτήματα. Πρόσφατες μελέτες της γενετικής δομής των φυσικών πληθυσμών του εντόμου υποστηρίζουν την παρουσία πληθυσμών με διάφορα επίπεδα γονιδιακής ροής. Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκαν τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ενήλικων της ραγολέτιδας της κερασιάς από πληθυσμούς της Ελλάδας και της Γερμανίας, οι οποίοι διαφέρουν ως προς τα γεωγραφικά και τα οικολογικά χαρακτηριστικά των ενδιαιτημάτων τους και είτε συνδέονται με χαμηλά επίπεδα γονιδιακής ροής (αλλοπάτριοι πληθυσμοί) είτε συνδέονται με υψηλότερα επίπεδα γονιδιακής ροής (πληθυσμοί με γονιδιακή ροή). Λαμβάνοντας υπόψη ότι το μέγεθος του σώματος επηρεάζει τις τιμές των δημογραφικών παραμέτρων των ενηλίκων, το μέγεθος του θώρακα και της κεφαλής χρησιμοποιήθηκαν ως συμμεταβλητές στις σχετικές στατιστικές αναλύσεις. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι το μέγεθος του σώματος διέφερε σημαντικά μεταξύ των πληθυσμών της κάθε ομάδας (αλλοπάτριοι πληθυσμοί, πληθυσμοί με γονιδιακή ροή) ενώ τα θηλυκά είχαν σταθερά μεγαλύτερο μέγεθος από τα αρσενικά σε όλους τους πληθυσμούς. Επίσης, σημαντική παραλλακτικότητα καταγράφηκε για μια σειρά από δημογραφικά χαρακτηριστικά μεταξύ των ενηλίκων των πληθυσμών με γονιδιακή ροή, ενώ δεν καταγράφηκαν διαφορές μεταξύ των ενηλίκων των αλλοπατριων πληθυσμών. Κατά συνέπεια, η γενετική παραλλακτικότητα των πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς, που απορρέει από τη γεωγραφική απόσταση, δεν αποτελεί αξιόπιστο δείκτη της παραλλακτικότητας των δημογραφικών χαρακτηριστικών των ενηλίκων.

6.1. Εισαγωγή

Οι εξελικτικές δυνάμεις, όπως είναι η φυσική επιλογή, η γονιδιακή ροή και η γενετική παρέκκλιση, είναι άμεσα συνδεδεμένες τόσο με τη μεταβολή των περιβαλλοντικών συνθηκών από έτος σε έτος όσο και με τη γενετική δομή των βιολογικών χαρακτηριστικών των ατόμων, καθορίζοντας την ικανότητα προσαρμογής των πληθυσμών στις τοπικές περιβαλλοντικές συνθήκες των ενδιαιτημάτων τους (τοπική προσαρμογή) (Kawecki & Ebert, 2004). Ο βαθμός διαφοροποίησης των περιβαλλοντικών συνθηκών από περιοχή σε περιοχή επηρεάζει σημαντικά τη δράση της αποκλίνουσας φυσικής επιλογής. Η αποκλίνουσα φυσική επιλογή σχετίζεται με τη γενετική διαφοροποίηση των φυσικών πληθυσμών ενός είδους (ανεξάρτητα από την γεωγραφική τους απόσταση), είτε άμεσα, δρώντας σε σημαντικά λειτουργικά γονίδια και σε όσα άλλα γονίδια συνδέονται μαζί τους με φυσικό τρόπο, είτε έμμεσα μέσω της γενετικής παρέκκλισης (Schluter, 2001; Rundle & Nosil, 2005; Nosil, Funk & Ortiz-Barrientos, 2009). Γενικότερα, η γονιδιακή ροή δρα ως μια ομοιογενής εξελικτική δύναμη, εμποδίζοντας τη γενετική διαφοροποίηση των πληθυσμών κατά τη διαδικασία της προσαρμογής στα διάφορα ενδιαιτήματα (Barton & Partridge, 2000; Lenormand, 2002), αν και υπάρχουν και εξαιρέσεις (Garant, Forde & Hendry, 2007). Επίσης, οι πληθυσμοί (κυρίως μικρού μεγέθους) που έχουν επηρεαστεί από φαινόμενα 'γενετικής στένωσης' ή φαινόμενα επίδρασης ιδρυτή (bottleneck) είναι ιδιαίτερα επιρρεπείς στην έκφραση τυχαίας γενετικής παραλλακτικότητας λόγω γενετικής παρέκκλισης, καθώς περιορίζεται η δράση της φυσικής επιλογής αλλά και η δυνατότητα προσαρμογής των πληθυσμών στις τοπικές περιβαλλοντικές συνθήκες των ενδιαιτημάτων τους (Kawecki & Ebert, 2004). Συνεπώς, η αλληλεπίδραση μεταξύ της αποκλίνουσας φυσικής επιλογής και των άλλων εξελικτικών δυνάμεων, και ειδικότερα της γονιδιακής ροής, είναι καθοριστική για την έκφραση των βιολογικών χαρακτηριστικών των πληθυσμών που απαντώνται σε διαφορετικά ενδιαιτήματα.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι τιμές των παραμέτρων που σχετίζονται με την επιβίωση και την αναπαραγωγή των ατόμων είναι αντιπροσωπευτικές της καταλληλότητας των ενδιαιτημάτων, ο βαθμός διαφοροποίησης των χαρακτηριστικών που σχετίζονται με την αρμοστικότητα γεωγραφικά απομονωμένων πληθυσμών είναι ενδεικτικός της απόκρισης του κάθε είδους στην αποκλίνουσα φυσική επιλογή. Ωστόσο, τα χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την αρμοστικότητα των πληθυσμών ενδέχεται να διαφέρουν ακόμα και μεταξύ πληθυσμών με γονιδιακή ροή (Reznick *et al.*, 1997; Koskinen, Haugen & Primmer, 2002), εξαιτίας της επιτάχυνσης των εξελικτικών διαδικασιών (Till-Bottrand, Wu & Herding, 1990; Partridge *et al.*, 1995). Αν και θεωρείται ότι τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ατόμων έχουν περιορισμένη

κληρονομικότητας (Fisher, 1958; Mousseau & Roff, 1987; Papaïx *et al.*, 2010; αλλά βλέπε και Seko *et al.*, 2006), η εξελικτική τους ικανότητα παραμένει υψηλή (Houle, 1992) εξαιτίας κυρίως των υψηλών επιπέδων της αθροιστικής γενετικής παραλλακτικότητας (additive genetic variance) (Fowler *et al.*, 1997; Kruuk *et al.*, 2000). Προκειμένου, επομένως, να κατανοηθούν σε βάθος οι εξελικτικές διαδικασίες της προσαρμογής των πληθυσμών στις τοπικές συνθήκες, είναι απαραίτητο να προσδιοριστούν οι παράγοντες διαφοροποίησης των χαρακτηριστικών της αρμοστικότητας των πληθυσμών (Ellegren & Sheldon, 2008).

Η έκφραση πολυγονιδιακών χαρακτήρων, όπως είναι η διάρκεια ζωής και η αναπαραγωγή των εντόμων, επηρεάζεται σημαντικά από τις μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες (Price & Schluter, 1991) και από το μέγεθος των σωματικών δομών των ενηλίκων, όπως είναι το κεφάλι και ο θώρακας που αναπτύσσονται από ξεχωριστούς εμβρυικούς δίσκους (imaginal discs) (Ruiz *et al.*, 1991; Chua, 1992; Hasson *et al.*, 1993; Sivinski, 1993; Partridge *et al.*, 1999). Όμως, το μέγεθος σώματος των ενηλίκων επηρεάζεται άμεσα από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, με αποτέλεσμα να καθίσταται αξιόπιστος δείκτης της επίδρασης των περιβαλλοντικών συνθηκών στην αρμοστικότητα των πληθυσμών. Σε αυτό το πλαίσιο, το μέγεθος σώματος συνιστάται να χρησιμοποιείται ως συμμεταβλητή κατά τις στατιστικές αναλύσεις των δημογραφικών χαρακτηριστικών των ενηλίκων, ώστε να καθίσταται εφικτός ο διαχωρισμός των περιβαλλοντικών από τις γενετικές επιδράσεις (Roff, 1992; Kingsolver & Huey, 2008).

Η παρουσία της ραγολέτιδας της κερασιάς, *Rhagoletis cerasi* L. (Diptera: Tephritidae), στην ευρύτερη περιοχή της Ευρασίας μέσω διάσπαρτων πληθυσμών συνδέεται με την παρουσία γεωγραφικής παραλλακτικότητας στα οικολογικά χαρακτηριστικά (δομή οικοσυστήματος, κλίμα) των ενδιαιτημάτων, δημιουργώντας προϋποθέσεις για την παραλλακτικότητα στα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ατόμων μεταξύ των πληθυσμών (Stearns, 1992). Στο γεγονός αυτό συντελεί και η μειωμένη ικανότητα διασποράς της ραγολέτιδας της κερασιάς σε συνδυασμό με τη διάσπαρτη κατανομή των φυτών-ξενιστών στις περιοχές διασποράς του εντόμου (Phillips & Dirks, 1933; Jones & Wallace, 1955; Boller & Prokopy, 1976; Fletcher, 1989; Kneifl, Paprštejn & Kňourková, 1997). Εντούτοις, μέχρι σήμερα, ελάχιστες είναι οι πληροφορίες για τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς (Boller, 1966a; Boller & Prokopy, 1976), ενώ απουσιάζουν συγκριτικές δημογραφικές μελέτες για πληθυσμούς που προέρχονται από περιοχές με διαφορετικά γεωγραφικά και οικολογικά χαρακτηριστικά. Επίσης, πρόσφατες πληθυσμιακές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση μικροδορυφόρων υποστηρίζουν ότι η γενετική δομή των φυσικών πληθυσμών της ραγολέτιδας της

κερασιάς καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τη γεωγραφική απομόνωση που προκαλείται λόγω απόστασης (Augustinos *et al.*, 2011; 2013). Δεδομένου ότι η γενετική παραλλακτικότητα των γεωγραφικά απομονωμένων πληθυσμών επηρεάζει την έκφραση φαινοτυπικών διαφορών, η παρούσα μελέτη αποσκοπεί, συγκρίνοντας τα δημογραφικά χαρακτηριστικά πληθυσμών από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές, να διαλευκάνει αν τα χαμηλά επίπεδα γονιδιακής ροής που απορρέουν κυρίως από τη γεωγραφική απόσταση των πληθυσμών αποτελεί δείκτη της διαφοροποίησης των δημογραφικών χαρακτηριστικών των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς. Ειδικότερα, εξετάσαμε την υπόθεση ότι τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ενηλίκων διαφέρουν μεταξύ των γεωγραφικά απομονωμένων πληθυσμών με χαμηλά επίπεδα γονιδιακής ροής, ενώ δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών με υψηλά επίπεδα γονιδιακής ροής.

6.2. Υλικά και Μέθοδοι

6.2.1. Πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν πέντε πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς, τέσσερις από την Ελλάδα και ένας από τη Γερμανία (Εικόνα 15). Οι ελληνικοί πληθυσμοί προέρχονταν από τη Δάφνη (Κοζάνη), το Περτούλι (Τρίκαλα), τα Κάτω Λεχώνια (Μαγνησία) και τα Χανιά (Κρήτη), και ο γερμανικός πληθυσμός από το Stecklenberg (Harz). Η ανάλυση της γενετικής δομής των παραπάνω πληθυσμών με τη χρήση ουδέτερων μοριακών δεικτών έδειξε ότι οι πληθυσμοί από τη Δάφνη, το Περτούλι και τα Κ. Λεχώνια ανήκουν στην ίδια ομάδα (cluster) ενώ οι πληθυσμοί από τα Χανιά και το Stecklenberg παρουσιάζουν μικρότερα επίπεδα γονιδιακής ροής με τους παραπάνω πληθυσμούς, παρότι η γονιδιακή ροή μεταξύ τους είναι αυξημένη (Augustinos *et al.*, 2011; 2013).

Η Δάφνη και το Περτούλι είναι ορεινές περιοχές, ενώ τα Κ. Λεχώνια είναι πεδινή-παραθαλάσσια περιοχή (Πίνακας 12). Η περιοχή του Stecklenberg χαρακτηρίζεται από εύκρατο κλίμα, με κρύους χειμώνες και ζεστά και υγρά καλοκαίρια, όπου σημειώνονται συχνές βροχοπτώσεις (Πίνακας 13). Τα καλοκαίρια στα Χανιά είναι δροσερά και ξηρά και ακολουθούνται από ήπιους αλλά βροχερούς χειμώνες. Στις περιοχές του Περτουλίου και της Δάφνης, τα καλοκαίρια είναι επίσης δροσερά και ξηρά, αλλά οι χειμώνες είναι κρύοι και βροχεροί. Αντίθετα, η παραθαλάσσια περιοχή των Κ. Λεχωνίων χαρακτηρίζεται από ζεστά και ξηρά καλοκαίρια με ήπιους και υγρούς χειμώνες. Η περίοδος ωρίμανσης των καρπών της κερασιάς άλλα και άλλων

λιγότερο σημαντικών ξενιστών (*P. mahaleb* and *Lonicera* spp.; Πίνακας 14) είναι ενδεικτικός του χρόνου εμφάνισης των ενηλίκων της ραβολέτιδας της κερασιάς σε κάθε περιοχή.



Εικόνα 15. Χάρτης γεωγραφικής κατανομής των πληθυσμών της ραβολέτιδας της κερασιάς που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν Κεφάλαιο.

Πίνακας 12. Γεωγραφικά χαρακτηριστικά των περιοχών και ημερομηνία συλλογής καρπών για τους πέντε πληθυσμούς της ραγολέτιδας της κερασιάς που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα δημογραφίας.

Πληθυσμός	Ενδιαίτημα	Γεωγραφικό στίγμα (γεωγρ. μήκος, γεωγρ. πλάτος)	Υψόμετρο (μ)	Συλλογή καρπών
Δάφνη	Ορεινή περιοχή της Ελλάδας	40°17'08'' N, 21°08'53'' E	1.050	30 Ιουνίου
Περτούλι	Ορεινή περιοχή της Ελλάδας	39°32'19'' N, 21°27'58'' E	1.121	2 Ιουλίου
Κάτω Λεχώνια	Πεδινή περιοχή της Ελλάδας	39°19'49'' N, 23°02'17'' E	41	21 Μαΐου
Χανιά	Νησιώτικη περιοχή της Ελλάδας	35°51'01'' N, 24°01'07'' E	450	13 Ιουνίου
Stecklenberg	Στους πρόποδες της οροσειράς Harz, Γερμανία	51°73'00'' N, 11°08'00'' E	264	10 Ιουλίου

Πίνακας 13. Κλιματικά δεδομένα των πέντε περιοχών από όπου προήλθαν οι πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς.

Μήνας	Θερμοκρασία [μ.ο., (ελάχιστη-μέγιστη)], °C ¹					Μέση βροχόπτωση, χιλ.				
	Δάφνη	Περτούλι	Κ. Λεχώνια	Χανιά	Stecklenberg	Δάφνη	Περτούλι	Κ. Λεχώνια	Χανιά	Stecklenberg
Ιαν.	4.5 (-3.5 - 18.7)	1.55 (-1 - 4.4)	8.7 (6.1 - 11.7)	12 (9.3 - 15.7)	2 (-0.7 - 4.8)	36.3	204.2	39.8	96.8	48.4
Φεβ.	4 (-4.3 - 17.6)	0.8 (-3 - 4.7)	9.9 (6.5 - 13.6)	11.7 (8.5 - 15.6)	1.2 (-1.8 - 4.3)	20.9	216.7	29.2	85.7	43.9
Μάρ.	7 (0.3 - 20.6)	3.5 (-0.9 - 8.5)	12.9 (8.9 - 17.5)	13.9 (10.3 - 18.5)	4.1 (0.1 - 8.5)	56	177.1	23.4	34.4	49.1
Απρίλ.	11 (4.0 - 22.2)	7.7 (2.6 - 12.2)	15.9 (11.7 - 20.6)	16.3 (12.6 - 20.7)	9.8 (3.8 - 15.3)	42.3	90	17	29.1	38.2
Μάιος	15.8 (6.8 - 27.5)	12.9 (7.0 - 19.7)	21.3 (16.8 - 26.3)	20 (15.8 - 24.5)	13.7 (7.9 - 19.2)	44.9	85.4	31.1	22.6	87.6
Ιουν.	18.9 (11.2 - 27.5)	15.8 (9.6 - 22.4)	25.9 (21.4 - 31.4)	24.9 (20.4 - 30.3)	17.1 (11.1 - 22.1)	39.5	56.9	24.8	0.1	60.7
Ιουλ.	23.3 (13.8 - 31.8)	18.1 (11.5 - 25.8)	28.5 (23.8 - 33.6)	27 (22.2 - 31.4)	19.6 (13.8 - 25.2)	0	57	7.4	0	82.5
Αύγ.	23.2 (15.0 - 34.3)	18.9 (11.7 - 24.4)	28.3 (23.3 - 32.7)	26.7 (22.1 - 31.4)	16.5 (11.6 - 21.5)	3.7	22.5	28.4	0.2	49.6
Σεπτ.	17.5 (9.3 - 30.6)	13.2 (9.3 - 19.0)	22.6 (18.5 - 26.6)	23.3 (19.3 - 28.0)	15.4 (10.2 - 21.1)	43.7	101.3	34.5	14.5	82.2
Οκτ.	15.5 (7.2 - 28.9)	9.2 (5.7 - 14.9)	18 (14.6 - 22.5)	19.9 (16.2 - 24.8)	11 (7.0 - 15.6)	77.1	343.4	66	43.7	27.1
Νοέμ.	13 (6.4 - 22.9)	7.7 (1.9 - 12.8)	14.4 (10.3 - 17.5)	16.8 (13.3 - 20.7)	6.2 (3.2 - 9.3)	146.1	160.8	46.5	38	40.9
Δεκ.	3.3 (-5.1 - 16.6)	3.7 (2.5 - 8.1)	10.3 (7.2 - 13.3)	13.5 (10.4 - 16.7)	3.2 (0.7 - 5.8)	62.1	177.3	99.6	108.9	33.1

¹ Περίοδος αναφοράς : Δάφνη, Χανιά και Κ. Λεχώνια: 2007-2010, Περτούλι: 2009 -2010, Stecklenberg: 2005-2007. Τα κλιματικά στοιχεία της περιοχής της Δάφνης Κοζάνης προέρχονται από το μετεωρολογικό σταθμό του Αεροδρομίου της Καστοριάς (Άργος Ορεστικού) (υψόμετρο: 669μ) σε απόσταση περίπου 20 χμ. από τη Δάφνη.

Πίνακας 14. Περίοδοι διαθεσιμότητας καρπών σε κάθε περιοχή. Οι σκιαζόμενες οριζόντιες περιοχές αναφέρονται στη διάρκεια της περιόδου διαθεσιμότητας καρπών.

Πληθυσμός	Απρίλιος	Μάιος	Ιούνιος	Ιούλιος	Αύγουστος
Δάφνη			■	■	
Περτούλι			■	■	■
Κάτω Λεχώνια		■	■		
Χανιά		■	■		
Stecklenberg			■	■	

Βάσει της γεωγραφικής και γενετικής απόστασης, καθώς και των χαρακτηριστικών των ενδαιτημάτων (περίοδος διαθεσιμότητας καρπών, κλίμα), ορίσαμε δύο ομάδες πληθυσμών. Η πρώτη ομάδα (που από εδώ και στο εξής θα αναφέρεται ως ‘αλλοπάτριοι πληθυσμοί’) περιλαμβάνει τους πληθυσμούς της Δάφνης, των Χανίων και του Stecklenberg, οι οποίοι θεωρούνται γεωγραφικά απομονωμένοι με χαμηλά επίπεδα γονιδιακής ροής (Augustinos *et al.*, 2013). Ο πληθυσμός της Δάφνης, ο οποίος είναι αντιπροσωπευτικός της ηπειρωτικής Ελλάδας, επιλέχθηκε τυχαία μεταξύ των τριών ηπειρωτικών πληθυσμών. Οι διαφορές στα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ενηλίκων μεταξύ των αλλοπατριων πληθυσμών παρέμεναν σταθερές (βλέπε Αποτελέσματα), ανεξάρτητα του πληθυσμού (Δάφνη, Περούλι ή Κ. Λεχώνια) που αντιπροσώπευε την ηπειρωτική Ελλάδα στην ομάδα των αλλοπατριων πληθυσμών. Η δεύτερη ομάδα αποτελείται από τους πληθυσμούς της Δάφνης, του Περούλιου και των Κ. Λεχωνίων, οι οποίοι βρίσκονται σε μικρότερη γεωγραφική απόσταση (ηπειρωτικοί ελληνικοί πληθυσμοί) και συνδέονται με υψηλότερα επίπεδα γονιδιακής ροής (από εδώ και στο εξής θα αναφέρεται ως ‘πληθυσμοί με γονιδιακή ροή’), ενώ διαφέρουν ως προς τα οικολογικά χαρακτηριστικά των ενδαιτημάτων τους.

6.2.2. Πειραματική διαδικασία

Τα ενήλικα της ραγολέτιδας της κερασιάς προέκυψαν από νύμφες που συλλέχτηκαν από προσβεβλημένα κεράσια (*P. avium* L.) των εξεταζόμενων περιοχών (Κεφάλαιο 2). Οι νύμφες, αμέσως μετά την συλλογή τους, παρέμειναν στο Εργαστήριο στους $25 \pm 1^\circ\text{C}$ για 2.5 μήνες. Στη συνέχεια, μια ομάδα αποτελούμενη από 400 νύμφες από κάθε πληθυσμό τοποθετήθηκε στους $3 \pm 1^\circ\text{C}$ για μια περίοδο από 6 έως 8 μήνες, που είναι ικανή για την περάτωση της διάπαυσης του κάθε πληθυσμού. Οι νύμφες μεταφέρθηκαν ξανά στους $25 \pm 1^\circ\text{C}$ μέχρι να ολοκληρωθεί η έξοδος των ενηλίκων. Ένα ζευγάρι ατόμων (ένα αρσενικό και ένα θηλυκό) από κάθε πληθυσμό (εντός 24 ωρών μετά την ενηλικίωσή τους) τοποθετήθηκε σε ατομικό κλουβάκι δημογραφίας (Κεφάλαιο 2) και καταγράφονταν καθημερινά η ωτοκία των θηλυκών και η ημερομηνία του θανάτου των αρσενικών και των θηλυκών ατόμων. Προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση της πιθανής παραλλακτικότητας της τροφής των προνυμφών στις δημογραφικές παραμέτρους των ενηλίκων, καταγράφηκε το μέγεθος του θώρακα και της κεφαλής του κάθε ενήλικου (θηλυκό και αρσενικό) κατά την ημερομηνία του θανάτου του, έτσι ώστε να οριστεί το μέγεθος του σώματος ως συμμεταβλητή στις αναλύσεις των δημογραφικών χαρακτηριστικών των ενηλίκων (Κεφάλαιο 2). Πραγματοποιήθηκαν 33-50 επαναλήψεις για κάθε πληθυσμό.

6.2.3. Στατιστική ανάλυση

Για να εξεταστεί εάν τα στοιχεία ακολουθούν κανονική κατανομή, χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο Kolmogorov–Smirnov. Τα κριτήρια Kruskal–Wallis και Mann–Whitney χρησιμοποιήθηκαν για να εξεταστεί αν ο πληθυσμός και το φύλο είχαν σημαντική επίδραση στο μήκος του θώρακα, στο πλάτος του θώρακα και στο πλάτος της κεφαλής των ενηλίκων μεταξύ των πληθυσμών των δύο εξεταζόμενων ομάδων (‘αλλοπάτριοι πληθυσμοί’ και ‘πληθυσμοί με γονιδιακή ροή’). Το μοντέλο ανάλογων κινδύνων του Cox (Cox proportional hazard model) της μορφής $h_i(t) = h_0(t)e^{\eta_i}$ (Μοντέλο 1) (Collett, 2003) χρησιμοποιήθηκε για να εξεταστεί: α) η επίδραση του πληθυσμού, του φύλου και του μεγέθους σώματος (μήκος θώρακα, πλάτος θώρακα και πλάτος κεφαλής) στη διάρκεια ζωής και β) η επίδραση του πληθυσμού και του μεγέθους σώματος στη διάρκεια των αναπαραγωγικών περιόδων των θηλυκών (περίοδος πρωτοκίας, ωτοκίας και περίοδος μετά την ωτοκία) μεταξύ των πληθυσμών και των δύο ομάδων. Η $h_i(t)$ αποτελεί τη συνάρτηση κινδύνου (hazard rates) δεδομένων των παρατηρήσεων στις συμμεταβλητές και η $h_0(t)$ τη συνάρτηση κινδύνου αναφοράς (baseline hazard). Οι παράγοντες με σημαντική επίδραση εισήχθησαν σε πολυ-παραγοντικό μοντέλο ανάλογων κινδύνων (μοντέλο Cox). Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε σταδιακή διαδικασία επιλογής (forward stepwise) για την κατασκευή του τελικού μοντέλου. Οι παράγοντες που δεν είχαν σημαντική επίδραση (κριτήριο Wald) εξαιρέθηκαν από το τελικό μοντέλο. Για παράδειγμα, στην περίπτωση της ομάδας των πληθυσμών με γονιδιακή ροή, ο παράγοντας πληθυσμός αποτελεί τη συμμεταβλητή (covariate) στο μοντέλο (1), όπου το $h_i = \beta_1 \text{πληθυσμός}_1 + \beta_2 \text{πληθυσμός}_2$ αποτελεί το γραμμικό τμήμα του μοντέλου. Ο παράγοντας πληθυσμός₁ λαμβάνει την τιμή 1 όταν το ενήλικο προέρχεται από τη Δάφνη (διαφορετικά λαμβάνει την τιμή 0) και ο παράγοντας πληθυσμός₂ λαμβάνει την τιμή 1 όταν το ενήλικο προέρχεται από το Περούλι (διαφορετικά λαμβάνει την τιμή 0). Ο πληθυσμός των Κ. Λεχωνίων χρησιμοποιήθηκε ως πληθυσμός αναφοράς (baseline). Η επίδραση των συμμεταβλητών είτε στη διάρκεια της ζωής είτε στη διάρκεια των αναπαραγωγικών περιόδων υπολογίζεται από τους συντελεστές $\beta_{(i)}$ στο γραμμικό τμήμα του μοντέλου.

Οι τιμές της μέσης ωτοκίας (fecundity) των θηλυκών των πληθυσμών με γονιδιακή ροή μετατράπηκαν σε $\sqrt{x} + 1$ ώστε να τηρούν τις προϋποθέσεις για την ανάλυση συνδιακύμανσης. Η ανάλυση συνδιακύμανσης (ANCOVA) χρησιμοποιήθηκε για να εξεταστούν οι παράγοντες που επηρεάζουν την ωτοπαραγωγή, με τον πληθυσμό να ορίζεται ως σταθερός παράγοντας (fixed factor) και το μέγεθος σώματος των

ενηλίκων (μήκος θώρακα, πλάτος θώρακα και πλάτος κεφαλής) ως συμμεταβλητή (covariate). Η σύγκριση της κατανομής της ωτοκίας σε σχέση με την ηλικία μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση ROC (Receiver Operating Characteristic), όπως αυτή περιγράφηκε από τους Alonzo *et al.* (2009). Οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση των στατιστικών πακέτων SPSS 17.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA.) και R 2.10 (<http://www.r-project.org>).

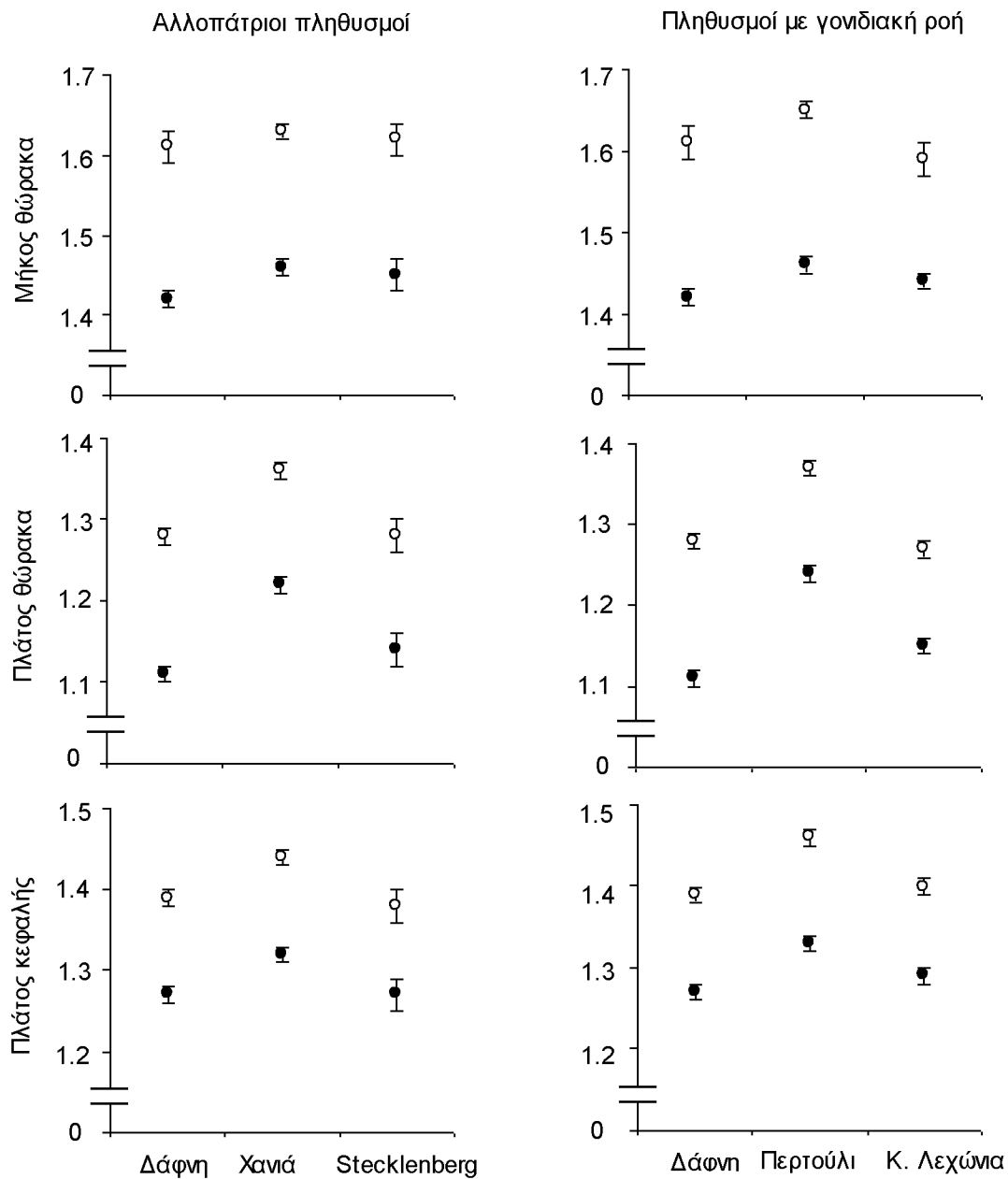
6.3. Αποτελέσματα

6.3.1. Μέγεθος σώματος ενηλίκων

Σύμφωνα με το κριτήριο Mann–Whitney, τα αρσενικά είχαν σημαντικά μικρότερο μέγεθος από τα θηλυκά των αλλοπάτριων πληθυσμών (μήκος θώρακα: $U = 1759.5$, $N = 261$, $P < 0.001$; πλάτος θώρακα: $U = 2280$, $N = 261$, $P < 0.001$; πλάτος κεφαλής: $U = 2864$, $N = 261$, $P < 0.001$) και των πληθυσμών με γονιδιακή ροή (μήκος θώρακα: $U = 1944.5$, $N = 295$, $P < 0.001$; πλάτος θώρακα: $U = 3229$, $N = 295$, $P < 0.001$; πλάτος κεφαλής: $U = 3441$, $N = 295$, $P < 0.001$) (Διάγραμμα 6).

Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο μήκος του θώρακα ανάμεσα στα αρσενικά (Κριτήριο Kruskal–Wallis; $\chi^2 = 4.852$, d.f. = 2, $P = 0.088$) ή θηλυκών (Κριτήριο Kruskal–Wallis; $\chi^2 = 1.633$, d.f. = 2, $P = 0.435$) των αλλοπάτριων πληθυσμών. Αντίθετα, το πλάτος του θώρακα και το πλάτος της κεφαλής διέφερε σημαντικά μεταξύ των πληθυσμών τόσο στα αρσενικά (Κριτήριο Kruskal–Wallis; πλάτος θώρακα: $\chi^2 = 42.970$, d.f. = 2, $P < 0.001$; πλάτος κεφαλής: $\chi^2 = 26.522$, d.f. = 2, $P < 0.001$) όσο και στα θηλυκά (Κριτήριο Kruskal–Wallis; πλάτος θώρακα: $\chi^2 = 11.835$, d.f. = 2, $P = 0.003$; πλάτος κεφαλής: $\chi^2 = 12.473$, d.f. = 2, $P = 0.002$).

Το μέγεθος του σώματος των ενηλίκων διέφερε σημαντικά μεταξύ των πληθυσμών με γονιδιακή ροή τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά, με εξαίρεση το μήκος του θώρακα των αρσενικών απόμων (αρσενικά, μήκος θώρακα: $\chi^2 = 3.556$, d.f. = 2, $P = 0.169$; πλάτος θώρακα: $\chi^2 = 57.202$, d.f. = 2, $P < 0.001$; πλάτος κεφαλής: $\chi^2 = 20.140$, d.f. = 2, $P < 0.001$; θηλυκά, μήκος θώρακα: $\chi^2 = 10.277$, d.f. = 2, $P = 0.006$; πλάτος θώρακα: $\chi^2 = 36.960$, d.f. = 2, $P < 0.001$; πλάτος κεφαλής: $\chi^2 = 16.935$, d.f. = 2, $P < 0.001$).



Διάγραμμα 6. Μήκος θώρακα, πλάτος θώρακα και πλάτος κεφαλής (χιλιοστά \pm SE) των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς που προέρχονται από αλλοπάτριους πληθυσμούς και από πληθυσμούς με γονιδιακή ροή. Οι κύκλοι μαύρου και άσπρου χρώματος αναφέρονται στα αρσενικά και θηλυκά, αντίστοιχα. Για να διευκολυνθεί η σύγκριση μεταξύ των πληθυσμών, τα δεδομένα του μεγέθους του σώματος των ενηλίκων της Δάφνης δίνονται και στις δύο στήλες.

6.3.2. Επιβίωση

Η μέση διάρκεια ζωής των ενήλικων ατόμων (αρσενικών και θηλυκών) τόσο των αλλοπατριων πληθυσμών όσο και των πληθυσμών με γονιδιακή ροή δίνονται στον Πίνακα 15. Στους αλλοπατριους πληθυσμούς, το μοντέλο Cox (εξετάζοντας τον κάθε παράγοντα χωριστά) έδειξε ότι ούτε ο πληθυσμός ($\chi^2 = 4.298$, d.f. = 2, $P = 0.117$) ούτε το φύλο ($\chi^2 = 3.319$, d.f. = 1, $P = 0.068$) είχαν σημαντική επίδραση στη μακροβιότητα των ενηλίκων, σε αντίθεση με το μέγεθος σώματος (μήκος θώρακα: $\chi^2 = 5.032$, d.f. = 1, $P = 0.025$; πλάτος θώρακα: $\chi^2 = 6.366$, d.f. = 1, $P = 0.012$; πλάτος κεφαλής: $\chi^2 = 7.277$, d.f. = 1, $P = 0.007$). Οι παράγοντες με σημαντική επίδραση εισήχθησαν σε πολυ-παραγοντικό μοντέλο ανάλογων κινδύνων (μοντέλο Cox). Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε σταδιακή διαδικασία επιλογής (forward stepwise) για την κατασκευή του τελικού μοντέλου, που έδειξε ότι μόνο το πλάτος της κεφαλής είχε σημαντική επίδραση στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων.

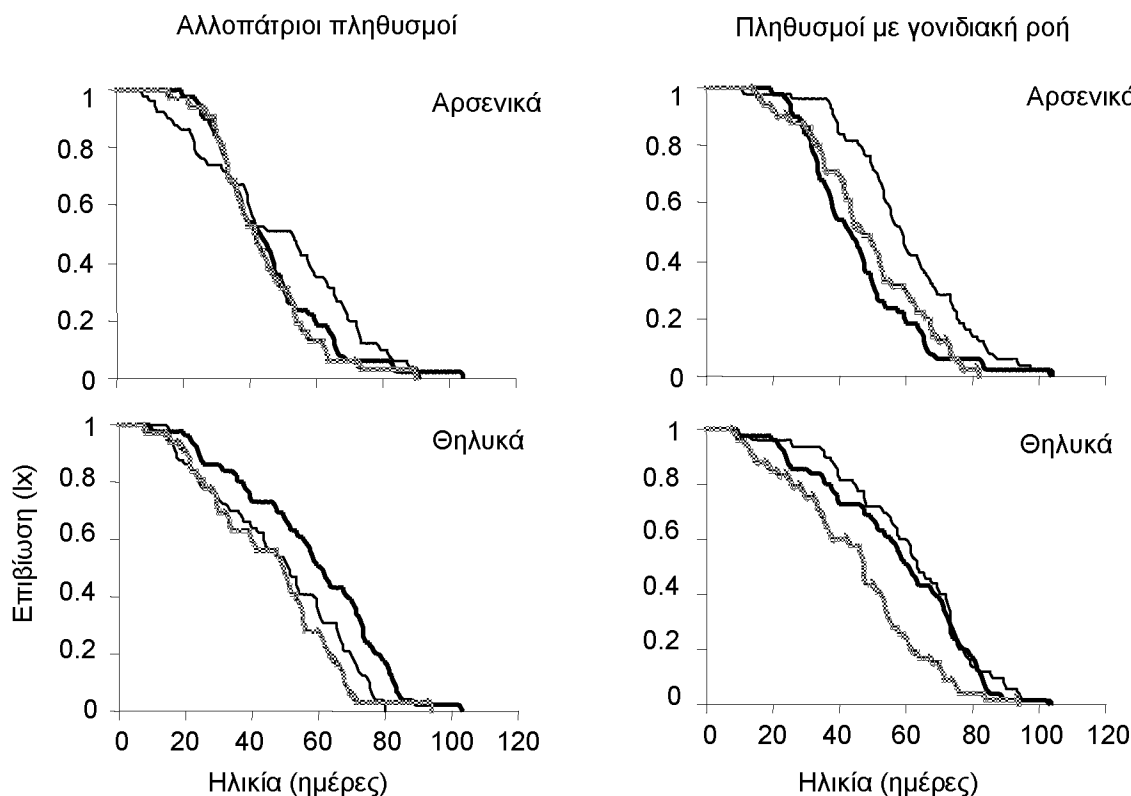
Σχετικά με τους πληθυσμούς με γονιδιακή ροή, το μοντέλο Cox (εξετάζοντας τον κάθε παράγοντα χωριστά) έδειξε ότι ο πληθυσμός ($\chi^2 = 21.003$, d.f. = 2, $P < 0.001$), το φύλο ($\chi^2 = 4.311$, d.f. = 1, $P = 0.038$) και το μέγεθος του σώματος (μήκος θώρακα: $\chi^2 = 23.552$, d.f. = 1, $P < 0.001$; πλάτος θώρακα: $\chi^2 = 23.627$, d.f. = 1, $P < 0.001$; πλάτος κεφαλής: $\chi^2 = 20.766$, d.f. = 1, $P < 0.001$) είχαν σημαντική επίδραση στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων. Οι παράγοντες με σημαντική επίδραση εισήχθησαν σε πολυ-παραγοντικό μοντέλο ανάλογων κινδύνων (μοντέλο Cox). Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε σταδιακή διαδικασία επιλογής για την κατασκευή του τελικού μοντέλου. Βρέθηκε ότι η διάρκεια ζωής των ενηλίκων επηρεάζεται σημαντικά από τον πληθυσμό ($\chi^2 = 15.159$, d.f. = 2, $P = 0.001$) και το μήκος του θώρακα ($\chi^2 = 17.885$, d.f. = 1, $P < 0.001$). Συγκεκριμένα, τα ενήλικα από το Περτούλι ήταν τα μακροβιότερα άτομα όλων των πληθυσμών. Ο κίνδυνος θανάτου για ένα ενήλικο άτομο από το Περτούλι μειώνεται κατά παράγοντα $e^{-0.475}$ (≈ 0.622), κατά μέσο όρο, ή 62%, σε σχέση με ένα ενήλικο από τα Κ. Λεχώνια (πληθυσμός αναφοράς).

Πίνακας 15. Μακροβιότητα αρσενικών και θηλυκών και αναπαραγωγικοί ρυθμοί (μέση και μέγιστη ωοπαραγωγή) θηλυκών πέντε πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς.

Πληθυσμός	Μέση διάρκεια ζωής (ημέρες± SE)		Αναπαραγωγικοί ρυθμοί (αυγά ανά θηλυκό)	
	Αρσενικά	Θηλυκά	Μέση συνολική ωοπαραγωγή ± SE	Μέγιστη ωοπαραγωγή
Δάφνη	45.98 ± 2.44	57.34 ± 3.21	278.84 ± 22.3	384.16
Περτούλι	60.48 ± 2.61	62.38 ± 2.87	116.84 ± 11.1	152.20
Κάτω Λεχώνια	47.58 ± 2.59	43.54 ± 3.07	138.88 ± 18.0	266.38
Χανιά	48.10 ± 3.40	48.20 ± 2.92	156.68 ± 16.3	220.73
Stecklenberg	42.94 ± 2.80	44.64 ± 3.59	191.67 ± 22.5	284.19

Η μέγιστη ωοπαραγωγή υπολογίστηκε από τον τύπο $\sum_{x=a}^b Mx$, όπου x = διάστημα ηλικίας σε ημέρες, a = ηλικία κατά την έναρξη της ωοπαραγωγής, b = ηλικία κατά τη λήξη της ωοπαραγωγής, Mx = συνολικός αριθμός αυγών που εναπόθεσε ένα μέσο θηλυκό στην ηλικία x (Carey, 1993).

Οι καμπύλες επιβίωσης σε σχέση με την ηλικία των θηλυκών και των αρσενικών ατόμων τόσο των αλλοπάτριων πληθυσμών όσο και των πληθυσμών με γονιδιακή ροή δίνονται στο Διάγραμμα 7. Στα θηλυκά των αλλοπάτριων πληθυσμών, ο ρυθμός θνησιμότητας παρέμεινε χαμηλός μέχρι την 20^η ημέρα ζωής τους και αυξάνονταν σταδιακά στις μεγαλύτερες ηλικίες. Ωστόσο, ο ρυθμός θνησιμότητας των θηλυκών από τη Δάφνη ήταν μικρότερος (αλλά όχι σημαντικά) από τον αντίστοιχο των θηλυκών από τα Χανιά και Stecklenberg. Οι καμπύλες επιβίωσης των αρσενικών από τη Δάφνη και το Stecklenberg ήταν σχεδόν ταυτόσημες, παρουσιάζοντας μια χαρακτηριστική απότομη αύξηση του ρυθμού θνησιμότητας μετά την 20^η ημέρα ζωής τους, ενώ παρόμοια ήταν και η καμπύλη επιβίωσης των αρσενικών από τα Χανιά. Σχετικά με την ομάδα των πληθυσμών με γονιδιακή ροή, τα θηλυκά από τη Δάφνη και το Περούλι είχαν υψηλότερο ρυθμό επιβίωσης μετά την ηλικία των 10 ημερών σε σχέση με τα θηλυκά από τα Κ. Λεχώνια. Ο ρυθμός θνησιμότητας των αρσενικών ήταν πολύ χαμηλός μέχρι περίπου την ημέρα 20 για τα άτομα από τη Δάφνη και τα Κ. Λεχώνια, ενώ ο ρυθμός επιβίωσης των αρσενικών από το Περούλι παρέμεινε υψηλός μέχρι την 40^η ημέρα της ενήλικης ζωής τους.



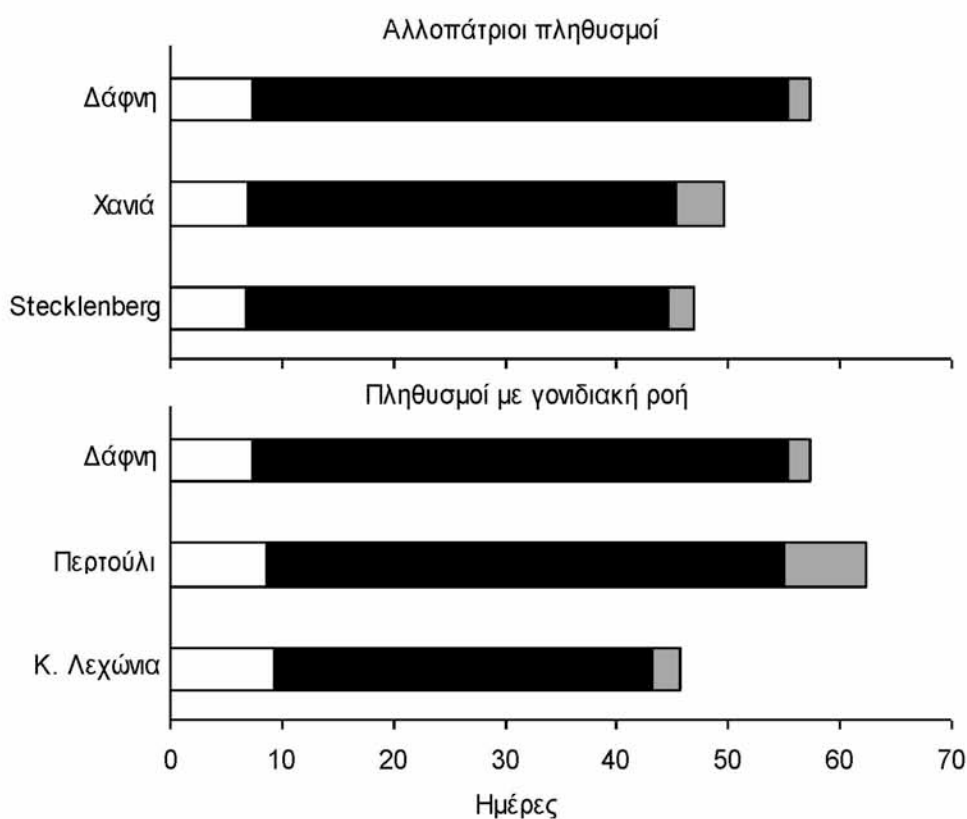
Διάγραμμα 7. Καμπύλες επιβίωσης των ενηλίκων ατόμων (αρσενικών και θηλυκών) των αλλοπατριων πληθυσμών και των πληθυσμών με γονιδιακή ροή. Οι έντονες μαύρες, λεπτές μαύρες και γκρι γραμμές αναφέρονται στα ενήλικα από τη Δάφνη, τα Χανιά και το Stecklenberg, αντίστοιχα (αριστερή στήλη). Οι έντονες μαύρες, λεπτές μαύρες και γκρι γραμμές αναφέρονται στα ενήλικα από τη Δάφνη, το Perthouli και τα Κάτω Λεχώνια, αντίστοιχα (δεξιά στήλη). Για να διευκολυνθεί η σύγκριση μεταξύ των πληθυσμών, οι καμπύλες επιβίωσης των ενηλίκων της Δάφνης δίνονται και στις δύο στήλες.

6.3.3. Αναπαραγωγή

Η έναρξη της ωοτοκίας των θηλυκών των αλλοπατριων πληθυσμών πραγματοποιήθηκε μέχρι την 7^η ημέρα της ζωής τους και η μέση διάρκεια της περιόδου μετά την ωοτοκία ήταν περίπου 3 ημέρες (Διάγραμμα 8). Η μέση διάρκεια της περιόδου ωοτοκίας των θηλυκών κυμαίνονταν από 37 έως 48 ημέρες. Ειδικότερα, η περίοδος ωοτοκίας των θηλυκών από τη Δάφνη ήταν μεγαλύτερη από αυτή των θηλυκών από τα Χανιά και το Stecklenberg. Το μοντέλο Cox έδειξε ότι ούτε ο πληθυσμός ($\chi^2 = 1.326$, d.f. = 2, $P = 0.515$) ούτε το μέγεθος του σώματος (μήκος θώρακα: $\chi^2 = 0.354$, d.f. = 1, $P = 0.552$; πλάτος θώρακα: $\chi^2 = 0.546$, d.f. = 1, $P =$

0.460; πλάτος κεφαλής: $\chi^2 = 0.219$, d.f. = 1, $P = 0.640$) ήταν σημαντικοί εκτιμητές της διάρκειας της περιόδου πριν την ωτοκία. Ομοίως, δεν βρέθηκε σημαντική επίδραση του πληθυσμού ή του μεγέθους του σώματος στη διάρκεια της περιόδου μετά την ωτοκία (Μοντέλο Cox; πληθυσμός: $\chi^2 = 2.367$, d.f. = 2, $P = 0.306$; μήκος θώρακα: $\chi^2 = 0.000$, d.f. = 1, $P = 0.993$; πλάτος θώρακα: $\chi^2 = 0.537$, d.f. = 1, $P = 0.463$; πλάτος κεφαλής: $\chi^2 = 0.253$, d.f. = 1, $P = 0.615$). Ωστόσο, ο πληθυσμός ($\chi^2 = 14.633$, d.f. = 1, $P = 0.001$) είχε σημαντική επίδραση στη διάρκεια της περιόδου ωτοκίας, σε αντίθεση με το μέγεθος του σώματος (μήκος θώρακα: $\chi^2 = 0.137$, d.f. = 1, $P = 0.711$; πλάτος θώρακα: $\chi^2 = 0.015$, d.f. = 1, $P = 0.902$; πλάτος κεφαλής: $\chi^2 = 0.081$, d.f. = 1, $P = 0.777$).

Σχετικά με τους πληθυσμούς με γονιδιακή ροή, η έναρξη της ωτοκίας πραγματοποιήθηκε μέχρι την 7^η ημέρα της ζωής των θηλυκών από τη Δάφνη, ενώ χρειάστηκαν περισσότερο από 9 ημέρες για να ξεκινήσουν να ωτοκοούν τα θηλυκά από τα Κ. Λεχώνια (Διάγραμμα 8). Επιπρόσθετα, η περίοδος ωτοκίας των θηλυκών από τη Δάφνη και το Περούλι ήταν μακρύτερη από αυτή των θηλυκών από τα Κ. Λεχώνια. Το μοντέλο Cox έδειξε ότι ο πληθυσμός ($\chi^2 = 8.195$, d.f. = 2, $P = 0.017$) είχε σημαντική επίδραση στη διάρκεια της περιόδου πριν την ωτοκία, σε αντίθεση με το μέγεθος του σώματος (μήκος θώρακα: $\chi^2 = 0.119$, d.f. = 1, $P = 0.730$; πλάτος θώρακα: $\chi^2 = 0.065$, d.f. = 1, $P = 0.799$; πλάτος κεφαλής: $\chi^2 = 0.024$, d.f. = 1, $P = 0.878$). Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα για τη διάρκεια της περιόδου μετά την ωτοκία (πληθυσμός: $\chi^2 = 11.930$, d.f. = 2, $P = 0.003$; μήκος θώρακα: $\chi^2 = 2.671$, d.f. = 1, $P = 0.102$; πλάτος θώρακα: $\chi^2 = 3.685$, d.f. = 1, $P = 0.055$; πλάτος κεφαλής: $\chi^2 = 0.364$, d.f. = 1, $P = 0.547$). Το μοντέλο Cox (εξετάζοντας τον κάθε παράγοντα χωριστά) έδειξε ότι η διάρκεια της περιόδου ωτοκίας επηρεάζεται σημαντικά από τον πληθυσμό ($\chi^2 = 11.059$, d.f. = 2, $P = 0.004$) και το μήκος του θώρακα ($\chi^2 = 6.487$, d.f. = 1, $P = 0.011$), σε αντίθεση με το πλάτος του θώρακα ($\chi^2 = 2.746$, d.f. = 1, $P = 0.097$) και το πλάτος της κεφαλής ($\chi^2 = 2.697$, d.f. = 1, $P = 0.101$). Χρησιμοποιώντας μόνο τους παράγοντες με σημαντική επίδραση στο τελικό μοντέλο του Cox, βρέθηκε ότι ο πληθυσμός ($\chi^2 = 8.502$, d.f. = 2, $P = 0.014$) και το μήκος του θώρακα ($\chi^2 = 4.223$, d.f. = 1, $P = 0.040$) ήταν σημαντικοί εκτιμητές της διάρκειας της περιόδου ωτοκίας των θηλυκών των πληθυσμών με γονιδιακή ροή.



Διάγραμμα 8. Περίοδοι αναπαραγωγής σε σχέση με την ηλικία των θηλυκών των αλλοπάτριων πληθυσμών και των πληθυσμών με γονιδιακή ροή. Οι στήλες με άσπρο, μαύρο και γκρι χρώμα αναφέρονται στη διάρκεια της περιόδου πριν την ωτοτομία, την περίοδο ωτοτομίας και την περίοδο μετά την ωτοτομία, αντίστοιχα. Για να διευκολυνθεί η σύγκριση μεταξύ των πληθυσμών, τα δεδομένα σχετικά με τις αναπαραγωγικές περιόδους της Δάφνης δίνονται και στα δύο γραφήματα.

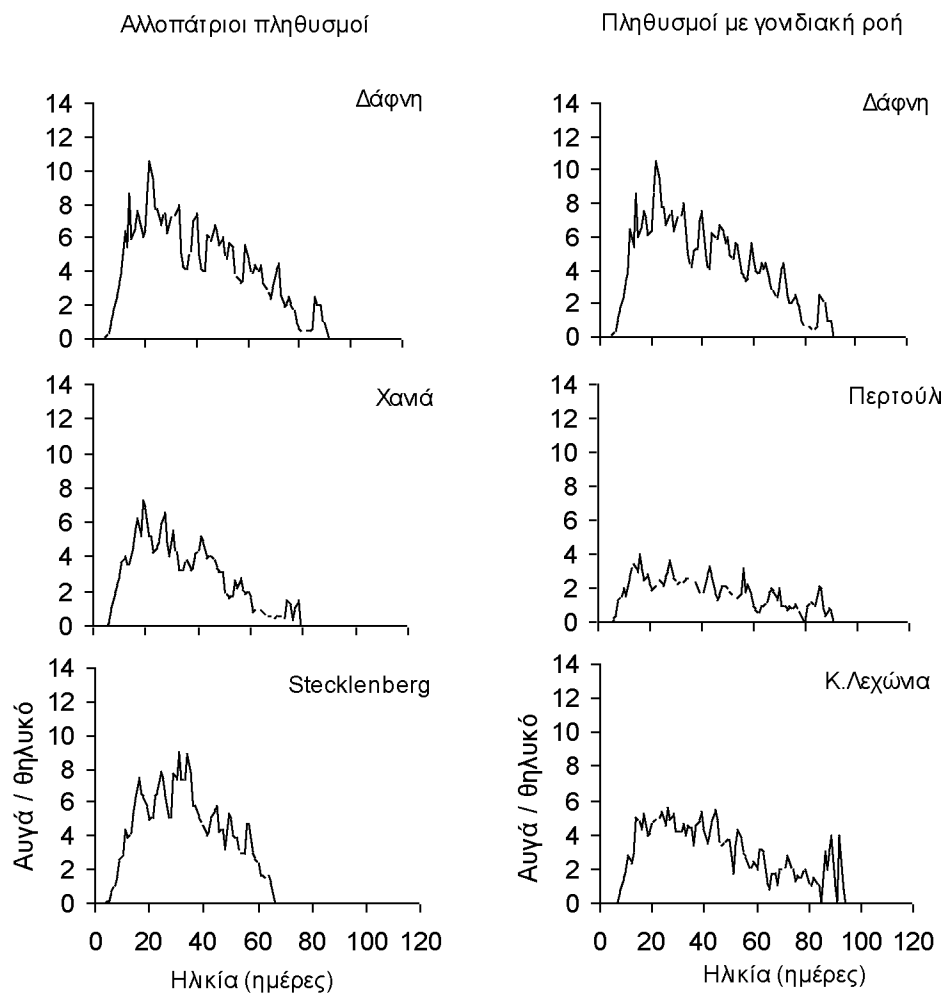
Η ανάλυση συνδιακύμανσης (ANCOVA), χρησιμοποιώντας τον πληθυσμό ως σταθερό παράγοντα και το μέγεθος σώματος των ενηλίκων ως συμμεταβλητή, έδειξε ότι ο πληθυσμός και το μήκος του θώρακα είχαν σημαντική επίδραση στη μέση συνολική ωτοπαραγωγή των θηλυκών των αλλοπάτριων πληθυσμών, σε αντίθεση με το πλάτος του θώρακα και το πλάτος της κεφαλής (πληθυσμός: $F = 12.772$, d.f. = 2, 124, $P < 0.001$; μήκος θώρακα: $F = 5.880$, d.f. = 1, $P = 0.017$; πλάτος θώρακα: $F = 0.456$, d.f. = 1, $P = 0.501$; πλάτος κεφαλής: $F = 0.526$, d.f. = 1, $P = 0.470$). Τα θηλυκά από τη Δάφνη εναπόθεσαν περισσότερα αυγά σε σχέση με αυτά από τα Χανιά και το Stecklenberg (Πίνακας 15). Επιπρόσθετα, τα θηλυκά από τη Δάφνη είχαν διαφορετική κατανομή ωτοτομίας σε σχέση με την ηλικία, συγκριτικά με τα θηλυκά από τα Χανιά (ROC ανάλυση, $P < 0.001$) και το Stecklenberg ($P < 0.011$). Οι κατανομές

ωοτοκίας των θηλυκών από τα Χανιά και το Stecklenberg ήταν παρόμοιες ($P = 0.511$).

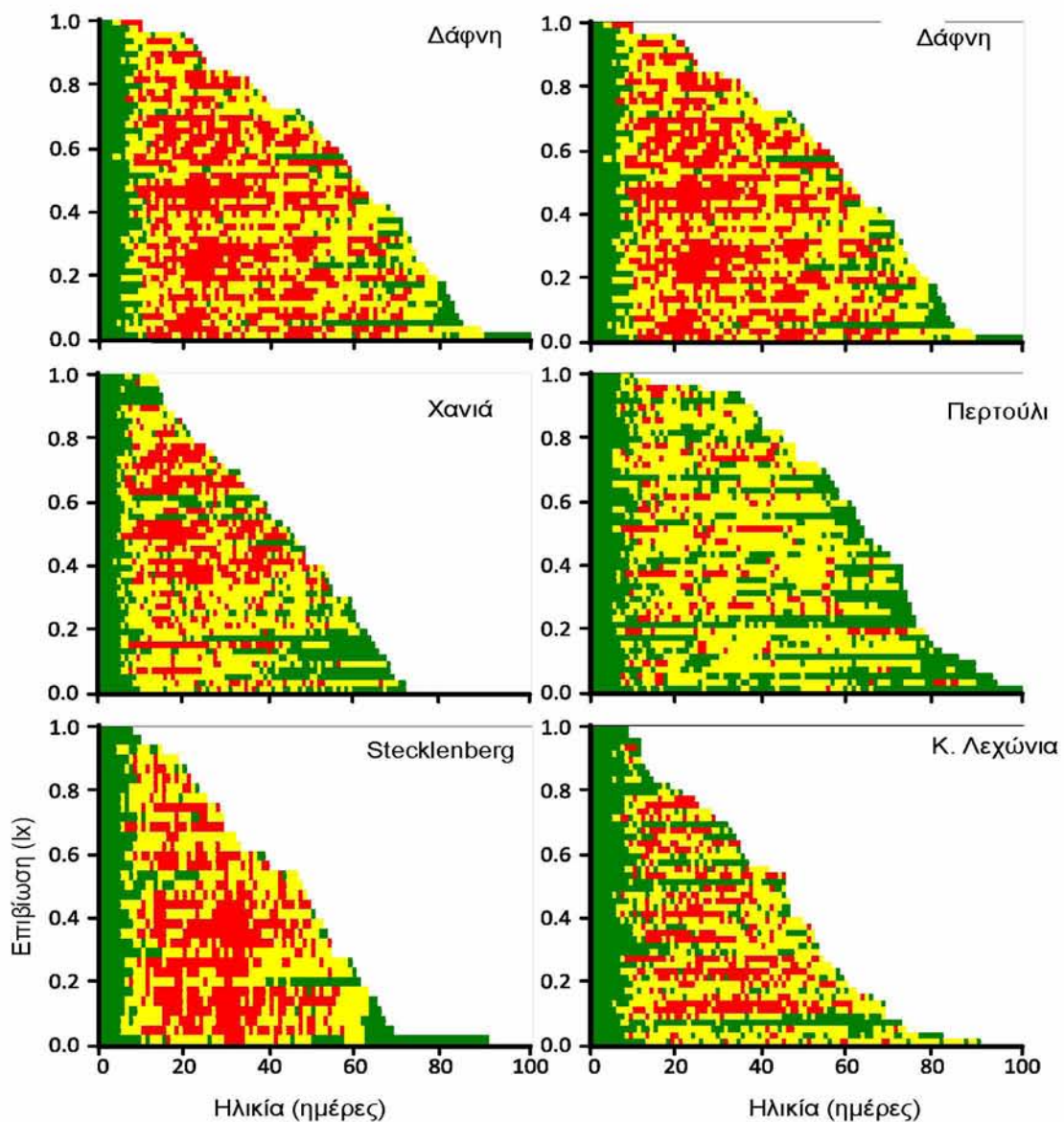
Σχετικά με τους πληθυσμούς με γονιδιακή ροή, τα θηλυκά από τη Δάφνη εναπόθεσαν περισσότερα αυγά σε σχέση με αυτά από το Περτούλι και τα Κ. Λεχώνια (Πίνακας 15). Η Ανάλυση συνδιακύμανσης (ANCOVA), χρησιμοποιώντας τον πληθυσμό ως σταθερό παράγοντα και το μέγεθος σώματος των ενηλίκων (μήκος θώρακα, πλάτος θώρακα, πλάτος κεφαλής) ως συμμεταβλητή, έδειξε ότι μόνο ο πληθυσμός έχει σημαντική επίδραση στη μέση συνολική ωοπαραγωγή (πληθυσμός: $F = 26.530$, d.f. = 2, 140, $P < 0.001$; μήκος θώρακα: $F = 0.835$, d.f. = 1, $P = 0.362$; πλάτος θώρακα: $F = 0.685$, d.f. = 1, $P = 0.409$; πλάτος κεφαλής: $F = 2.086$, d.f. = 1, $P = 0.151$). Όμως, η κατανομή των ημερών ωοτοκίας ήταν παρόμοια μεταξύ των θηλυκών από τη Δάφνη και το Περτούλι (ROC ανάλυση, $P = 0.978$), τη Δάφνη και τα Κ. Λεχώνια ($P = 0.206$) και από το Περτούλι και τα Κ. Λεχώνια ($P = 0.235$).

Οι καμπύλες της κατανομής ωοτοκίας σε σχέση με την ηλικία δεν διέφεραν μεταξύ των θηλυκών των αλλοπάτριων πληθυσμών (Διάγραμμα 9). Ο μέγιστος ρυθμός ωοπαραγωγής (5 αυγά ανά θηλυκό) καταγράφηκε μεταξύ της 20^{ης} και 27^{ης} ημέρας. Αμέσως μετά, παρατηρήθηκε μια σταδιακή μείωση της ωοπαραγωγής των θηλυκών από τη Δάφνη και τα Χανιά, ενώ η ωοπαραγωγή των θηλυκών από το Stecklenberg μειώθηκε απότομα. Περισσότερες λεπτομέρειες για την κατανομή της ωοτοκίας σε σχέση με την ηλικία απεικονίζονται στο Διάγραμμα 10 (Carey *et al.*, 1998).

Οι καμπύλες κατανομής της ωοτοκίας σε σχέση με την ηλικία διέφεραν μεταξύ των πληθυσμών με γονιδιακή ροή (Διάγραμμα 9). Ο μέγιστος ρυθμός ωοπαραγωγής καταγράφηκε μεταξύ της 20^{ης} και 27^{ης} ημέρας για τα θηλυκά από τη Δάφνη, ενώ δεν καταγράφηκαν μέγιστα ωοπαραγωγής για τα θηλυκά από το Περτούλι και τα Κ. Λεχώνια. Στο Διάγραμμα 10 αποτυπώνονται λεπτομερώς οι διαφορές στην ωοτοκία σε σχέση με την ηλικία των θηλυκών στους πληθυσμούς με γονιδιακή ροή. Η ωοτοκία των θηλυκών από τη Δάφνη ήταν συνεχής και υψηλή σε σχέση με τις αντίστοιχες των θηλυκών από τα Κ. Λεχώνια, ενώ η ωοτοκία των θηλυκών από το Περτούλι ήταν σχετικά χαμηλή και σποραδική.



Διάγραμμα 9. Καμπύλες ωοπαραγωγής (σε σχέση με την ηλικία) των θηλυκών των αλλοπάτριων πληθυσμών και των πληθυσμών με γονιδιακή ροή. Για να διευκολυνθεί η σύγκριση μεταξύ των πληθυσμών, η καμπύλη ωοπαραγωγής των θηλυκών της Δάφνης δίνεται και στις δύο στήλες.



Διάγραμμα 10. Λεπτομερειακή αποτύπωση της ωτοκίας των θηλυκών (event-history diagram) των αλλοπάτριων πληθυσμών και των πληθυσμών με γονιδιακή ροή. Πράσινο = 0 αυγά/ημέρα, κίτρινο = 1-5 αυγά/ημέρα, κόκκινο < 5 αυγά/ημέρα. Χρησιμοποιήθηκαν 33-50 άτομα για κάθε πληθυσμό. Κάθε οριζόντια γραμμή αντιπροσωπεύει ένα θηλυκό άτομο του πληθυσμού και το μήκος της γραμμής ισοδυναμεί με τη διάρκεια ζωής του. Οι χρωματισμοί κατά μήκος της γραμμής αναφέρονται στον αριθμό των αυγών που εναπόθετε σε καθημερινή βάση το θηλυκό. Η ταξινόμηση των θηλυκών γίνεται από το πιο βραχύβιο στο μακροβιότερο έτσι ώστε να διακρίνεται το ποσοστό επιβίωσης των ατόμων για κάθε ημέρα της ενήλικης ζωής του πληθυσμού.

6.3. Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη γίνεται εκτενής ανάλυση των δημογραφικών χαρακτηριστικών των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς που προέρχονται από πληθυσμούς που διαφέρουν ως προς τα οικολογικά χαρακτηριστικά των ενδιαιτημάτων τους. Παρατηρήθηκε σημαντική παραλλακτικότητα στα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ενηλίκων τόσο μεταξύ των αλλοπάτριων πληθυσμών όσο και μεταξύ των πληθυσμών με γονιδιακή ροή. Σημαντικές ήταν και οι διαφορές στο μέγεθος του σώματος των ενηλίκων μεταξύ των πληθυσμών. Σε επίπεδο πληθυσμού, τα αρσενικά είχαν μικρότερο μέγεθος από τα θηλυκά, παρότι η μέση διάρκεια ζωής δεν διέφερε μεταξύ των δύο φύλων. Η μέση ωοπαραγωγή και η διάρκεια της περιόδου ωοτοκίας των θηλυκών διέφερε σημαντικά μεταξύ των αλλοπάτριων πληθυσμών, ενώ οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων αποδίδονται στην παραλλακτικότητα του μεγέθους του σώματος (πλάτος κεφαλής). Ωστόσο, η διάρκεια των περιόδων πριν και μετά την ωοτοκία δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των θηλυκών των αλλοπάτριων πληθυσμών. Στους πληθυσμούς με γονιδιακή ροή, καταγράφηκε σημαντική παραλλακτικότητα στη διάρκεια ζωής, στη μέση ωοπαραγωγή και στη διάρκεια των αναπαραγωγικών περιόδων (περίοδος πριν την ωοτοκία, περίοδος ωοτοκίας, περίοδος μετά την ωοτοκία). Φαίνεται, λοιπόν, ότι η ετερογένεια των ενδιαιτημάτων (περίοδος διαθεσιμότητας των καρπών) καθορίζει την παραλλακτικότητα των δημογραφικών χαρακτηριστικών των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς σε σχέση με τη γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των πληθυσμών, που εκφράζεται κυρίως ως αποτέλεσμα της γεωγραφικής απόστασης.

Μέγεθος σώματος ενηλίκων

Οι περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των εντόμων επηρεάζουν σημαντικά την έκφραση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των ενηλίκων (de Jong, 1995; Debat & David, 2001; Liefing, Hoffman & Ellers, 2009). Δεδομένης της πλαστικότητας κατά τα στάδια ανάπτυξης (developmental plasticity), το μέγεθος σώματος των ενηλίκων αναμένεται να διαφέρει μεταξύ των ατόμων που αναπτύχθηκαν σε διαφορετικά περιβάλλοντα ως προς τη θερμοκρασία, τη διατροφή (Davidowitz, D'Amico & Nijhout, 2004; Salazar-Ciudad, 2007; Shingleton, 2010) και το μέγεθος του ξενιστή (Lafferty & Kuris, 2002; Bonal & Muñoz, 2009). Στην παρούσα μελέτη, οι προσβεβλημένοι καρποί, αμέσως μετά τη συλλογή τους, μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο όπου επικρατούσαν σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας, περιορίζοντας το πειραματικό λάθος λόγω της παραλλακτικότητας

στη θερμοκρασία κατά τη διάρκεια του τελευταίου σταδίου ανάπτυξης των προνυμφών που είναι όμως καθοριστικό για το μέγεθος σώματος των ενηλίκων. Ωστόσο, η αναλογία σακχάρων/αμινοξέων των καρπών διαφέρει μεταξύ των ποικιλιών της κερασιάς λόγω γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων (Serrano *et al.*, 2005; Wang, 2006; Karlidag *et al.*, 2009), και η ανάπτυξη των προνυμφών της ραγολέτιδας της κερασιάς επιβραδύνεται σε κεράσια με χαμηλά επίπεδα σακχάρων και υψηλά επίπεδα αμινοξέων (Boller, 1966b). Κατά συνέπεια, η δυνατότητα μεταβολής του ρυθμού ανάπτυξης των προνυμφών σε σχέση με την ποιότητα των θρεπτικών στοιχείων των καρπών-ξενιστών (λόγω πλαστικότητας) μπορεί να επηρεάσει την παραλλακτικότητα στο μέγεθος σώματος των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς.

Δημογραφικά χαρακτηριστικά ενηλίκων

Οι πληροφορίες σχετικά με την εξέλιξη των δημογραφικών χαρακτηριστικών των πολυκυκλικών, πολυφάγων εντόμων της οικογένειας Tephritidae (Carey, 1984; 2011; Carey, Harris & McInnis, 1985; Papadopoulos, Katsoyannos & Carey, 2002; Joachim- Bravo *et al.*, 2003; Diamantidis *et al.*, 2009; Duyck *et al.*, 2010) είναι πολλές και λεπτομερείς. Όμως, ελάχιστα είναι γνωστά για τη δημογραφία των πολυκυκλικών ολιγοφάγων ειδών (Brènavault, Duyck & Quilici, 2008) και, ειδικότερα, των μονοκυκλικών ολιγοφάγων ή μονοφάγων ειδών (Wiesmann, 1933; Boller, 1966a; Boller & Prokopy, 1976; Kasana & AliNiazee, 1994). Σχετικά με τη ραγολέτιδα της κερασιάς, βρήκαμε ότι η διάρκεια ζωής των ενηλίκων κυμαίνεται από 42 έως 62 ημέρες μεταξύ των εξεταζόμενων πληθυσμών και είναι περίπου 10 ημέρες μεγαλύτερη από την εκτιμώμενη μέση διάρκεια ζωής του εντόμου σε συνθήκες αγρού (Wiesmann, 1933; Böhm, 1949). Η διάρκεια ζωής δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των δύο φύλων, σε συμφωνία και με άλλα είδη του γένους *Rhagoletis* (Kasana & AliNiazee, 1994). Αντίθετα, μακροβιότερα των θηλυκών είναι τα αρσενικά άτομα άλλων ειδών της οικογένειας Tephritidae (Foote & Carey, 1987; Carey & Liedo, 1995; Carey *et al.*, 1995; Vargas *et al.*, 2000; Diamantidis *et al.*, 2009). Για παράδειγμα, στη μύγα της Μεσογείου (*Ceratitis capitata*), η μεγαλύτερη διάρκεια ζωής των αρσενικών σχετίζεται με τις διαφορές που παρουσιάζουν τα δύο φύλα στην αναπαραγωγική συμπεριφορά. Ειδικότερα, η μεγαλύτερη σε σχέση με τα θηλυκά διάρκεια ζωής των αρσενικών της μύγας της Μεσογείου αυξάνει τις πιθανότητες σύζευξης, καθώς τα αρσενικά έχουν την τάση να ζευγαρώνουν με πολλά θηλυκά (polygynous males) σε αντίθεση με τα θηλυκά που συζευγνύονται μία ή σε μικρό ποσοστό δύο φορές κατά τη διάρκεια της ζωής τους (oligo-androus females) (Carey & Liedo, 1995; Carey *et al.*, 1995). Όμως, τόσο τα αρσενικά όσο και θηλυκά άτομα

της ραγολέτιδας της κερασιάς συζευγνύονται πολλές φορές κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Συνεπώς, δεν προκύπτει κάποιο πιθανό πλεονέκτημα σύζευξης για αρσενικά με μεγαλύτερη διάρκεια ζωής. Η μέση ωοπαραγωγή των θηλυκών ατόμων της ραγολέτιδας της κερασιάς κυμαίνεται από 117 έως 279 αυγά ανά θηλυκό, και συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες (Boller, 1966a). Σε συνθήκες αγρού, όμως, αναμένεται σημαντική μείωση της ωοπαραγωγής (30-100 αυγά/θηλυκό) (Wiesmann, 1933). Συμπερασματικά, τα στοιχεία μας δείχνουν ότι η ραγολέτιδα της κερασιάς έχει χαμηλό αναπαραγωγικό δυναμικό, ανάλογο του αντίστοιχου δυναμικού των ολιγοφάγων ειδών της οικογένειας Tephritidae, το οποίο είναι χαρακτηριστικά χαμηλότερο σε σχέση με αυτό των αντίστοιχων πολυφάγων ειδών (Papadopoulos *et al.*, 2002; Carey *et al.*, 2005; Ekesi, Nderitu & Rwomushana, 2006; Brèvault *et al.*, 2008; Diamantidis *et al.*, 2009). Το χαμηλό αναπαραγωγικό δυναμικό των ολιγοφάγων ειδών της οικογένειας Tephritidae απορρέει πιθανότατα από τη σύντομη περίοδο διαθεσιμότητας των καρπών-ξενιστών σε συνδυασμό με τη διάσπαρτη κατανομή των φυτών-ξενιστών στην ευρύτερη περιοχή διασποράς των εντόμων. Αντίθετα, τα πολυφάγα είδη της οικογένειας Tephritidae διαθέτουν αναπτυγμένη ικανότητα διασποράς κατά την αναζήτηση εναλλακτικών ξενιστών, η οποία λαμβάνει χώρα σε όλη τη διάρκεια του έτους (Fletcher, 1989).

Σχετικά με την ομάδα των αλλοπάτριων πληθυσμών, οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων αποδίδονται στην παραλλακτικότητα του πλάτους της κεφαλής, καθώς η προέλευση του πληθυσμού δεν βρέθηκε να είναι σημαντικός εκτιμητής της διάρκειας ζωής των ενηλίκων. Η δράση της σταθεροποιούσας επιλογής (stabilizing selection) στα δημογραφικά χαρακτηριστικά ελαχιστοποιεί πιθανότατα τις διαφορές μεταξύ των γεωγραφικά απομονωμένων πληθυσμών, όπως συμβαίνει για παράδειγμα στη *Drosophila melanogaster* (Stearns & Kawecki, 1994). Διαφορές στον ρυθμό αναπαραγωγής και στη διάρκεια της περιόδου ωοτοκίας καταγράφηκαν μόνο μεταξύ των θηλυκών από τη Δάφνη και αυτών από το Stecklenberg και τα Χανιά. Η παραλλακτικότητα μεταξύ των πληθυσμών της Δάφνης και των Χανίων μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι οι πληθυσμοί που προέρχονται από τις νησιώτικες περιοχές διασποράς ενός είδους διαφέρουν φαινοτυπικά με τους πληθυσμούς των ηπειρωτικών περιοχών (Grant, 1998). Όμως, τα ενήλικα από τα Χανιά και το Stecklenberg δεν διέφεραν ως προς τα δημογραφικά τους χαρακτηριστικά παρά τη γεωγραφική απόσταση. Αξίζει να αναφερθεί ότι οι διαφορές μεταξύ των δύο παραπάνω πληθυσμών παρέμειναν μη σημαντικές ακόμα κι όταν κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε διαφορετικός (από τη Δάφνη) πληθυσμός της ηπειρωτικής Ελλάδας (που συνδέεται με χαμηλά επίπεδα γονιδιακής ροής με τους πληθυσμούς των Χανίων και

Stecklenberg, όπως το Περούλι ή τα Κ. Λεχώνια) (Μωραΐτη και Παπαδόπουλος, αδημοσίευτα στοιχεία). Φαίνεται, λοιπόν, ότι η αρμοστικότητα των πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς στα διαφορετικά ενδιαιτήματα, όπως αυτή εκφράζεται από τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ενηλίκων, καθορίζεται και από κάποια άλλη ή άλλες εξελικτικές δυνάμεις που αλληλεπιδρούν με την αποκλίνουσα επιλογή. Χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για να προσδιοριστούν με ακρίβεια οι εξελικτικές δυνάμεις που περιορίζουν την παραλλακτικότητα στα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ενηλίκων μεταξύ των πληθυσμών των Χανίων και του Stecklenberg.

Σχετικά με τους πληθυσμούς με γονιδιακή ροή, σημαντικές ήταν οι διαφορές που βρέθηκαν τόσο στη διάρκεια των αναπαραγωγικών περιόδων και στο ρυθμό αναπαραγωγής όσο και στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων. Τα ενήλικα που προήλθαν από νύμφες από την περιοχή του Περούλιού είχαν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής, ενώ τα θηλυκά από το Περούλι και τη Δάφνη εμφάνισαν μεγαλύτερες περιόδους ωοτοκίας συγκριτικά με τα θηλυκά από τα Κ. Λεχώνια. Στη δασική περιοχή του Περούλιού, η παρουσία αγριοκερασιών και δένδρων του είδους *P. mahaleb* με αλληλοεπικαλυπτόμενες περιόδους καρποφορίας επιμηκύνουν την περίοδο διαθεσιμότητας των καρπών-ξενιστών, ακόμα και για διάστημα μετά την ολοκλήρωση της περιόδου πτήσης των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς. Η περίοδος διαθεσιμότητας καρπών κατάλληλων για ωοτοκία, που είναι μεγαλύτερη στη δασική περιοχή του Περούλιού, σχετίζεται πιθανότατα με την παραλλακτικότητα της διάρκειας ζωής των ενηλίκων. Ωστόσο, μέρος της παραλλακτικότητας της διάρκειας ζωής των ενηλίκων και της περιόδου ωοτοκίας των θηλυκών αποδίδεται στην επίδραση της τροφής (καρποί από διαφορετικές ποικιλίες κερασιάς και αγριοκερασιάς) κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των προνυμφών (βλέπε παραλλακτικότητα στο μήκος του θώρακα). Γεωγραφικές διαφορές στο χρονικό διάστημα που ορίζεται από την ενηλικίωση των θηλυκών ως την ωρίμανση των κερασιών ή αγριοκέρασων (υποστρώματα ωοτοκίας) επηρεάζουν τη διάρκεια της περιόδου πριν την ωοτοκία, η οποία βρέθηκε να είναι μικρότερη στα θηλυκά της Δάφνης σε σχέση με αυτά του Περούλιού και των Κ. Λεχωνίων. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η επιβίωση μετά το τέλος της περιόδου ωοτοκίας δεν επιφέρει όφελος προσαρμογής στα θηλυκά (Reznick, Bryant & Holmes, 2006), είναι δύσκολο να εξηγηθεί η εκτεταμένη μετα-αναπαραγωγική περίοδος των θηλυκών από το Περούλι. Η παρουσία μετα-αναπαραγωγικής περιόδου είναι χαρακτηριστική για τα άτομα που επένδυσαν περισσότερη ενέργεια στη διατήρηση και ανάπτυξη των σωματικών λειτουργιών σε σχέση με την αναπαραγωγή. Σε αυτό το πλαίσιο, θεωρούμε ότι τα θηλυκά από το Περούλι, που παρουσιάζουν όχι μόνο τη μεγαλύτερη διάρκεια ζωής μετά το τέλος της ωοτοκίας αλλά και τη μικρότερη

ωοπααραγωγή, κατάφεραν να εκφράσουν τη μέγιστη αναπαραγωγική τους δυναμική υπό τις ιδανικές συνθήκες εκτροφής στο Εργαστήριο. Επίσης, τα θηλυκά από τις ορεινές περιοχές της Δάφνης και του Περτουλίου παρουσίασαν τον υψηλότερο και χαμηλότερο ρυθμό αναπαραγωγής, αντίστοιχα. Ωστόσο, η παρουσία αρκετών ημερών απουσίας ωοτοκίας κατά την περίοδο ωοτοκίας υπογραμμίζουν, σε κάθε περίπτωση, τη σχετική ανεπάρκεια αναπαραγωγικών αποθεμάτων για τα θηλυκά από το Περτούλι (Novoseltsev, Novoseltseva & Yashin, 2003).

Παρότι παραδοσιακά θεωρείται ότι η δράση της γονιδιακής ροής εμποδίζει τη διαφοροποίηση των πληθυσμών (Kirkpatrick & Barton, 1997), πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι μπορεί και να ενθαρρύνει την προσαρμογή των πληθυσμών στις τοπικές περιβαλλοντικές συνθήκες των ενδιαιτημάτων τους (Gandon & Nuismer, 2009; Ribeiro, Llord & Bowie, 2011). Η παρουσία γονιδιακής ροής μεταξύ πληθυσμών από διαφορετικά ως προς τις οικολογικές συνθήκες ενδιαιτήματα συμβάλλει στη διατήρηση μεγάλων ποσοστών παραλλακτικότητας, ενισχύοντας περαιτέρω την τοπική γενετική παραλλακτικότητα, και κατά επέκταση τη δράση της φυσικής επιλογής (Alleaume-Benharira, Pen & Ronce, 2006; Barrett & Schluter, 2008). Κατά συνέπεια, τα μέτρια επίπεδα γονιδιακής ροής ενισχύουν τη δυνατότητα προσαρμογής των πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς (που απαντώνται σε διαφορετικά και διάσπαρτα ενδιαιτήματα στην ευρύτερη περιοχή διασποράς) στα τοπικά περιβάλλοντα, μειώνοντας τις πιθανότητες εξαφάνισης εξαιτίας γενετικών επιδράσεων (Lynch, Conery & Burger, 1995; Crnokrak & Roff, 1999).

Η γονιδιακή ροή έχει τη δυνατότητα να περιορίζει τη γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των γονιδιακών θέσεων (loci), εκτός από αυτές που βρίσκονται υπό την άμεση επίδραση της φυσικής επιλογής ή είναι άμεσα συνδεδεμένες με τις παραπάνω θέσεις (Via, 2009). Στους πολυγονιδιακούς χαρακτήρες (όπου η ποικιλότητα των τιμών οφείλεται στη δράση δύο ή περισσότερων γονιδιακών θέσεων), όπως είναι τα δημογραφικά χαρακτηριστικά, η ισχυρή αποκλίνουσα επιλογή επιταχύνει την προσαρμογή (rapid adaptation) μέσω της διασποράς μικρής συχνότητας αλληλομόρφων σε πολλές γονιδιακές θέσεις. Όμως, η μοριακή ανίχνευση της προσαρμογής των χαρακτηριστικών που ελέγχονται από πολλά γονίδια διαφέρει από αυτήν που χρησιμοποιείται όταν η προσαρμογή οφείλεται σε μια νέα μετάλλαξη σε ορισμένα άτομα ενός πληθυσμού (selective sweeps), με αποτέλεσμα να μην είναι εφικτό να ανιχνευθούν με τη χρήση συμβατικών μεθόδων (Pritchard & Di Rienzo, 2010; Pritchard, Picknell & Coop, 2010). Επομένως, για να μπορέσουμε να κατανοήσουμε τη δυνατότητα προσαρμογής των πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς στα διαφορετικά ενδιαιτήματα είναι απαραίτητο να αναλύσουμε τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ενηλίκων σε επίπεδο γονιδιώματος (genome).

Χρησιμοποιώντας σύγχρονα εργαλεία της ποσοτικής γενετικής (π.χ. οι γονιδιακές θέσεις ποσοτικών γνωρισμάτων (quantitative trait locus, QTL) και της γονιδιωματικής των πληθυσμών (population genomics) (π.χ. τεχνικές νέας γενιάς αλληλούχισης (next-generation sequencing, NGS) μπορούν να ταυτοποιηθούν γονίδια που σχετίζονται με τη γρήγορη προσαρμογή των πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς (Stapley *et al.*, 2010).

Συμπερασματικά, τα δεδομένα μας υποστηρίζουν ότι η γενετική παραλλακτικότητα των πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς, όπως αυτή προκύπτει από την ανάλυση των ουδέτερων γονιδιακών θέσεων, δεν είναι ενδεικτική της διαφοροποίησης των δημογραφικών χαρακτηριστικών των ενηλίκων. Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ενηλίκων δεν διαφέρουν συστηματικά μεταξύ των αλλοπάτριων πληθυσμών ενώ καταγράφηκαν σημαντικές διαφορές σε μια σειρά δημογραφικών χαρακτηριστικών ενηλίκων από πληθυσμούς με γονιδιακή ροή. Στο πλαίσιο της οικολογικής προσαρμογής (ecological adaptation), η διαφοροποίηση των δημογραφικών χαρακτηριστικών των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς χωρίς να υπάρχει ουδέτερη γενετική παραλλακτικότητα (βάσει της ανάλυσης με ουδέτερους μοριακούς δείκτες) είναι ενδεικτική της δράσης της αποκλίνουσας επιλογής που απορρέει από τη διαφοροποίηση των τοπικών περιβαλλοντικών συνθηκών των ενδιαιτημάτων των πληθυσμών. Ωστόσο, η πιθανή παρουσία κι άλλων εξελικτικών δυνάμεων συμβάλλει πιθανότατα στην παρεμπόδιση της διαφοροποίησης των δημογραφικών χαρακτηριστικών των ενηλίκων μεταξύ των αλλοπάτριων πληθυσμών. Συνεπώς, τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με τα συμπεράσματα θεωρητικών μελετών που υποστηρίζουν ότι η γενετική παραλλακτικότητα των πληθυσμών που βασίζεται στην χρήση ουδέτερων μοριακών δεικτών δεν είναι αντιπροσωπευτική της διαφοροποίησης σημαντικών βιολογικών παραμέτρων (Hedrick, 1999; McKay & Latta, 2002). Αρκετά σχετικά παραδείγματα υπάρχουν για τα φυτά (Karhu *et al.*, 1996; Gonzalo-Turpin & Hazard, 2009), τους βατράχους (Palo *et al.*, 2003; Knopp *et al.*, 2007; Richter-Boix *et al.*, 2010), τα ψάρια (Conover *et al.*, 2006; Hutchings *et al.*, 2007; Hankinson & Ptacek, 2008; Nielsen *et al.*, 2009), τα πουλιά (Ballentine & Greenberg, 2010) και τα έντομα (Andersen *et al.*, 2008).

Τέλος, στην παρούσα μελέτη αναλύονται για πρώτη φορά με συστηματικό τρόπο τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ενηλίκων πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς και αναφέρονται σημαντικές διαφορές στις παραμέτρους της επιβίωσης και της αναπαραγωγής. Η εκτίμηση των παραμέτρων των πινάκων ζωής των εντόμων για διαφορετικούς πληθυσμούς της ραγολέτιδας της κερασιάς αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάπτυξη πληθυσμιακών μοντέλων εξειδικευμένων για κάθε περιοχή (Carey, 2001). Προκειμένου να έχουμε μια πιο πλήρη εικόνα για τη

γεωγραφική παραλλακτικότητα των δημογραφικών χαρακτηριστικών των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς, είναι απαραίτητο να εξεταστούν περισσότεροι πληθυσμοί. Επίσης, αξίζει να αναφερθεί ότι τα επίπεδα της γονιδιακής ροής μεταξύ των πληθυσμών των σολομών που ωτοκοούν την άνοιξη, που απαντώνται σε διαφορετικά ενδιαιτήματα και βρίσκονται στα αρχικά στάδια διαφοροποίησης, μεταβάλλονται σε ετήσια βάση λόγω της εξέλιξης των διαδικασιών προσαρμογής των πληθυσμών (Junge *et al.*, 2011). Επομένως, η επανάληψη των αναλύσεων της γενετικής δομής των πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς (βάσει των ουδέτερων μοριακών δεικτών) για ορισμένα συναπτά έτη είναι πιθανόν να βοηθήσει στον εντοπισμό πιθανών διακυμάνσεων στα επίπεδα γονιδιακής ροής. Εντούτοις, για να χαρακτηριστεί λεπτομερώς η σχέση που συνδέει το γενότυπο με το φαινότυπο, είναι απαραίτητη η ανάλυση των σημείων του γονιδιώματος που εκφράζονται κατά την προσαρμογή των πληθυσμών στα διάφορα ενδιαιτήματα.

Βιβλιογραφία

- Alleaume – Benharira M, Pen IR, Ronce O. 2006.** Geographical patterns of adaptation within a species' range: interactions between drift and gene flow. *Journal of Evolutionary Biology* **19**: 203-215.
- Alonzo TA, Nakas CT, Papadopoulos NT, Papachristos DP. 2009.** A Receiver Operating Characteristic analysis approach for the assessment of the separation of female Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) oviposition distributions. *Journal of Economic Entomology* **102**: 1985-1991.
- Andersen DH, Pertoldi C, Loeschcke V, Cavicchi S, Scoli V. 2008.** Divergence at neutral and non-neutral loci in *Drosophila buzzatii* populations and their hybrids. *Evolutionary Ecology* **22**: 593-605.
- Augustinos AA, Asimakopoulou AK, Moraiti CA, Mavragani-Tsipidou P, Papadopoulos NT, Bourtzis K. 2013.** Microsatellite and *Wolbachia* analysis in *Rhagoletis cerasi* natural populations: population structuring and multiple infections. *Ecology and Evolution*, in press.
- Augustinos AA, Asimakopoulou AK, Papadopoulos NT, Bourtzis K. 2011.** Cross-amplified microsatellites in the European cherry fly, *Rhagoletis cerasi*: medium polymorphic-highly informative markers. *Bulletin of Entomological Research* **101**: 45-52.
- Ballentine B, Greenber R. 2010.** Common garden experiments reveals genetic control of phenotypic divergence between swamp sparrow subspecies that lack divergence in neutral genotypes. *Plos ONE* **5**: e10229.
- Barrett RDH, Schluter D. 2008.** Adaptation from standing genetic variation. *Trends in Ecology and Evolution* **23**: 38-44.
- Barton N, Partridge L. 2000.** Limits to natural selection. *BioEssays* **22**: 1075-1084.
- Böhm H. 1949.** Untersuchungen über die Lebensweise und Bekämpfung der Kirschfliege (*Rhagoletis cerasi* L.). *Pflanzenschutzberichte* **3**: 177-185.
- Boller E. 1966a.** Beitrag zur Kenntnis der Eiablage und Fertilität der Kirschenfliege *Rhagoletis cerasi* L. *Mitteilung der Schweizerischen entomologischen Gesellschaft* **38**: 195-202.
- Boller E. 1966b.** The influence of natural mortality factors on the Cherry fruit fly (*Rhagoletis cerasi* L.) in the Northwest of Switzerland (summary).
- Boller EF, Prokopy RJ. 1976.** Bionomics and management of *Rhagoletis*. *Annual Review of Entomology* **21**: 223-246.

- Bonal R, Muñoz A. 2009.** Seed weevils living on the edge: pressures and conflicts over body size in the endoparasitic *Curculio* larvae. *Ecological Entomology* **34**: 304-309.
- Brévault T, Duyck P-F, Quilici S. 2008.** Life-history strategy in an oligophagous tephritid: the tomato fruit fly, *Neoceratitis cyanesceus*. *Ecological Entomology* **33**: 529-536.
- Carey JR. 2011.** Biodemography of the Mediterranean fruit fly: Aging, longevity and adaptation in the wild. *Experimental Gerontology* **46**: 404-411.
- Carey JR. 2001.** Insect biodemography. *Annual Review of Entomology* **46**: 79-110.
- Carey JR. 1993.** *Applied demography for biologists with special emphasis on insects*. New York: Oxford.
- Carey JR. 1984.** Host specific demographic studies of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. *Ecological Entomology* **9**: 261–270.
- Carey JR, Liedo P, Müller H-G, Wang J-L, Senturke D, Harshman L. 2005.** Biodemography of a long-lived tephritid: Reproduction and longevity in a large cohort of female Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens*. *Experimental Gerontology* **40**: 793-800.
- Carey JR, Liedo P, Mueller HG, Wang JL, Vaupel, J.W. 1998.** A simple graphical technique for displaying individual fertility data and cohort survival: case study of 1000 Mediterranean fruit fly females. *Functional Ecology* **12**: 359–363.
- Carey JR, Liedo P. 1995.** Sex mortality differentials and selective survival in large medfly cohorts – implications for human sex mortality differentials. *Gerontologist* **35**: 588–596.
- Carey JR, Liedo P, Orozco D, Tatar M, Vaupel JW. 1995.** A male-female longevity paradox in medfly cohorts. *Journal of Animal Ecology* **64**:107–116.
- Carey JR, Harris EJ, McInnis DO. 1985.** Demography of a native strain of the melon fly, *Dacus curcubitae*, from Hawaii. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **38**:195-199.
- Chua TH. 1992.** Relationship between female body size and demographic parameters in *Bacrocera* Malaysian A (Diptera: Tephritidae). *Researches on Population Ecology* **34**: 285-292.
- Collett D. 2003.** *Modeling survival data in medical research*. Boca Raton, FL: CRC.
- Conover DO, Clarke LM, Munch SB, Wagner GN. 2006.** Spatial and temporal scales of adaptive divergence in marine fishes and the implications for conservation. *Journal of Fish Biology* **69**: 21-47.
- Crnokrak P, Roff DA. 1999.** Inbreeding depression in the wild. *Heredity* **83**: 260-270.

- Davidowitz G, D'Amico LJ, Nijhout HF. 2004.** The effects of environmental variation on a mechanism that controls insect body size. *Evolutionary Ecology Research* **6**: 49-62.
- de Jong G. 1995.** Phenotypic plasticity as a product of selection in a variable environment. *American Naturalist* **145**: 493-512.
- Debat V, David P. 2001.** Mapping phenotypes: canalization, plasticity and developmental stability. *Trends in Ecology & Evolution* **16**: 555–561.
- Diamantidis AD, Papadopoulos NT, Nakas CT, Wu S, Müller HG, Carey JR. 2009.** Life history evolution in a globally-invading tephritid: patterns of survival and reproduction in medflies from six world regions. *Biological Journal of the Linnean Society* **97**: 106–117.
- Duyck P-F, Kouloussis NA, Papadopoulos NT, Quilici S, Wang J-L, Jiang C-R, Müller H-G, Carey JR. 2010.** Lifespan of a *Ceratitis* fruit fly increases with higher altitudes. *Biological Journal of the Linnean Society* **101**: 345-350.
- Ekesi S, Nderitu PW, Rwamushana I. 2006.** Field infestation, life history and demographic parameters of the fruit fly *Bactrocera invadens* (Diptera: Tephritidae) in Africa. *Bulletin of Entomological Research* **96**: 376-386.
- Ellegren H, Sheldon BC. 2008.** Genetic basis of fitness differences in natural populations. *Nature* **452**: 169-175.
- Fisher RA. 1958.** *The Genetical Theory of Natural Selection*. Oxford: Clarendon Press.
- Fletcher BS. 1989.** Life history strategies of Tephritid fruit flies. In: Robinson S, Hooper G, eds. *Fruit flies, their Biology, Natural Enemies and Control. World Crop Pests*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 195-208.
- Foote D, Carey JR. 1987.** Comparative demography of a laboratory and a wild strain of the oriental fruit fly, *Dacus dorsalis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **44**: 263-268.
- Fowler K, Semple C, Barton NH, Partridge L. 1997.** Genetic variation for total fitness in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **264**: 191-199.
- Gandon S, Nuismer SL. 2009.** Interactions between genetic drift, gene flow, and selection mosaics drive parasite local adaptation. *American Naturalist* **173**: 212-224.
- Garant D, Forde SE, Hendry AP. 2007.** The multifarious effects of dispersal and gene flow on contemporary adaptation. *Functional Ecology* **21**: 434–443.
- Gonzalo-Turpin H, Hazard L. 2009.** Local adaptation occurs along altitudinal gradient despite the existence of gene flow in the alpine plant species *Festuca eskia*. *Journal of Ecology* **97**: 742-751.

- Grant PR. 1998.** *Evolution on islands*. New York: Oxford University Press.
- Hankinson SJ, Ptacek MB. 2008.** Geographic variation of genetic and phenotypic traits in the Mexican sailfin mollies, *Poecilia velifera* and *P. petenensis*. *Molecular Ecology* **17**: 2219-2233.
- Hasson E, Fanara JJ, Rodriguez C, Vilardi JC, Reig OA, Fontdevila A. 1993.** The evolutionary history of *Drosophila buzzatii* XXVII: Thorax length is positively correlated with longevity in a natural population from Argentina. *Genetics* **92**: 61-65.
- Hedrick PW. 1999.** Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* **53**: 313-318.
- Houle D. 1992.** Comparing evolvability and variability of quantitative traits. *Genetics* **130**: 195-204.
- Hutchings JA, Swain DP, Rowe S, Eddington JD, Puvanendran V, Brown JA. 2007.** Genetic variation in life-history reaction norms in a marine fish. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **274**: 1693-1699.
- Joachim - Bravo I, Magalhães TC, Da Silva Neto AM, Guimarães AN, Nascimento AS. 2003.** Longevity and fecundity of four species of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). *Neotropical Entomology* **32**: 543-549.
- Jones SC, Wallace L. 1955.** Cherry fruit fly dispersion studies. *Journal of Economic Entomology* **48**: 616-617.
- Junge C, Vøllestad LA, Barson NJ, Hangen TO, Otero J, Sætre G-P, Leder EH, Primmer CR. 2011.** Strong gene flow and lack of stable populations structure in the face of rapid adaptation to local temperature in a spring-spawning salmonid, the European grayling (*Thymallus thymallus*). *Heredity* **106**: 460-471.
- Karhu A, Hurme P, Karjalainen M, Karvonen P, Karkkainen K, Neale D, Savolainen O. 1996.** Do molecular markers reflect patterns of differentiation in adaptive traits of conifers? *Theoretical and Applied Genetics* **93**: 215-221.
- Karlidag H, Ercisli S, Sengul M, Tosun M. 2009.** Physico-chemical diversity in fruits of wild-growing sweet cherries (*Prunus avium* L.). *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **23**: 1325-1329.
- Kasana A, AliNiazee MT. 1994.** Effect of constant temperatures on development of the walnut husk fly, *Rhagoletis completa*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **73**: 247-254.
- Kawecki TJ, Ebert D. 2004.** Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters* **7**: 1225-1241.
- Kingsolver JG, Huey RB. 2008.** Size, temperature and fitness: three rules. *Evolutionary Ecology Research* **10**: 251-268.

- Kirkpatrick M, Barton NH. 1997. Evolution of a species' range. *American Naturalist* **150**: 1-23.
- Kneifl V, Paprštein F, Kňourková J. 1997. Dispersion of cherry fruit fly (*Rhagoletis cerasi* L.). *Vedecké Práce Ovocnarsk* **15**: 89-92.
- Knopp T, Cano JM, Crochet P-A, Merilä J. 2007. Contrasting levels of variation in neutral and quantitative genetic loci on island populations of moor frogs (*Rana arvalis*). *Conservation Genetics* **8**: 45-56.
- Koskinen MT, Haugen TO, Primmer CR. 2002. Contemporary fisherian life history evolution in small salmonid populations. *Nature* **419**: 826–830.
- Kruuk LE, Clutton-Brock T-H, Slate J, Pemberton JM, Brotherstone S, Guinness FE. 2000. Heritability of fitness in a wild mammal population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 698-703.
- Lafferty KD, Kuris AM. 2002. Trophic strategies, animal diversity and body size. *Trends in Ecology & Evolution* **17**: 507-513.
- Lenormand T. 2002. Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology & Evolution* **17**: 183–189.
- Liefting M, Hoffman AA, Ellers J. 2009. Plasticity versus environmental canalization: population differences in thermal responses along a latitudinal gradient in *Drosophila serrata*. *Evolution* **63**: 1954 – 1963.
- Lynch M, Conery J, Burger R. 1995. Mutation accumulation and the extinction of small population. *American Naturalist* **146**: 485-518.
- McKay JK, Latta RG. 2002. Adaptive population divergence: markers, QTL and traits. *Trends in Ecology & Evolution* **17**: 285-291.
- Mousseau TA, Roff DA. 1987. Natural selection and the heritability of fitness components. *Heredity* **59**: 181-197.
- Nielsen EE, Hemmer-Hansen J, Poulsen NA, Loeschcke V, Moen T, Johansen T, Mittelholzer C, Taranger GL, Ogden R, Carvalho GR. 2009. Genomic signatures of local directional selection in a high gene flow marine organism; the Atlantic cod (*Gadus morhua*). *BMC Evolutionary Biology* **9**: 276-287.
- Nosil P, Funk DJ, Ortiz-Barrientos D. 2009. Divergent selection and heterogeneous genomic divergence. *Molecular Ecology* **18**: 375-402.
- Novoseltsev VN, Novoseltseva JA, Yashin AI. 2003. What does a fly's individual fecundity pattern look like? The dynamics of resource allocation in reproduction and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development* **124**: 605-617.
- Palo JU, R.B. O'Hara RB, Laugen AT, Laurila A, Primmer CR and Merilä J. 2003. Latitudinal divergence of common frog (*Rana temporaria*) life history traits by natural

- selection: evidence from a comparison of molecular and quantitative genetic data. *Molecular ecology* **12**: 1963-1978.
- Papadopoulos NT, Katsoyannos BI, Carey JR. 2002.** Demographic parameters of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) reared in apples. *Annals of the Entomological Society of America* **95**: 546-569.
- Papaix J, Cubaynes S, Buoro M, Charmantier A, Perret P, Gimenez O. 2010.** Combining capture-recapture data and pedigree information to assess heritability of demographic parameters in the wild. *Journal of Evolutionary Biology* **23**: 2176-2184.
- Partridge L, Langelan R, Fowler K, Zwann B, French V. 1999.** Correlated responses to selection on body size in *Drosophila melanogaster*. *Genetic Research* **74**: 43-54.
- Partridge L, Barrie B, Barton NH, Fowler K, French V. 1995.** Rapid laboratory evolution of adult life-history traits in *Drosophila melanogaster* in response to temperature. *Evolution* **49**: 538-544.
- Phillips CR, Dirks CO. 1933.** Dispersal of the apple maggot. *Journal of Economic Entomology* **26**: 344-349.
- Price T, Schluter D. 1991.** On the low heritability of life history traits. *Evolution* **45**: 853-861.
- Pritchard JK, Di Rienzo A. 2010.** Adaptation – not by sweep alone. *Nature Reviews Genetics* **11**: 665-667.
- Pritchard JK, Picknell JK, Coop G. 2010.** The genetics of human adaptation: hard sweeps, soft sweeps, and polygenic adaptation. *Current Biology* **10**: 208-215.
- Reznick D, Bryant M, Holmes D. 2006.** The evolution of senescence and post-reproductive lifespan in guppies (*Poecilia reticulata*). *PLoS Biology* **4**: 136–143.
- Reznick DN, Shaw FH, Rodd FH, Shaw RG. 1997.** Evaluation of the rate of evolution in natural populations of guppies (*Poecilia reticulata*). *Science* **275**: 1934–1937.
- Ribeiro AM, Llord P, Bowie RCK. 2011.** A tight balance between natural selection and gene flow in a southern African arid-zone endemic bird. *Evolution* **65**: 3499-3514.
- Richter-Boix A, Teplitsky C, Rogell B, Laurila A. 2010.** Local selection modifies phenotypic divergence among *Rana temporaria* populations in the presence of gene flow. *Molecular Ecology* **19**: 716-731.
- Roff DA. 1992.** *The Evolution of Life Histories: Theory and Analysis*. London: Chapman and Hall.

- Ruiz A, Santos M, Barbadilla A, Quezada-Diaz JE, Hasson E, Fontdevila A. 1991.** Genetic variance for body size in a natural population of *Drosophila buzzatii*. *Genetics* **128**: 739-750.
- Rundle HD, Nosil P. 2005.** Ecological speciation. *Ecology Letters* **8**: 336–352.
- Salazar-Ciudad I. 2007.** On the origins of morphological variation, canalization, robustness and evolvability. *Integrative and Comparative Biology*. **47**: 390-400.
- Schluter D. 2001.** Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology & Evolution* **16**: 372-380.
- Seko T, Miyatake T, Fujioka S, Nakasuji F. 2006.** Genetic and environmental sources of egg size, fecundity and body size in the migrant skipper *Parnara guttata guttata* (Lepidoptera: Hesperidae). *Population Ecology* **48**: 225-232.
- Serrano M, Guillén F, Martínez-Romero D, Castillo S, Valero D. 2005.** Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 2741-2745.
- Shingleton AW. 2010.** The regulation of organ size in *Drosophila*: Physiology, plasticity, patterning and physical force. *Organogenesis* **6**: 76-87.
- Sivinski JM. 1993.** Longevity and fecundity in the Caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae): effects of mating, strain and body size. *Florida Entomologist* **76**: 635-644.
- Stapley J, Reger J, Fenlner PGD, Smadja C, Galindo J, Ekblom R, Bennison C, Ball AD, Beckerman AP, Slate J. 2010.** Adaptation genomics: the next generation. *Trends in Ecology and Evolution* **25**: 705-712.
- Stearns SC. 1992.** *The Evolution of Life Histories*. Oxford: Oxford University Press.
- Stearns SC, Kawecki TJ. 1994.** Fitness sensitivity and the canalization of life-history traits. *Evolution* **48**: 1438-1450.
- Till-Bottrand I, Wu L, Herding J. 1990.** Rapid evolution of life history traits in populations of *Poa annua* L. *Journal of Evolutionary Biology* **3**: 205-224.
- Vargas RI, Walsch WA, Kanehisa D, Stark JD, Nishida T. 2000.** Comparative demography of three Hawaiian fruit flies (Diptera: Tephritidae) at alternating temperatures. *Annals of the Entomological Society of America* **93**: 75-81.
- Via S. 2009.** Natural selection in action during speciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 9939-9946.
- Wang SY. 2006.** Effect of Pre-harvest Conditions on Antioxidant Capacity in Fruits. *Acta Horticulturae* **712**: 291-298.
- Wiesmann R. 1933.** Untersuchungen über die Lebensgeschichte und Bekämpfung der Kirschenfliege *Rhagoletis cerasi* Linné I. *Mitteilung. Landwirtschaftliches Jahrbuch der Schweiz* **47**: 711-760.

7. Η ΠΑΡΑΤΕΤΑΜΕΝΗ ΔΙΑΠΑΥΣΗ ΣΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΝΥΜΦΗΣ ΕΠΙΦΕΡΕΙ ΚΟΣΤΟΣ ΣΤΑ ΕΝΗΛΙΚΑ ΤΗΣ ΡΑΓΟΛΕΤΙΔΑΣ ΤΗΣ ΚΕΡΑΣΙΑΣ

Περίληψη

Στις εύκρατες περιοχές, η εποχική αδράνεια (διάπαυση και/ή quiescence) των φυτοφάγων εντόμων συμβάλλει στην προσαρμογή των ειδών στις εποχικές μεταβολές των ενδαιτημάτων τους, συγχρονίζοντας τα στάδια ανάπτυξης και αναπαραγωγής των εντόμων με τη φαινολογία των φυτών-ξενιστών. Σε περίπτωση απρόβλεπτων μεταβολών των περιβαλλοντικών συνθηκών, η παραλλακτικότητα στην ένταση της εποχικής αδράνειας μεταξύ των ατόμων ενός πληθυσμού αυξάνει τις πιθανότητες επιβίωσης ενός είδους. Όμως, η παρατεταμένη εποχική αδράνεια επιφέρει συχνά κόστος σε σημαντικές βιολογικές παραμέτρους των ενηλίκων, όπως είναι η διάρκεια ζωής και η αναπαραγωγή. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήσαμε τη ραγολέτιδα της κερασιάς, ως ένα ολιγοφάγο μονοκυκλικό είδος εντόμου που διαχειμάζει στο στάδιο της νύμφης συνήθως για ένα ή και περισσότερα έτη, για να εξετάσουμε αν η παρατεταμένη διάπαυση των νυμφών έχει αρνητικές επιπτώσεις (trade-offs) στο μέγεθος του σώματος, στην επιβίωση και αναπαραγωγή των ενηλίκων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήσαμε δύο γεωγραφικά και γενετικά απομονωμένους πληθυσμούς της ραγολέτιδας της κερασιάς για να συγκρίνουμε τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ατόμων που ενηλικιώθηκαν μετά από υποβολή των νυμφών σε έναν ή δύο κύκλους θερμών-ψυχρών περιόδων (ενός έτους και παρατεταμένη διάπαυση, αντίστοιχα). Τα ενήλικα που εξήλθαν από νύμφες με παρατεταμένη διάπαυση είχαν μεγαλύτερο μέγεθος συγκριτικά με τα αντίστοιχα άτομα που ενηλικιώθηκαν κατά το πρώτο έτος διάπαυσης. Η παρατεταμένη διάπαυση δεν είχε σημαντική επίδραση στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων ενώ σημαντική ήταν η μείωση στην ωοπαραγωγή. Η επιμήκυνση του βιολογικού κύκλου ορισμένων ατόμων ενός πληθυσμού, που εκφράζεται μέσω της παρατεταμένης διάπαυσης, αποτελεί πιθανότατα μέρος των bet-hedging στρατηγικών της ραγολέτιδας της κερασιάς.

7.1. Εισαγωγή

Στις εύκρατες περιοχές, οι περιβαλλοντικές συνθήκες διαφοροποιούνται σημαντικά από περιοχή σε περιοχή και παράλληλα παρουσιάζουν έντονη εποχική διακύμανση. Τα έντομα, προκειμένου να αντεπεξέλθουν στις εποχικά

μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες των ενδαιτημάτων τους, εισέρχονται σε διάπαυση. Ως διάπαυση ορίζεται μια γενετικά προγραμματισμένη διαδικασία κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης ή αναπαραγωγής, που λαμβάνει χώρα σε συγκεκριμένο για κάθε είδος εντόμου αναπτυξιακό στάδιο ή στο στάδιο της αναπαραγωγής, και αποσκοπεί στο συγχρονισμό του βιολογικού του κύκλου με τις εκάστοτε εποχικές μεταβολές (Tauber, Tauber & Masaki, 1986; Danks, 1987). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι η διάπαυση που διαρκεί παραπάνω από ένα έτος, γνωστή ως παρατεταμένη διάπαυση (prolonged ή extended diapause), δεν αποτελεί εξαίρεση για τα έντομα, αν και συχνά η παρουσία της παραβλέπεται (Danks, 1987; Hanski, 1988). Συνήθως απαντάται σε είδη εντόμων για τα οποία η διαθεσιμότητα και η αφθονία των πηγών τροφής μεταβάλλονται στο χρόνο με τρόπο μη προβλέψιμο (Hanski, 1988). Κατά συνέπεια, τα είδη των εντόμων που παρουσιάζουν παρατεταμένη εποχική αδράνεια (διάπαυση ή quiescence) απαντώνται συνήθως σε ξερικές ή ημι-ξερικές περιοχές (Nakamura & Ae, 1977; Sims, 1983; Powell, 1987; 1989; 2001; Danforth, 1999; Tauber & Tauber, 2002), καθώς και σε περιοχές της αρκτικής ζώνης (Danks, 2004). Ωστόσο, παρατεταμένη διάπαυση έχει καταγραφεί και σε είδη της εύκρατης ζώνης (Barnes, 1952; Neilson, 1962; Prentiss, 1976; Shapiro, 1979; 1980; Annala, 1982; Hedlin, Miller & Ruth, 1982; Tzanakanis *et al.*, 1991; Levine, Oloumi-Sadeghi & Ellis, 1992; Menu, 1993; Higaki & Ando, 1999; Maeto & Ozaki, 2003; Higaki, 2005; Matsuo, 2006; Wang *et al.*, 2006; Chirumamilla *et al.*, 2008).

Τα άτομα με παρατεταμένη διάπαυση είναι περισσότερο εκτεθειμένα στους διάφορους παράγοντες θνησιμότητας κατά το στάδιο της διαχείμασης και παράλληλα αναβάλλουν την αναπαραγωγική τους δραστηριότητα για ένα ή περισσότερα έτη, αυξάνοντας το κόστος αρμοστικότητας των πληθυσμών (Danks, 1987). Τα άτομα με παρατεταμένη διάπαυση έχουν κατά κανόνα μεγαλύτερο μέγεθος, καθώς η αυξημένη μάζα σώματος σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα ενεργειακών αποθεμάτων. Τα παραπάνω άτομα αναμένεται να έχουν υψηλό ρυθμό επιβίωσης κατά τη διάρκεια της παρατεταμένης διάπαυσης (Sahota & Ibaraki, 1991; Danforth, 1999; Menu & Desouhant, 2002) αλλά και ικανοποιητική μεταδιαπαιτική προσαρμογή (Soula & Menu, 2005; Wei *et al.*, 2010). Ωστόσο, έχει βρεθεί αρνητική συσχέτιση (trade-offs) στην κατανομή των ενεργειακών αποθεμάτων μεταξύ της διατήρησης του σώματος κατά τη διάρκεια της παρατεταμένης διάπαυσης και της μετέπειτα αναπαραγωγικής δραστηριότητας στα είδη *Neodiprion swainei* (Hymenoptera: Diprionidae) (Lyons, 1970) και *N. sertifer* (Hymenoptera: Diprionidae) (Sullivan & Wallace, 1967). Προκειμένου να προσδιοριστούν οι επιπτώσεις της παραλλακτικότητας της διάρκειας της διάπαυσης στις βιολογικές παραμέτρους των εντόμων και να κατανοηθεί σε

βάθος η εξελικτική τους βιολογία, χρειάζεται να καθοριστούν οι τιμές των δημογραφικών παραμέτρων (επιβίωση και αναπαραγωγή) για τα άτομα με διαφορετικούς τύπους διάπαυσης.

Η ραγολέτιδα της κερασιάς, *Rhagoletis cerasi*, είναι ένα ολιγοφάγο, μονοκυκλικό είδος εντόμου της εύκρατης ζώνης που διαχειμάζει ως νύμφη σε υποχρεωτική διάπαυση (Boller & Prokory, 1976). Σε συνθήκες εργαστηρίου, έχει βρεθεί ότι ένα ποσοστό των νυμφών, το οποίο κυμαίνεται από 15% έως 90%, παραμένει σε διάπαυση για περισσότερο από ένα έτος (Vallo, Remund & Boller, 1976; Κεφάλαιο 4). Δεδομένης της σπανιότητας των δεδομένων σχετικά με τις επιπτώσεις της παρατεταμένης διάπαυσης (ειδικά στο στάδιο της νύμφης) στις βιολογικές παραμέτρους των μονοκυκλικών εντόμων, χρησιμοποιήσαμε τη ραγολέτιδα της κερασιάς ως οργανισμό-μοντέλο για να προσδιοριστούν οι επιπτώσεις της παρατεταμένης διάπαυσης στα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ενηλίκων. Εξετάσαμε τις υποθέσεις ότι τα ενήλικα άτομα που εξέρχονται από νύμφες με παρατεταμένη εποχική αδράνεια έχουν: α) μεγαλύτερο μέγεθος και β) μεγαλύτερο προσδόκιμο ζωής και υψηλότερους αναπαραγωγικούς ρυθμούς σε σχέση με τα ενήλικα που εξέρχονται από τις νύμφες με διάπαυση ενός έτους. Για το σκοπό αυτό, συγκρίναμε το μέγεθος σώματος και τις δημογραφικές παραμέτρους των ενηλίκων δύο γεωγραφικά και γενετικά απομονωμένων ελληνικών πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς, που εξήλθαν μετά από έκθεση των νυμφών σε έναν ή δύο κύκλους θερμών-ψυχρών περιόδων.

7.2. Υλικά και Μέθοδοι

7.2.1. Πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς

Για την εκτέλεση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο ελληνικοί πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς που προέρχονταν από περιοχές της α) Μακεδονίας (Μίκρα, Θεσσαλονίκη) και β) Πελοποννήσου (Κερνίτσα, Αχαΐα) (Εικόνα 16). Τα ενδιαιτήματα των παραπάνω πληθυσμών διαφέρουν ως προς τα οικολογικά τους χαρακτηριστικά (Πίνακας 16) και οι πληθυσμοί θεωρούνται γεωγραφικά και γενετικά απομονωμένοι (Augustinos *et al.*, 2013).



Εικόνα 16. Χάρτης γεωγραφικής κατανομής των πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν Κεφάλαιο.

Πίνακας 16. Κλιματικά και γεωγραφικά δεδομένα για τις δύο περιοχές από όπου προέρχονται οι πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς. Χρησιμοποιήθηκαν τα μετεωρολογικά δεδομένα του πλησιέστερου μετεωρολογικού σταθμού σε κάθε περιοχή.

Περιοχή	Γεωγραφικό πλάτος	Γεωγραφικό μήκος	Υψόμετρο (μ.)	Εύρος μέσης θερμοκρασίας (°C)	Ετήσια βροχόπτωση (χιλ.)
Μακεδονία (Θεσσαλονίκη)	40°31'0'' N	22°58'0'' E	4	5.2 – 26.0	448.7
Πελοπόννησος (Αχαΐα)	38°02'0'' N	22°06'0'' E	731	4.0 - 22.1	490.2

Τα δεδομένα προέρχονται από το Ελληνικό Εθνικό Αστεροσκοπείο. Περίοδος αναφοράς: 1956 -1997.

7.2.2. Πειραματική διαδικασία

Χρησιμοποιήθηκαν ενήλικα των παραπάνω πληθυσμών που εξήλθαν από νύμφες που περάτωσαν τη διάπαυσή τους μετά από έναν κύκλο θερμών-ψυχρών περιόδων (1 έτους διάπαυση) ή μετά από δύο κύκλους θερμών-ψυχρών περιόδων (παρατεταμένη διάπαυση). Περίπου 400 νύμφες από κάθε πληθυσμό παρέμειναν στους $25 \pm 1^\circ\text{C}$ για 3 μήνες και έπειτα τοποθετήθηκαν στους $3 \pm 1^\circ\text{C}$ για 6 μήνες. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν πίσω στους $25 \pm 1^\circ\text{C}$ προκειμένου να εξέλθουν τα ενήλικα. Όταν η έξοδος των ενηλίκων ολοκληρώθηκε, όλα τα άδεια πουπάρια απομακρύνθηκαν και οι νύμφες που παρέμειναν διαχωρίστηκαν σε νεκρές και ζωντανές, δηλ. αυτές που παραμένουν σε διάπαυση. Τα ποσοστά των νυμφών που παρέμειναν σε διάπαυση κυμαίνονταν από 41.5% (Μακεδονία) έως 74% (Πελοπόννησος). Οι νύμφες που βρίσκονταν σε διάπαυση παρέμειναν στους $25 \pm 1^\circ\text{C}$ για 3 μήνες και έπειτα μεταφέρθηκαν στους $3 \pm 1^\circ\text{C}$ για μια επιπλέον περίοδο διάρκειας 6 μηνών. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν πίσω στους $25 \pm 1^\circ\text{C}$ μέχρι να ολοκληρωθεί η έξοδος των ενηλίκων. Το ποσοστό εξόδου των ενηλίκων υπολογίστηκε σε 79.7% (Μακεδονία) και 72.8% (Πελοπόννησος) και το ποσοστό των νεκρών νυμφών κυμάνθηκε από 20.3% (Μακεδονία) έως 27.2% (Πελοπόννησος). Δεν καταγράφηκαν νύμφες που να παραμένουν ζωντανές για μεγαλύτερο διάστημα.

Ένα ζευγάρι ενηλίκων ατόμων τοποθετήθηκε εντός 24 ωρών από την ενηλικίωσή του σε κατάλληλο ατομικό κλουβάκι και καταγράφηκε σε καθημερινή βάση η ωτοκία και η επιβίωση καθώς και το μέγεθος του σώματος των ενηλίκων κατά το θάνατο των ατόμων (Κεφάλαιο 2). Πραγματοποιήθηκαν 49-50 επαναλήψεις για κάθε τύπο διάπαυσης (1 έτους και παρατεταμένη διάπαυση) σε κάθε πληθυσμό.

7.2.3. Στατιστική ανάλυση

Για να εξεταστεί εάν τα δεδομένα ακολουθούν κανονική κατανομή, εφαρμόστηκε το κριτήριο Kolmogorov–Smirnov. Το Κριτήριο Mann–Whitney χρησιμοποιήθηκε για να εξεταστεί αν το μέγεθος σώματος των ενηλίκων (μήκος θώρακα, πλάτος θώρακα και πλάτος κεφαλής) μεταβάλλεται με: α) τον τύπο διάπαυσης και β) το φύλο για κάθε τύπο διάπαυσης. Το μοντέλο των ανάλογων κινδύνων του Cox (Cox proportional hazard regression) χρησιμοποιήθηκε για να μελετηθεί η επίδραση του φύλου, του τύπου της διάπαυσης και του μεγέθους του σώματος στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων, καθώς και η επίδραση του τύπου της διάπαυσης και του μεγέθους του σώματος στις αναπαραγωγικές περιόδους των θηλυκών των δύο πληθυσμών (περίοδος πρωτοκίας, περίοδος ωτοκίας και

περίοδος μετά την ωτοτοκία). Οι παράγοντες χωρίς σημαντική επίδραση (Κριτήριο Wald's) εξαιρέθηκαν από το παραπάνω μοντέλο και οι παράγοντες με σημαντική επίδραση εισήχθησαν σε πολυ-παραγοντικό μοντέλο ανάλογων κινδύνων (μοντέλο Cox). Η Ανάλυση συνδιακύμανσης (ANCOVA) χρησιμοποιήθηκε για να καθοριστούν οι παράγοντες που επηρεάζουν την ωτοπαραγωγή, με τον τύπο διάπαυσης να ορίζεται ως σταθερός παράγοντας και το μέγεθος του σώματος των ενηλίκων (μήκος θώρακα, πλάτος θώρακα και πλάτος κεφαλής) ως συμμεταβλητή. Η σύγκριση της κατανομής της ωτοτοκίας σε σχέση με την ηλικία μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση ROC (Receiver Operating Characteristic), όπως αυτή περιγράφηκε από τους Alonzo *et al.*, (2009). Οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα στατιστικά πακέτα SPSS 17.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA.) και R 2.10 (<http://www.r-project.org>).

7.3. Αποτελέσματα

7.3.1. Μέγεθος σώματος ενηλίκων

Σε κάθε πληθυσμό, τόσο τα αρσενικά όσο και τα θηλυκά, που προήλθαν από νύμφες με παρατεταμένη διάπαυση, είχαν μεγαλύτερο μέγεθος σώματος σε σχέση με τα άτομα που ενηλικιώθηκαν κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους (Κριτήριο Mann-Whitney, Μακεδονία: αρσενικά, $U > 410.5$, $n = 97$, $P < 0.001$; θυληκά, $U > 356$, $n = 98$, $P < 0.001$; Πελοπόννησος: αρσενικά, $U > 436.5$, $n = 95$, $P < 0.001$; θηλυκά: $U > 378.5$, $n = 95$, $P < 0.001$) (Πίνακας 17). Σε επίπεδο πληθυσμού, τα θηλυκά είχαν μεγαλύτερο μέγεθος από τα αρσενικά ($U > 77$, $n = 95-100$, $P < 0.001$), ανεξαρτήτως του τύπου διάπαυσης (Πίνακας 17).

Πίνακας 17. Μέγεθος σώματος (χιλιοστά ± SE) αρσενικών και θηλυκών της ραγολέτιδας της κερασιάς που προέρχονταν από πληθυσμούς της Μακεδονίας και της Πελοποννήσου. Τα ενήλικα εξήλθαν από νύμφες με διαφορετικό τύπο διάπαυσης (ενός έτους και παρατεταμένη διάπαυση).

Πληθυσμός/ Τύπος διάπαυσης	N		Μέσο μήκος θώρακα		Μέσο πλάτος θώρακα		Μέσο πλάτος κεφαλής	
	Αρσενικά	Θηλυκά	Αρσενικά	Θηλυκά	Αρσενικά	Θηλυκά	Αρσενικά	Θηλυκά
Μακεδονία								
ενός έτους	47	48	1.46 ± 0.01	1.59 ± 0.02	1.17 ± 0.01	1.28 ± 0.02	1.28 ± 0.01	1.36 ± 0.02
παρατεταμένη	50	50	1.52 ± 0.01	1.73 ± 0.01	1.26 ± 0.01	1.41 ± 0.01	1.38 ± 0.01	1.50 ± 0.02
Πελοπόννησος								
ενός έτους	47	48	1.45 ± 0.01	1.60 ± 0.02	1.16 ± 0.01	1.29 ± 0.01	1.27 ± 0.01	1.40 ± 0.01
παρατεταμένη	48	47	1.53 ± 0.01	1.73 ± 0.01	1.24 ± 0.01	1.40 ± 0.01	1.36 ± 0.01	1.48 ± 0.01

7.3.2. Επιβίωση

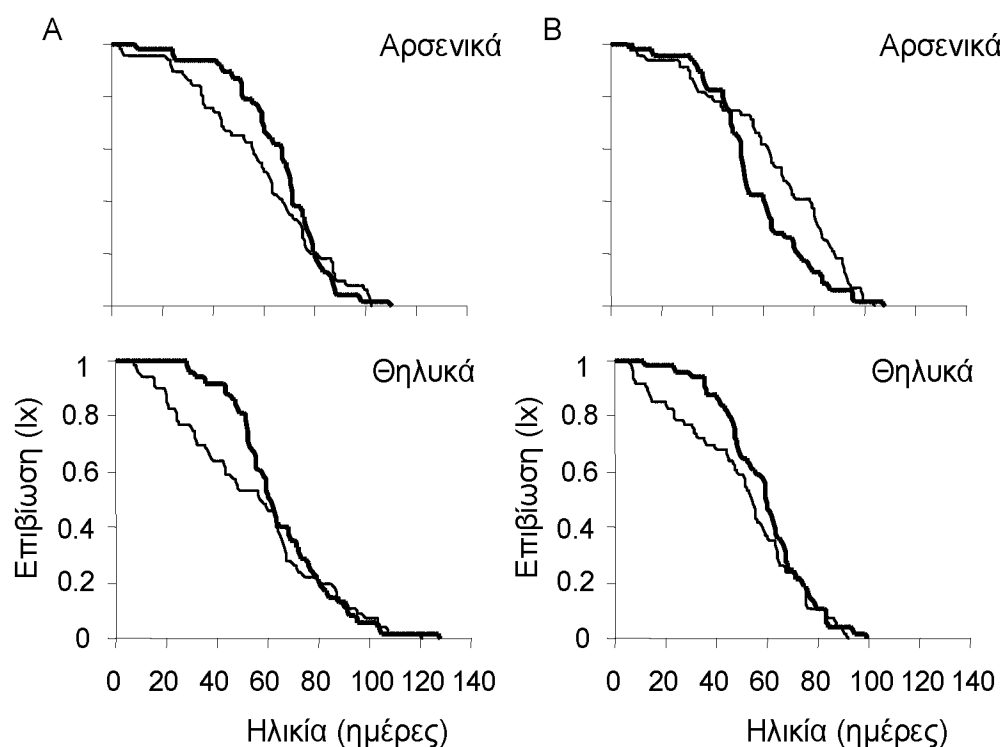
Η μέση διάρκεια ζωής των αρσενικών κυμάνθηκε από 55 έως 64 ημέρες και των θηλυκών από 48 έως 64 ημέρες (Πίνακας 18). Σχετικά με τα ενήλικα από τη Μακεδονία, το μοντέλο Cox (εξετάζοντας τον κάθε παράγοντα χωριστά) έδειξε ότι το φύλο ($\chi^2 = 0.058$, $df = 1$, $P = 0.809$) και ο τύπος διάπαυσης ($\chi^2 = 1.087$, $df = 1$, $P = 0.297$) δεν είχαν σημαντική επίδραση στη μακροβιότητα, σε αντίθεση με το μέγεθος του σώματος των ενηλίκων (μήκος θώρακα: $\chi^2 = 6.034$, $df = 1$, $P = 0.014$; πλάτος θώρακα: $\chi^2 = 6.076$, $df = 1$, $P = 0.014$; πλάτος κεφαλής: $\chi^2 = 4.985$, $df = 1$, $P = 0.026$). Οι παράγοντες με σημαντική επίδραση εισήχθησαν σε πολυ-παραγοντικό μοντέλο ανάλογων κινδύνων (μοντέλο Cox). Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε σταδιακή διαδικασία επιλογής για την κατασκευή του τελικού μοντέλου, το οποίο έδειξε ότι η μακροβιότητα των ενηλίκων επηρεάζεται σημαντικά μόνο από το πλάτος του θώρακα. Σχετικά με τα ενήλικα από την Πελοπόννησο, το μοντέλο Cox (εξετάζοντας τον κάθε παράγοντα χωριστά) έδειξε ότι ο τύπος διάπαυσης έχει σημαντική επίδραση στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων ($\chi^2 = 0.949$, $df = 1$, $P = 0.330$), σε αντίθεση με το φύλο ($\chi^2 = 5.086$, $df = 1$, $P = 0.024$) και το μέγεθος του σώματος των ενηλίκων (μήκος θώρακα: $\chi^2 = 2.558$, $df = 1$, $P = 0.110$; πλάτος θώρακα: $\chi^2 = 1.839$, $df = 1$, $P = 0.175$; πλάτος κεφαλής: $\chi^2 = 8.779$, $df = 1$, $P = 0.003$). Εξετάζοντας μόνο τους σημαντικούς παράγοντες στο τελικό μοντέλο και χρησιμοποιώντας σταδιακή διαδικασία επιλογής, αποδείχτηκε ότι μόνο το πλάτος της κεφαλής έχει σημαντική επίδραση στη μακροβιότητα των ενηλίκων ($P < 0.05$).

Οι καμπύλες επιβίωσης σε σχέση με την ηλικία δείχνουν ότι τα θηλυκά που εξήλθαν από νύμφες με παρατεταμένη διάπαυση και των δύο πληθυσμών είχαν υψηλότερους ρυθμούς θνησιμότητας κατά τη διάρκεια των 60 περίπου πρώτων ημερών σε σχέση με τα θηλυκά που εξήλθαν κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους (Διάγραμμα 11). Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν συστηματικές διαφορές στις καμπύλες επιβίωσης των αρσενικών μεταξύ των δυο πληθυσμών, ανεξαρτήτως του τύπου της διάπαυσης (Διάγραμμα 11).

Πίνακας 18. Μακροβιότητα ενηλίκων, μέση και μέγιστη συνολική ωοπαραγωγή θηλυκών της ραγολέτιδας της κερασιάς που προέρχονταν από πληθυσμούς της Μακεδονίας και Πελοποννήσου. Τα ενήλικα εξήλθαν από νύμφες με διαφορετικό τύπο διάπαυσης.

Πληθυσμός/ Τύπος διάπαυσης	N	Μέση διάρκεια ζωής (ημέρες ± SE)		Αναπαραγωγικοί ρυθμοί (αυγά ανά θηλυκό)	
		Αρσενικά	Θηλυκά	Μέση συνολική ωοπαραγωγή ± SE	Μέγιστη συνολική παραγωγή
Μακεδονία					
ενός έτους	50	64.4 ± 3.0	63.6 ± 3.0	376.7 ± 28.6	490.0
παρατεταμένη	50	58.7 ± 3.6	51.2 ± 4.2	109.9 ± 18.5	183.4
Πελοπόννησος					
ενός έτους	50	54.9 ± 3.1	57.7 ± 2.7	312.2 ± 22.7	408.3
παρατεταμένη	49	59.7 ± 4.1	47.9 ± 3.6	109.5 ± 17.2	206.7

Η μέγιστη συνολική παραγωγή δίνεται από τον τύπο $\sum_{x=a}^b Mx$, όπου x = διάστημα ηλικίας σε ημέρες, a = ηλικία κατά την έναρξη της ωοπαραγωγής, b = ηλικία κατά τη λήξη της ωοπαραγωγής, Mx = συνολικός αριθμός αυγών που εναπόθεσε ένα μέσο θηλυκό στην ηλικία x (Carey, 1993).



Διάγραμμα 11. Καμπύλες επιβίωσης αρσενικών και θηλυκών ατόμων της ραγολέτιδας της κερασιάς από πληθυσμούς της Μακεδονίας (A: αριστερή στήλη) και της Πελοποννήσου (B: δεξιά στήλη). Τα ενήλικα εξήλθαν από νύμφες είτε με διάπαυση ενός έτους (έντονη γραμμή) είτε με παρατεταμένη διάπαυση (λεπτή γραμμή).

7.3.3. Αναπαραγωγή

Οι περίοδοι αναπαραγωγής σε σχέση με την ηλικία (πριν την ωοτοκία, ωοτοκία, μετά την ωοτοκία) των ενήλικων που εξήλθαν από νύμφες με παρατεταμένη και ενός έτους διάπαυση δίνονται στο Διάγραμμα 12. Η περίοδος πριν την ωοτοκία είχε διάρκεια 8.2 και 7.1 ημέρες για τα θηλυκά που εξήλθαν από νύμφες με ενός έτους εποχική αδράνεια από τη Μακεδονία και την Πελοπόννησο, αντίστοιχα. Ωστόσο, τα θηλυκά και των δύο πληθυσμών που προήλθαν από νύμφες με παρατεταμένη διάπαυση χρειάστηκαν περίπου 9 ημέρες μέχρι την έναρξη της ωοτοκίας. Σχετικά με τα θηλυκά από τη Μακεδονία, το μοντέλο Cox (εξετάζοντας τον κάθε παράγοντα χωριστά) έδειξε ότι

ούτε ο τύπος διάπαυσης ($\chi^2 = 0.969$, $df = 1$, $P = 0.325$) ούτε το μέγεθος του σώματος (μήκος θώρακα: $\chi^2 = 0.442$, $df = 1$, $P = 0.506$; πλάτος θώρακα: $\chi^2 = 0.395$, $df = 1$, $P = 0.530$; πλάτος κεφαλής: $\chi^2 = 0.175$, $df = 1$, $P = 0.676$) είχε σημαντική επίδραση στη μέση διάρκεια της περιόδου πριν την ωτοκία. Σχετικά με τα θηλυκά από την Πελοπόννησο, το μοντέλο Cox (εξετάζοντας τον κάθε παράγοντα χωριστά) έδειξε ότι ο τύπος διάπαυσης ($\chi^2 = 6.304$, $df = 1$, $P = 0.012$), το μήκος του θώρακα ($\chi^2 = 6.549$, $df = 1$, $P = 0.010$) και το πλάτος της κεφαλής ($\chi^2 = 3.916$, $df = 1$, $P = 0.048$) επηρεάζουν σημαντικά τη μέση διάρκεια της περιόδου πριν την ωτοκία, ενώ το πλάτος του θώρακα δεν έχει σημαντική επίδραση ($\chi^2 = 2.576$, $df = 1$, $P = 0.109$). Εξετάζοντας μόνο τους σημαντικούς παράγοντες στο τελικό μοντέλο και χρησιμοποιώντας σταδιακή διαδικασία επιλογής, αποδείχτηκε ότι ο μόνος σημαντικός παράγοντας ήταν το μήκος του θώρακα ($P < 0.05$).

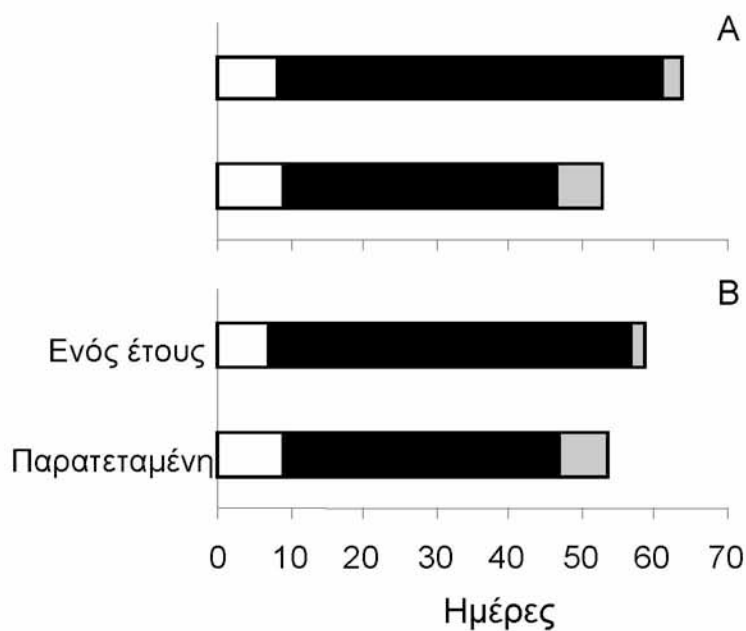
Η περίοδος ωτοκίας των θηλυκών που προήλθαν από νύμφες με παρατεταμένη διάπαυση ήταν περίπου 13 ημέρες μικρότερη από την αντίστοιχη των θηλυκών που προήλθαν από νύμφες με ενός έτους διάπαυση. Το μοντέλο Cox (εξετάζοντας τον κάθε παράγοντα χωριστά) έδειξε ότι τόσο ο τύπος διάπαυσης ($\chi^2 = 5.211$, $df = 1$, $P = 0.022$) όσο και το μέγεθος σώματος των ενηλίκων (μήκος θώρακα: $\chi^2 = 9.393$, $df = 1$, $P = 0.002$; πλάτος θώρακα: $\chi^2 = 13.123$, $df = 1$, $P < 0.001$; πλάτος κεφαλής: $\chi^2 = 5.728$, $df = 1$, $P = 0.017$) είχαν σημαντική επίδραση στη διάρκεια της περιόδου ωτοκίας των θηλυκών από τη Μακεδονία. Εξετάζοντας μόνο τους σημαντικούς παράγοντες στο τελικό μοντέλο χρησιμοποιώντας σταδιακή διαδικασία επιλογής, αποδείχτηκε ότι ο μόνος σημαντικός παράγοντας είναι το πλάτος του θώρακα ($P < 0.05$). Σχετικά με τα θηλυκά από την Πελοπόννησο, το μοντέλο Cox (εξετάζοντας τον κάθε παράγοντα χωριστά) έδειξε ότι ούτε ο τύπος διάπαυσης ($\chi^2 = 1.945$, $df = 1$, $P = 0.163$) ούτε το μέγεθος του σώματος των ενηλίκων (μήκος θώρακα: $\chi^2 = 1.337$, $df = 1$, $P = 0.248$; πλάτος θώρακα: $\chi^2 = 1.143$, $df = 1$, $P = 0.285$; πλάτος κεφαλής: $\chi^2 = 0.295$, $df = 1$, $P = 0.587$) είχαν σημαντική επίδραση στη διάρκεια της περιόδου ωτοκίας.

Η μετα-αναπαραγωγική διάρκεια ζωής των θηλυκών που εξήλθαν από νύμφες με παρατεταμένη διάπαυση ήταν περισσότερο από τρεις φορές μακρύτερη σε σχέση με την αντίστοιχη των θηλυκών που εξήλθαν κατά το πρώτο έτος, ανεξαρτήτως πληθυσμού. Το μοντέλο Cox (εξετάζοντας τον κάθε παράγοντα χωριστά) έδειξε ότι μόνο ο τύπος διάπαυσης είχε σημαντική επίδραση στη διάρκεια της περιόδου μετά την ωτοκία των θηλυκών και των δύο πληθυσμών (Μακεδονία, τύπος διάπαυσης: $\chi^2 = 7.421$, $df = 1$, $P = 0.006$; μήκος θώρακα: $\chi^2 = 0.380$, $df = 1$, $P = 0.538$; πλάτος θώρακα: $\chi^2 = 0.317$, $df = 1$, $P = 0.573$; πλάτος κεφαλής: $\chi^2 = 0.475$, $df = 1$, $P = 0.490$; Πελοπόννησος, τύπος

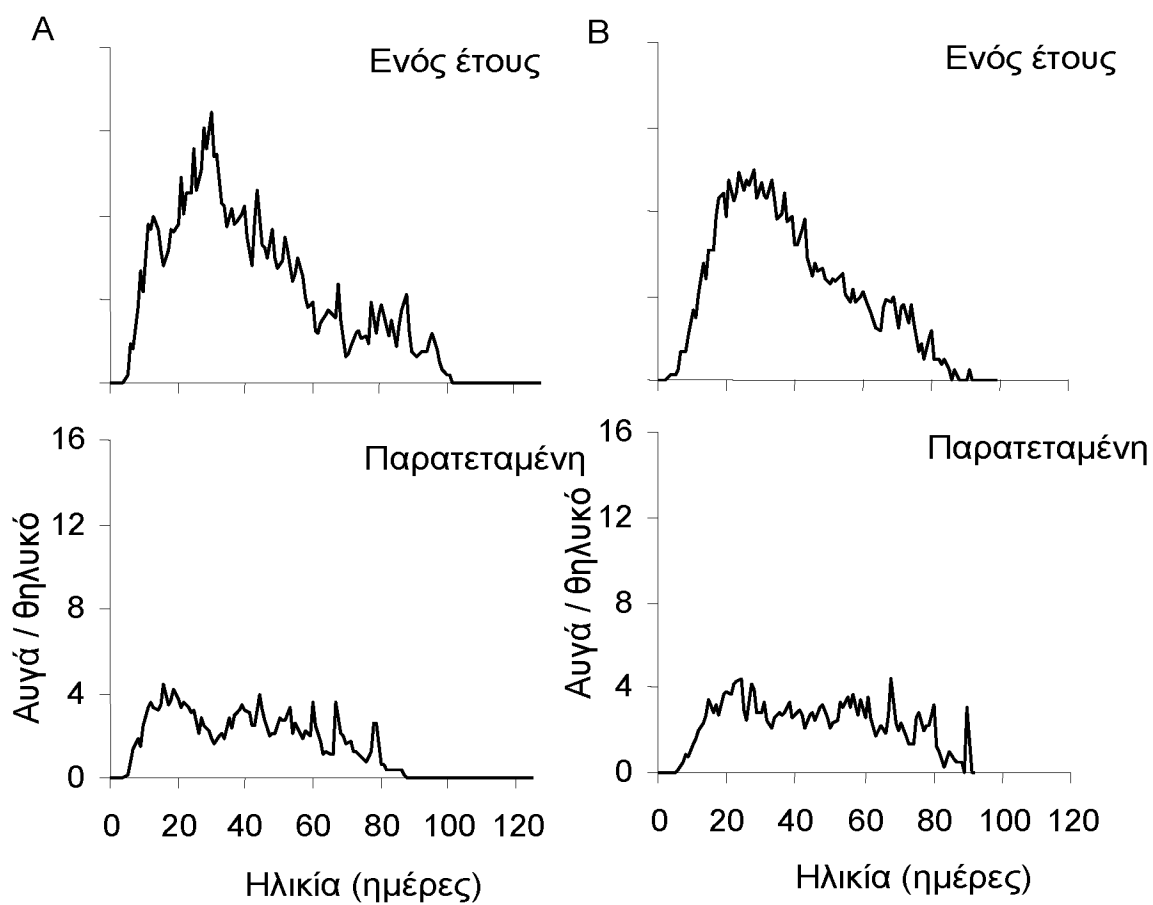
διάπαυσης: $\chi^2 = 8.914$, $df = 1$, $P = 0.003$; μήκος θώρακα: $\chi^2 = 0.755$, $df = 1$, $P = 0.385$; πλάτος θώρακα: $\chi^2 = 2.091$, $df = 1$, $P = 0.148$; πλάτος κεφαλής: $\chi^2 = 0.925$, $df = 1$, $P = 0.336$).

Η μέση συνολική ωοπαραγωγή των θηλυκών που εξήλθαν από νύμφες με παρατεταμένη διάπαυση ήταν χαμηλή (110 αυγά/θηλυκό) και στους δύο πληθυσμούς (Πίνακας 18). Η ανάλυση συνδιακύμανσης (ANCOVA) έδειξε ότι για τα θηλυκά από τη Μακεδονία ο τύπος διάπαυσης είχε σημαντική επίδραση στην ωοπαραγωγή ($F = 41.432$, $df = 1$, $P < 0.001$), ενώ το μέγεθος σώματος των ενηλίκων δεν ήταν σημαντική συμμεταβλητή (μήκος θώρακα: $F = 2.787$, $df = 1$, $P = 0.098$; πλάτος θώρακα: $F = 0.253$, $df = 1$, $P = 0.616$, πλάτος κεφαλής: $F = 0.609$, $df = 1$, $P = 0.437$). Ομοίως, η παρατεταμένη διάπαυση είχε σημαντική επίδραση στο ρυθμό ωοπαραγωγής των θηλυκών από την Πελοπόννησο, ενώ το μέγεθος σώματος των ενηλίκων δεν ήταν σημαντική συμμεταβλητή (ANCOVA, τύπος διάπαυσης: $F = 20.046$, $df = 1$, $P < 0.001$; μήκος θώρακα: $F = 0.187$, $df = 1$, $P = 0.667$; πλάτος θώρακα: $F = 3.097$, $df = 1$, $P = 0.082$, πλάτος κεφαλής: $F = 0.113$, $df = 1$, $P = 0.737$). Επιπρόσθετα, η κατανομή της ωοτοκίας δεν διέφερε μεταξύ των θηλυκών που εξήλθαν από νύμφες με παρατεταμένη διάπαυση και νύμφες με ενός έτους διάπαυση, ανεξαρτήτως πληθυσμού (ROC ανάλυση, Μακεδονία: $P = 0.365$; Πελοπόννησος: $P = 0.463$).

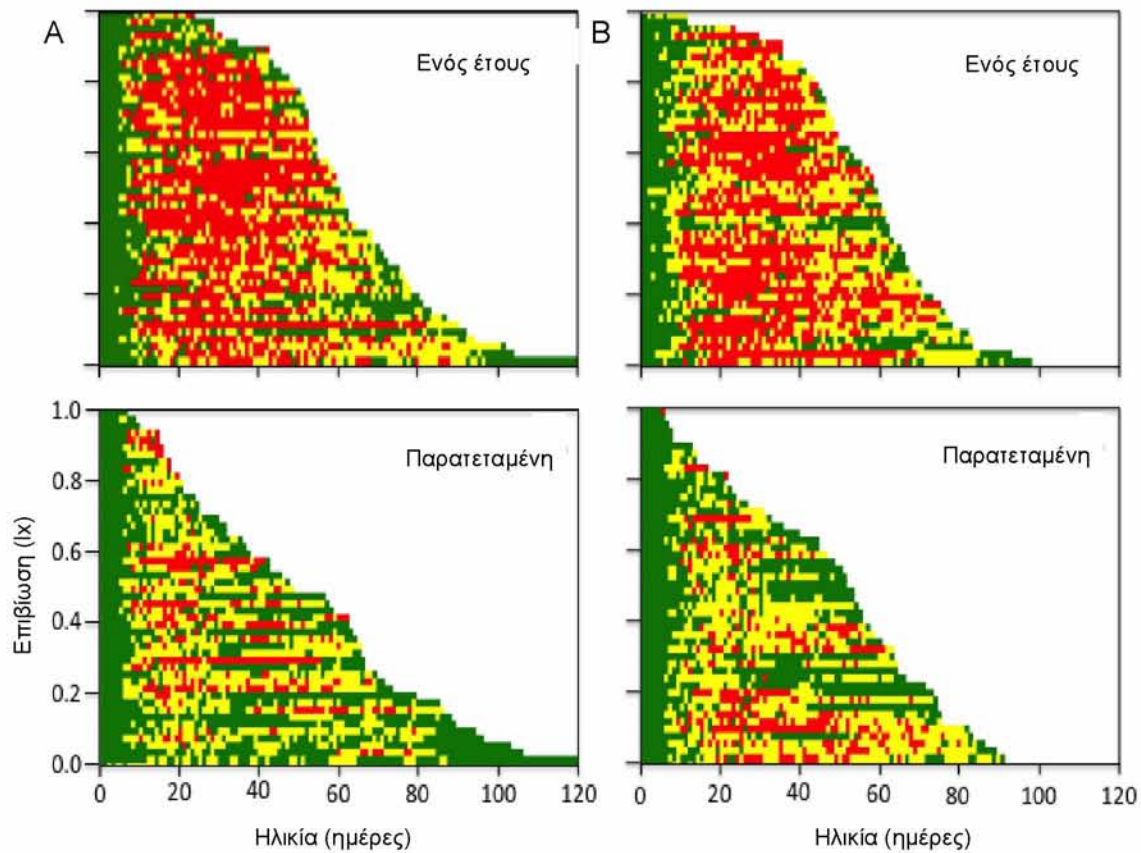
Ο τύπος διάπαυσης επηρέασε πολλά χαρακτηριστικά της κατανομής ωοτοκίας σε σχέση με την ηλικία, ανεξάρτητα από τον πληθυσμό (Διάγραμμα 13). Για παράδειγμα, το μέγιστο του ρυθμού ωοπαραγωγής των θηλυκών που εξήλθαν κατά το πρώτο έτος καταγράφηκε περίπου την 30^η ημέρα και στους δύο πληθυσμούς. Αντίθετα, ο ρυθμός ωοπαραγωγής παρέμεινε σταθερός καθόλη τη διάρκεια της περιόδου ωοτοκίας των θηλυκών που εξήλθαν από νύμφες με παρατεταμένη διάπαυση και στους δύο πληθυσμούς. Οι διαφορές στην κατανομή ωοτοκίας σε σχέση με την ηλικία μεταξύ των θηλυκών και των δύο πληθυσμών που εξήλθαν από νύμφες με διαφορετικό τύπο διάπαυσης αποτυπώνονται λεπτομερειακά στο Διάγραμμα 14 (Carey et al., 1998). Σε κάθε πληθυσμό, η ωοτοκία των θηλυκών που εξήλθαν από νύμφες με παρατεταμένη διάπαυση φαίνεται να είναι σποραδική με μικρό αριθμό εναποθετημένων αυγών, ενώ οι αντίστοιχες των θηλυκών που προήλθαν από νύμφες με ενός έτους διάπαυση ήταν συνεχείς και υψηλότερης έντασης. Κατά μέσο όρο, ένα θηλυκό από τη Μακεδονία και την Πελοπόννησο που ενηλικιώθηκε μετά από παρατεταμένη διάπαυση φαίνεται να ωοτοκεί ανά 1.7 και 1.5 ημέρες, αντίστοιχα. Αντίθετα, ένα μέσο θηλυκό που προήλθε από νύμφη με ενός έτους διάπαυση ωοτοκεί κάθε 1.2 ημέρες.



Διάγραμμα 12. Περίοδοι αναπαραγωγής σε σχέση με την ηλικία των θηλυκών της ραγολέτιδας της κερασιάς που προέρχονταν από πληθυσμούς της Μακεδονίας (A) και της Πελοποννήσου (B). Οι στήλες με άσπρο, μαύρο και γκρι χρώμα αναφέρονται στη διάρκεια της περιόδου πριν την ωτοκία, την περίοδο ωτοκίας και την περίοδο μετά την ωτοκία, αντίστοιχα. Τα ενήλικα εξήλθαν από νύμφες είτε με διάπαυση ενός έτους είτε με παρατεταμένη διάπαυση.



Διάγραμμα 13. Καμπύλες ωοπαραγωγής (σε σχέση με την ηλικία) των θηλυκών της ραγολέτιδας της κερασιάς που προέρχονταν από πληθυσμούς της Μακεδονίας (A: αριστερή στήλη) και της Πελοποννήσου (B: δεξιά στήλη). Τα θηλυκά εξήλθαν από νύμφες είτε με διάπαυση ενός έτους είτε με παρατεταμένη διάπαυση.



Διάγραμμα 14. Λεπτομερειακή αποτύπωση της ωοτοκίας των θηλυκών (event-history diagram) της ρακολέτιδας της κερασιάς που προέρχονται από πληθυσμούς της Μακεδονίας (A: αριστερή στήλη) και της Πελοποννήσου (B: δεξιά στήλη). Τα θηλυκά εξήλθαν από νύμφες είτε με διάπαυση ενός έτους είτε με παρατεταμένη διάπαυση. Πράσινο= 0 αυγά/ημέρα, κίτρινο= 1-5 αυγά/ημέρα, κόκκινο< 5 αυγά/ημέρα. Χρησιμοποιήθηκαν περίπου 50 άτομα για κάθε πληθυσμό. Κάθε οριζόντια γραμμή αντιπροσωπεύει ένα θηλυκό άτομο του πληθυσμού και το μήκος της γραμμής ισοδυναμεί με τη διάρκεια ζωής του. Οι χρωματισμοί κατά μήκος της γραμμής αναφέρονται στον αριθμό των αυγών που εναπόθετε σε καθημερινή βάση το θηλυκό. Η ταξινόμηση των θηλυκών γίνεται από το πιο βραχύβιο στο μακροβιότερο έτσι ώστε να διακρίνεται το ποσοστό επιβίωσης των ατόμων για κάθε ημέρα της ενήλικης ζωής του πληθυσμού.

7.4. Συζήτηση

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η παρατεταμένη διάπαυση στο στάδιο της νύμφης συνδέεται με μεγαλύτερο μέγεθος και με αυξημένο κόστος προσαρμογής για τα ενήλικα της ραγολέτιδας της κερασιάς. Ανεξάρτητα του πληθυσμού, η παρατεταμένη διάπαυση στο στάδιο της νύμφης δεν προκαλεί σημαντική μείωση στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων, η οποία φαίνεται να επηρεάζεται μόνο από την παραλλακτικότητα στο μέγεθος του σώματος. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στη διάρκεια της περιόδου πριν την ωοτοκία και της περιόδου ωοτοκίας αποδίδονται στη παραλλακτικότητα του μέγεθους του σώματος μεταξύ των ενηλίκων και δεν οφείλονται στον τύπο της διάπαυσης. Εντούτοις, η παρατεταμένη διάπαυση προκαλεί σημαντική μείωση στον αριθμό των ημερών ωοτοκίας ενώ καταγράφηκε αύξηση της εναπομείνουσας ζωής μετά το τέλος της περιόδου ωοτοκίας. Συνεπώς, επιβεβαιώνεται η αρχική υπόθεση ότι τα ενήλικα που εξέρχονται μετά από παρατεταμένη διάπαυση στο στάδιο της νύμφης έχουν μεγαλύτερο μέγεθος σώματος σε σχέση με τα ενήλικα που εξέρχονται κατά το πρώτο έτος διάπαυσης. Ωστόσο, η υπόθεση ότι η παρατεταμένη εποχική αδράνεια προκαλεί αύξηση τόσο της διάρκειας ζωής των ενηλίκων όσο και της ωοπαραγωγής των θηλυκών απορρίπτεται.

Σύμφωνα και με προηγούμενες μελέτες (Powell, 1989; Sahota & Ibaraki, 1991; Danforth, 1999; Wei *et al.*, 2010), τα ενήλικα της ραγολέτιδας της κερασιάς που εξήλθαν από νύμφες με παρατεταμένη διάπαυση είχαν σημαντικά μεγαλύτερο μέγεθος σώματος σε σχέση με τα αντίστοιχα από νύμφες με διάπαυση ενός έτους. Το μέγεθος σώματος των ατόμων της ραγολέτιδας της κερασιάς φαίνεται να είναι καθοριστικό για την είσοδο των νυμφών σε παρατεταμένη διάπαυση. Σε έναν πληθυσμό, είναι πιθανό να συνυπάρχουν δύο διακριτοί φαινότυποι ατόμων, μικρού και μεγάλου μεγέθους, οι οποίοι δυνητικά να μπορούν να ακολουθήσουν διαφορετικό τύπο διάπαυσης, δηλ. τα μεγάλα σε μέγεθος άτομα να εισέρχονται σε παρατεταμένη διάπαυση ενώ τα αντίστοιχα μικρά να πρέπει να περατώσουν τη διάπαυση κατά το πρώτο έτος. Από την άλλη πλευρά, το μεγαλύτερο μέγεθος σώματος των ατόμων με παρατεταμένη διάπαυση μπορεί να είναι το αποτέλεσμα της διαφορετικής ικανότητας επιβίωσης κατά τη διάρκεια της παρατεταμένης διάπαυσης. Σε αυτήν τη περίπτωση, ένας δυσανάλογα μεγαλύτερος αριθμός ατόμων με μεγάλο μέγεθος που εισήλθαν σε παρατεταμένη διάπαυση θα καταφέρει να επιβιώσει, να ενηλικιωθεί και να αρχίσει να αναπαράγεται, καθώς τα αντίστοιχα μικρότερα σε μέγεθος άτομα θα πεθάνουν. Χρειάζονται περαιτέρω μελέτες

σχετικά με τους μηχανισμούς που καθορίζουν το μέγεθος σώματος των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς που εξέρχονται από νύμφες με ενός έτους και παρατεταμένη διάπαυση.

Εξελικτικά, οι οργανισμοί φροντίζουν να 'προστατεύουν' περισσότερο εκείνα τα βιολογικά χαρακτηριστικά που συμβάλλουν περισσότερο στην αρμοστικότητα των πληθυσμών στα διαφορετικά ενδιαιτήματα (Ricklefs & Wikelski, 2002). Η μακροβιότητα των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς φαίνεται να είναι ένα τέτοιο χαρακτηριστικό, καθώς τα άτομα που εξήλθαν από νύμφες με παρατεταμένη διάπαυση ζουν όσο και τα ενήλικα που εξέρχονται κατά το πρώτο έτος. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η διάρκεια ζωής των ενηλίκων δεν επηρεάζεται από τον τύπο της διάπαυσης και δεδομένου ότι οι συνθήκες κατά την ενήλικη ζωή παραμένουν ευνοϊκές, το σταθερό προσδόκιμο ζωής καθιστά τα άτομα με παρατεταμένη διάπαυση ικανά να αντεπεξέλθουν στο μειονέκτημα κατά το ξεκίνημα της ενήλικης ζωής τους που διαμορφώνεται εξαιτίας της ενεργειακά απαιτητικής περιόδου της παρατεταμένης διάπαυσης. Επιπρόσθετα, η παρατεταμένη διάπαυση έχει σημαντική επίδραση μόνο στη διάρκεια της περιόδου μετά την ωοτοκία, ενώ η παραλλακτικότητα στη διάρκεια τόσο της περιόδου πριν την ωοτοκία όσο και της περιόδου ωοτοκίας αποδίδεται κυρίως στο μέγεθος σώματος των ενηλίκων. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η περίοδος μετά την ωοτοκία δεν έχει κανένα εμφανές, τουλάχιστον, όφελος στην αρμοστικότητα των ειδών που στερούνται μετα-αναπαραγωγική μητρική φροντίδα (post-reproductive maternal care), θα αναμενόταν τα ενήλικα άτομα της ραγολέτιδας της κερασιάς να έχουν μια σύντομη περίοδο ζωής μετά το τέλος της ωοτοκίας (Reznick, Bryant & Holmes, 2006). Αντίθετα, η παρατεταμένη διάπαυση στο στάδιο της νύμφης βρέθηκε να συνδέεται με μια σημαντική αύξηση της διάρκειας ζωής των θηλυκών ατόμων μετά το τέλος της ωοτοκίας και για τους δύο πληθυσμούς του εντόμου, παρότι η συνολική διάρκεια ζωής των θηλυκών ατόμων δεν αυξάνεται. Υπό τις ευνοϊκές για την επιβίωση και αναπαραγωγή συνθήκες του εργαστηρίου, η επιμήκυνση της περιόδου μετά την ωοτοκία (για τα άτομα με παρατεταμένη διάπαυση) ενδεχομένως να απορρέει από τη μειωμένη σε διάρκεια περίοδο ωοτοκίας λόγω της σημαντικά μειωμένης ωοπαραγωγής.

Η μέση ωοπαραγωγή των θηλυκών που εξήλθαν μετά από παρατεταμένη διάπαυση μειώθηκε σημαντικά ενώ χαρακτηριστική ήταν η παρουσία διαστημάτων χωρίς εναπόθεση αυγών κατά την περίοδο ωοτοκίας. Αν και ανάλογα δεδομένα έχουν αναφερθεί για είδη εντόμων με παρατεταμένη αναπαραγωγική ανωριμότητα (reproductive diapause) (Kroon & Veenendal, 1998), η συγκεκριμένη μελέτη είναι η

πρώτη, με βάση αυτά που γνωρίζουμε, που περιγράφει τα παραπάνω χαρακτηριστικά στην αναπαραγωγική συμπεριφορά ειδών με παρατεταμένη διάπαυση στο στάδιο της νύμφης. Η παραπάνω συμπεριφορά είναι πιθανόν να απορρέει από τις περιοδικές ελλείψεις στα ενεργειακά αποθέματα που προορίζονται για τις ανάγκες της αναπαραγωγής (Novoseltsev, Novoseltseva & Yashin, 2003). Αν και ο μεταβολισμός μειώνεται κατά τη διάρκεια της διάπαυσης (Hahn & Denlinger, 2007; 2011), οι νύμφες της ραγολέτιδας της κερασιάς φαίνεται να έχουν επαρκή ενεργειακά αποθέματα για την ολοκλήρωση της ανάπτυξης, την έξοδο των ενηλίκων και την έναρξη της αναπαραγωγής. Όμως, ελάχιστες είναι οι πληροφορίες σχετικά με τους φυσιολογικούς μηχανισμούς που διέπουν την παρατεταμένη διάπαυση (Tauber *et al.*, 1986; Saulich, 2010). Για παράδειγμα, η κατανάλωση λιπιδίων, η οποία είναι άμεσα συνδεδεμένη με το ρυθμό ωοπαραγωγής, μπορεί είτε να αυξηθεί (Soula & Menu, 2005) είτε να παραμείνει αμετάβλητη (Ushatinskaya, 1984) σε ενήλικα που εξήλθαν μετά από παρατεταμένη εποχική αδράνεια. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι τα ενήλικα της ραγολέτιδας της κερασιάς «εξέρχονται νωρίτερα του αναμενόμενου» (Baker & Miller, 1978) μετά από παρατεταμένη διάπαυση, με κίνδυνο την έλλειψη διαθέσιμων υποστρωμάτων ωοτοκίας (ώριμα φρούτα). Παρότι η αυξημένη ικανότητα διασποράς των ενηλίκων που εξέρχονται μετά από παρατεταμένη διάπαυση δεν είναι σύμφωνη με την ανταγωνιστική σχέση μεταξύ της διασποράς στο χώρο και της διασποράς στο χρόνο, το μεγαλύτερο σχετικά μέγεθος των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς που εξήλθαν μετά από παρατεταμένη διάπαυση μπορεί να συνδέεται με μεγαλύτερη πτητική ικανότητα (Fric, Klimova & Konvicka, 2006; Clobert *et al.*, 2009; Stevens, Turlure & Baguette, 2010), η οποία θα αποτελούσε συγκριτικό πλεονέκτημα για είδη εντόμων που αποτελούνται από πληθυσμούς σε διάσπαρτα ενδιαιτήματα. Κατά συνέπεια, υπάρχει πιθανότητα αρνητική συσχέτιση στη διαθεσιμότητα και στην κατανομή πόρων μεταξύ σωματικών δομών που συνδέονται με την πτήση και την αναπαραγωγή κατά τη διάρκεια της νυμφικής ανάπτυξης της ραγολέτιδας της κερασιάς (Karlsson & Lohansson, 2008; Saastomoinen *et al.*, 2010). Προκειμένου να αξιολογηθεί η ενεργειακή κατάσταση των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς, χρειάζεται να προσδιοριστούν οι αλλαγές στο μεταβολισμό και ο τρόπος ρύθμισης των ενεργειακών αποθεμάτων των νυμφών με παρατεταμένη διάπαυση.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, υπάρχουν σημαντικές αρνητικές επιπτώσεις της παρατεταμένης διάπαυσης των νυμφών της ραγολέτιδας της κερασιάς στα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ενηλίκων, και ειδικότερα στην

ωοπααραγωγή. Σε συνθήκες αγρού, αναμένεται περαιτέρω μείωση του ρυθμού ωοπααραγωγής (Wiesmann, 1933) καθώς και επιπλέον αρνητικές επιπτώσεις στα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ενηλίκων, που αυξάνουν περαιτέρω το κόστος προσαρμογής των ατόμων με παρατεταμένη διάπαυση. Το παραπάνω κόστος προσαρμογής αποτελεί μέρος των 'bet-hedging' στρατηγικών της ραγολέτιδας της κερασιάς (Soula & Menu, 2003), όπου μέσω της παραλλακτικότητας στη διάρκεια του βιολογικού κύκλου των ατόμων διασφαλίζεται η προσαρμογή ενός πληθυσμού στις λιγότερο προβλεπόμενες μεταβολές των περιβαλλοντικών συνθηκών (Gillespie, 1974; Philippi & Seger, 1989; Hopper, 1999). Ειδικότερα, η αναπααραγωγική επιτυχία της ραγολέτιδας της κερασιάς, που είναι ένα μονοκυκλικό, ολιγοφάγο είδος με μειωμένη ικανότητα διασποράς (Daniel & Wyss, 2009), είναι άμεσα συνδεδεμένη με την έγκαιρη παρουσία του εντόμου κατά την περιορισμένη χρονικά περίοδο διαθεσιμότητας των καρπών-ξενιστών σε κάθε περιοχή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η ραγολέτιδα της κερασιάς να καθίσταται επιρρεπής σε φαινολογικές αστοχίες (phenological mismatches), που προκαλούνται από ασταθείς καιρικές συνθήκες ή την κλιματική αλλαγή (Miller- Rushing *et al.*, 2010). Παράλληλα, η πλήρης ικανοποίηση των αναγκών των δένδρων σε ψύχος, η οποία δεν αποτελεί μόνο προϋπόθεση εξόδου από τον χειμερινό λήθαργο αλλά και ομοιόμορφης ανθοφορίας και δεσίματος των καρπών της κερασιάς, εμποδίζεται από την αύξηση της θερμοκρασίας (Hedhly, Hormaza & Herrero, 2007; Oukabli & Mahhou, 2007; Luedeling, Zhang & Girvertz, 2009). Κατά συνέπεια, αναμένονται προβλήματα στο συγχρονισμό της περιόδου ωοτοκίας της ραγολέτιδας της κερασιάς με την περίοδο διαθεσιμότητας των καρπών για ωοτοκία. Επιπλέον, οι φαινολογικές αστοχίες συνδέονται με υψηλό κόστος προσαρμογής των οργανισμών στα περιβάλλοντά τους (Parmesan, 2006; Van Asch *et al.*, 2007). Συνεπώς, η παρατεταμένη διάπαυση της ραγολέτιδας της κερασιάς αποτελεί συγκριτικό πλεονέκτημα για την προσαρμογή των πληθυσμών σε περιοχές όπου η περίοδος διαθεσιμότητας καρπών καθίσταται λιγότερη προβλέψιμη λόγω κλιματικής αλλαγής. Μέχρι σήμερα, οι στρατηγικές 'bet-hedging' αποτελούν τον κύριο παράγοντα έκφρασης της παρατεταμένης διάπαυσης στα είδη *Curculio elephas* (Menu, 1993; Menu & Debouzie, 1993; Menu & Desouhant, 2002; Soula & Menu, 2003; Gourbière & Menu, 2009) και *Perdita portalis* (Danforth, 1999).

Συνοψίζοντας, από τα δεδομένα της παρούσας μελέτης προκύπτει ότι, ανεξαρτήτως πληθυσμού, η παρατεταμένη διάπαυση σχετίζεται με μεγάλο μέγεθος σώματος ενηλίκων και με σημαντικά μειωμένο ρυθμό ωοπααραγωγής για τα θηλυκά, ενώ δεν επηρεάζεται σημαντικά η διάρκεια ζωής των ενηλίκων. Επίσης, τα θηλυκά που

εξέρχονται από νύμφες με παρατεταμένη διάπαυση παρουσιάζουν εκτεταμένη περίοδο μετά την ωοτοκία. Η παρατεταμένη διάπαυση της ραγολέτιδας της κερασιάς εκφράζεται ως μέρος των 'bet-hedging' στρατηγικών του εντόμου, προκειμένου οι διάφοροι πληθυσμοί να ανταποκριθούν στις απρόβλεπτα μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες των ενδιαιτημάτων τους. Για να μπορέσουμε να κατανοήσουμε σε βάθος την εξέλιξη των βιολογικών χαρακτηριστικών της ραγολέτιδας της κερασιάς, είναι απαραίτητο να μελετηθεί το κόστος προσαρμογής περισσότερων πληθυσμών αλλά και οι οικολογικοί και μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν την έκφραση των διαφορετικών τύπων διάπαυσης.

Βιβλιογραφία

- Alonzo TA, Nakas CT, Papadopoulos NT, Papachristos DP. 2009.** A Receiver Operating Characteristic analysis approach for the assessment of the separation of female Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) oviposition distributions. *Journal of Economic Entomology* **102**: 1985-1991.
- Annala E. 1982.** Diapause and population fluctuations in *Megastigmus specularis* Walley and *M. spermotrophus* Wachtl (Hymenoptera: Torymidae). *Annales Entomologici Fennici* **48**: 33-36.
- Augustinos AA, Asimakopoulou AK, Moraiti CA, Mavragani-Tsipidou P, Papadopoulos NT, Bourtzis K. 2013.** Microsatellite and *Wolbachia* analysis in *Rhagoletis cerasi* natural populations: population structuring and multiple infections. *Ecology and Evolution*, in press.
- Baker CRB, Miller GW. 1978.** The effect of temperature on the post-diapause development on four geographical populations of the European cherry fruit fly (*Rhagoletis cerasi*). *Entomologia Experimentalis et Applicata* **23**: 1-13.
- Barnes HF. 1952.** Studies of fluctuations in insect populations. XII. Further evidence of prolonged larval life in the wheat-blossom midges. *Annals of Applied Biology* **39**: 370-373.
- Boller E, Prokopy RJ. 1976.** Bionomics and management of *Rhagoletis*. *Annual Review of Entomology* **21**: 223-246.
- Carey JR. 1993.** *Applied demography for biologists with special emphasis on insects*. New York: Oxford.
- Carey JR, Liedo P, Mueller HG, Wang JL, Vaupel JW. 1998.** A simple graphical technique for displaying individual fertility data and cohort survival: case study of 1000 Mediterranean fruit fly females. *Functional Ecology* **12**: 359–363.
- Chirumamilla A, Yocum GD, Boetel MA, Dregseth RJ. 2008.** Multi-year survival of sugarbeet root maggot (*Tetanops myopaeformis*) larvae in cold storage. *Journal of Insect Physiology* **54**: 691 – 699.
- Clobert J, Le Galliard JF, Cote J, Meylan S, Massot M. 2009.** Informed dispersal, heterogeneity in animal dispersal syndrome and the dynamics of spatially structured populations. *Ecology Letters* **12**: 197-209.

- Daniel C, Wyss E. 2009.** Migration und Ausbreitung der Kirschfruchtfliege innerhalb von Obstanlagen – Möglichkeit der biologischen Bodenbehandlung. *Mitteilungen der deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie* **17**: 247-248.
- Danforth BN. 1999.** Emergence dynamics and bet-hedging in a desert bee, *Perdita portalis*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **266**: 1985-1994.
- Danks HV. 2004.** Seasonal adaptation in Arctic insects. *Integrative and Comparative Biology* **44**: 85-94.
- Danks HV. 1987.** *Insect Dormancy: an Ecological Perspective*. Ottawa: Biological Survey on Canada (Terrestrial Arthropods).
- Fric Z, Klimova M, Konvicka M. 2006.** Mechanical design indicates differences in mobility among butterfly generations. *Evolutionary Ecology Research* **8**: 1511-1522.
- Gillespie JH. 1974.** Natural-selection for within-generation variance in offspring number. *Genetics* **76**: 601–606.
- Gourbière S, Menu F. 2009.** Adaptive dynamics of dormancy duration variability: evolutionary trade-off and priority effect lead to suboptimal adaptation. *Evolution* **63**: 1879-1892.
- Hahn DA, Denlinger DL. 2011.** Energetics of insect diapause. *Annual Review of Entomology* **56**: 103-121.
- Hahn DA, Denlinger DL. 2007.** Meeting the energetic demands of insect diapause: nutrient storage and utilization. *Journal of Insect Physiology* **53**: 760–773.
- Hanski I. 1988.** Four kinds of extra long diapause in insects: A review of theory and observations. *Annales Zoologici Fennici* **25**: 37-53.
- Hedhly A, Hormaza JI, Herrero M. 2007.** Warm temperatures at bloom reduce fruit set in sweet cherry. *Journal of Applied botany and Food Quality* **81**: 158-164.
- Hedlin AF, Miller GE, Ruth DS. 1982.** Induction of prolonged diapause in *Barbara colfaxiana* (Lepidoptera: Olethreutidae): correlations with cone crops and weather. *Canadian Entomologist* **114**: 465-471.
- Higaki M. 2005.** Effect of temperature on the termination of prolonged larval diapause in the chestnut weevil *Curculio sikkimensis* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Insect Physiology* **51**: 1352–1358.
- Higaki M, Ando Y. 1999.** Seasonal and altitudinal adaptations in three katydid species: Ecological significance of initial diapause. *Entomological Science* **2**: 1-11.
- Hopper KR. 1999.** Risk-spreading and bet-hedging in insect population biology. *Annual Review of Entomology* **44**: 535–560.

- Karlsson B, Lohansson A. 2008.** Season polyphenism and developmental trade-offs between flight ability and egg laying in a pierid butterfly. *Proceedings of the Royal Society London B* **275**: 2131-2136.
- Kroon A, Veenendal RL. 1998.** Trade-off between diapause and other life-history traits in the spider mite *Tetranychus urticae*. *Ecological Entomology* **23**: 298-304.
- Levine E, Oloumi-Sadeghi H, Ellis CR. 1992.** Thermal requirements, hatching patterns, and prolonged diapause in Western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) eggs. *Journal of Economic Entomology* **85**: 2425-2432.
- Luedeling E, Zhang M, Girvertz EH. 2009.** Climatic changes lead to declining winter chill for fruit and nut trees in California during 1950-2099. *PLoS ONE* **4**: e6166.
- Lyons LA. 1970.** Some population features of reproductive capacity in *Neodiprion swainei* (Hymenoptera, Diprionidae). *Canadian Entomologist* **102**: 68-84.
- Maeto K, Ozaki K. 2003.** Prolonged diapause of specialist seed-feeders makes predator satiation unstable in masting of *Quercus crispula*. *Oecologia* **137**: 392– 398.
- Matsuo Y. 2006.** Cost of prolonged diapause and its relationship to body size in a seed predator. *Functional Ecology* **20**: 300-306.
- Menu F. 1993.** Strategies of emergence in the chestnut weevil *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae). *Oecologia* **96**: 383-390.
- Menu F, Desouhant E. 2002.** Bet-hedging for variability in life-cycle duration: bigger and later-emerging chestnut weevils have increased probability of a prolonged diapause. *Oecologia* **132**: 167-174.
- Menu F, Debouzie D. 1993.** Coin-flipping plasticity and prolonged diapause in insects: example of the chestnut weevil *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae). *Oecologia* **93**: 367-373.
- Miller-Rushing AJ, Høye TT, Inouye DW, Post E. 2010.** The effects of phenological mismatches on demography. *Philosophical Transactions of the Royal Society* **365**: 3177-3186.
- Nakamura I, Ae SA. 1977.** Prolonged pupal diapause of *Papilio alexanor*. Arid zone adaptation directed by larval host plant. *Annals of the Entomological Society of America* **70**: 481–484.
- Neilson WTA. 1962.** Effects of temperature on development of overwintering pupae of the apple maggot, *Rhagoletis pomonella* (Walsh). *Canadian Entomologist* **94**: 924–928.

- Novoseltsev VN, Novoseltseva JA, Yashin AI. 2003.** What does a fly's individual fecundity pattern look like? The dynamics of resource allocation in reproduction and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development* **124**: 605-617.
- Oukabli A, Mahhou A. 2007.** Dormancy in sweet cherry (*Prunus avium* L.) under Mediterranean climatic conditions. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* **11**: 133-139.
- Parmesan C. 2006.** Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **37**: 637–639.
- Philippi T, Seger J. 1989.** Hedging ones evolutionary bets, revisited. *Trends in Ecology & Evolution* **4**: 41-44.
- Powell JA. 2001.** Longest insect dormancy: Yucca moth larvae (Lepidoptera: Prodoxidae) metamorphose after 20, 25 and 30 years in diapause. *Annals of the Entomological Society of America* **94**: 677-680.
- Powell JA. 1989.** Synchronized, mass-emergences of a yucca moth, *Prodoxus y-inversus* (Lepidoptera: Prodoxidae) after 16 and 17 years in diapause. *Oecologia* **81**: 490– 493.
- Powell JA. 1987.** Records of prolonged diapause in Lepidoptera. *The Journal of Research on the Lepidoptera* **25**: 83-109.
- Prentiss JB. 1976.** Time variations of pupal stage of *Eupackardia calleta* (Saturniidae). *Journal of the Lepidopterists' Society* **30**: 187.
- Reznick D, Bryant M, Holmes D. 2006.** The evolution of senescence and post-reproductive lifespan in guppies (*Poecilia reticulata*). *PLoS Biology* **4**: 136–143.
- Ricklefs RE, Wikelski M, 2002.** The physiology / life history nexus. *Trends in Ecology & Evolution* **17**: 462-468.
- Saastomoinen M, Van der Sterren D, Vastenhout N, Zwaan BJ, Brakefield PM, 2010.** Predictive adaptive responses: condition-dependent impact of adult nutrition and flight in the tropical butterfly *Bicyclus anynana*. *American Naturalist* **176**: 686-698.
- Sahota TS, Ibaraki A. 1991.** 1- and 2-year dormancy of the Douglas-fir cone moth, *Barbara colfaxiana* KFT (Lepidoptera: Olethreutidae): possible relation to individual weights. *Canadian Entomologist* **123**: 1153–1155.
- Saulich AKh. 2010.** Long life cycles in insects. *Entomological Review* **90**: 1127-1152.
- Shapiro AM. 1980.** Egg-load assessment and carryover diapause in *Anthocharis* (Pieridae). *Journal of the Lepidopterists' Society* **34**: 307-315.

- Shapiro AM. 1979.** The phenology of *Pieris napi microstriata* (Lepidoptera: Pieridae) during and after the 1975–77 California drought, and its evolutionary significance. *Psyche* **86**: 1–10.
- Sims SR. 1983.** Prolonged diapause and pupal survival of *Papilio zelicaon* Lucas (Lepidoptera: Papilionidae). *Journal of the Lepidopterists' Society* **37**: 29–31.
- Soula B, Menu F. 2005.** Extended life cycle in the chestnut weevil: prolonged or repeated diapause? *Entomologia Experimentalis et Applicata* **115**: 333–340.
- Soula B, Menu F. 2003.** Diapause duration variability in the chestnut weevil: mixed ESS, genetic polymorphism or bet-hedging? *Oikos* **100**: 574–580.
- Stevens VM, Turlure C, Baguette M. 2010.** A meta-analysis of dispersal in butterflies. *Biological Reviews* **85**: 625–642.
- Sullivan CR, Wallace DR. 1967.** Interaction of temperature and photoperiod in the induction of prolonged diapause in *Neodiprion sertifer*. *Canadian Entomologist* **99**: 834–850.
- Tauber MJ, Tauber CA. 2002.** Prolonged dormancy in *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae): a ten-year field study with implications for crop rotation. *Environmental Entomology* **31**: 499–504.
- Tauber MJ, Tauber CA, Masaki S. 1986.** *Seasonal adaptations of insects*. Oxford: University Press.
- Tzanakanis ME, Karakassis EJ, Tsaklidis G, Karabina EC, Argalavini IC, Arabatzis G. 1991.** Diapause termination in the almond seed wasp, *Eurytoma amygdali* Enderlein (Hym., Eurytomidae), in northern Greece and under certain photoperiods and temperatures. *Journal of Applied Entomology* **111**: 86–98.
- Ushatinskaya RS. 1984.** A critical review of the superdiapause in insects. *The Annals of Zoology* **21**: 3–30.
- Vallo V, Remund U, Boller EF. 1976.** Storage conditions of stockpiled diapausing pupae of *Rhagoletis cerasi* for obtaining high emergence rates. *Entomophaga* **21**: 251–256.
- Van Asch M, Van Tienderen PH, Holleman LJM, Visser ME. 2007.** Predicting adaptation of phenology in response to climate change, an insect herbivore example. *Global Change Biology* **13**: 1596–1604.
- Wang XP, Xue FS, Hua A, Ge F. 2006.** Effects of diapause duration on future reproduction in the cabbage beetle, *Colaphellus bowringi*: positive or negative? *Physiological Entomology* **31**: 190–196.

Wei X-T, Zhou Y-C, Xiao H-J, Wang X-P, Bao Z-M, Xue F-S. 2010. Relationship between the natural duration of diapause and post-diapause reproduction in the cabbage beetle, *Colaphellus bowringi* (Coleoptera: Chrysomelidae). *European Journal of Entomology* **107**: 337-340.

Wiesmann R. 1933. Untersuchungen über die Lebensgeschichte und Bekämpfung der Kirschenfliege *Rhagoletis cerasi* Linné I. Mitteilung. *Landwirtschaftliches Jahrbuch der Schweiz* **47**: 711-760.

8. ΠΡΟΣΥΖΕΥΚΤΙΚΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΑ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΗΣ ΡΑΓΟΛΕΤΙΔΑΣ ΤΗΣ ΚΕΡΑΣΙΑΣ

Περίληψη

Η αναπαραγωγική ασυμβατότητα που βασίζεται στην επιλογή σύζευξης διαφορετικών πληθυσμών αποτελεί σημαντικό μηχανισμό προσυζευκτικής απομόνωσης που μπορεί τελικά να οδηγήσει σε φαινόμενα ειδογένεσης. Στο παρόν Κεφάλαιο μελετήθηκε ο ρόλος της γενετικής απόστασης και της αποκλίνουσας επιλογής στην ανάπτυξη μηχανισμών προσυζευκτικής απομόνωσης μεταξύ των πληθυσμών της ραγολετίδας της κερασιάς. Αρχικά μελετήθηκε η γεωγραφική παραλλακτικότητα στον ημερήσιο ρυθμό σύζευξης. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πειράματα πολλαπλής επιλογής σύζευξης μεταξύ πληθυσμών με διαφορετικά επίπεδα γονιδιακής ροής και οικολογικά χαρακτηριστικά ενδιαιτημάτων (φαινολογία ενηλίκων στον αγρό) προκειμένου να εξεταστεί η παρουσία φυλετικής απομόνωσης. Επίσης, εξετάστηκε το διάστημα έως τη (πρώτη) σύζευξη και η διάρκεια της πρώτης και του συνόλου των συζεύξεων για κάθε τύπο σύζευξης σε πέντε συνδυασμούς πληθυσμών. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν: α) απουσία γεωγραφικής παραλλακτικότητας στον ημερήσιο ρυθμό σύζευξης και β) απουσία φυλετικής απομόνωσης μεταξύ των πληθυσμών, ανεξάρτητα από τη γενετική απόσταση και τα οικολογικά χαρακτηριστικά των πληθυσμών. Ωστόσο, τα ποσοστά σύζευξης ορισμένων ομοτυπικών και ετεροτυπικών συζεύξεων επηρεάστηκαν από την παρουσία της φυλετικής επιλογής, δείχνοντας πρόδρομα στοιχεία προσυζευκτικής απομόνωσης σε δύο συνδυασμούς πληθυσμών. Το διάστημα έως την πρώτη σύζευξη και η διάρκειά της δε διέφεραν μεταξύ των τεσσάρων τύπων σύζευξης σε όλους τους συνδυασμούς πληθυσμών που εξετάστηκαν. Ωστόσο, καταγράφηκε παραλλακτικότητα στη διάρκεια σύζευξης για το σύνολο των συζεύξεων (πρώτη σύζευξη και επανασυζεύξεις) σε ορισμένους συνδυασμούς πληθυσμών. Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι δεν υπάρχει φυλετική απομόνωση μεταξύ των πληθυσμών της ραγολετίδας της κερασιάς αλλά η επίδραση της φυλετικής επιλογής στα άτομα του ίδιου φύλου διαφορετικών πληθυσμών ευνοεί τις μη τυχαίες ομοτυπικές ή ετεροτυπικές συζεύξεις σε ορισμένους συνδυασμούς πληθυσμών.

8.1. Εισαγωγή

Η αναπαραγωγική απομόνωση, που ορίζεται ως αδυναμία παραγωγής βιώσιμων απογόνων μέσω προσυζευκτικών ή/και μετασυζευκτικών μηχανισμών, αποτελεί βασικό στοιχείο της ειδογένεσης των εντόμων (Schluter, 2001; Barton & de Cara 2009; Maan & Seehauser, 2011). Η σύζευξη ομοίων (assortative mating), δηλ. οι μη τυχαία συζεύξεις μεταξύ ατόμων με ίδιο γενότυπο ή φαινότυπο, αποτελεί σημαντικό μηχανισμό προσυζευκτικής απομόνωσης τόσο μεταξύ γενετικά απομονωμένων πληθυσμών όσο και μεταξύ πληθυσμών με γονιδιακή ροή που βρίσκονται στα αρχικά στάδια της ειδογένεσης (Funk, 1998; Matsubayashi, Ohshima & Nosil, 2010). Η αποκλίνουσα επιλογή που εκφράζεται λόγω παραλλακτικότητας των περιβαλλοντικών συνθηκών στα διάφορα ενδιαιτήματα μπορεί να επηρεάσει την επιλογή σύζευξης και την έκφραση φυλετικής απομόνωσης επιδρώντας στο σύστημα σύζευξης ή επικοινωνίας των εντόμων (mating or communication systems), με αποτέλεσμα να αναμένονται περισσότερες συζεύξεις μεταξύ πληθυσμών/γενότυπων που προέρχονται από οικολογικά όμοια ενδιαιτήματα σε σχέση με αυτές μεταξύ των πληθυσμών/γενότυπων που έχουν προσαρμοστεί σε διαφορετικά περιβάλλοντα (Schwartz & Hendry, 2006). Από την άλλη πλευρά, η φυλετική επιλογή (sexual selection), δρώντας απευθείας στα χαρακτηριστικά των δύο φύλων που σχετίζονται με την επίτευξη συζεύξεων, επηρεάζει τη συμπεριφορά σύζευξης των ατόμων του ίδιου φύλου που προέρχονται από διαφορετικούς πληθυσμούς ή των αρσενικών και θηλυκών του ίδιου πληθυσμού και μπορεί να δράσει σε συνεργασία ή και ανταγωνιστικά με την αποκλίνουσα επιλογή κατά την αναπαραγωγική απομόνωση (Panhuis *et al.*, 2001; Andersson & Simmons, 2006; Svensson, Eroukhmanoff & Friberg, 2006; Ritchie, 2007; Nosil, Harmon & Seehausen, 2009; Hoskin & Higgie, 2010; Hine, McGuigan & Blows, 2011). Επίσης, η ατομική δράση της φυλετικής επιλογής είναι ικανή να προκαλέσει ειδογένεση μεταξύ γενετικά απομονωμένων πληθυσμών. Όμως, σε πληθυσμούς με γονιδιακή ροή η αναπαραγωγική απομόνωση επιταχύνεται μόνο όταν η αποκλίνουσα επιλογή έχει ήδη προκαλέσει την έναρξη των σχετικών διαδικασιών ή συνδέεται με τη δημιουργία μη βιώσιμων υβριδίων (Servedio & Noor, 2003; Thibert - Plante & Hendry, 2009; van Doorn, Edelaar & Weissing, 2009; Weissing, Edelaar & van Doorn, 2011; Servedio & Kopp, 2012). Επιπλέον, η αύξηση της γενετικής απόστασης των πληθυσμών ευνοεί την αναπαραγωγική απομόνωση (Benvenuto *et al.*, 2012; Maan & Seehausen, 2011). Ωστόσο, στις περιπτώσεις όπου εμπλέκονται κι άλλες δυνάμεις επιλογής (π.χ.

αποκλίνουσα επιλογή ή φυλετική επιλογή), η γενετική απομόνωση δεν θεωρείται αξιόπιστος δείκτης αναπαραγωγικής απομόνωσης (Shug *et al.*, 2008; Thibert - Plante & Hendry, 2009). Ωστόσο, όταν η δράση της αποκλίνουσας επιλογής είναι πολλαπλή, δηλ. δρα σε περισσότερες από μια βιολογικές παραμέτρους, η αναπαραγωγική απομόνωση είναι πιθανότερο να εκδηλωθεί μεταξύ πληθυσμών με σχετικά χαμηλά επίπεδα γονιδιακής ροής σε σχέση με τους πληθυσμούς με υψηλή γονιδιακή ροή (Nosil *et al.*, 2009). Συνεπώς, η αλληλεπίδραση των δυνάμεων φυσικής επιλογής, κυρίως της αποκλίνουσας και της φυλετικής επιλογής, καθώς και η παρουσία γονιδιακής ροής επηρεάζουν την ανάπτυξη μηχανισμών αναπαραγωγικής απομόνωσης στα έντομα (Coyne & Orr, 2004).

Η ραγολέτιδα της κερασιάς, *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae), επιτρέπει την αξιολόγηση της δράσης της γενετικής απόστασης και της αποκλίνουσας επιλογής στην ανάπτυξη των αρχικών μηχανισμών αναπαραγωγικής απομόνωσης. Ειδικότερα, η μελέτη της γενετικής δομής των ευρωπαϊκών πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς με τη χρήση ουδέτερων μοριακών δεικτών αποκάλυψε ότι οι πληθυσμοί συνδέονται με ποικίλα επίπεδα γονιδιακής ροής που καθορίζονται, κυρίως, από τη μεταξύ τους γεωγραφική απόσταση (Augustinos *et al.*, 2011; 2013). Γνωρίζοντας τη γενετική δομή των πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς, καθίσταται εφικτή η μελέτη της επίδρασης της γενετικής απόστασης στην εξέλιξη των μηχανισμών αναπαραγωγικής απομόνωσης. Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα των Κεφαλαίων 4 & 6 υπάρχει γεωγραφική παραλλακτικότητα στην ένταση της διάπαυσης λόγω προσαρμογής των πληθυσμών της ραγολέτιδας στη φαινολογία των τοπικών φυτών-ξενιστών. Επίσης, καταγράφονται διαφορές στα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ενηλίκων (επιβίωση και αναπαραγωγή) μεταξύ των πληθυσμών που απαντώνται σε οικολογικά διαφορετικά ενδιαιτήματα, ακόμα κι όταν οι πληθυσμοί συνδέονται με γονιδιακή ροή. Είδη με πληθυσμούς που βρίσκονται στα αρχικά στάδια αναπαραγωγικής απομόνωσης λόγω παραλλακτικότητας των οικολογικών χαρακτηριστικών των ενδιαιτημάτων τους (οικολογική απομόνωση), όπως η ραγολέτιδα της κερασιάς, θεωρούνται κατάλληλα για τη μελέτη των εξελικτικών διαδικασιών της ειδογένεσης (Schwarz & McPherson, 2007).

Παρότι υπάρχουν αρκετές μελέτες σχετικά με τη συμπεριφορά σύζευξης των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς (Katsoyannos, 1975; 1976; 1982; Jaastad, 1998a), η παρουσία μηχανισμών προσυζευκτικής απομόνωσης δεν έχει μελετηθεί. Προκειμένου να μελετήσουμε την επίδραση της γενετικής απόστασης και των δυνάμεων επιλογής στην ανάπτυξη προσυζευκτικών μηχανισμών αναπαραγωγικής απομόνωσης, διερευνήθηκε η

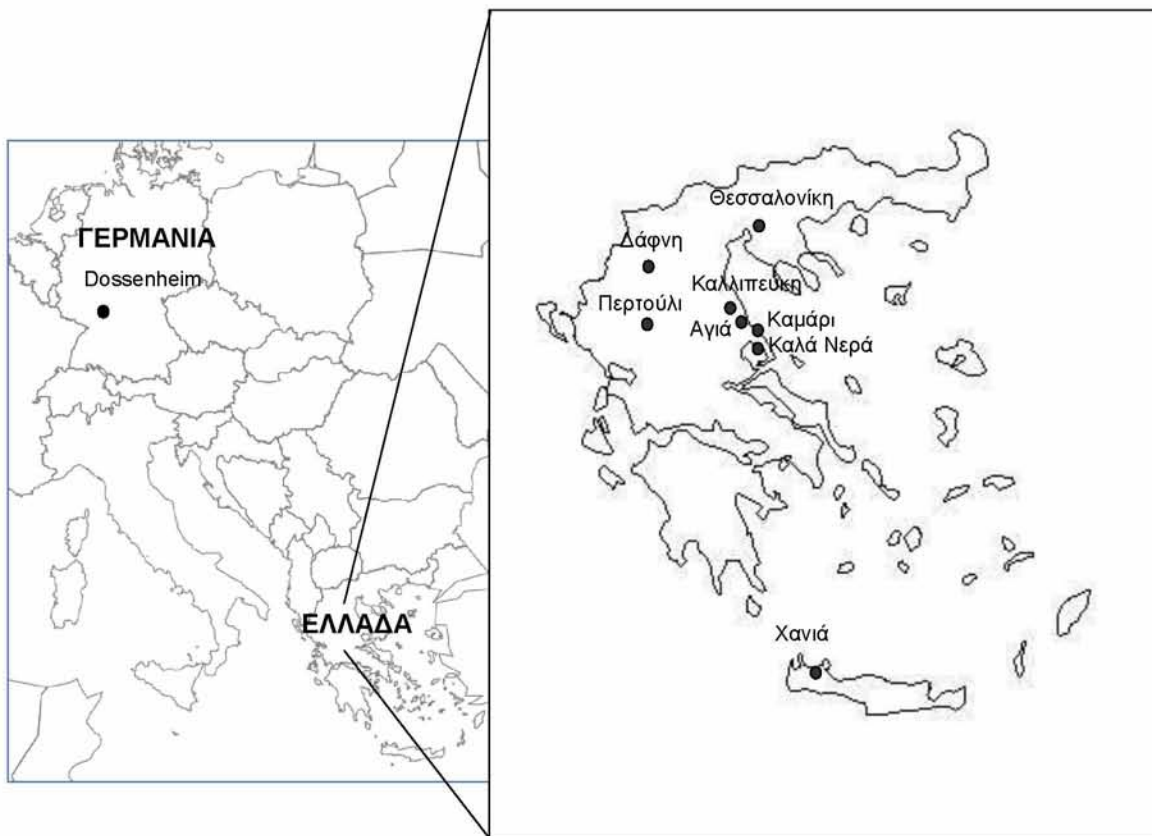
δυνατότητα σύζευξης ομοίων μεταξύ γεωγραφικά απομονωμένων πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς που διαφοροποιούνται ως προς τα γενετικά ή οικολογικά τους χαρακτηριστικά. Υποθέσαμε ότι: α) η προσυζευκτική απομόνωση, που εκφράζεται μέσω των υψηλών ποσοστών σύζευξης ομοίων, είναι πιθανότερη με την αύξηση της γενετικής απόστασης των πληθυσμών και β) υπάρχει φυλετική απομόνωση μεταξύ γεωγραφικά απομονωμένων πληθυσμών με διαφορετική φαινολογία ενηλίκων (δηλ. που είναι χωρικά και χρονικά απομονωμένοι). Γι' αυτό το σκοπό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα πολλαπλής επιλογής σύζευξης (multiple choice experiments) χρησιμοποιώντας πέντε συνδυασμούς έξι γεωγραφικά απομονωμένων πληθυσμών (πέντε από την Ελλάδα και έναν από τη Γερμανία) που έχουν ίδια ή διαφορετική φαινολογία ενηλίκων και χαρακτηρίζονται από ποικίλα επίπεδα γονιδιακής ροής. Σημειώνεται ότι για κάθε εξεταζόμενο συνδυασμό πληθυσμών τεκμηριώθηκε η απουσία γεωγραφικής παραλλακτικότητας στον ημερήσιο ρυθμό σύζευξης προκειμένου να αποφευχθούν προβλήματα στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων (βλέπε 'Αποτελέσματα' παρακάτω). Επιπρόσθετα, υπολογίστηκε το διάστημα έως την πρώτη σύζευξη (latency time), καθώς και η διάρκεια σύζευξης των ετεροτυπικών και ομοτυπικών συζεύξεων για κάθε εξεταζόμενο συνδυασμό πληθυσμών.

8.2. Υλικά και Μέθοδοι

8.2.1. Πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς

Χρησιμοποιήθηκαν οκτώ ελληνικοί και ένας γερμανικός πληθυσμός της ραγολέτιδας της κερασιάς που προέρχονταν από: α) τη Μακεδονία (Θεσσαλονίκη, Δάφνη Κοζάνης), β) τη Θεσσαλία (Καλά Νερά Μαγνησίας, Καμάρι Μαγνησίας, Καλλιπεύκη Λάρισας, Αγιά Λάρισας, Περούλι Τρικάλων), γ) την Κρήτη (Χανιά) και γ) την επαρχία Baden – Württemberg (Dossenheim, Karlsruhe) (Εικόνα 17, Πίνακας 19). Νύμφες των παραπάνω πληθυσμών συλλέχτηκαν από προσβεβλημένα κεράσια (Κεφάλαιο 2) και εκτέθηκαν στους $5 \pm 1^\circ\text{C}$ για διάστημα 6-8 μηνών προκειμένου να περατώσουν τη διάπαυσή τους. Κατά την ενηλικίωσή τους, τα άτομα της ραγολέτιδας της κερασιάς διαχωρίστηκαν σε αρσενικά και θηλυκά και τοποθετήθηκαν χωριστά (ανά φύλο) σε κλουβάκια που ήταν κατασκευασμένα από ένα διαφανές πλαστικό ποτήρι χωρητικότητας 400 ml (6.5 x 9 x 12 εκ.), όπου η μία πλευρά ήταν καλυμμένη με οργαντίνα (παράθυρο αερισμού) ενώ στο κάτω μέρος υπήρχε πλαστικό τρυβλίο Petri διαμέτρου 9 εκ. Τα ενήλικα είχαν *ad libitum*

πρόσβαση σε τροφή ενηλίκων (μείγμα υδρολυμένης μαγιάς, ζάχαρης και νερού σε αναλογία κατά βάρος 1:4:5, αντίστοιχα) και νερό. Ο μέγιστος αριθμός ατόμων του ίδιου φύλου ανά κλουβάκι ήταν 10. Τα κλουβάκια παρέμειναν στις συνθήκες του Εργαστηρίου μέχρι τα ενήλικα να ωριμάσουν αναπαραγωγικά (περίπου σε ηλικία 7-10 ημερών).



Εικόνα 17. Χάρτης των περιοχών από όπου προήλθαν οι πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν Κεφάλαιο.

Πίνακας 19. Γεωγραφικά και οικολογικά χαρακτηριστικά (φαινολογία καρπών-ξενιστών) των περιοχών από όπου προέρχονται οι πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν Κεφάλαιο.

Πληθυσμός	Γεωγραφικό μήκος	Γεωγραφικό πλάτος	Υψόμετρο (μ/)	Φαινολογία καρπών-ξενιστών
Dossenheim	N 49°27' 0''	E 8°40'0''	153	όψιμοι
Θεσσαλονίκη	N 40°28' 02"	E 22°58' 60"	132	πρώιμοι
Δάφνη	N 40°17' 06"	E 21°08' 55"	1.040	όψιμοι
Καλλιπεύκη	N 39°58' 0"	E 22°27' 37"	1.054	όψιμοι
Περτούλι	N 39°32' 19"	E 21°27' 58"	1.121	όψιμοι
Καμάρι	N 39°34' 47"	E 22°55' 40"	100	πρώιμοι
Αγιά	N 39°43' 04"	E 22°45' 49"	152	πρώιμοι
Καλά Νερά	N 39°18' 24"	E 23°07' 10"	64	πρώιμοι
Χανιά	N 35°51' 0"	E 24°01' 0"	450	πρώιμοι

8.2.2. Ημερήσιος ρυθμός σύζευξης

Παραλλακτικότητα στον ημερήσιο ρυθμό σύζευξης επιφέρει προ-συζευκτική απομόνωση μεταξύ ορισμένων ειδών της οικογένειας Tephritidae, όπως π.χ. του γένους *Anastrepha* spp. (Vera *et al.*, 2006). Στην περίπτωση της ραγολέτιδας της κερασιάς, το μέγιστο του ημερήσιου ρυθμού σύζευξης των ενηλίκων του εντόμου τοποθετείται 7-9 ώρες μετά την αυγή (Katsoyannos, 1982) αλλά δεν υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με την παρουσία γεωγραφικής παραλλακτικότητας στον ημερήσιο ρυθμό σύζευξης. Προκειμένου να αποκλειστεί κάθε πιθανή επίδραση του ημερήσιου ρυθμού σύζευξης στα αποτελέσματα των πειραμάτων επιλογής σύζευξης, προσδιορίστηκε ο ημερήσιος ρυθμός σύζευξης έξι ελληνικών πληθυσμών (Δάφνη Κοζάνης, Θεσσαλονίκη, Καλά Νερά Μαγνησίας, Καμάρι Μαγνησίας, Καλλιπεύκη Λάρισας και Χανιά Κρήτης) και ενός γερμανικού (Dossenheim, Karlsruhe). Πέντε αναπαραγωγικά ώριμα αρσενικά και θηλυκά άτομα του ίδιου πληθυσμού τοποθετήθηκαν σε κλουβί πειραμάτων προσυζευκτικής απομόνωσης (Κεφάλαιο 2) (στο εξής 'κλουβί') στις σταθερές συνθήκες του Εργαστηρίου. Κάθε κλουβί με τα 5 ζευγάρια ενηλίκων αποτελούσε μία επανάληψη. Κατά το χρονικό διάστημα από

τις 08:00 π.μ. έως τις 20:00 μ.μ., καταγράφονταν σε ωριαία βάση ο αριθμός των συζεύξεων σε κάθε κλουβί. Σημειώνεται ότι η είσοδος των αρσενικών ατόμων στο κλουβί προηγήθηκε αυτής των θηλυκών κατά μία ώρα (δηλ. πραγματοποιήθηκε στις 07:00 π.μ.) προκειμένου να υπάρχει αρκετός χρόνος για την προσαρμογή των αρσενικών στο χώρο. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 10 επαναλήψεις για κάθε πληθυσμό.

8.2.3. Πειράματα πολλαπλής επιλογής σύζευξης

Κατά τη μελέτη της αναπαραγωγικής ασυμβατότητας των πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς, εξετάστηκαν πέντε συνδυασμοί πληθυσμών (διασταυρώσεις) που προέρχονταν από πέντε περιοχές της Ελλάδας (Θεσσαλονίκη, Δάφνη Κοζάνης, Καλά Νερά Μαγνησίας, Αγιά Λάρισας και Περούλι Τρικάλων) και μία περιοχή της Γερμανίας (Dossenheim, Karlsruhe). Τα επίπεδα της γονιδιακής ροής και η φαινολογία των ενηλίκων των διασταυρώσεων δίνονται στον Πίνακα 20. Προκειμένου να εξετάσουμε την πρώτη υπόθεση υπολογίσαμε τα ποσοστά σύζευξης ομοίων μεταξύ ατόμων που προέρχονται από: α) πληθυσμούς με χαμηλή γονιδιακή ροή ('Dossenheim - Δάφνη', 'Dossenheim - Καλά Νερά') και β) πληθυσμούς με μέτρια ή υψηλή γονιδιακή ροή ('Δάφνη - Καλά Νερά', 'Θεσσαλονίκη - Αγιά', 'Δάφνη - Περούλι'), ανεξαρτήτως από τη φαινολογία των ενηλίκων στον αγρό. Για να εξετάσουμε τη δεύτερη υπόθεση, υπολογίσαμε τα ποσοστά σύζευξης ομοίων μεταξύ των ατόμων που προέρχονται: α) από πληθυσμούς με ίδια φαινολογία ενηλίκων ('Dossenheim - Δάφνη', 'Θεσσαλονίκη - Αγιά') και β) πληθυσμούς με διαφορετική φαινολογία ενηλίκων ('Dossenheim - Καλά Νερά', 'Δάφνη - Καλά Νερά', 'Δάφνη - Περούλι'), ανεξάρτητα από την παρουσία χαμηλής ή υψηλής γονιδιακής ροής μεταξύ των πληθυσμών των εξεταζόμενων διασταυρώσεων.

Πίνακας 20. Οι πέντε συνδυασμοί πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς που εξετάστηκαν στο παρόν Κεφάλαιο. Για κάθε συνδυασμό πληθυσμών δίνονται τα μεταξύ τους επίπεδα γονιδιακής ροής (χαμηλό, μεσαίο, υψηλό) και η φαινολογία των ενηλίκων στον αγρό (ίδια ή διαφορετική).

Συνδυασμός πληθυσμών	Επίπεδο γονιδιακής ροής	Φαινολογία ενηλίκων
Dossenheim - Δάφνη	χαμηλό	ίδια
Dossenheim - Καλά Νερά	χαμηλό	διαφορετική
Δάφνη - Καλά Νερά	μεσαίο	διαφορετική
Δάφνη - Περτούλι	υψηλό	διαφορετική
Θεσσαλονίκη - Αγιά	μεσαίο	ίδια

Προκειμένου να προσδιοριστεί η παρουσία αναπαραγωγικής ασυμβατότητας μεταξύ των εξεταζόμενων διασταυρώσεων, πραγματοποιήθηκαν πειράματα πολλαπλής επιλογής σύζευξης (multiple mate choice). Για να είναι εφικτή η αναγνώριση της προέλευσης του πληθυσμού των ατόμων κατά τη σύζευξη, μία - δύο μέρες πριν την εκτέλεση των πειραμάτων σύζευξης, τα αρσενικά και θηλυκά από κάθε πληθυσμό σημάνθηκαν στο θώρακα με μία κουκίδα μη-τοξικής χρωστικής (νερομπογιά) χρησιμοποιώντας πινέλο ζωγραφικής και ακινητοποιώντας ελαφρά τα ενήλικα κάτω από μουσελίνα. Τα αρσενικά και τα θηλυκά που προέρχονταν από τον ίδιο πληθυσμό σημάνθηκαν με το ίδιο χρώμα ενώ διαφορετικά χρώματα χρησιμοποιήθηκαν για τους διαφορετικούς πληθυσμούς της κάθε διασταύρωσης. Τα χρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κόκκινο, πράσινο και άσπρο.

Δύο ζευγάρια (ένα αρσενικό και ένα θηλυκό) αναπαραγωγικά ώριμων ενηλίκων, ένα για κάθε πληθυσμό της εξεταζόμενης διασταύρωσης, τοποθετήθηκαν σε κλουβί στο Εργαστήριο. Κατά το διάστημα από τις 14:00 μ.μ. έως τις 18:00 μ.μ, καταγράφονταν ανά 10 λεπτά ο αριθμός και η ταυτότητα των συζεύξεων σε κάθε κλουβί. Σημειώνεται ότι τα αρσενικά τοποθετήθηκαν στο κλουβί μία ώρα νωρίτερα από τα θηλυκά (δηλ. στις 13:00 μ.μ.) προκειμένου να προσαρμοστούν καλύτερα στο χώρο. Συνολικά

πραγματοποιήθηκαν 64-103 επαναλήψεις για κάθε διασταύρωση (ως επανάληψη ορίζεται το κάθε κλουβί με τα 2 ζευγάρια ενηλίκων, ένα για κάθε πληθυσμό).

Καταγράφηκε η ταυτότητα της πρώτης σύζευξης και όλων των συζεύξεων (πρώτη σύζευξη και επανασυζεύξεις) και υπολογίστηκε: α) το διάστημα ως την πρώτη σύζευξη (latency time) και β) η διάρκεια σύζευξης (πρώτη σύζευξη και επανασυζεύξεις) για κάθε εξεταζόμενο συνδυασμό πληθυσμών και για το σύνολο των εξεταζόμενων διασταυρώσεων. Σημειώνεται ότι εξαιρέθηκαν από περαιτέρω αναλύσεις όλες οι συζεύξεις διάρκειας μικρότερης των 10 λεπτών, καθώς και οι επανασυζεύξεις που πραγματοποιήθηκαν όταν τα 2 από τα 4 άτομα που υπήρχαν σε κάθε κλουβί-επανάληψη ήταν σε σύζευξη.

8.2.4. Στατιστική ανάλυση

Για να εκτιμηθεί η επίδραση του πληθυσμού στον ημερήσιο ρυθμό σύζευξης των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς χρησιμοποιήθηκε η Ανάλυση Παραλλακτικότητας επαναλαμβανόμενων μετρήσεων (Repeated Measures Analysis of Variance) (Sokal & Rohlf, 1995) χρησιμοποιώντας την ώρα (time of the day) ως επαναλαμβανόμενο παράγοντα.

Τα επίπεδα της προσυζευκτικής απομόνωσης καθορίστηκαν βάσει της ταυτότητας της πρώτης σύζευξης και των συνολικών συζεύξεων (πρώτης σύζευξης και επανασυζεύξεις) που καταγράφηκαν κατά το διάστημα από τις 14:00 μ.μ. μέχρι 18:00 μ.μ. Χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης φυλετικής απομόνωσης I_{PSI} για να προσδιοριστεί η σχετική σημασία των ομοτυπικών συζεύξεων (αυτές μεταξύ ατόμων του ίδιου πληθυσμού) έναντι των ετεροτυπικών συζεύξεων (αυτές μεταξύ ατόμων διαφορετικών πληθυσμών).

Ο δείκτης φυλετικής απομόνωσης, I_{PSI} , υπολογίστηκε βάσει του συντελεστή επιλογής σύζευξης για κάθε τύπο σύζευξης (δύο ομοτυπικές και δύο ετεροτυπικές συζεύξεις) ενός συνδυασμού πληθυσμών (φυλετική απομόνωση ανά τύπο σύζευξης, Pair Sexual Isolation, PSI) (Rolán-Alvarez & Caballero, 2000; Pérez-Figueroa, Caballero & Rolán-Alvarez, 2005). Για κάθε τύπο σύζευξης, ο συντελεστής PSI υπολογίστηκε ως εξής:

$$PSI_{\alpha\alpha} = (\alpha\alpha \times y) / (\alpha\alpha + \alpha\beta)(\alpha\alpha + \beta\alpha)$$

$$PSI_{\beta\beta} = (\beta\beta \times y) / (\beta\beta + \beta\alpha)(\beta\beta + \alpha\beta)$$

$$PSI_{\alpha\beta} = (\alpha\beta \times y) / (\alpha\alpha + \alpha\beta)(\beta\beta + \alpha\beta)$$

$$PSI_{\beta\alpha} = (\beta\alpha \times y) / (\beta\beta + \beta\alpha)(\alpha\alpha + \beta\alpha)$$

όπου, $y = \alpha\alpha + \alpha\beta + \beta\alpha + \beta\beta$ ο συνολικός αριθμός συζεύξεων. Οι αριθμοί $\alpha\alpha$, $\beta\beta$, $\alpha\beta$ και $\beta\alpha$ αναφέρονται στον αριθμό συζεύξεων μεταξύ θηλυκών και αρσενικών του πληθυσμού A και του πληθυσμού B.

Ο δείκτης φυλετικής απομόνωσης ενός συνδυασμού πληθυσμών, I_{PSI} , δίνεται από τη σχέση:

$$I_{PSI} = [PSI_{\alpha\alpha} + PSI_{\beta\beta} - PSI_{\alpha\beta} - PSI_{\beta\alpha}] / PSI_{\alpha\alpha} + PSI_{\beta\beta} + PSI_{\alpha\beta} + PSI_{\beta\alpha}$$

Ο δείκτης φυλετικής απομόνωσης, I_{PSI} , υπολογίζει την προσυζευκτική απομόνωση αποκλειστικά βάσει της επιλογής σύζευξης (φυλετική απομόνωση), χωρίς δηλαδή να συνυπολογίζονται οι επιδράσεις της φυλετικής επιλογής στη συμπεριφορά σύζευξης των ατόμων του ίδιου φύλου των δύο εξεταζόμενων πληθυσμών ή των αρσενικών και θηλυκών ατόμων του ίδιου πληθυσμού που ευνοούν τις μη τυχαίες ομοτυπικές και ετεροτυπικές συζεύξεις. Οι τιμές του δείκτη I_{PSI} κυμαίνονται από -1 έως 1, με την τιμή -1 να αναφέρεται σε συζεύξεις ατόμων με διαφορετικό φαινότυπο ή γενότυπο (disassortative mating), το 0 να υποδεικνύει τυχαία σύζευξη και το 1 να υποδεικνύει σύζευξη ομοίων (assortative mating), δηλαδή πλήρη φυλετική απομόνωση. Η παρουσία φυλετικής απομόνωσης μεταξύ των πληθυσμών συνδέεται άμεσα με την ειδογένεση (Carvajal-Rodríguez & Rolán-Alvarez, 2006).

Οι επιδράσεις της φυλετικής επιλογής, οι οποίες προκαλούν αποκλίσεις από τις τυχαίες συζεύξεις μεταξύ των πληθυσμών και δεν σχετίζονται με την επιλογή σύζευξης λόγω φυλετικής απομόνωσης, μπορούν να εκτιμηθούν βάσει του συντελεστή W (mating propensity coefficient, W), ο οποίος υπολογίζει τη σχετική επιδεκτικότητα σύζευξης του θηλυκού (female receptivity) ή ικανότητα σύζευξης του αρσενικού (male vigor) του ενός πληθυσμού σε σχέση με το θηλυκό ή αρσενικό του άλλου πληθυσμού, αντίστοιχα (Rolán-Alvarez & Caballero, 2000; Carvajal-Rodríguez & Rolán-Alvarez, 2006). Για παράδειγμα, θεωρώντας ότι ο συντελεστής W των αρσενικών του πληθυσμού B ισούται με 1 (δηλ. έχει τη μεγαλύτερη τάση για σύζευξη μεταξύ των αρσενικών των δύο

πληθυσμών) ($W_{B\delta} = 1$), ο συντελεστής W των αρσενικών του πληθυσμού A δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$W_{A\delta} = (\alpha\alpha + \beta\alpha)B / A(\alpha\beta + \beta\beta),$$

όπου A και B ο συνολικός αριθμός των αρσενικών του πληθυσμού A και B , αντίστοιχα, και $\alpha\alpha$, $\beta\alpha$, $\alpha\beta$ και $\beta\beta$ ο αριθμός των συζεύξεων μεταξύ των θηλυκών και αρσενικών ατόμων των πληθυσμών A και B .

Σε περίπτωση που η τάση σύζευξης μεταξύ των ατόμων του ίδιου φύλου δεν διαφέρει στατιστικά, η επιλογή σύζευξης των θηλυκών ή αρσενικών θεωρείται τυχαία μεταξύ των δύο εξεταζόμενων πληθυσμών χωρίς να επηρεάζεται από τη φυλετική επιλογή.

Ο δείκτης ασυμμετρίας, I_{PSI} (Index of asymmetry), αναφέρεται στην παραλλακτικότητα των συχνοτήτων σύζευξης μεταξύ των δύο τύπων των ετεροτυπικών συζεύξεων (δB συζευγνύεται με δA / δA συζευγνύεται με δB) και υπολογίζεται βάσει της αναλογίας των συντελεστών φυλετικής απομόνωσης των ετεροτυπικών συζεύξεων δηλαδή $\alpha\beta / \beta\alpha = PSI_{\alpha\beta} / PSI_{\beta\alpha}$ (Carvajal-Rodriguez & Rolán-Alvarez, 2006). Τιμές που διαφοροποιούνται σημαντικά από τη μονάδα (συμμετρία) υποδεικνύουν ασύμμετρες συζεύξεις.

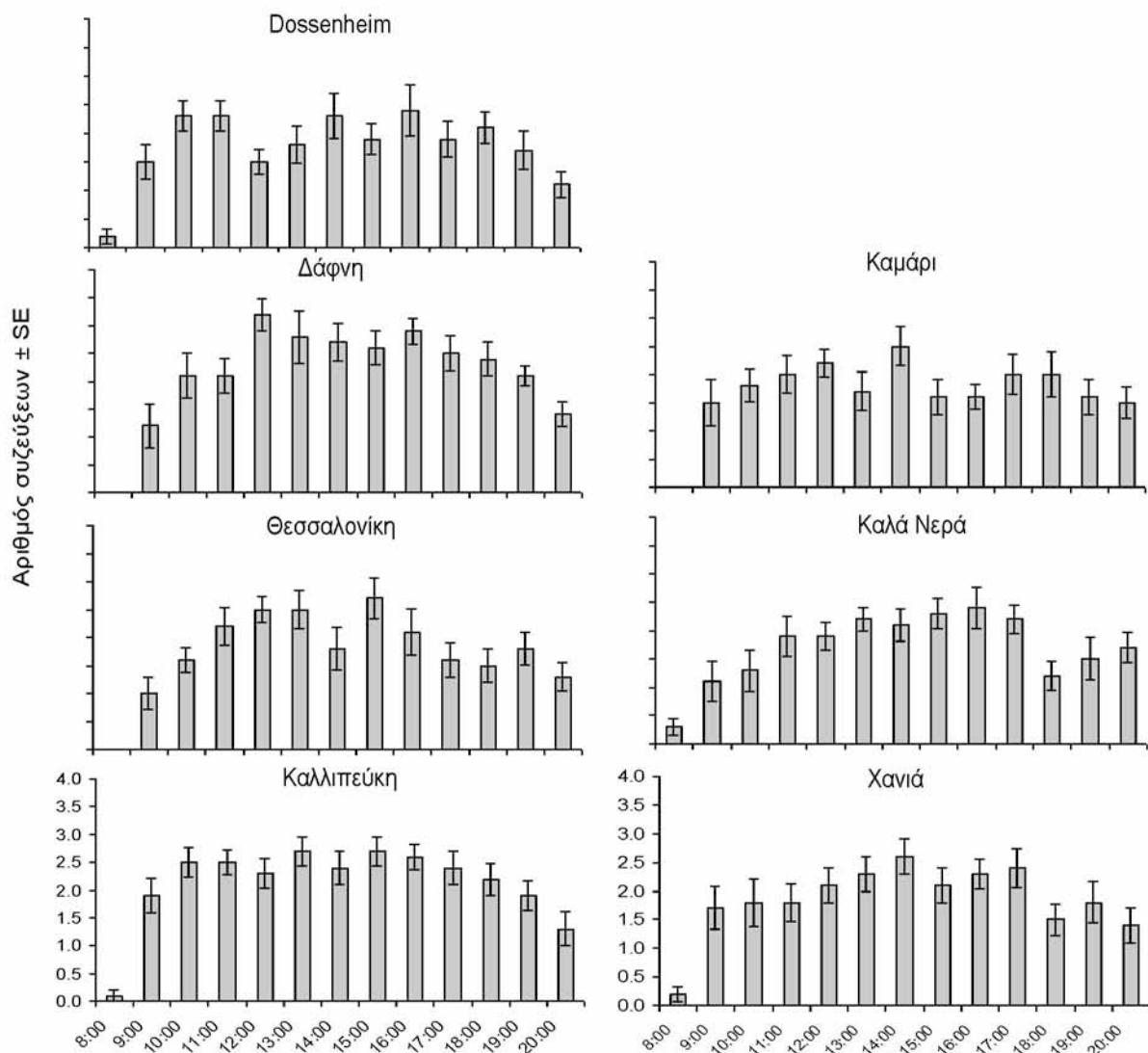
Χρησιμοποιώντας το λογισμικό JMATING ver. 1.0.8 (Carvajal-Rodriguez & Rolán-Alvarez, 2006), ελέγχθηκαν στατιστικά οι υποθέσεις: α) οι τιμές του δείκτη I_{PSI} και του συντελεστή W είναι διαφορετικές της μονάδας και β) οι τιμές του δείκτη I_{PSI} δεν είναι μηδέν.

Χρησιμοποιήθηκε το μη-παραμετρικό κριτήριο Kolmogorov-Smirnov για να εξεταστεί εάν η κατανομή των τιμών του χρόνου έως τη (πρώτη) σύζευξη και της διάρκειας σύζευξης ήταν κανονική. Το κριτήριο Kruskal-Wallis χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθεί η επίδραση του κάθε τύπου σύζευξης (δύο ετεροτυπικοί και δύο ομοτυπικοί τύποι σύζευξης ανά διασταύρωση) στο διάστημα έως τη σύζευξη και στη διάρκεια σύζευξης της πρώτης σύζευξης και αυτή του συνόλου των συζεύξεων για κάθε συνδυασμό πληθυσμών. Το κριτήριο Mann - Whitney χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθεί εάν το διάστημα έως τη σύζευξη και η διάρκεια σύζευξης: α) κατά την πρώτη σύζευξη και β) του συνόλου των συζεύξεων (πρώτη σύζευξη και επανασυζεύξεις) διαφέρει μεταξύ των ετεροτυπικών και ομοτυπικών συζεύξεων όλων των εξεταζόμενων συνδυασμών πληθυσμών. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, US).

8.3. Αποτελέσματα

8.3.1. Ημερήσιος ρυθμός σύζευξης

Η κατανομή των συχνοτήτων σύζευξης των ενηλίκων ανά ώρα για κάθε πληθυσμό της ραγολέτιδας της κερασιάς δίνεται στο Διάγραμμα 15. Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι πρώτες συζεύξεις παρατηρήθηκαν περίπου μία ώρα μετά την είσοδο των θηλυκών και τα υψηλότερα ποσοστά συζεύξεων καταγράφηκαν από τις 11:00 π.μ. έως τις 18:00 μ.μ. Η Ανάλυση Παραλλακτικότητας επαναλαμβανόμενων μετρήσεων έδειξε ότι ο πληθυσμός δεν έχει σημαντική επίδραση ενώ η ώρα της ημέρας ήταν σημαντικός εκτιμητής του αριθμού των συζεύξεων που καταγράφηκαν. Η αλληλεπίδραση μεταξύ του πληθυσμού και της ώρας αποδείχθηκε μη σημαντική, υποδεικνύοντας παραπλήσιο ημερήσιο ρυθμό συζεύξεων μεταξύ των εξεταζόμενων πληθυσμών (Πίνακας 21). Συνεπώς, ο ημερήσιος ρυθμός σύζευξης δε φαίνεται να αποτελεί παράγοντα προσυζευκτικής απομόνωσης μεταξύ των πληθυσμών της ραγολέτιδας.



Διάγραμμα 15. Ημερήσιος ρυθμός σύζευξης των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς που προέρχονται από έξι ελληνικούς πληθυσμούς και έναν πληθυσμό από τη Γερμανία. Οι τιμές του άξονα-γ αναφέρονται στον μέσο αριθμό των συζεύξεων (\pm SE) σε κάθε κλουβί.

Πίνακας 21. Παράμετροι της Ανάλυσης Παραλλακτικότητας επαναλαμβανόμενων μετρήσεων για την επίδραση του πληθυσμού (παράγοντας) και της ώρας κατά τη διάρκεια της ημέρας (επαναλαμβανόμενος παράγοντας) στον ημερήσιο ρυθμό σύζευξης των ενηλίκων έξι ελληνικών και ενός γερμανικού πληθυσμού της ραγολέτιδας της κερασιάς. Η παρατήρηση και καταγραφή των συζεύξεων γίνονταν ανά ώρα κατά το διάστημα από τις 08:00 π.μ έως 20:00 μ.μ.

Πηγή παραλλακτικότητας	df	Μέσα Τετράγωνα	F	P
Πληθυσμός	6	4.951	1.913	0.093
Σφάλμα (μεταξύ των πληθυσμών)	63	2.588		
Ωρα	12	26.697	35.117	<0.001
Ωρα * πληθυσμός	72	0.946	1.245	0.090
Σφάλμα (Ωρα)	756	0.76		

8.3.2. Πειράματα πολλαπλής επιλογής σύζευξης

Πρώτη σύζευξη

Λαμβάνοντας υπόψη μόνο την πρώτη σύζευξη, η απόκλιση των τιμών του δείκτη I_{PSI} από το μηδέν δεν ήταν σημαντική, δηλ. δεν υπάρχει φυλετική απομόνωση μεταξύ των πληθυσμών της κάθε διασταύρωσης, ανεξαρτήτως της γενετικής απόστασης και της φαινολογίας των ενηλίκων στον αγρό (Πίνακας 22). Βάσει των τιμών του συντελεστή W , τα αρσενικά από τα Κ. Νερά ήταν περισσότερο πιθανό να συζευχθούν σε σχέση με τα αρσενικά από το Dossenheim στη διασταύρωση 'Dossenheim - Καλά Νερά', δείχνοντας ότι η δράση της φυλετικής επιλογής προκαλεί αύξηση των συζεύξεων μεταξύ των ενηλίκων από τα Καλά Νερά (Πίνακας 23). Στη διασταύρωση 'Δάφνη - Περτούλι', τα αρσενικά από το Περτούλι και τα θηλυκά από τη Δάφνη χαρακτηρίζονταν από μικρότερη τάση για σύζευξη σε σχέση με τα αρσενικά από τη Δάφνη και τα θηλυκά από το Περτούλι, αντίστοιχα (Πίνακας 23). Αυτό έχει ως αποτελέσματα να πραγματοποιούνται περισσότερες συζεύξεις μεταξύ των αρσενικών από τη Δάφνη και τα θηλυκά από το Περτούλι και λιγότερες συζεύξεις μεταξύ των αρσενικών από το Περτούλι και των θηλυκών από τη Δάφνη σε σχέση με τον αναμενόμενο αριθμό των τυχαίων ετεροτυπικών συζεύξεων. Δεν παρατηρήθηκαν ασυμμετρίες στις ετεροτυπικές συζεύξεις στους πέντε συνδυασμούς πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς (Πίνακας 22).

Πίνακας 22. Δείκτης φυλετικής απομόνωσης (I_{PSI}) και δείκτης ασυμμετρίας ($I_{A_{PSI}}$) (\pm SD) για την πρώτη σύζευξη στους πέντε συνδυασμούς πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς. N, ο αριθμός των συζεύξεων (διάρκειας μεγαλύτερης των 10 λεπτών).

Πληθυσμός A	Πληθυσμός B	Επαναλήψεις	N	Φυλετική απομόνωση		Φυλετική ασυμμετρία	
				I_{PSI}	P	$I_{A_{PSI}}$	P
Dossenheim	Δάφνη	94	71	0.072 ± 0.120	0.554	0.997 ± 0.059	0.874
Dossenheim	Καλά Νερά	70	56	0.182 ± 0.145	0.215	1.093 ± 0.196	0.602
Δάφνη	Καλά Νερά	103	77	-0.163 ± 0.116	0.166	1.066 ± 0.077	0.348
Δάφνη	Περτούλι	103	55	-0.033 ± 0.150	0.815	1.023 ± 0.169	0.841
Θεσσαλονίκη	Αγιά	73	50	0.005 ± 0.146	0.999	1.010 ± 0.089	0.922

Πίνακας 23. Προσδιορισμός της σχετικής τάσης σύζευξης των αρσενικών και θηλυκών ατόμων βάσει του συντελεστή W κατά την πρώτη σύζευξη για τους πέντε συνδυασμούς πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς.

Πληθυσμός A	Πληθυσμός B	Αρσενικά			Θηλυκά		
		Πληθυσμός (W=1)	W	P	Πληθυσμός (W=1)	W	P
Dossenheim	Δάφνη	A	0.893 ± 0.219	0.275	A	0.945 ± 0.232	0.366
Dossenheim	Καλά Νερά	B	0.528 ± 0.153	0.009	B	0.719 ± 0.202	0.115
Δάφνη	Καλά Νερά	A	0.855 ± 0.198	0.206	B	0.767 ± 0.180	0.103
Δάφνη	Περτούλι	A	0.638 ± 0.180	0.038	B	0.588 ± 0.170	0.019
Θεσσαλονίκη	Αγιά	B	0.966 ± 0.285	0.445	A	0.882 ± 0.257	0.327

Σύνολο συζεύξεων (πρώτη σύζευξη και επανασυζεύξεις)

Τα ενήλικα της ραγολέτιδας της κερασιάς συζεύχθηκαν από 1 έως 4 φορές κατά τη διάρκεια της περιόδου παρατήρησης (14:00 μ.μ. – 18:00 μ.μ.) στους εξεταζόμενους συνδυασμούς πληθυσμών. Οι συχνότητες επανασύζευξης (αριθμός ενηλίκων που επανασυζευγνύονται ($n_{\text{σζεύξεων}} \geq 2$) / αριθμός ενηλίκων που συζευγνύονται ($n_{\text{σζεύξεων}} \geq 1$)) για κάθε φύλο και για κάθε συνδυασμό πληθυσμών δίνονται στον Πίνακα 24. Στη διασταύρωση 'Dossenheim - Καλά Νερά', τα ενήλικα από τα Κ. Νερά που επανασυζεύχθηκαν ήταν περισσότερα από τα αντίστοιχα του Dossenheim. Όμως, τόσο τα αρσενικά όσο και τα θηλυκά από το Dossenheim παρουσίασαν υψηλά ποσοστά επανασύζευξης στη διασταύρωση 'Dossenheim - Δάφνη'. Στη διασταύρωση 'Θεσσαλονίκη - Αγιά', ένα ποσοστό 52% των αρσενικών από τη Θεσσαλονίκη επανασυζεύχθηκε ενώ το αντίστοιχο ποσοστό των θηλυκών ήταν μόλις 23%. Φαίνεται ότι η δυνατότητα επανασύζευξης των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς εξαρτάται τόσο από το φύλο όσο και από τον εκάστοτε συνδυασμό πληθυσμών.

Συμπεριλαμβάνοντας στις στατιστικές αναλύσεις όλες τις συζεύξεις (πρώτη σύζευξη και επανασυζεύξεις) που καταγράφηκαν κατά το διάστημα 14:00 μ.μ - 18:00 μ.μ., ο δείκτης I_{PSI} έδειξε ότι δεν υπάρχει φυλετική απομόνωση μεταξύ των πληθυσμών στις πέντε διασταυρώσεις της ραγολέτιδας της κερασιάς (Πίνακας 25). Βάσει των τιμών του συντελεστή W , τα αρσενικά από το Dossenheim και το Περτούλι καθώς και τα θηλυκά από τη Δάφνη είχαν σημαντικά μικρότερη τάση σύζευξης σε σχέση με τους εταίρους τους στις διασταυρώσεις 'Dossenheim - Καλά Νερά' και 'Δάφνη - Περτούλι', υποδεικνύοντας την παρουσία φυλετικής επιλογής (Πίνακας 26). Ωστόσο, δεν καταγράφηκαν ασυμμετρίες στις ετεροτυπικές συζεύξεις σε κανέναν από τους πέντε συνδυασμούς πληθυσμών (Πίνακας 25).

Πίνακας 24. Συχνότητα επανασύζευξης αρσενικών και θηλυκών ατόμων για κάθε πληθυσμό των πέντε εξεταζόμενων συνδυασμών πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς που πραγματοποιήθηκαν από τις 14:00 μ.μ. έως 18:00 μ.μ.

Πληθυσμός A	Πληθυσμός B	Συχνότητα επανασύζευξης (%)			
		Πληθυσμός A		Πληθυσμός B	
		Αρσενικά	Θηλυκά	Αρσενικά	Θηλυκά
Dossenheim	Δάφνη	40.0	38.2	45.0	45.0
Dossenheim	Καλά Νερά	10.5	26.8	46.3	46.2
Δάφνη	Καλά Νερά	25.0	30.0	53.0	38.0
Δάφνη	Περτούλι	35.0	20.0	30.8	29.3
Θεσσαλονίκη	Αγιά	51.6	23.1	46.8	40.5

Πίνακας 25. Δείκτης φυλετικής απομόνωσης (I_{PSI}) και δείκτης ασυμμετρίας ($I_{A_{PSI}}$) (\pm SD) για το σύνολο των συζεύξεων που καταγράφηκαν από τις 14:00 μ.μ. έως 18:00 μ.μ. στους πέντε συνδυασμούς πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς. N, ο αριθμός των συζεύξεων (διάρκειας μεγαλύτερης των 10 λεπτών).

Πληθυσμός A	Πληθυσμός B	Επαναλήψεις	N	Φυλετική απομόνωση		Φυλετική ασυμμετρία	
				I_{PSI}	P	$I_{A_{PSI}}$	P
Dossenheim	Δάφνη	94	126	-0.031 ± 0.089	0.722	0.998 ± 0.025	0.876
Dossenheim	Καλά Νερά	70	100	0.003 ± 0.109	0.982	1.008 ± 0.060	0.995
Δάφνη	Καλά Νερά	103	128	-0.115 ± 0.090	0.195	1.016 ± 0.035	0.688
Δάφνη	Περτούλι	103	90	-0.034 ± 0.119	0.757	1.033 ± 0.144	0.782
Θεσσαλονίκη	Αγία	73	89	0.042 ± 0.108	0.705	1.001 ± 0.033	0.952

Πίνακας 26. Προσδιορισμός της σχετικής τάσης σύζευξης των αρσενικών και θηλυκών ατόμων βάσει του συντελεστή για το σύνολο των συζεύξεων που καταγράφηκαν κατά το διάστημα από τις 14:00 μ.μ. έως 18:00 μ.μ. στους πέντε συνδυασμούς πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς.

Πληθυσμός A	Πληθυσμός B	Αρσενικά			Θηλυκά		
		Πληθυσμός (W=1)	W	P	Πληθυσμός (W=1)	W	P
Dossenheim	Δάφνη	A	0.924 ± 0.168	0.326	A	1.017 ± 0.187	0.533
Dossenheim	Καλά Νερά	B	0.523 ± 0.111	0.001	B	0.801 ± 0.165	0.135
Δάφνη	Καλά Νερά	A	0.957 ± 0.173	0.403	B	0.815 ± 0.145	0.118
Δάφνη	Περτούλι	A	0.588 ± 0.132	0.007	B	0.534 ± 0.122	0.002
Θεσσαλονίκη	Αγιά	B	0.875 ± 0.198	0.233	A	0.870 ± 0.189	0.221

8.3.3. Διάστημα έως τη (πρώτη) σύζευξη και διάρκεια συζεύξεων

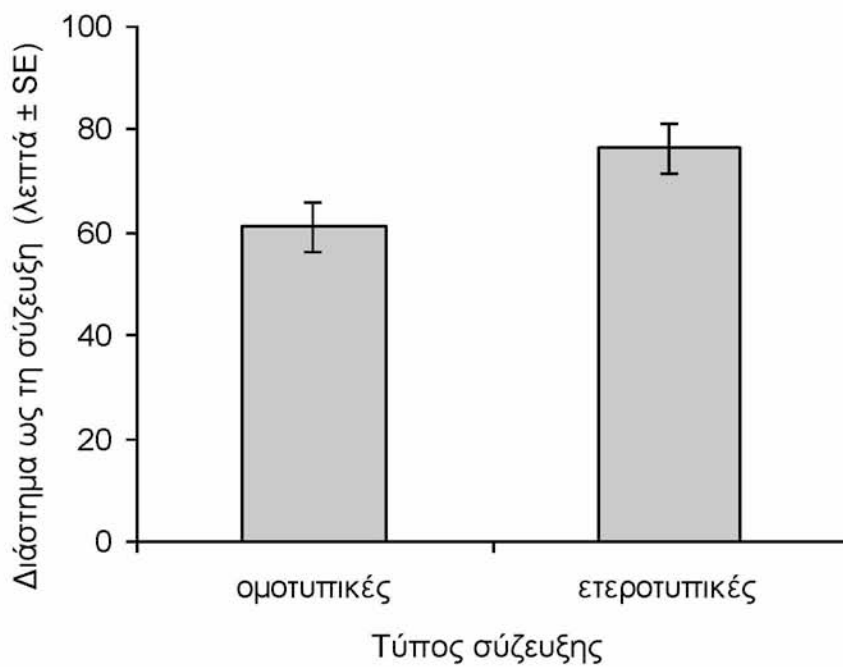
Πρώτη σύζευξη

Το διάστημα που απαιτείται μέχρι τη διενέργεια της πρώτης σύζευξης σε κάθε τύπο σύζευξης των πέντε συνδυασμών πληθυσμών δίνεται στον Πίνακα 27. Το διάστημα έως την πρώτη σύζευξη των ομοτυπικών συζεύξεων για τα ενήλικα από τα Καλά Νερά και το Περτούλι ήταν 43-54 λεπτά ενώ απαιτήθηκε σχεδόν ο διπλάσιος χρόνος για να πραγματοποιηθούν ετεροτυπικές συζεύξεις στις διασταυρώσεις 'Δάφνη – Καλά Νερά' και 'Δάφνη – Περτούλι'. Ο τύπος σύζευξης δεν είχε σημαντική επίδραση στο διάστημα έως τη σύζευξη για τους πέντε συνδυασμούς πληθυσμών (Κριτήριο Kruskal-Wallis: 'Dossenheim - Δάφνη': $\chi^2 = 2.044$, $df = 3$, $P = 0.563$; 'Dossenheim - Καλά Νερά': $\chi^2 = 4.494$, $df = 3$, $P = 0.213$; 'Δάφνη - Καλά Νερά': $\chi^2 = 4.370$, $df = 3$, $P = 0.224$; 'Δάφνη - Περτούλι': $\chi^2 = 6.482$, $df = 3$, $P = 0.090$; 'Θεσσαλονίκη - Αγιά': $\chi^2 = 1.262$, $df = 3$, $P = 0.738$). Ωστόσο, το διάστημα έως την πρώτη ετεροτυπική σύζευξη ήταν μακρύτερο κατά περίπου 15 λεπτά σε σχέση με τις ομοτυπικές συζεύξεις για το σύνολο των εξεταζόμενων πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς (Κριτήριο Mann - Whitney: $U = 10043.5$, $n = 309$, $P = 0.016$) (Διάγραμμα 16).

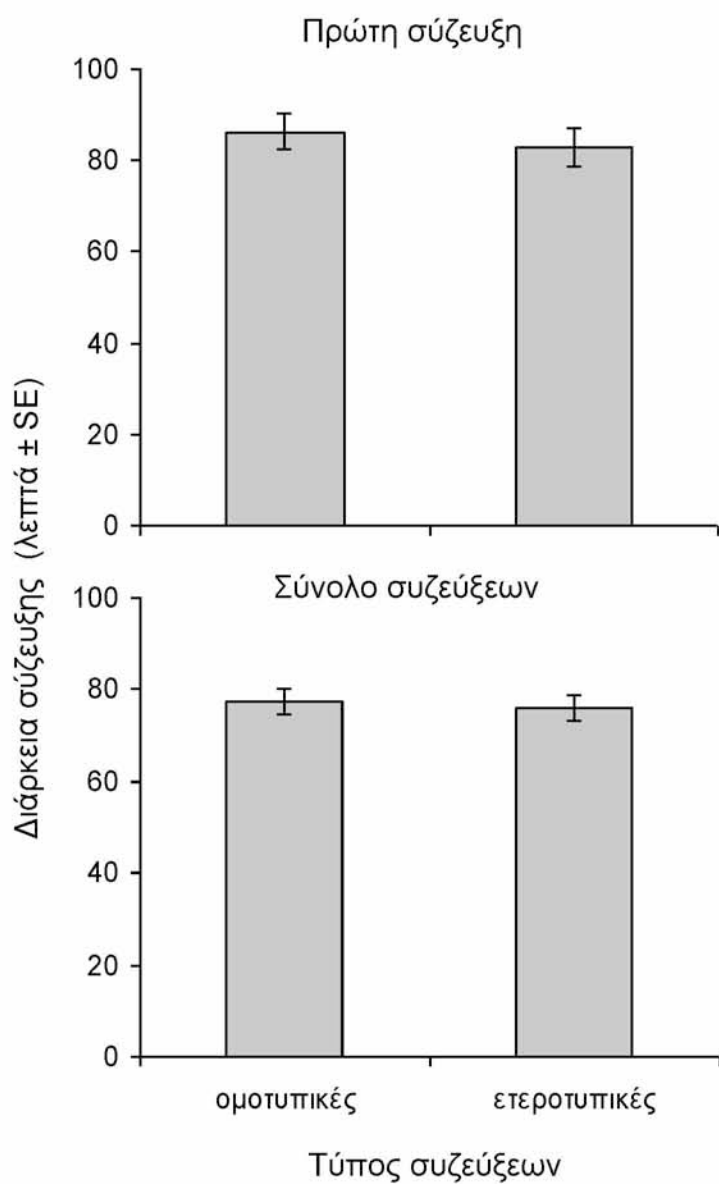
Η μέση διάρκεια σύζευξης κατά την πρώτη σύζευξη κυμάνθηκε από 57 έως 114 λεπτά στους πέντε συνδυασμούς πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς (Πίνακας 27). Το κριτήριο Kruskal-Wallis έδειξε ότι ο τύπος σύζευξης δεν ήταν σημαντικός εκτιμητής της διάρκειας σύζευξης στους πέντε συνδυασμούς πληθυσμών ('Dossenheim - Δάφνη': $\chi^2 = 0.654$, $df = 3$, $P = 0.884$; 'Dossenheim - Καλά Νερά': $\chi^2 = 2.013$, $df = 3$, $P = 0.156$; 'Δάφνη - Καλά Νερά': $\chi^2 = 4.609$, $df = 3$, $P = 0.203$; 'Δάφνη - Περτούλι': $\chi^2 = 1.324$, $df = 3$, $P = 0.719$; 'Θεσσαλονίκη - Αγιά': $\chi^2 = 7.429$, $df = 3$, $P = 0.059$). Επίσης, το κριτήριο Mann - Whitney έδειξε ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη διάρκεια σύζευξης μεταξύ του συνόλου των ομοτυπικών και ετεροτυπικών συζεύξεων ($U = 11465.5$, $n = 309$, $P = 0.550$) (Διάγραμμα 17).

Πίνακας 27. Διάστημα έως τη (πρώτη) σύζευξη (λεπτά \pm SE) και διάρκεια σύζευξης (λεπτά \pm SE) κατά την πρώτη σύζευξη για τους πέντε συνδυασμούς πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς. N, ο αριθμός των συζεύξεων (διάρκειας μεγαλύτερης από 10 λεπτά).

Πληθυσμός A	Πληθυσμός B	Τύπος σύζευξης A-B (♂ x ♀)	N	Διάστημα έως τη σύζευξη (μ.ο. \pm SE) (λεπτά)	Διάρκεια σύζευξης (μ.ο. \pm SE) (λεπτά)
Dossenheim	Δάφνη	AA	17	68.1 \pm 14.5	76.2 \pm 8.1
		BB	21	78.5 \pm 13.8	85.7 \pm 13.3
		AB	16	82.1 \pm 13.5	79.4 \pm 10.3
		BA	17	65.1 \pm 15.1	86.7 \pm 10.1
Dossenheim	Καλά Νερά	AA	10	55.9 \pm 17.1	114.3 \pm 17.7
		BB	24	43.7 \pm 7.0	85.4 \pm 10.1
		AB	9	70.6 \pm 10.5	74.8 \pm 12.6
		BA	13	58.9 \pm 14.5	84.4 \pm 9.2
Δάφνη	Καλά Νερά	AA	15	84.0 \pm 16.9	96.7 \pm 14.9
		BB	17	54.6 \pm 13.2	62.7 \pm 8.4
		AB	27	91.9 \pm 13.2	96.9 \pm 13.2
		BA	18	73.9 \pm 15.6	77.8 \pm 12.6
Δάφνη	Περτούλι	AA	12	52.0 \pm 12.1	98.3 \pm 21.5
		BB	13	43.6 \pm 15.4	69.9 \pm 6.9
		AB	22	77.4 \pm 14.5	71.8 \pm 7.6
		BA	8	90.0 \pm 21.6	86.4 \pm 13.7
Θεσσαλονίκη	Αγιά	AA	13	53.2 \pm 15.2	88.5 \pm 11.9
		BB	12	77.7 \pm 20	101.8 \pm 11.8
		AB	11	67.7 \pm 19.7	57.4 \pm 6.6
		BA	14	73.9 \pm 18.4	101.1 \pm 19.3



Διάγραμμα 16. Διάστημα έως τη (πρώτη) σύζευξη (λεπτά ± SE) για τις ομοτυπικές και ετεροτυπικές συζεύξεις του συνόλου των εξεταζόμενων συνδυασμών πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς.



Διάγραμμα 17. Διάρκεια σύζευξης (μ.ο ± SE) (λεπτά) των ομοτυπικών και ετεροτυπικών συζητήσεων για την πρώτη σύζευξη και το σύνολο των συζητήσεων (πρώτη σύζευξη και επανασυζητήσεις) που καταγράφηκαν από τις 14:00 μ.μ. έως 18:00 μ.μ. στο σύνολο των εξεταζόμενων συνδυασμών πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς.

Σύνολο συζεύξεων (πρώτη σύζευξη και επανασυζεύξεις)

Η μέση διάρκεια σύζευξης για το σύνολο των συζεύξεων για κάθε τύπο σύζευξης και για κάθε συνδυασμό πληθυσμών δίνεται στον Πίνακα 28. Στη διασταύρωση 'Δάφνη - Καλά Νερά', καταγράφηκε μεγαλύτερη διάρκεια σύζευξης μεταξύ των ομοτυπικών συζεύξεων των ενηλίκων της Δάφνης (♂ Δάφνη x ♀ Δάφνη) και των ετεροτυπικών συζεύξεων των αρσενικών της Δάφνης και των θηλυκών των Καλών Νερών (♂ Δάφνη x ♀ Καλά Νερά). Επιπρόσθετα, η μέση διάρκεια σύζευξης μεταξύ των αρσενικών από τη Θεσσαλονίκη και των θηλυκών της Αγιάς υπολογίστηκε στα 60 λεπτά ενώ για τους υπόλοιπους τύπους συζεύξεων η μέση διάρκεια σύζευξης ξεπέρασε τα 85 λεπτά. Το κριτήριο Krustall-Wallis έδειξε ότι ο τύπος σύζευξης είχε σημαντική επίδραση στη διάρκεια σύζευξης στη διασταύρωση 'Δάφνη - Καλά Νερά' ($\chi^2 = 11.23$, $df = 3$, $P = 0.011$) ενώ είχε οριακά σημαντική επίδραση στη διασταύρωση 'Θεσσαλονίκη - Αγιά' ($\chi^2 = 7.836$, $df = 3$, $P = 0.050$). Αντίθετα, ο τύπος σύζευξης αποδείχθηκε μη σημαντικός εκτιμητής της διάρκειας σύζευξης για τους υπόλοιπους συνδυασμούς πληθυσμών ('Dossenheim - Δάφνη': $\chi^2 = 0.654$, $df = 3$, $P = 0.884$; 'Dossenheim - Καλά Νερά': $\chi^2 = 0.614$, $df = 3$, $P = 0.893$; 'Δάφνη -Περτούλι': $\chi^2 = 2.611$, $df = 3$, $P = 0.456$). Το κριτήριο Mann Whitney έδειξε ότι δεν υπάρχουν διαφορές στη διάρκεια σύζευξης των ομοτυπικών και ετεροτυπικών συζεύξεων για το σύνολο των εξεταζόμενων πληθυσμών ($U = 33988$, $n = 533$, $P = 0.420$) (Διάγραμμα 17).

Πίνακας 28. Διάρκεια σύζευξης (λεπτά \pm SE) (λεπτά) για το σύνολο των συζεύξεων που καταγράφηκαν κατά το διάστημα από τις 14:00 μ.μ. έως 18:00 μ.μ. στους πέντε συνδυασμούς πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς. N, ο αριθμός των συζεύξεων (διάρκειας μεγαλύτερης από 10 λεπτά).

Πληθυσμός A	Πληθυσμός B	Τύπος σύζευξης A-B (♂ x ♀)	N	Διάρκεια σύζευξης (μ.ο. \pm SE) (λεπτά)
Dossenheim	Δάφνη	AA	29	74.37 \pm 6.7
		BB	32	77.59 \pm 9.4
		AB	31	72.65 \pm 7.6
		BA	34	79.24 \pm 7.7
Dossenheim	Καλά Νερά	AA	15	97.67 \pm 11.4
		BB	37	78.78 \pm 7.5
		AB	19	75.6 \pm 9.4
		BA	29	74.10 \pm 7.9
Δάφνη	Καλά Νερά	AA	24	83.58 \pm 10.4
		BB	33	55.27 \pm 5.1
		AB	38	90.24 \pm 10.2
		BA	33	66.3 \pm 7.9
Δάφνη	Περτούλι	AA	19	86.10 \pm 14.5
		BB	21	67.29 \pm 5.1
		AB	38	67.97 \pm 6.0
		BA	12	84.08 \pm 11.6
Θεσσαλονίκη	Αγιά	AA	18	83.06 \pm 11.2
		BB	25	86.28 \pm 8.2
		AB	23	60.10 \pm 5.9
		BA	23	92.17 \pm 11.8

8.4. Συζήτηση

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποστηρίζουν την απουσία: α) γεωγραφικής παραλλακτικότητας στον ημερήσιο ρυθμό σύζευξης των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς και β) φυλετικής απομόνωσης μεταξύ των πληθυσμών του εντόμου, ανεξαρτήτως της γενετικής απόστασης και της φαινολογίας των ενηλίκων στον αγρό. Ωστόσο, καταγράφηκαν σημαντικές διαφορές στην τάση σύζευξης μεταξύ των αρσενικών ατόμων της διασταύρωσης 'Dossenheim - Καλά Νερά' καθώς και μεταξύ των αρσενικών αλλά και θηλυκών ατόμων της διασταύρωσης 'Δάφνη - Περούλι', που απορρέουν από τη δράση της φυλετικής επιλογής. Το διάστημα έως την πρώτη σύζευξη δεν διέφερε μεταξύ των τεσσάρων τύπων σύζευξης στους πέντε συνδυασμούς πληθυσμών, παρότι οι ετεροτυπικές συζεύξεις χρειάζονται περισσότερο χρόνο για να πραγματοποιηθούν σε σχέση με τις ομοτυπικές των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς. Επίσης, η διάρκεια σύζευξης δεν διέφερε: α) κατά την πρώτη σύζευξη και β) μεταξύ των ετεροτυπικών και ομοτυπικών συζεύξεων των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς. Όμως, στη διασταύρωση 'Δάφνη – Καλά Νερά', οι ομοτυπικές συζεύξεις των ενηλίκων της Δάφνης και οι ετεροτυπικές συζεύξεις μεταξύ των αρσενικών από τη Δάφνη και των θηλυκών από τα Καλά Νερά είχαν σημαντικά μεγαλύτερη διάρκεια, όταν συμπεριλάμβαναν το σύνολο των συζεύξεων (πρώτη σύζευξη και επανασυζεύξεις).

Προσυζευκτική απομόνωση μεταξύ γενετικά ή οικολογικά διαφορετικών πληθυσμών

Η γενετική απόσταση των πληθυσμών δεν βρέθηκε να είναι σημαντικός εκτιμητής της επιλογής σύζευξης των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς. Θεωρητικά, τα υψηλά επίπεδα γονιδιακής ροής ευνοούν τον ανασυνδυασμό μεταξύ των γονιδίων που σχετίζονται με τη σύζευξη ομοίων και αυτών που βρίσκονται υπό την επίδραση της αποκλίνουσας επιλογής, δυσχεραίνοντας την έκφραση φυλετικής απομόνωσης μεταξύ των πληθυσμών των εντόμων (Smadja & Butlin, 2011). Ωστόσο, πρόσφατα βρέθηκαν γενετικοί μηχανισμοί που «ανθίστανται» του ανταγωνισμού μεταξύ των δυνάμεων φυσικής επιλογής και του ανασυνδυασμού των σχετικών γονιδίων, ευνοώντας τη σύζευξη ομοίων και συνεπώς την προ-συζευκτική απομόνωση υπό την παρουσία της γονιδιακής ροής (Smadja & Butlin, 2011; Via, 2012). Για παράδειγμα, στην περίπτωση όπου υπάρχει σημαντική δράση της φυλετικής επιλογής, προσυζευκτική απομόνωση θα μπορούσε να επιτευχθεί μέσω της ανισόρροπης σύνδεσης (linkage disequilibrium) των γονιδίων προσαρμογής με αυτών της σύζευξης ομοίων, δεδομένου ότι ο ρυθμός

ανασυνδουασμού παραμένει σχετικά χαμηλός (Matsubayashi *et al.*, 2010). Στην περίπτωση της ραγολέτιδας της κερασιάς, δεν παρατηρήθηκε φυλετική απομόνωση μεταξύ των πληθυσμών με γονιδιακή ροή ακόμα κι όταν υπήρχε σημαντική δράση της φυλετικής επιλογής (όπως π.χ. στη διασταύρωση 'Δάφνη - Περούλι') ή οι πληθυσμοί προέρχονταν από οικολογικά διαφορετικά ενδιαιτήματα. Απουσία φυλετικής απομόνωσης μεταξύ οικολογικά διαφορετικών πληθυσμών με γονιδιακή ροή έχει επίσης αναφερθεί στα είδη *Timema* spp. (Phasmatodea: Timematidae) και στο *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) (Dopman *et al.*, 2005; Nosil, 2007). Επίσης, τα χαμηλά επίπεδα γονιδιακής ροής δεν οδήγησαν σε φυλετική απομόνωση μεταξύ των πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς, υποδεικνύοντας ότι η γενετική απόσταση δεν αποτελεί προαπαιτούμενο για τη διαφοροποίηση της συμπεριφοράς σύζευξης των ενηλίκων του εντόμου (Tregenza, 2002; Shug *et al.*, 2008).

Η απουσία φυλετικής απομόνωσης μεταξύ οικολογικά διαφορετικών πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς υποδεικνύει ότι η επιλογή σύζευξης δεν ελέγχεται από την αποκλίνουσα επιλογή. Παρότι είναι γενικά αποδεκτό ότι η δράση της αποκλίνουσας επιλογής είναι δύο φορές πιο ισχυρή στα χαρακτηριστικά σύζευξης σε σχέση με τις παραμέτρους επιβίωσης και αναπαραγωγής (Kingsolver & Pfennig, 2007; Nanda & Singh, 2012), φαίνεται ότι υπάρχουν περιορισμοί στην ανάπτυξη μηχανισμών φυλετικής απομόνωσης μεταξύ των πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς, καθώς έχει ήδη τεκμηριωθεί η παρουσία σημαντικής γεωγραφικής παραλλακτικότητας στις βιολογικές παραμέτρους του εντόμου (δημογραφικά χαρακτηριστικά των ενηλίκων και παράμετροι της διάπαυσης) (Κεφάλαια 4-6). Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι η οικολογική προσαρμογή των ειδών του γένους *Rhagoletis* στα φυτά-ξενιστές προηγείται εξελικτικά της αναπαραγωγικής απομόνωσης (Schwarz & McPheron, 2007; Rull, Aluja & Feder, 2010). Σε αντιστοιχία με τα αποτελέσματά μας, δεν έχει μέχρι σήμερα καταγραφεί φυλετική απομόνωση μεταξύ των φυλών των φυτοφάγων ειδών *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae) και *Acrocercops transecta* (Lepidoptera: Gracillariidae) που έχουν προσαρμοστεί σε διαφορετικά φυτά-ξενιστές (Via, 1999; Ohshima, 2010). Η γεωγραφική και χρονική απομόνωση (σε περίπτωση διαφορετικής φαινολογίας ενηλίκων) των πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς θα μπορούσε να αποτελεί περιοριστικό παράγοντα στην ανάπτυξη μηχανισμών φυλετικής απομόνωσης, καθώς καθιστά την πιθανότητα 'λάθους' κατά την επιλογή σύζευξης (σύζευξη με άτομο από οικολογικά διαφορετικό περιβάλλον) σχετικά μικρή. Αντίθετα, η γεωγραφική εγγύτητα ενισχύει τα ποσοστά σύζευξης ομοίων, καθώς η αναπόφευκτα συχνή επαφή ατόμων

από οικολογικά διαφορετικούς πληθυσμούς δρα θετικά στην ανάπτυξη μηχανισμών αποφυγής σύζευξης μεταξύ των ατόμων από διαφορετικούς πληθυσμούς (Servedio & Noor, 2003). Ένας άλλος παράγοντας που θα μπορούσε να επιβραδύνει την εξέλιξη μηχανισμών φυλετικής απομόνωσης είναι η ίδια η αποκλίνουσα επιλογή που δρα στους οικολογικά διαφορετικούς πληθυσμούς του εντόμου, καθώς αυξάνει τη θνησιμότητα των ατόμων που μετακινούνται (*immigrant inviability*) σε οικολογικά διαφορετικά ενδιαιτήματα, ελαχιστοποιώντας τις ετεροτυπικές συζεύξεις (Thibert - Plante & Hendry, 2009). Σημειώνεται ότι η θνησιμότητα των ατόμων που διασπείρονται αποτελεί το δεύτερο (μαζί με τη σύζευξη ομοίων) μηχανισμό προσυζευκτικής απομόνωσης που αναπτύσσεται κατά τα αρχικά στάδια οικολογικής διαφοροποίησης των πληθυσμών (Matsubayashi *et al.*, 2010).

Παρουσία φυλετικής επιλογής στους πληθυσμούς της ραγολέτιδας της κερασιάς

Επιδράσεις της φυλετικής επιλογής καταγράφηκαν στις διασταυρώσεις 'Dossenheim - Καλά Νερά' και 'Δάφνη - Περτούλι'. Η φυλετική επιλογή μεταξύ των ατόμων του ίδιου φύλου δυο διαφορετικών πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς απορρέει από την επιλογή σύζευξης των θηλυκών (*female choice*) και τον ανταγωνισμό μεταξύ των αρσενικών (*male-male competition*) (Jaastad, 1998a). Λαμβάνοντας υπόψη ότι το μέγεθος σώματος των αρσενικών και η συμπεριφορά ερωτοτροπίας (*courtship display*) δεν επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα σύζευξης των θηλυκών της ραγολέτιδας της κερασιάς (Jaastad, 1998b), η φερομόνη φύλου των αρσενικών, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επικοινωνία (σύζευξης) των ενηλίκων του εντόμου, θα μπορούσε να σχετίζεται άμεσα με την επιλογή σύζευξης των θηλυκών στις παραπάνω διασταυρώσεις (Raptopoulos *et al.*, 1995). Ωστόσο, στη διασταύρωση 'Δάφνη - Περτούλι' παρατηρήθηκαν διαφορές στην τάση σύζευξης και των θηλυκών (εκτός των αρσενικών), δείχνοντας ότι η φυλετική επιλογή είναι πιθανό να σχετίζεται με τις αλληλεπιδράσεις των δύο φύλων ενός πληθυσμού, παρότι δεν παρατηρήθηκαν ασύμμετρες (ετεροτυπικές) συζεύξεις (Sugano & Akimoto, 2011). Συνεπώς, η παρουσία της φυλετικής επιλογής είναι πιθανό να ορίζεται τόσο από την επιλογή σύζευξης των θηλυκών όσο και από την παραλλακτικότητα στη συμπεριφορά σύζευξης μεταξύ των δύο φύλων ενός πληθυσμού (*sexual conflict*) (υπόθεση της ανταγωνιστικής συνεξέλιξης, *antagonistic coevolution hypothesis*). Αξίζει να αναφερθεί ότι η φυλετική επιλογή που εκφράζεται μέσω της επιλογής σύζευξης των θηλυκών θεωρείται ότι παρεμποδίζει τη δράση άλλων εξελικτικών δυνάμεων, όπως π.χ. αυτή της αποκλίνουσας επιλογής, κατά

την ανάπτυξη μηχανισμών φυλετικής απομόνωσης, εξηγώντας εν μέρει την απουσία φυλετικής απομόνωσης στους εξεταζόμενους συνδυασμούς πληθυσμών (Otto, Serveido & Nuismer, 2008).

Απουσία παραλλακτικότητας στο διάστημα έως την πρώτη σύζευξη και διάρκεια σύζευξης

Το διάστημα έως την πρώτη σύζευξη δεν διέφερε μεταξύ των τεσσάρων τύπων σύζευξης (δύο ομοτυπικές και δύο ετεροτυπικές) στους πέντε συνδυασμούς πληθυσμών, υποδεικνύοντας απουσία φυλετικής απομόνωσης, σύμφωνα και με τα αποτελέσματα της πολλαπλής επιλογής σύζευξης. Ωστόσο, το διάστημα έως την πρώτη σύζευξη διέφερε μεταξύ των ετεροτυπικών και ομοτυπικών συζεύξεων για το σύνολο των διασταυρώσεων, πιθανότατα λόγω της επίδρασης της φυλετικής επιλογής ή και άλλων δυνάμεων επιλογής που χρειάζονται περαιτέρω μελέτη. Σχετικά με τη διάρκεια σύζευξης, προηγούμενες μελέτες υποστηρίζουν ότι η πλήρης μεταφορά σπέρματος πραγματοποιείται σε λιγότερο από 45 λεπτά (Katsoyannos, Boller & Benz, 1987) αλλά η διάρκεια σύζευξης είναι πιθανόν να διαφοροποιείται μεταξύ των ατόμων της ραγολέτιδας της κερασιάς βάσει του μεγέθους σώματος των θηλυκών, την αναλογία φύλου και την πυκνότητα του πληθυσμού (Jaastad, 1998a). Η παραλλακτικότητα στη διάρκεια σύζευξης θεωρείται ότι απορρέει από την παρατεταμένη «περιφρούρηση» του πρόσφατου σεξουαλικού συντρόφου (extended mate guarding hypothesis) από τα αρσενικά και τον ανταγωνισμό σπέρματος στα θηλυκά (sperm competition) (Jaastad, 1998a). Στην παρούσα μελέτη, δεν εντοπίστηκαν διαφορές στη διάρκεια σύζευξης μεταξύ: α) των τεσσάρων τύπων σύζευξης του κάθε εξεταζόμενου συνδυασμού πληθυσμών και β) του συνόλου των ετεροτυπικών και ομοτυπικών συζεύξεων που έλαβαν χώρα κατά την πρώτη σύζευξη. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη το σύνολο των συζεύξεων (πρώτη σύζευξη και επανασυζεύξεις), οι ομοτυπικές και ετεροτυπικές συζεύξεις των αρσενικών από τη Δάφνη είχαν σημαντικά μεγαλύτερη διάρκεια σε σχέση με τις αντίστοιχες των αρσενικών από τα Καλά Νερά στη διασταύρωση 'Δάφνη – Καλά Νερά'. Σύμφωνα με τη θεωρία της παρατεταμένης «περιφρούρησης» του πρόσφατου σεξουαλικού συντρόφου, η παρατεταμένη σύζευξη των αρσενικών της Δάφνης θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι αποσκοπεί στην παράταση του χρόνου έως την επανασύζευξη των θηλυκών, η οποία λειτουργεί προς όφελος των αρσενικών (Alcock, 1994). Σημειώνεται ότι τα θηλυκά αναμένονται να είναι περισσότερο πρόθυμα να επανασυζευχθούν όταν το σπέρμα που υπάρχει στη σπερματοθήκη είναι για κάποιο

λόγο μη επαρκές (ατελής μεταφορά, συνειδητή απομάκρυνση κ.α.), οδηγώντας πιθανότατα σε χαμηλά ποσοστά εκκόλαψης των αυγών, όπως συμβαίνει π.χ. στα είδη του γένους *Drosophila* spp. (Sagga & Civetta, 2011). Επομένως, θα ήταν χρήσιμο να διερευνηθεί η παρουσία μηχανισμών προσυζευκτικής απομόνωσης που λαμβάνουν χώρα πριν τη δημιουργία του ζυγωτού, συμπεριλαμβανομένων και των μηχανισμών ανταγωνισμού σπέρματος στα θηλυκά, για να κατανοηθεί η παραλλακτικότητα στη διάρκεια σύζευξης των ατόμων της ραγολέτιδας της κερασιάς κατά τη διασταύρωση 'Δάφνη – Καλά Νερά'.

Περιβαλλοντικοί και άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τα αποτελέσματα της συμπεριφοράς σύζευξης

Παρότι η παρατηρούμενη προ-συζευκτική απομόνωση μεταξύ των πληθυσμών της *Drosophila melanogaster* θεωρήθηκε αρχικά ως μια έμμεση επίδραση της προσβολής των πληθυσμών του εντόμου με διαφορετικά στελέχη του βακτηρίου *Wolbachia* (Κουκου *et al.*, 2006), πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι στελέχη του βακτηρίου, όπως αυτά που προκαλούν κυτταροπλασματική ασυμβατότητα, είναι σε θέση να προκαλέσουν άμεσα προσυζευκτική απομόνωση (Miller, Ehrman & Schneider, 2010; Gazla & Carracedo, 2011), αν και έχουν αναφερθεί εξαιρέσεις όπως στο είδος *Trichogramma chilonis* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (Benvenuto *et al.*, 2012). Στην περίπτωση της ραγολέτιδας της κερασιάς, υπάρχει σημαντική ποικιλομορφία στη σύνθεση των στελεχών *Wolbachia* μεταξύ των ατόμων των ευρωπαϊκών και κυρίως των ελληνικών πληθυσμών του εντόμου (Augustinos *et al.*, 2013) αλλά ο ρόλος του βακτηρίου στην ανάπτυξη μηχανισμών προ-συζευκτικής απομόνωσης δεν έχει προσδιοριστεί μέχρι σήμερα. Για να γίνει αυτό είναι απαραίτητη η ταυτοποίηση όλων των στελεχών σε κάθε άτομο που συμμετέχει στις συζεύξεις των εξεταζόμενων συνδυασμών πληθυσμών. Επίσης, στελέχη του βακτηρίου με δυνατότητα πρόκλησης αναπαραγωγικής ασυμβατότητας ενδέχεται να επιφέρουν αλλαγές στη φυσιολογία της αναπαραγωγής (παραγωγή ή μεταφορά σπέρματος κ.α), όπως π.χ. στα είδη *D. simulans* (Diptera: Drosophilidae) (Snook *et al.*, 2000), *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae) (Wade & Change, 1995) και *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) (Lewis *et al.*, 2011), επηρεάζοντας πιθανότητα την ανάπτυξη προ-συζευκτικών μηχανισμών αναπαραγωγικής απομόνωσης που εκφράζονται πριν τη δημιουργία του ζυγωτού. Όμως, η παρουσία των παραπάνω μηχανισμών και ο πιθανός ρόλος της *Wolbachia* δεν έχει μελετηθεί στη ραγολέτιδα της κερασιάς.

Ένας άλλος παράγοντας που θα πρέπει να συνυπολογιστεί κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων είναι η σύνθεση των υδατανθράκων του δερματίου των ενηλίκων, η οποία επηρεάζεται άμεσα από τη χημική σύνθεση των φυτών-ξενιστών και καθορίζει σε σημαντικό βαθμό τη συμπεριφορά σύζευξης (Etges & Ahrens, 2001; Etges, Veenstra & Jackson, 2006; Etges, Veenstra & Jackson, 2009; Rundle, Chenoweth & Blows, 2009). Τα ενήλικα της ραγολέτιδας της κερασιάς που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα του παρόντος Κεφαλαίου προέρχονταν από προνύμφες που αναπτύχθηκαν σε καρπούς διαφορετικών ποικιλιών κερασιάς λόγω της έλλειψης αποτελεσματικής μεθόδου μαζικής εκτροφής του εντόμου. Κατά συνέπεια, είναι πιθανό η παραλλακτικότητα στη θρεπτική σύσταση της τροφής των προνυμφών να έχει επηρεάσει τη σύνθεση των υδατανθράκων του δερματίου των ενηλίκων καθορίζοντας πιθανότατα τη δράση της φυλετικής επιλογής κατά την επιλογή σύζευξης. Ωστόσο, δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα μελέτες σχετικές με τη σύνθεση των υδατανθράκων του δερματίου των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς που τρέφονται κατά το στάδιο της προνύμφης σε διαφορετικά είδη ή ποικιλίες ξενιστών, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να εκτιμηθεί η συμβολή τους στη συμπεριφορά σύζευξης των ενηλίκων του εντόμου.

Οι δοκιμές σύζευξης στο εργαστήριο γεωγραφικά απομονωμένων πληθυσμών δεν προσομοιάζει απόλυτα τη συμπάτρια φάση των πληθυσμών λόγω παραλλακτικότητας στις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες στη φύση. Κατά συνέπεια, οι μηχανισμοί αναπαραγωγικής ασυμβατότητας που καταγράφονται στα πειράματα του εργαστηρίου ενδέχεται να μην είναι αντιπροσωπευτικοί αυτών που απαντώνται στη φύση (Hendry, 2009). Συνήθης εναλλακτική πρακτική αποτελεί η διενέργεια πειραμάτων πολλαπλής επιλογής σύζευξης στον αγρό χρησιμοποιώντας κατάλληλους κλωβούς (field cages). Όμως, στην περίπτωση της ραγολέτιδας της κερασιάς, υπάρχουν δύο σημαντικοί περιορισμοί: α) δεν υπάρχει διαθέσιμη μια αποτελεσματική μέθοδος εκτροφής της ραγολέτιδας της κερασιάς που να μπορεί να δώσει ικανοποιητικό μέγεθος πληθυσμού για τη διεξαγωγή πειραμάτων στον αγρό (Körppler, Kaffer & Vogt, 2009) και β) δεν είναι πάντα εφικτό να υπάρχει ταυτόχρονα διαθέσιμο ικανοποιητικό μέγεθος πληθυσμού εντόμων που προέρχονται από πληθυσμούς με διαφορετική ένταση διάπαυσης (πρώιμοι και όψιμοι πληθυσμοί) και έχουν περατώσει τη διάπαυση σε σταθερές συνθήκες εργαστηρίου. Αυτό γιατί οι νύμφες της ραγολέτιδας της κερασιάς έχουν την ικανότητα να εισέρχονται σε παρατεταμένη διάπαυση ή να 'επιστρέφουν' σε εποχική αδράνεια όταν εκτίθενται σε υψηλές θερμοκρασίες πριν ή μετά την περάτωση της διάπαυσης του πληθυσμού, αντίστοιχα (Κεφάλαιο 4). Επιπλέον, περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως

θερμοκρασία, ηλιοφάνεια και ταχύτητα του ανέμου, επηρεάζουν τη διάρκεια σύζευξης και το χρόνο έως τη σύζευξη σε συνθήκες αγρού (Petit-Marty *et al.*, 2004). Επομένως, για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη παρουσία ή μη προ-συζευκτικής απομόνωσης στη ραγολέτιδα της κερασιάς θα ήταν χρήσιμο να πραγματοποιηθούν, στο βαθμό που αυτό είναι εφικτό, πειράματα συμπεριφοράς σύζευξης σε συνθήκες αγρού, συμπληρωματικά των αντίστοιχων πειραμάτων που έλαβαν χώρα στο εργαστήριο.

Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας, στο παρόν Κεφάλαιο τεκμηριώθηκε η απουσία φυλετικής απομόνωσης μεταξύ των πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς, παρά την επίδραση της αποκλίνουσας επιλογής στα βιολογικά χαρακτηριστικά του εντόμου (δημογραφία ενηλίκων, διάπαυση νυμφών) και τη σχετικά περιορισμένη γονιδιακή ροή. Ωστόσο, η δράση της φυλετικής επιλογής επηρέασε τα ποσοστά σύζευξης μεταξύ των διαφορετικών τύπων σύζευξης σε ορισμένες διασταυρώσεις, υποδεικνύοντας ότι η έκφραση μηχανισμών προ-συζευκτικής απομόνωσης είναι μια ιδιαίτερα πολύπλοκη διαδικασία (Hendry, 2009; Pereira, Monahan & Wake, 2011). Προκειμένου να κατανοηθεί σε βάθος ο τρόπος που αλληλεπιδρούν οι εξελικτικές δυνάμεις κατά την αναπαραγωγική απομόνωση, είναι χρήσιμο να εξεταστεί η παρουσία περισσότερων μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένων και των μετα-συζευκτικών, χρησιμοποιώντας περισσότερους γενετικά απομονωμένους ή μη πληθυσμούς της ραγολέτιδας της κερασιάς (Maan & Seehausen, 2011).

Βιβλιογραφία

- Alcock J. 1994.** Postinsemination associations between males and females in insects: the mate-guarding hypothesis. *Annual Review of Entomology* **39**: 1-21.
- Andersson M, Simmons LW. 2006.** Sexual selection and mate choice. *Trends in Ecology & Evolution* **21**: 296-302.
- Augustinos AA, Asimakopoulou AK, Moraiti CA, Mavragani-Tsipidou P, Papadopoulos NT, Bourtzis K. 2013.** Microsatellite and *Wolbachia* analysis in *Rhagoletis cerasi* natural populations: population structuring and multiple infections. *Ecology and Evolution, in press*.
- Augustinos AA, Asimakopoulou AK, Papadopoulos NT, Bourtzis K. 2011.** Cross-amplified microsatellites in the European cherry fly, *Rhagoletis cerasi*: medium polymorphic-highly informative markers. *Bulletin of Entomological Research* **101**: 45-52.
- Barton NH, de Cara MAR. 2009.** The evolution of strong reproductive isolation. *Evolution* **63**: 1171–1190.
- Benvenuto C, Tabone E, Vercken E, Sorbier N, Colombel E, Warot S, Fauvergue X, Ris N. 2012.** Intraspecific variability in the parasitoid wasp *Trichogramma chilonis*: can we predict the outcome of hybridization? *Evolutionary Applications* **5**: 498-510.
- Carvajal-Rodriguez A, Rolán-Alvarez, E. 2006.** JMATING: a software for the analysis of sexual selection and sexual isolation effects from mating frequency data. *BMC Evolutionary Biology* **6**: 40.
- Coyne JA, Orr HA. 2004.** *Speciation*. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates.
- Dopman EB, Pérez L, Bogdanowicz SM, Harrison RG. 2005.** Consequences of reproductive barriers for genealogical discordance in the European corn borer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 14706–14711.
- Etges WJ, de Oliveira CC, Ritchie MG, Noor AF. 2009.** Genetics of incipient speciation in *Drosophila mojavensis*: II. Host plants and mating status influence cuticular hydrocarbon QTL expression and G x E interactions. *Evolution* **63**: 1712– 1730.
- Etges WJ, Veenstra CL, Jackson LL. 2006.** Premating isolation is determined by larval rearing substrates in cactophilic *Drosophila mojavensis*. VII. Effects of larval dietary fatty acids on adult epicuticular hydrocarbons. *Journal of Chemical Ecology* **32**: 2629-2646.
- Etges WJ, Ahrens MA. 2001.** Premating isolation is determined by larval rearing substrates in cactophilic *Drosophila mojavensis*. V. Deep geographic variation in

epicuticular hydrocarbons among isolated populations. *The American Naturalist* **158**: 585–598.

Funk DJ. 1998. Isolating a role for natural selection in speciation: host adaptation and sexual isolation in *Neochlamisus bebbianae* leaf beetles. *Evolution* **52**: 1744–1759.

Gazla NI, Carracedo CM. 2011. *Wolbachia* induces sexual isolation in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. *Open Journal of Genetics* **1**: 18-26.

Hendry AP. 2009. Ecological speciation! Or the lack thereof? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **66**: 1383-1398.

Hine E, McGuigan K, Blows MW. 2011. Natural selection stops the evolution of male attractiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* **108**: 3659-3664.

Hoskin CJ, Higgie M. 2010. Speciation via species interactions: the divergence of mating traits within species. *Ecology Letters* **13**: 409-420.

Jaastad G. 1998a. Mating behavior and distribution of the European cherry fruit fly (*Rhagoletis cerasi* L.) in Norway; applied and evolutionary research aspects on an insect pest. Unpublished D. Phil. Thesis, Department of Zoology, University of Bergen, Norway. ISBN 82-992402-9-8.

Jaastad G. 1998b. Male mating success and body size in the European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi* L. (Dipt., Tephritidae). *Journal of Applied Entomology* **122**: 121-124.

Katsoyannos BI. 1982. Male sex pheromone of *Rhagoletis cerasi* L. (diptera, tephritidae): Factors affecting release and response and its role in mating behavior. *Journal of Applied Entomology* **94**: 187-198.

Katsoyannos BI. 1976. Female attraction to males in *Rhagoletis cerasi* (Diptera, Tephritidae). *Environmental Entomology* **5**: 474-476.

Katsoyannos BI. 1975. Oviposition-deterring, male-arresting, fruit-marking pheromone in *Rhagoletis cerasi*. *Environmental Entomology* **4**: 801- 807.

Katsoyannos BI, Boller E, Benz G. 1987. Zur reproduktionsbiologie der kirschenfliege *rhagoletis cerasi* L.: Präovipositionsperiode, tagesperiodizität und einfluss der kopulation auf die fekundität und fertilität einzeln oder in gruppen gehaltener weibchen (diptera: Tephritidae). *Mitteilung der Schweizerischen entomologischen Gesellschaft* **60**: 3-13.

Kingsolver JG, Pfennig DW. 2007. Patterns and power of phenotypic selection in nature. *Bioscience* **57**: 561–572.

- Köppler K, Kaffer T, Vogt H. 2009.** Substantial progress made in the rearing of the European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **132**: 283–288.
- Koukou K, Pavlikaki H, Kiliass G, Werren JH, Bourtzis K, and Alahiotis SN. 2006.** Influence of antibiotic treatment and *Wolbachia* curing on sexual isolation among *Drosophila melanogaster* cage populations. *Evolution* **60**: 87-96.
- Lewis Z, Champion de Crespigny FE, Sait SM, Tregenza T, Wedell N. 2011.** *Wolbachia* infection lowers fertile sperm transfer in a moth. *Biology Letters* **7**: 187-189.
- Maan ME, Seehausen O. 2011.** Ecology, sexual selection and speciation. *Ecology Letters* **14**: 591-602.
- Matsubayashi KW, Ohshima I, Nosil P. 2010.** Ecological speciation in phytophagous insects. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **134**: 1-27.
- Miller WJ, Ehrman L, Schneider D. 2010.** Infectious speciation revisited: Impact of symbiont-depletion on female fitness and mating behavior of *Drosophila paulistorum*. *PLoS Pathogens* **6**: e1001214.
- Nanda P, Singh BN. 2012.** Behavioural reproductive isolation and speciation in *Drosophila*. *Journal of Biosciences* **37**: 359-374.
- Nosil P. 2007.** Divergent host-plant adaptation and reproductive isolation between ecotypes of *Timema cristinae* walking-sticks. *The American Naturalist* **169**: 151–162.
- Nosil P, Harmon LJ, Seehausen O. 2009.** Ecological explanations for (incomplete) speciation. *Trends in Ecology and Evolution* **24**: 145-156.
- Ohshima I. 2010.** Host-associated pre-mating reproductive isolation between host races of *Acrocercops transecta*: mating site preferences and effect of host presence on mating. *Ecological Entomology* **35**: 253-257.
- Otto SP, Serveido MR, Nuismer SL. 2008.** Frequency-dependent selection and the evolution of assortative mating. *Genetics* **179**: 2091-2112.
- Panhuis TM, Butlin R, Zuk M, Tregenza T. 2001.** Sexual selection and speciation. *Trends in Ecology & Evolution* **16**: 364–371.
- Pereira RJ, Monahan WB, Wake DB. 2011.** Predictors for reproductive isolation in a ring species complex of following genetic and ecological divergence. *BMC Evolutionary Biology* **11**: 194.
- Pérez-Figueroa A, Caballero A, Rolán-Alvarez E. 2005.** Comparing the estimation properties of different statistics for measuring sexual isolation from mating frequencies. *Biological Journal of the Linnean Society* **85**: 307-318.

- Petit-Marty N, Vera MT, Calcagno G, Cladera JL, Segura DF, Allinghi A, Rodriguez M, Gómez Cendra P, Viscarret MM, Vilardi JC. 2004.** Sexual behavior and mating compatibility among four populations of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) from Argentina. *Annals of the Entomological Society of America* **97**: 1320-1327.
- Raptopoulos D, Haniotakis G, Koutsaftikis A, Kelly D, Mavraganis V. 1995.** Biological activity of chemicals identified from extracts and volatiles of male *Rhagoletis cerasi*. *Journal of Chemical Ecology* **21**: 1287-1297.
- Ritchie MG. 2007.** Sexual selection and speciation. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **38**: 79-102.
- Rolán-Alvarez E, Caballero A. 2000.** Estimating sexual selection and sexual isolation effects from mating frequencies. *Evolution* **54**: 30-36.
- Rull J, Aluja M, Feder JF. 2010.** Evolution of intrinsic reproductive isolation among four North American populations of *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae). *Biological Journal of the Linnean Society* **100**: 213-223.
- Rundle HD, Chenoweth SF, Blows MW. 2009.** The diversification of mate preferences by natural and sexual selection. *Journal of Evolutionary Biology* **8**: 1608–1615.
- Sagga N, Civetta A. 2011.** Male-female interactions and the evolution of postmating prezygotic reproductive isolation among species of the *Virilis* subgroup. *International Journal of Evolutionary Biology* Article ID: 485460, doi:10.4061/2011/485460.
- Smadja CM, Butlin RK. 2011.** A framework for comparing processes of speciation in the presence of gene flow. *Molecular Ecology* **20**: 5123-5140.
- Snook RR, Cleland SY, Wolfner MF, Karr TL. 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**: 167-178.
- Schluter D. 2001.** Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology & Evolution* **16**: 372–380.
- Schwartz AK, Hendry AP. 2006.** Sexual selection and the detection of ecological speciation. *Evolutionary Ecology Research* **8**: 399–413.
- Schwarz D, McPheron BA. 2007.** When ecological isolation breaks down: sexual isolation is an incomplete barrier to hybridization between *Rhagoletis* species. *Evolutionary Ecology Research* **9**: 829-841.
- Servedio MR, Kopp M. 2012.** Sexual selection and magic traits in speciation with gene flow. *Current Zoology* **58**: 510-516.

- Servedio MR, Noor MAF. 2003.** The role of reinforcement in speciation: theory and data. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **34**: 339–364.
- Shug MD, Baines JF, Killon-Atwood A, Mohanty S, Das A, Grath S, Smith SG, Zargham S, Mcervey SF, Wolfgang S. 2008.** Evolution of mating isolation between populations of *Drosophila ananassae*. *Molecular Ecology* **17**: 2706-2721.
- Sokal RR, Rohlf FJ. 1995.** *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. New York: W.H. Freeman.
- Sugano YC, Akimoto S. 2011.** Mating asymmetry resulting from sexual conflict in the brachypterous grasshopper *Podisma sapporensis*. *Behaviour Ecology* **22**: 701-709.
- Svensson EI, Eroukhmanoff F, Friberg M. 2006.** Effects of natural and sexual selection on adaptive population divergence and premating isolation in a damselfly. *Evolution* **60**: 1241-1253.
- Thibert - Plante X, Hendry AP. 2009.** Five questions on ecological speciation addressed with individual-based simulations. *Journal of Evolutionary Biology* **22**: 109-123.
- Tregenza T. 2002.** Divergence and reproductive isolation in the early stages of speciation. *Genetica* **116**: 291–300.
- van Doorn GS, Edelaar P, Weissing FJ. 2009.** On the origin of species by natural and sexual selection. *Science* **326**: 1704–1707.
- Vera MT, Cáceres C, Wornoayporn V, Islam A, Robinson AS, de la Vega MH, Hendrichs J, Cayol J-P. 2006.** Mating incompatibility among population of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America* **99**: 387-397.
- Via S. 2012** Divergence hitchhiking and the spread of genomic isolation during ecological speciation with gene flow. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **367**: 451–460.
- Via S. 1999.** Reproductive isolation between sympatric races of pea aphids. I. Gene flow restriction and habitat choice. *Evolution* **53**: 1446–1457.
- Wade MJ, Chang NW. 1995.** Increased male fertility in *Tribolium confusum* beetles after infection with the intracellular parasite *Wolbachia*. *Nature* **373**: 72-74.
- Weissing FJ, Edelaar P, van Doorn GS. 2011.** Adaptive speciation theory: a conceptual review. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **65**: 461–480.

9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

9.1. Ανακεφαλαίωση αποτελεσμάτων

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η βιο-οικολογία και συμπεριφορά διαφορετικών πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς προκειμένου να διαφωτιστούν πτυχές της εξελικτικής της βιολογίας. Εστιάζοντας αρχικά στην παρουσία του εντόμου στη χώρα μας, εξετάστηκε η διασπορά των πληθυσμών, τα είδη των φυτών που μπορούν να αποτελέσουν ξενιστές και η ένταση της προσβολής. Παράλληλα, διερευνήθηκε η παρουσία της *Wolbachia* στους ελληνικούς πληθυσμούς του εντόμου. Στη συνέχεια, μελετήθηκαν οι γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες (θερμοκρασία και διάρκεια έκθεσης στις χαμηλές θερμοκρασίες) που καθορίζουν το χρόνο περάτωσης της διάπαυσης και την έκφραση παρατεταμένων βιολογικών κύκλων στο στάδιο της νύμφης. Επίσης, προσδιορίστηκε η επίδραση του πληθυσμού και της θερμοκρασίας στη μεταδιαπαυτική ανάπτυξη των νυμφών που δίνουν ενήλικα κατά το πρώτο έτος της διάπαυσης ή μετά από παρατεταμένη διάπαυση. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν συγκριτικές δημογραφικές μελέτες μεταξύ: α) ενηλίκων που προέρχονται από γεωγραφικά απομονωμένους πληθυσμούς με οικολογικά διαφορετικά χαρακτηριστικά, οι οποίοι με διαφορετικά επίπεδα γονιδιακής ροής και β) ενηλίκων που εξήλθαν από νύμφες με διάπαυση ενός έτους και από αυτές με παρατεταμένη διάπαυση δύο γενετικά απομονωμένων πληθυσμών. Σχετικά με τη συμπεριφορά σύζευξης ενηλίκων, μελετήθηκε η παρουσία προσυζευκτικής απομόνωσης μεταξύ γενετικά ή οικολογικά διαφορετικών πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς εκτιμώντας: α) τα ποσοστά σύζευξης ομοίων και β) το διάστημα έως τη σύζευξη καθώς και τη διάρκεια σύζευξης πέντε συνδυασμών πληθυσμών. Επίσης, προσδιορίστηκε ο ημερήσιος ρυθμός σύζευξης έξι πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς από την Ελλάδα και ενός από τη Γερμανία. Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής συνοψίζονται στα εξής:

1. Γεωγραφική κατανομή πληθυσμών του εντόμου και μόλυνση με *Wolbachia*:

Πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς εντοπίστηκαν σε όλες τις εξεταζόμενες περιοχές της ηπειρωτικής και νησιωτικής Ελλάδας όπου καλλιεργούνται ή υπάρχουν αυτοφυείς κερασιές, βυσσινιές, άγριες κερασιές, φυτά μαχαλεπίου και άλλα είδη *Prunus spp.*, όπως οι άγριες κορομηλιές. Ωστόσο, τα ποσοστά προσβολής των καρπών διαφέρουν μεταξύ των περιοχών και των φυτών-

ξενιστών, ανεξάρτητα από το χρόνο ωρίμανσης των καρπών (πρώιμες ή όψιμες ποικιλίες). Επίσης, επιβεβαιώθηκε η παρουσία της *Wolbachia* σε όλους τους ελληνικούς πληθυσμούς του εντόμου, μέσω της ταυτοποίησης του στελέχους *wCer1*.

2. *Διάπαυση*: Οι διαπαύουσες νύμφες της ραγολέτιδας της κερασιάς χαρακτηρίζονται από: α) γεωγραφική παραλλακτικότητα στο χρόνο περάτωσης της διάπαυσης λόγω τοπικής προσαρμογής των πληθυσμών στα οικολογικά χαρακτηριστικά των εκάστοτε ενδαιτημάτων (διάπαυση ενός έτους) και β) τη δυνατότητα επιμήκυνσης του βιολογικού κύκλου, ανταποκρινόμενες στις ετήσιες κλιματικές μεταβολές των τοπικών ενδαιτημάτων ('bet-hedging' στρατηγικές). Ειδικότερα, οι νύμφες ενός πληθυσμού είτε εισέρχονται σε παρατεταμένη διάπαυση είτε 'επιστρέφουν' σε εποχική αδράνεια εξαιτίας της ανεπαρκούς ή παρατεταμένης έκθεσης σε χαμηλές θερμοκρασίες, αντίστοιχα. Η υποβολή σε έναν επιπλέον (προαιρετικό) κύκλο διαχείμασης στο στάδιο της νύμφης παρέχει τη δυνατότητα στα άτομα ενός πληθυσμού να ενηλικιωθούν κατά τη διάρκεια του επόμενου 'εποχικού παραθύρου' που συμπίπτει με τη φαινολογία των τοπικών καρπών-ξενιστών. Η παραπάνω στρατηγική περιγράφεται πρώτη φορά στα ολοκυκλικά έντομα. Επίσης, οι μέτρια υψηλές θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια του χειμώνα (8-10°C) βρέθηκαν να είναι ευνοϊκές για την περάτωση της διάπαυσης των νυμφών που προέρχονται είτε από θερμές είτε από ψυχρές περιοχές, αντίθετα με τις σχετικά υψηλές (> 12°C) θερμοκρασίες.
3. *Μεταδιαπαυτική ανάπτυξη*: Για τα άτομα με διάπαυση ενός έτους, η μεταδιαπαυτική ανάπτυξη των νυμφών (με ίδιας έντασης διάπαυση) βρέθηκε να διαφέρει μεταξύ των: α) όψιμων πληθυσμών με χαμηλά επίπεδα γονιδιακής ροής, β) πρώιμων πληθυσμών με υψηλά επίπεδα γονιδιακής ροής και γ) πρώιμων και όψιμων πληθυσμών με ποικίλα επίπεδα γονιδιακής ροής. Επίσης, η μείωση της διάρκειας μεταδιαπαυτικής περιόδου των νυμφών με την αύξηση της σχετικής θερμοκρασίας διαφέρει μεταξύ των πρώιμων και όψιμων πληθυσμών του εντόμου με διαφορετικά επίπεδα γονιδιακής ροής. Επομένως, προκύπτει ότι ο πληθυσμός είναι σημαντικός εκτιμητής της μεταδιαπαυτικής ανάπτυξης των νυμφών της ραγολέτιδας της κερασιάς που δίνουν ενήλικα κατά το πρώτο έτος της διάπαυσης. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν γεωγραφικές διαφορές στη μεταδιαπαυτική ανάπτυξη των νυμφών με παρατεταμένη διάπαυση που

προέρχονταν από πρώιμους και όψιμους πληθυσμούς με ποικίλα επίπεδα γονιδιακής ροής. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ότι η μεταδιαπαυτική ανάπτυξη των νυμφών επιταχύνεται με τη μείωση της έντασης της διάπαυσης ενός πληθυσμού, αν και η παρατεταμένη έκθεση σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι πιθανό να αυξήσει τη διάρκεια της μεταδιαπαυτικής περιόδου των ατόμων ενός πληθυσμού. Η έξοδος των θηλυκών προηγήθηκε αυτής των αρσενικών που εξήλθαν μετά την περάτωση της διάπαυσης ενός έτους καθώς και μετά από παρατεταμένη διάπαυση. Η γεωγραφική παραλλακτικότητα στη μεταδιαπαυτική ανάπτυξη των νυμφών της ραγολέτιδας της κερασιάς θεωρείται ότι συμβάλλει στην αποτελεσματικότερη προσαρμογή των πληθυσμών του εντόμου στα τοπικά ενδιαιτήματα.

4. *Δημογραφία ενηλίκων*: Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά (και το μέγεθος του σώματος) των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς που εξέρχονται κατά το πρώτο έτος της διάπαυσης των νυμφών διαφέρουν μεταξύ των πληθυσμών που απαντώνται σε ενδιαιτήματα με διαφορετικά οικολογικά χαρακτηριστικά, ανεξάρτητα της γενετικής απόστασης των πληθυσμών. Συνεπώς, η γενετική παραλλακτικότητα των πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς, που απορρέει από τη γεωγραφική απόσταση, δεν αποτελεί αξιόπιστο δείκτη της παραλλακτικότητας των δημογραφικών χαρακτηριστικών των ενηλίκων που εξέρχονται κατά το πρώτο έτος της διάπαυσης, υπογραμμίζοντας τη δράση της αποκλίνουσας επιλογής κατά την οικολογική προσαρμογή των πληθυσμών στα εκάστοτε ενδιαιτήματα. Τα ενήλικα που εξέρχονται από νύμφες με παρατεταμένη διάπαυση έχουν μεγαλύτερο μέγεθος σε σχέση με τα άτομα που ενηλικιώνονται κατά το πρώτο έτος διάπαυσης. Παρότι η παρατεταμένη διάπαυση δεν επηρεάζει τη διάρκεια ζωής των ενηλίκων, προκαλεί σημαντική μείωση της ωοπαραγωγής και αύξηση της διάρκειας της περιόδου μετά την ωοτοκία, δείχνοντας ότι η είσοδος των νυμφών σε παρατεταμένη διάπαυση επιφέρει αναπαραγωγικό κόστος στα ενήλικα που τελικά προκύπτουν.
5. *Προσυζευκτική απομόνωση*: Αναφορικά με τη συμπεριφορά σύζευξης των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς που αναφέρεται στην παρουσία ή μη προσυζευκτικής απομόνωσης μεταξύ των πληθυσμών του εντόμου, βρέθηκε ότι δεν υπάρχει: α) γεωγραφική παραλλακτικότητα στον ημερήσιο ρυθμό σύζευξης των ενηλίκων και β) φυλετική απομόνωση μεταξύ των πληθυσμών, ανεξάρτητα

της γενετικής τους απόστασης και των οικολογικών τους χαρακτηριστικών (π.χ. διαφορετική φαινολογία ενηλίκων στον αγρό λόγω προσαρμογής στη φαινολογία των τοπικών καρπών-ξενιστών). Ωστόσο, αποκλίσεις από τις αναμενόμενες τυχαίες συζεύξεις παρατηρήθηκαν σε ορισμένες ομοτυπικές και ετεροτυπικές συζεύξεις των διασταυρώσεων 'Dossenheim - Καλά Νερά' και 'Δάφνη - Περτούλι' λόγω των επιδράσεων της φυλετικής επιλογής. Επίσης, η διάρκεια σύζευξης των ενηλίκων διέφερε μεταξύ των τεσσάρων τύπων σύζευξης στη διασταύρωση 'Δάφνη - Καλά Νερά'. Συνεπώς, παρά την τοπική προσαρμογή των πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς στα οικολογικά διαφορετικά ενδιαιτήματα δεν έχει αναπτυχθεί αναπαραγωγική ασυμβατότητα λόγω φυλετικής απομόνωσης. Ωστόσο, καταγράφηκαν σημαντικές επιδράσεις φυλετικής επιλογής μεταξύ των θηλυκών και αρσενικών ατόμων των πληθυσμών. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η αναπαραγωγική ασυμβατότητα απορρέει συχνά από την αθροιστική δράση ποικίλων μηχανισμών με δυνατότητα πρόκλησης μερικής αναπαραγωγικής απομόνωσης (Nosil, Harmon & Seehausen, 2009), η αδυναμία εντοπισμού φυλετικής απομόνωσης μεταξύ των εξεταζόμενων πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς δεν συνεπάγεται ότι οι διαδικασίες ειδογένεσης δεν είναι σε εξέλιξη.

9.2. Πρακτικές εφαρμογές των αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα του Κεφαλαίου 3 υποδεικνύουν ότι πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς απαντώνται στο σύνολο της ηπειρωτικής και της νησιωτικής Ελλάδας όπου υπάρχουν φυτά-ξενιστές του εντόμου. Παρότι υπάρχει παραλλακτικότητα στα ποσοστά προσβολής των κερασιών μεταξύ των περιοχών ανά έτος, τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν ότι η ζημιά στην ελληνική παραγωγή κερασιών είναι δυνητικά πολύ μεγάλη. Επίσης, η δυνατότητα των νυμφών (ακόμα κι αυτών που προέρχονται από σχετικά ψυχρές περιοχές) να περατώνουν τη διάπαιση ακόμα κι όταν επικρατούν σχετικά υψηλές θερμοκρασίες ($\leq 10^{\circ}\text{C}$) κατά τη διάρκεια της περιόδου διαχείμασης υποδεικνύει ότι οι πληθυσμοί του εντόμου θα συνεχίσουν να απειλούν την παραγωγή κερασιών (και άλλων ξενιστών οικονομικής σημασίας, όπως τα βύσσινα) παρά την αναμενόμενη αύξηση της θερμοκρασίας λόγω κλιματικής αλλαγής (Κεφάλαιο 4). Επομένως, θεωρείται απαραίτητος ο σχεδιασμός και η εφαρμογή προγραμμάτων

ολοκληρωμένης καταπολέμησης του εντόμου βάσει της φαινολογίας, της δυναμικής και της συμπεριφοράς των πληθυσμών σε κάθε περιοχή.

Η φαινολογία των ενήλικων πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς επηρεάζεται από τους παράγοντες που καθορίζουν την περάτωση της διάπαυσης και τη μεταδιαπαυτική εξέλιξη των νυμφών σε κάθε περιοχή. Τα αποτελέσματα των Κεφαλαίων 4 & 5 επιβεβαιώνουν την παρουσία γεωγραφικής παραλλακτικότητας στις τιμές των παραμέτρων διάπαυσης, βάσει της οποίας επιτυγχάνεται ο συγχρονισμός της εξόδου των ενηλίκων με τη φαινολογία των τοπικών καρπών-ξενιστών (κεράσια, βύσσινα). Περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η θερμοκρασία και η διάρκεια διαχείμασης, θα πρέπει να συνεκτιμούνται κατά τη δημιουργία μοντέλων πρόβλεψης της εξόδου των ενηλίκων στον αγρό για τις περιοχές μελέτης. Όμως, η διάπαυση της ραγολέτιδας της κερασιάς είναι μια ιδιαίτερα δυναμική διαδικασία που αναφέρεται στην τοπική προσαρμογή στα κλιματικά και γεωγραφικά χαρακτηριστικά των ενδιαιτημάτων (διάπαυση ενός έτους) και στη δυνατότητα έκφρασης στρατηγικών 'bet-hedging' λόγω πλαστικότητας (Κεφάλαιο 4). Οι 'bet-hedging' στρατηγικές στοχεύουν στην αντιμετώπιση των απρόβλεπτων ετήσιων μεταβολών της θερμοκρασίας 'μεταφέροντας' στο επόμενο έτος (έτη) όλα εκείνα τα άτομα ενός πληθυσμού που 'απέτυχαν' να ενηλικιωθούν (παρατεταμένη διάπαυση) ή 'επέλεξαν' να μη δώσουν ενήλικα ('επιστροφή' σε εποχική αδράνεια) κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους. Επομένως, η πλαστική συμπεριφορά των ατόμων της ραγολέτιδας της κερασιάς σχετίζεται με το μέγεθος του ενήλικου πληθυσμού που αναμένεται να προσβάλει τα κεράσια (και λοιπούς ξενιστές) σε μια συγκεκριμένη περιοχή και έτος. Πρακτικά, προσβολές από τη ραγολέτιδα της κερασιάς αναμένονται δυνητικά κάθε έτος σε μια περιοχή, ακόμα κι όταν η καταπολέμηση του εντόμου ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματική κατά το προηγούμενο έτος. Ωστόσο, παράγοντες που δεν έχουν ακόμα μελετηθεί, όπως η θνησιμότητα των νυμφών κατά τη διάρκεια της διαχείμασης στον αγρό λόγω π.χ. φυσικών εχθρών ή εξαντλήσεως ενεργειακών αποθεμάτων, ενδέχεται να είναι καθοριστικοί για το μέγεθος του πληθυσμού των ενηλίκων ατόμων με βιολογικό κύκλο μεγαλύτερο του έτους. Φαίνεται επομένως ότι η πιθανή παρουσία των 'bet-hedger' ατόμων που δρουν ως ασφαλιστική δικλείδα επιβίωσης θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά τον καθορισμό του μεγέθους της προσβολής των καλλιεργειών σε ένα πρόγραμμα ολοκληρωμένης καταπολέμησης, παρότι το μέγεθος του πληθυσμού τους είναι δύσκολο να προσδιοριστεί με ακρίβεια με βάση τη διαθέσιμη γνώση σήμερα.

Η εκτίμηση των παραμέτρων των πινάκων ζωής διαφορετικών πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάπτυξη πληθυσμιακών προτύπων εξειδικευμένων για κάθε περιοχή. Στα Κεφάλαια 6-7 προσδιορίσαμε τις δημογραφικές παραμέτρους ενηλίκων που προέρχονταν από γεωγραφικά απομονωμένους πληθυσμούς με διαφορετικά επίπεδα γονιδιακής ροής ή/και οικολογικά χαρακτηριστικά ενδαιτημάτων ή διέφεραν ως προς τον τύπο διάπαυσης των νυμφών. Καταγράφηκε σημαντική γεωγραφική παραλλακτικότητα στις παραμέτρους επιβίωσης και αναπαραγωγής, ακόμα κι όταν οι πληθυσμοί συνδέονταν με υψηλά επίπεδα γονιδιακής ροής. Όμως, τα θηλυκά 'bet-hedgers' άτομα ενός πληθυσμού χαρακτηρίζονταν από χαμηλό αναπαραγωγικό δυναμικό. Επομένως, κατά τη δημιουργία πινάκων ζωής θα πρέπει να συνυπολογίζεται η συνύπαρξη ατόμων που διαφέρουν ως προς τις τιμές των δημογραφικών παραμέτρων των ενηλίκων, και ειδικότερα της αναπαραγωγής, η οποία σχετίζεται άμεσα με την αύξηση και τη δυναμική του πληθυσμού σε μια περιοχή (Vargas & Carey, 1989).

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, εκτός από τη συμβολή τους στην ολοκληρωμένη αντιμετώπιση του εντόμου, αναδεικνύουν παράλληλα τη ραγολέτιδα της κερασιάς ως οργανισμό-μοντέλο για τη μελέτη της εξελικτικής βιολογίας των μονοκυκλικών εντόμων. Συγκεκριμένα, οι πληθυσμοί της ραγολέτιδας της κερασιάς χαρακτηρίζονται από μια ιδιόμορφη συνύπαρξη οικοτύπων (ecotypes), δηλ. γεωγραφικά διακριτών ομάδων ατόμων που έχουν προσαρμοστεί στις τοπικές συνθήκες των ενδαιτημάτων, και περιβαλλοντικών τύπων (envirotypes), δηλ. ατόμων που διαφοροποιούνται φαινοτυπικά (φαινοτυπική πλαστικότητα) λόγω περιβαλλοντικών επιδράσεων (Lowry, 2012). Η παρουσία οικοτύπων και περιβαλλοντικών τύπων στους πληθυσμούς της ραγολέτιδας της κερασιάς επιτρέπει τον προσδιορισμό του ρόλου της τοπικής προσαρμογής και της φαινοτυπικής πλαστικότητας στην επιβίωση και την εξέλιξη των μονοκυκλικών ειδών εντόμων. Επίσης, παρά τη σημαντική γεωγραφική παραλλακτικότητα στις βιολογικές παραμέτρους της ραγολέτιδας της κερασιάς, δεν παρατηρήθηκε προσυζευκτική απομόνωση μεταξύ των πληθυσμών του εντόμου (Κεφάλαιο 8), καθιστώντας εφικτή τη μελέτη των εξελικτικών διαδικασιών της ειδογένεσης κατά τα αρχικά της στάδια.

9.3. Προοπτικές περαιτέρω έρευνας

Αν και η πρόοδος που έχει επιτευχθεί τα τελευταία χρόνια στη μελέτη της γενετικής δομής και των βιολογικών χαρακτηριστικών της ραγολέτιδας της κερασιάς είναι ιδιαίτερα σημαντική, οι πληθυσμοί του εντόμου παραμένουν λιγότερο καλά μελετημένοι, συγκριτικά με αυτούς άλλων ειδών της οικογένειας Tephritidae με οικονομική σημασία για τη χώρα μας, όπως η μύγα της Μεσογείου και ο δάκος της ελιάς. Εστιάζοντας στην αντιμετώπιση του εντόμου, χρειάζονται περαιτέρω μελέτες σχετικά με τον προσδιορισμό της έντασης της προσβολής ανά περιοχή ή/και φυτό-ξενιστή και των παραγόντων που την επηρεάζουν, ειδικότερα για τις περιοχές όπου η καλλιέργεια της κερασιάς έχει οικονομική σημασία. Για παράδειγμα, συνηθίζεται συστηματική παρακολούθηση της πορείας πτήσης των ενηλίκων με παγίδες *Rebell*[®] μαζί με δειγματοληψίες καρπών και παράλληλη καταγραφή των κλιματικών δεδομένων (θερμοκρασία, υγρασία, βροχοπτώσεις) σε κάθε περιοχή, προκειμένου να προσδιοριστεί η διακύμανση των ποσοστών προσβολής ανά έτος και περιοχή και να διευκρινιστεί ο ρόλος των εκάστοτε περιβαλλοντικών μεταβολών στο μέγεθος του πληθυσμού του εντόμου.

Επιπρόσθετα, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση της σχέσης της τοπικής προσαρμογής και της φαινοτυπικής πλαστικότητας κατά την περάτωση της υποχρεωτικής διάπαυσης και την έκφραση βιολογικών κύκλων μεγαλύτερου του έτους για να απαντηθούν ερωτήματα σχετικά με τη φαινολογία των ενηλίκων στον αγρό αλλά και την προσαρμογή γενικότερα των πληθυσμών σε διαφορετικά οικολογικά περιβάλλοντα υπό την επίδραση της κλιματικής αλλαγής. Χαρακτηριστικά απαιτούνται: α) η μελέτη της περάτωσης της διάπαυσης της ραγολέτιδας της κερασιάς γενετικά απομονωμένων ή μη πληθυσμών του εντόμου από ένα ευρύτερο φάσμα ενδαιτημάτων μετά από έκθεση σε ένα εύρος υψηλών θερμοκρασιών για ποικίλα χρονικά διαστήματα, β) η μελέτη της επίδρασης επιπρόσθετων περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως η υγρασία και η φωτοπερίοδος, στην περάτωση της διάπαυσης των νυμφών που προέρχονται από πληθυσμούς με διαφορετικά γενετικά ή/και οικολογικά χαρακτηριστικά και γ) ο προσδιορισμός των απαιτήσεων σε χαμηλές και υψηλές θερμοκρασίες για την ενηλικίωση των ατόμων που προέρχονται από νύμφες με βιολογικό κύκλο μεγαλύτερου του έτους (παρατεταμένη διάπαυση ή 'επιστροφή' σε εποχική αδράνεια). Η έρευνα πρέπει επίσης να εστιαστεί στις αλλαγές στο μεταβολισμό και στον τρόπο ρύθμισης των ενεργειακών αποθεμάτων των νυμφών που εισέρχονται σε παρατεταμένη διάπαυση ή 'επιστρέφουν' σε εποχική αδράνεια, προκειμένου να εκτιμηθούν σε φυσιολογικό επίπεδο

οι επιπτώσεις της επιμήκυνσης του βιολογικού κύκλου στο στάδιο της νύμφης και να αξιολογηθεί η ενεργειακή κατάσταση των ενηλίκων που τελικά προκύπτουν.

Σχετικά με τη γεωγραφική παραλλακτικότητα στα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς, χρειάζονται περισσότερες συγκριτικές δημογραφικές μελέτες χρησιμοποιώντας πληθυσμούς που διαφέρουν ή μη γενετικά ή/και οικολογικά. Σε επίπεδο πληθυσμού, συνιστάται να διερευνηθούν περαιτέρω οι επιπτώσεις της επιμήκυνσης του βιολογικού κύκλου στα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ενηλίκων περισσότερων πληθυσμών που εξέρχονται μετά από διαφορετικά διαστήματα παρατεταμένης έκθεσης σε χαμηλές θερμοκρασίες ή μετά από διαφορετικής διάρκειας έκθεση σε κύκλους υψηλών/χαμηλών θερμοκρασιών.

Αξιοποιώντας τις τελευταίες εξελίξεις στην ταυτοποίηση των στελεχών της *Wolbachia* στους πληθυσμούς της ραγολέτιδας της κερασιάς, καθίσταται εφικτή η ταυτοποίηση περισσότερων στελεχών του βακτηρίου στους ελληνικούς πληθυσμούς. Η 'χαρτογράφηση' των στελεχών της *Wolbachia* σε όσο το δυνατόν περισσότερους πληθυσμούς του εντόμου αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την αξιολόγηση της δυνατότητας της εφαρμογής της τεχνικής του ασύμβατου εντόμου (Bourtzis, 2008) με τη χρήση γηγενών ή μη πληθυσμών του εντόμου στη χώρα μας. Παράλληλα, θα πρέπει να προσδιοριστεί ο ρόλος της *Wolbachia* στην πρόκληση προσυζευκτικής απομόνωσης μεταξύ των επιθυμητών πληθυσμών ώστε να αποφευχθούν αστοχίες σύζευξης κατά την εξαπόλυση των εντόμων στον αγρό.

Παρότι δεν βρέθηκε προσυζευκτική απομόνωση μεταξύ των εξεταζόμενων πληθυσμών, συνιστάται, στο βαθμό που αυτό είναι εφικτό, η διενέργεια πειραμάτων συμπεριφοράς σύζευξης σε συνθήκες αγρού ως προέκταση των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στις ελεγχόμενες συνθήκες εργαστηρίου. Επίσης, χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για την ανίχνευση πιθανών μηχανισμών αναπαραγωγικής απομόνωσης μετασυζευκτικού τύπου που απαντώνται πριν και μετά τη δημιουργία του ζυγωτού χρησιμοποιώντας περισσότερους γεωγραφικά απομονωμένους πληθυσμούς της ραγολέτιδας της κερασιάς. Δεδομένου ότι ο τύπος διάπαυσης (ενός έτους ή παρατεταμένη) των ατόμων ενός πληθυσμού μπορεί να επηρεάζει τη συμπεριφορά σύζευξης, χρειάζεται περαιτέρω έρευνα σχετικά με την αναπαραγωγική συμβατότητα των ενηλίκων ενός πληθυσμού που εξέρχονται από νύμφες με διαφορετικό τύπο διάπαυσης.

Τέλος, για να κατανοηθεί σε βάθος η εξέλιξη των βιολογικών χαρακτηριστικών της ραγολέτιδας της κερασιάς, είναι απαραίτητο να αξιοποιηθούν τα νέα επιτεύγματα

στις τεχνικές αλληλούχισης του DNA σε συνδυασμό με τα εξελεγμένα στατιστικά πακέτα. Σε αυτό το πλαίσιο, συνιστάται: α) η ταυτοποίηση των γονιδίων που εκφράζονται κατά την τοπική προσαρμογή των πληθυσμών αλλά και κατά την ανταπόκριση στα διάφορα περιβαλλοντικά ερεθίσματα και β) ο προσδιορισμός των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την έκφραση των διαφορετικών τύπων εποχικής αδράνεια.

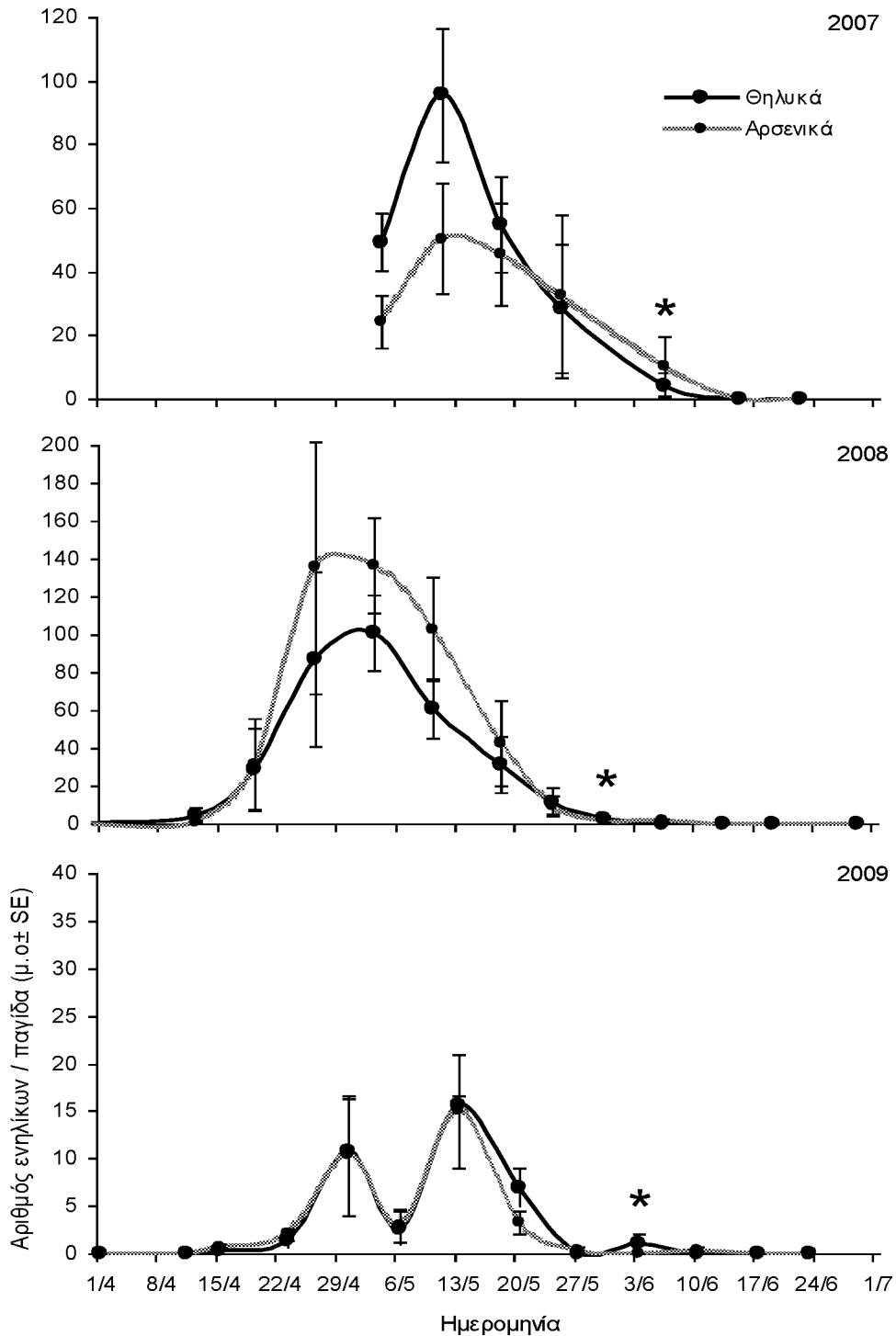
Βιβλιογραφία

Bourtzis K. 2008. *Wolbachia*-based technologies for insect pest population control. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **627**: 104-113.

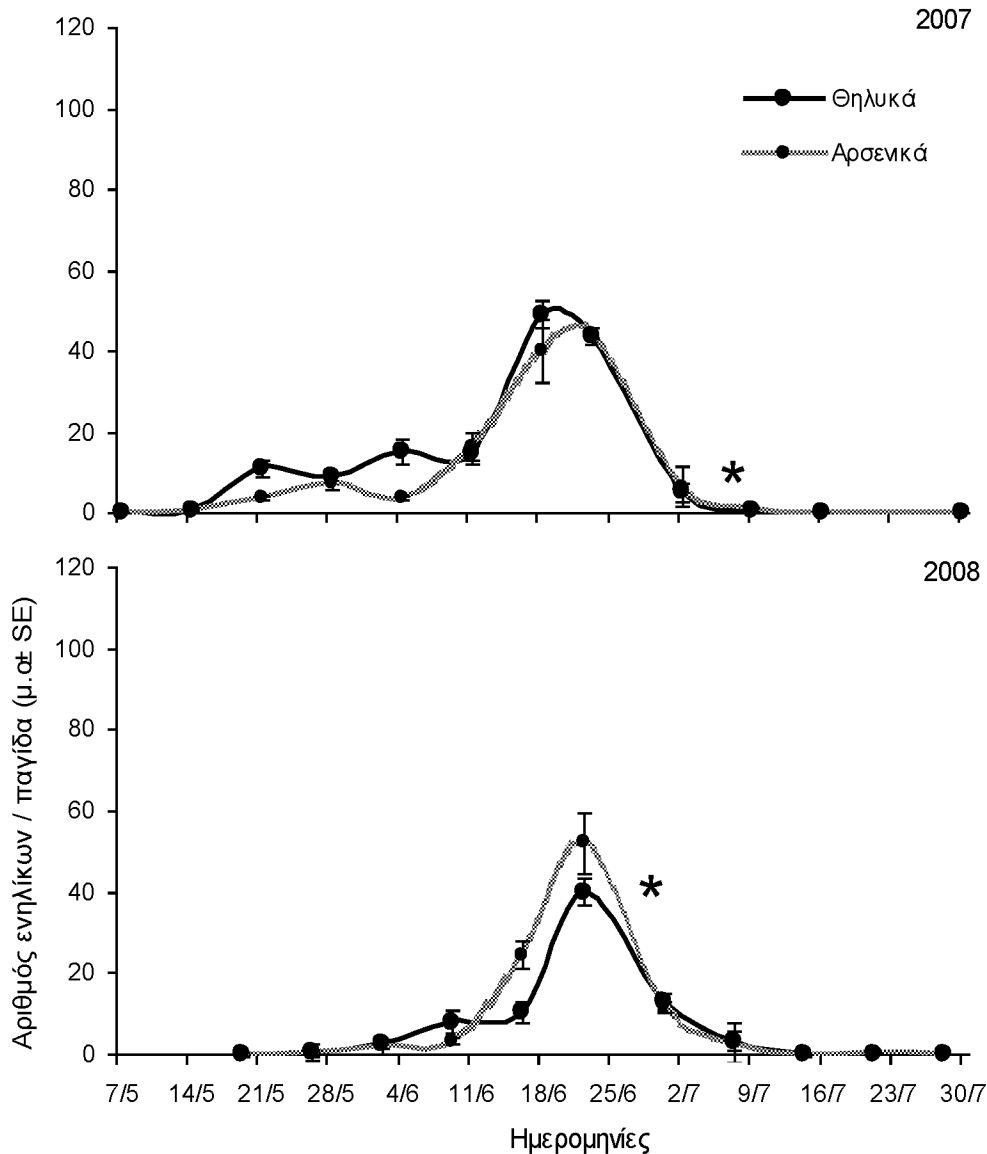
Lowry DB. 2012. Ecotypes and the controversy over stages in the formation of new species. *Biological Journal of the Linnean Society* **106**: 241-257.

Nosil P, Harmon LJ, Seehausen O. 2009. Ecological explanations for (incomplete) speciation. *Trends in Ecology and Evolution* **24**: 145-156.

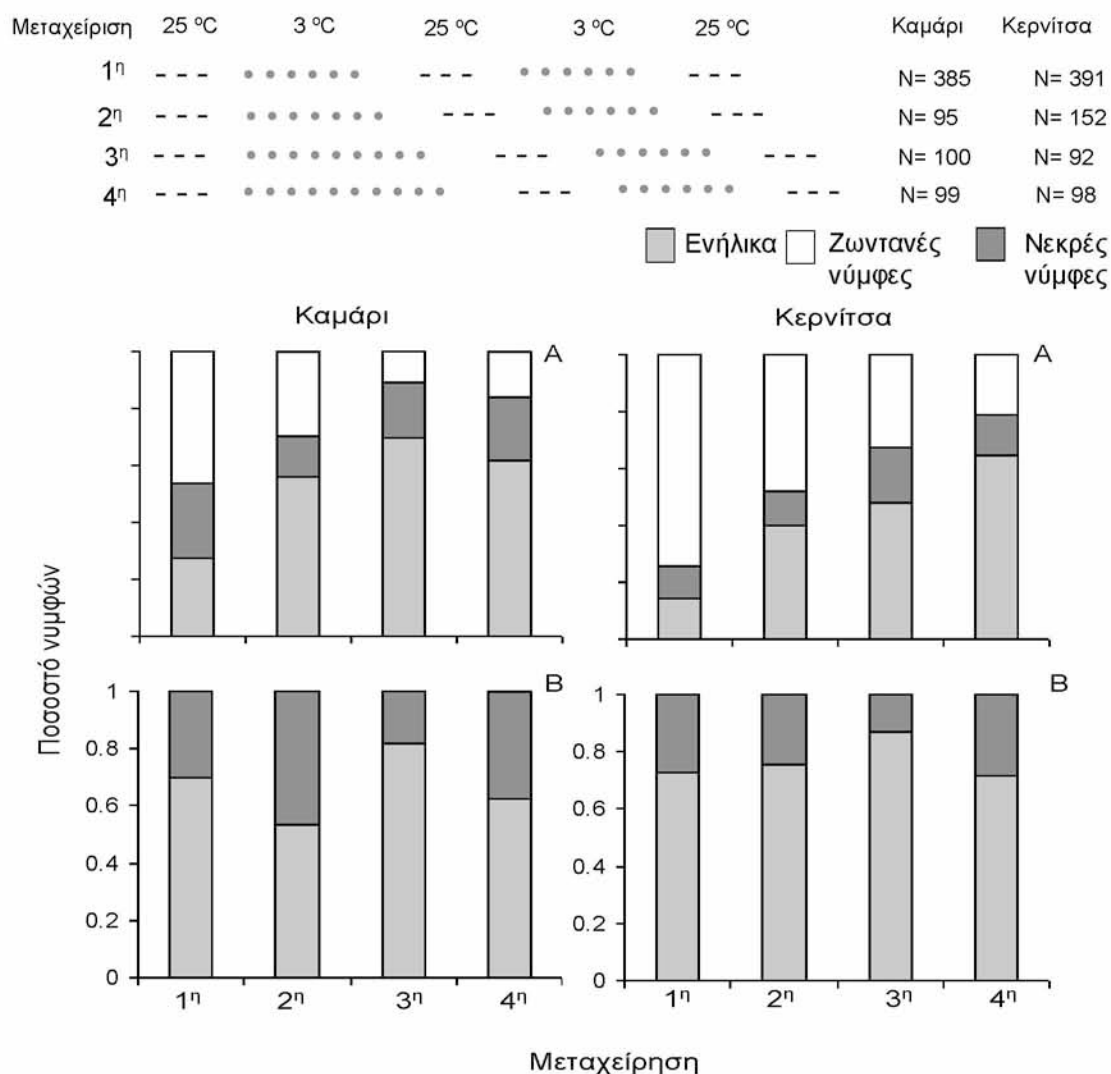
Vargas RI, Carey JR. 1989. Comparison of demographic parameters for wild and laboratory-adapted Mediterranean fruit fly (Diptera, Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America* **82**:55–59.



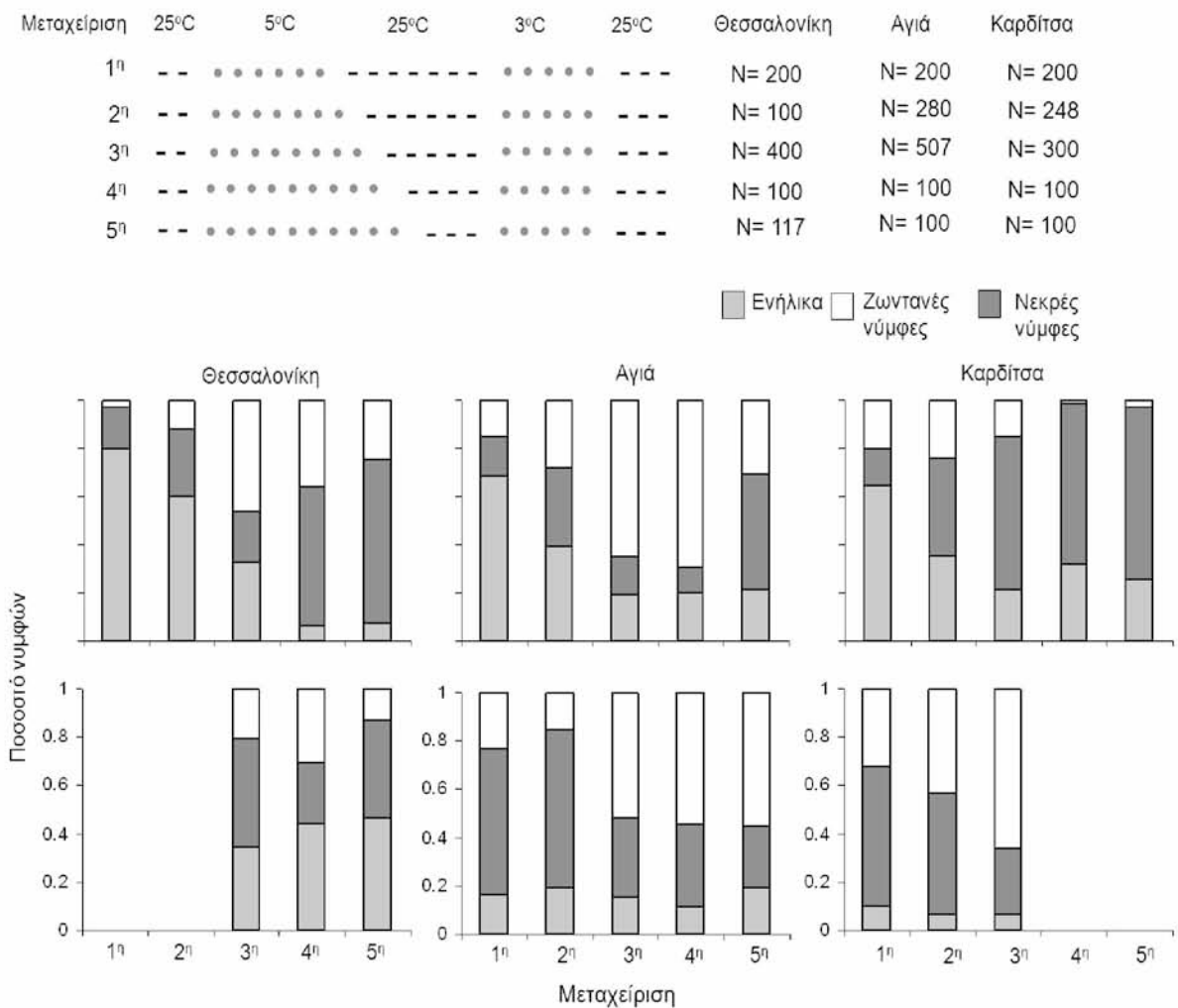
Διάγραμμα 1Π. Πορεία συλλήψεων ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς σε κίτρινες κολλητικές παγίδες Rebell® που αναρτήθηκαν σε τρεις κερασιές στην περιοχή των Καλών Νερών κατά την τριετία 2007-2009. Με αστεράκι σημειώνεται η ημερομηνία συλλογής των κερασιών για προσδιορισμό του ποσοστού προσβολής.



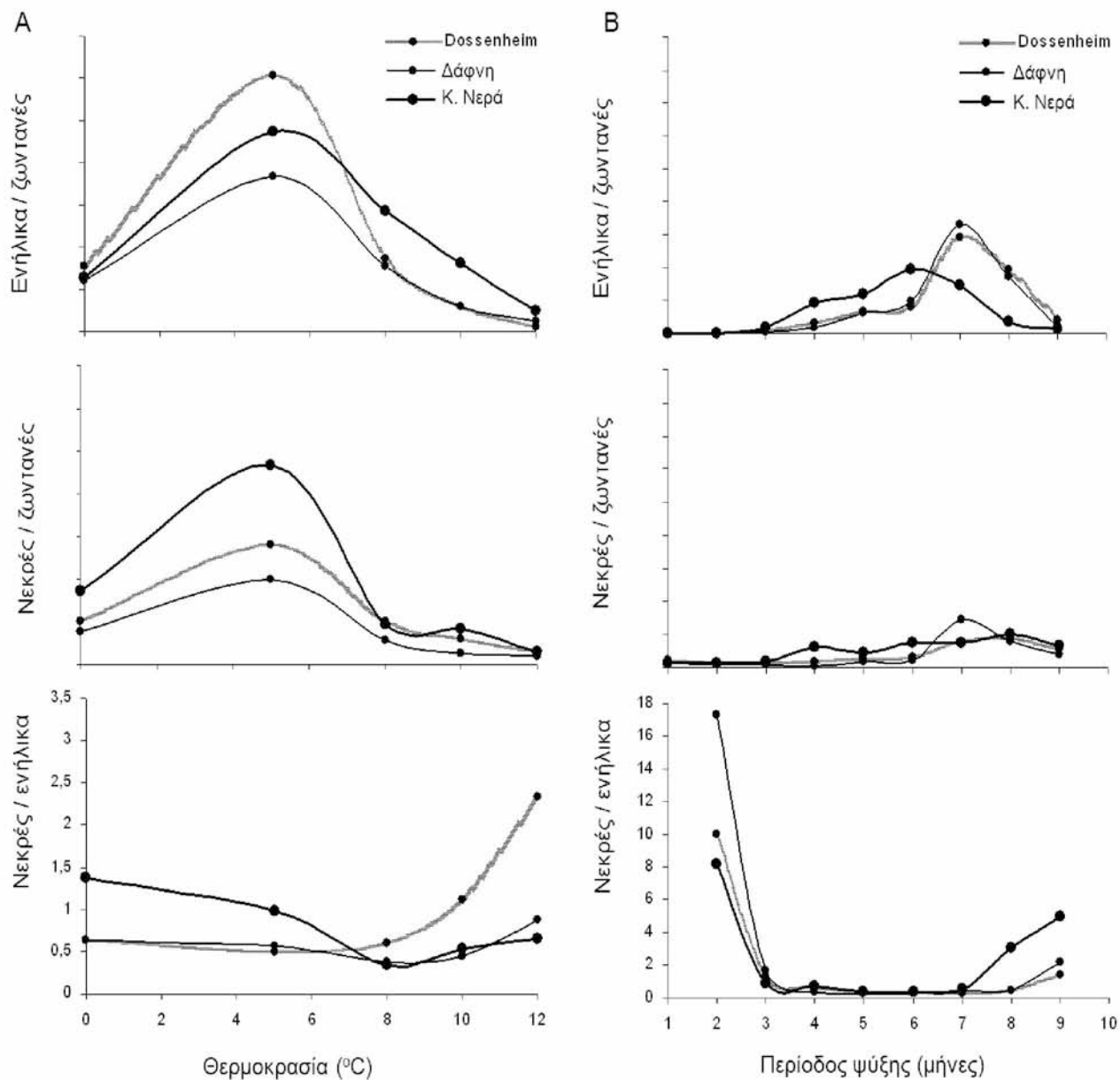
Διάγραμμα 2Π. Πορεία συλλήψεων ενηλίκων της ραγολέτιδας της κερασιάς σε κίτρινες κολλητικές παγίδες Rebell® που αναρτήθηκαν σε τρεις κερασιές στην περιοχή της Δάφνης κατά τα έτη 2007 και 2008. Με αστεράκι σημειώνεται η ημερομηνία συλλογής των κερασιών για προσδιορισμό του ποσοστού προσβολής.



Διάγραμμα 3Π. Επίδραση διαφορετικών συνδυασμών θερμών/ψυχρών περιόδων στο ποσοστό των νυμφών που δίνουν ενήλικα, πεθαίνουν ή παραμένουν ζωντανές μετά από ένα (A) και δύο κύκλους (B) θερμών/ψυχρών περιόδων και προέρχονται από Ελληνικούς πληθυσμούς της ραγολέτιδας της κερασιάς από την περιοχή του Καμαρίου (Μαγνησία, Θεσσαλία) και της Κερνίτσας (Αχαΐα, Πελοπόννησος). Η διάρκεια της πρώτης έκθεσης σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι μικρότερη από αυτή που απαιτείται για να επιτευχθεί το μέγιστο της εξόδου των ενηλίκων, οπότε οι νύμφες που παραμένουν ζωντανές εισέρχονται σε παρατεταμένη διάπαυση. Η κάθε μεταχείριση παριστάνεται γραφικά με μαύρες γραμμές και γκρι κύκλους. Η κάθε γραμμή και κύκλος αντιστοιχεί σε ένα μήνα έκθεσης σε υψηλές (25°C) και χαμηλές θερμοκρασίες (3°C), αντίστοιχα. N είναι ο αριθμός των νυμφών που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε μεταχείριση.



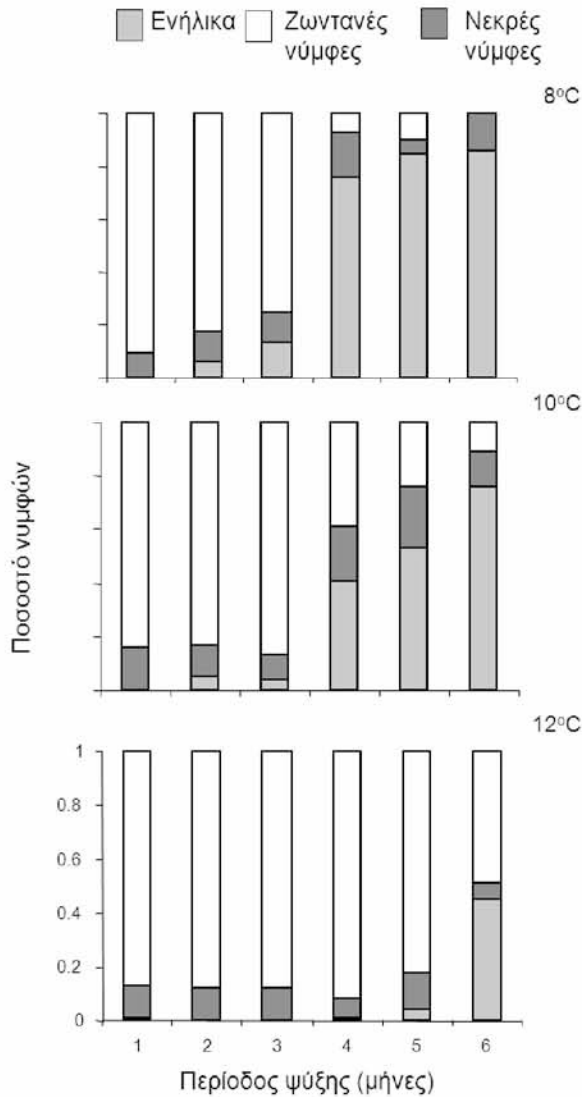
Διάγραμμα 4F. Επίδραση διαφορετικών συνδυασμών θερμών/ψυχρών περιόδων στο ποσοστό των νυμφών που δίνουν ενήλικα, πεθαίνουν ή παραμένουν ζωντανές μετά από έναν (Α) και δύο κύκλους (Β) θερμών/ψυχρών περιόδων και προέρχονται από Ελληνικούς πληθυσμούς της ραγολέτιδας της κερασιάς από την περιοχή της Μακεδονίας (Θεσσαλονίκη) και της Θεσσαλίας (Αγιά Λάρισας και Καρδίτσα). Η διάρκεια της πρώτης έκθεσης σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι μεγαλύτερη από αυτή που απαιτείται για να επιτευχθεί το μέγιστο της εξόδου των ενηλίκων, οπότε οι νύμφες 'επιστρέφουν' σε εποχική αδράνεια. Η κάθε μεταχείριση παριστάνεται γραφικά με μαύρες γραμμές και γκρι κύκλους. Η κάθε γραμμή και κύκλος αντιστοιχεί σε ένα μήνα έκθεσης σε υψηλές (25°C) και χαμηλές θερμοκρασίες (3 - 5°C), αντίστοιχα. N είναι ο αριθμός των νυμφών που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε μεταχείριση.



Διάγραμμα 5Π. Γραφική παράσταση της αναλογίας: α) των νυμφών που έδωσαν ενήλικα ως προς τις νύμφες που παρέμειναν ζωντανές, β) των νεκρών νυμφών ως προς τις νύμφες που παρέμειναν ζωντανές και γ) των νεκρών νυμφών ως προς τις νύμφες που έδωσαν ενήλικα μετά από έκθεση σε πέντε χαμηλές θερμοκρασίες ανεξάρτητα από το διάστημα έκθεσης (0, 5, 8, 10 και 12°C) (A) και για εννέα διαφορετικές περιόδους που κυμαίνονταν από ένα έως εννέα μήνες ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία (B). Οι νύμφες προέρχονταν από πληθυσμούς της ραγολέτιδας της κερασιάς από περιοχές του Dossenheim, της Δάφνης Κοζάνης και των Καλών Νερών Μαγνησίας.

Πίνακας 1Π. Μεταβλητές της πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης για την επίδραση της θερμοκρασίας, του πληθυσμού και της περιόδου ψύξης στο ποσοστό των νυμφών της ραγολέτιδας της κερασιάς που ενηλικιώθηκαν, πέθαναν ή παρέμειναν ζωντανές. Ο πληθυσμός του Dossenheim αποτελεί τον πληθυσμό αναφοράς.

Παράγοντας	Πηγή παραλλακτικότητας	β	Τυπικό		
			σφάλμα	Expr(B)	P.
Ενήλικα/ζωντανές	Θερμοκρασία	-0.153	0.021	0.858	P < 0.001
	Δάφνη	-0.854	0.230	0.426	P < 0.001
	Καλά Νερά	0.229	0.221	1.257	P = 0.300
	Περίοδος ψύξης	0.462	0.034	1.587	P < 0.001
	Δάφνη * περίοδος ψύξης	0.074	0.037	1.077	P = 0.048
	Καλά Νερά * περίοδος ψύξης	-0.065	0.036	0.937	P = 0.075
	Θερμοκρασία *περίοδος ψύξης	0.012	0.004	1.012	P = 0.001
	Δάφνη * θερμοκρασία	0.054	0.016	1.055	P = 0.001
	Καλά Νερά * θερμοκρασία	0.082	0.016	1.085	P < 0.001
Νεκρές/ζωντανές	Θερμοκρασία	0.001	0.020	1.001	P = 0.952
	Δάφνη	-0.779	0.236	0.459	P < 0.001
	Καλά Νερά	0.073	0.220	1.076	P = 0.740
	Περίοδος ψύξης	0.314	0.036	1.369	P < 0.001
	Δάφνη * περίοδος ψύξης	0.093	0.039	1.098	P = 0.016
	Καλά Νερά * περίοδος ψύξης	0.126	0.037	1.135	P = 0.001
	Θερμοκρασία *περίοδος ψύξης	-0.019	0.004	0.981	P < 0.001
	Δάφνη * θερμοκρασία	-0.009	0.017	0.991	P = 0.608
	Καλά Νερά * θερμοκρασία	-0.034	0.017	0.966	P = 0.040
Νεκρές/ενήλικα	Θερμοκρασία	0.083	0.020	1.087	P < 0.001
	Δάφνη	-0.479	0.213	0.620	P = 0.025
	Καλά Νερά	-1.152	0.189	0.316	P < 0.001
	Περίοδος ψύξης	-0.197	0.034	0.821	P < 0.001
	Δάφνη * περίοδος ψύξης	0.060	0.039	1.062	P = 0.124
	Καλά Νερά * περίοδος ψύξης	0.255	0.035	1.291	P < 0.001
	Θερμοκρασία *περίοδος ψύξης	-0.029	0.004	0.971	P < 0.001



Διάγραμμα 6Π. Επίδραση σχετικά υψηλών θερμοκρασιών (8 °C, 10 °C και 12°C) στο ποσοστό των νυμφών της ραγολέτιδας της κερασιάς που δίνουν ενήλικα, πεθαίνουν ή παραμένουν ζωντανές (σε παρατεταμένη διάπαυση) και προέρχονται από πληθυσμό του εντόμου από την περιοχή της Αγιάς Λάρισας (Θεσσαλία, Ελλάδα). Για τη συλλογή των νυμφών και την περάτωση της διάπαυσης ακολουθήθηκαν οι διαδικασίες που περιγράφονται στο Κεφάλαιο 2 και στην ενότητα 'Υλικά και Μέθοδοι' του Κεφαλαίου 4. Φαίνεται ότι οι νύμφες από τον πληθυσμό της Αγιάς, που προέρχεται από μια περιοχή με παρόμοια γενετικά και γεωγραφικά χαρακτηριστικά με την περιοχή των Καλών Νερών, μπορούν να περατώσουν με επιτυχία τη διάπαυσή τους σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες.

Πίνακας 2Π. Μεταδιαπαιτική ανάπτυξη (ημέρες \pm SE) αρσενικών και θηλυκών ατόμων της ραγολέτιδας της κερασιάς που προέρχονταν από πέντε ελληνικούς και ένα γερμανικό πληθυσμό και εξήλθαν από νύμφες 1^{ης}, 2^{ης} και 3^{ης} περιόδου.

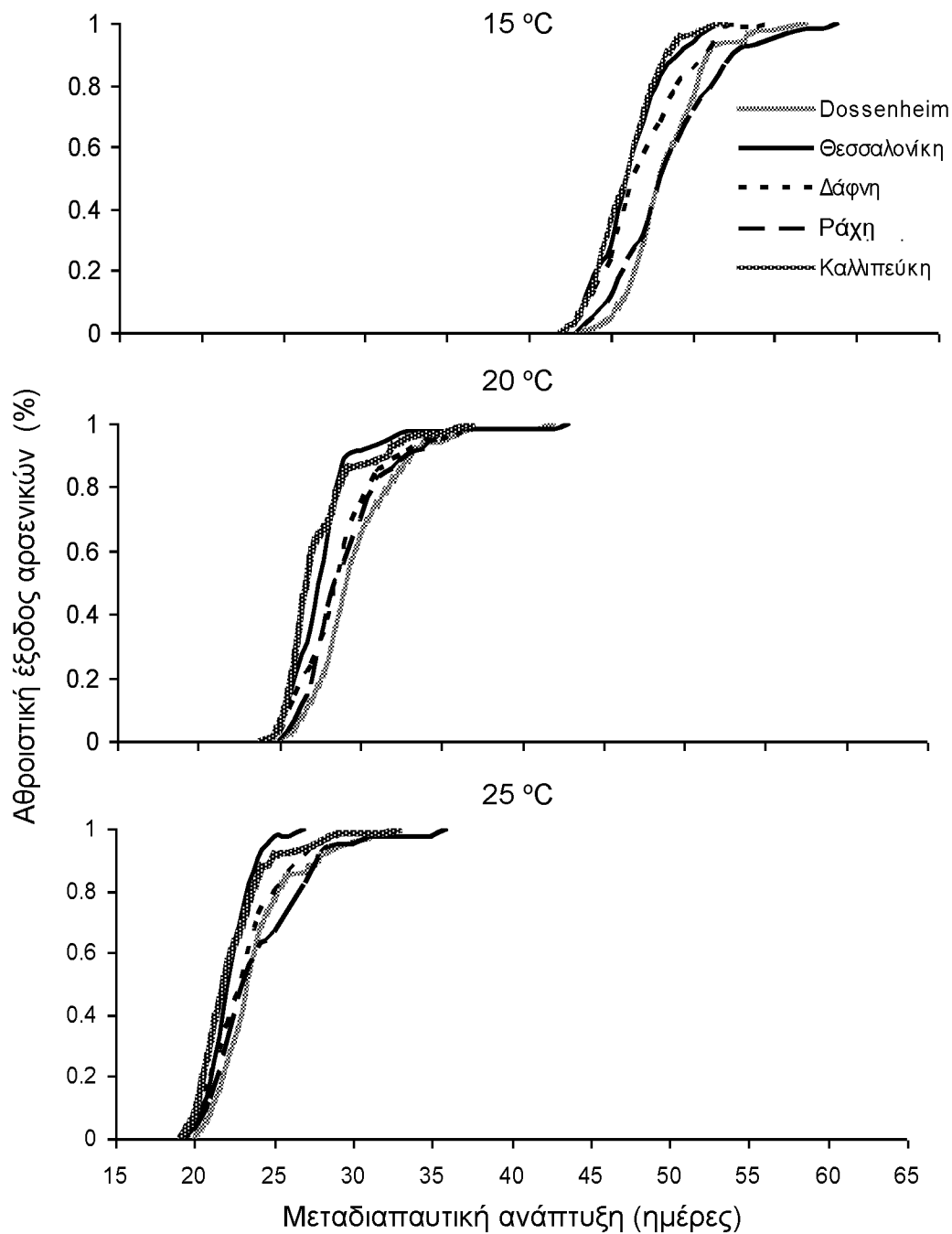
Ένταση διαπαυσης	Πληθυσμός	Αρσενικά		Θηλυκά	
		Μετα-διαπαιτική ανάπτυξη (ημέρες)		Μετα-διαπαιτική ανάπτυξη (ημέρες)	
		N	μ.ο. \pm SE	N	μ.ο. \pm SE
1 ^η περίοδος	Δάφνη	36	35.4 \pm 0.9 (24, 52) *	27	33.8 \pm 1.0 (24, 46)
	Dossenheim	21	29.9 \pm 1.2 (22, 43)	44	29.5 \pm 1.0 (19, 44)
2 ^η περίοδος	Δάφνη	179	22.2 \pm 0.2 (18, 33)	198	21.9 \pm 0.3 (18, 41)
	Dossenheim	205	20.7 \pm 0.4 (14, 36)	236	20.2 \pm 0.2 (14, 33)
3 ^η περίοδος	Δάφνη	33	16.3 \pm 0.3 (12, 20)	57	15.0 \pm 0.3 (11, 19)
	Dossenheim	38	16.9 \pm 0.4 (11, 21)	25	16.3 \pm 0.5 (10, 21)
2 ^η περίοδος	Θεσσαλονίκη	107	18.3 \pm 0.2 (15, 23)	113	18.9 \pm 0.1 (15, 21)
	Καμάρι	55	21.0 \pm 0.2 (18, 24)	71	20.1 \pm 0.1 (18, 23)
	Αγιά	59	18.5 \pm 0.2 (15, 22)	78	17.1 \pm 0.2 (12, 21)
	Καρδίτσα	64	13.5 \pm 0.3 (8, 20)	65	12.8 \pm 0.4 (8, 20)
3 ^η περίοδος	Θεσσαλονίκη	60	15.1 \pm 0.4 (11, 20)	75	14.4 \pm 0.3 (7, 20)
	Καμάρι	49	17.0 \pm 0.4 (9, 23)	46	16.0 \pm 0.3 (11, 20)
	Αγιά	87	16.7 \pm 0.3 (11, 27)	142	16.1 \pm 0.2 (9, 24)
	Καρδίτσα	94	15.9 \pm 0.5 (7, 25)	89	14.6 \pm 0.5 (7, 26)

* Σε παρένθεση δίνονται οι ημέρες για την έξοδο του πρώτου και τελευταίου ενήλικου του δείγματος.

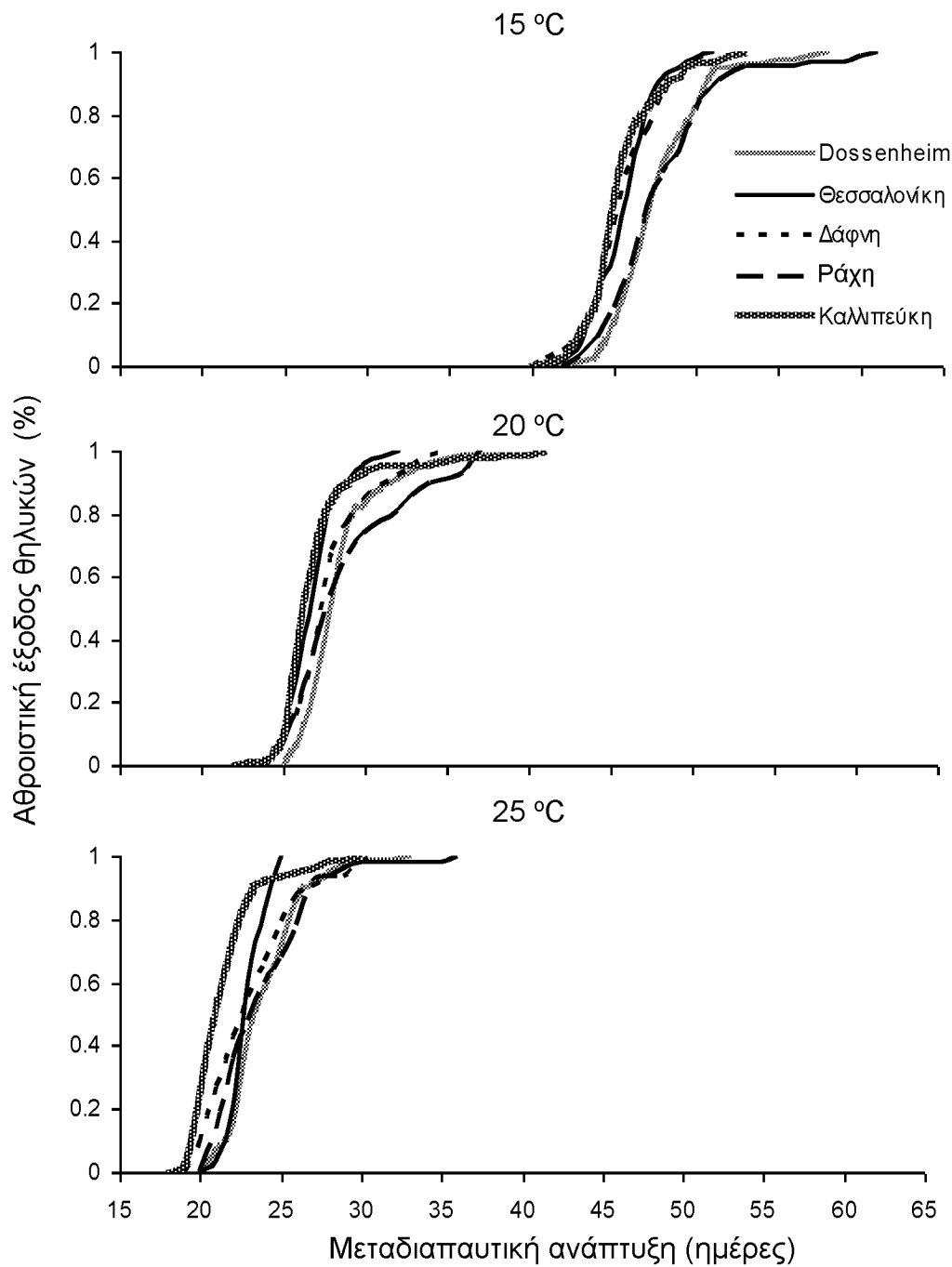
Πίνακας 3Π. Μεταδιαπαιτική ανάπτυξη (ημέρες \pm SE) αρσενικών και θηλυκών ατόμων της ραγολέτιδας της κερασιάς που προέρχονταν από πρώιμους και όψιμους πληθυσμούς με διαφορετικά επίπεδα γονιδιακής ροής. Τα ενήλικα εξήλθαν από νύμφες 2^{ης} περιόδου μετά από έκθεση σε τρεις υψηλές θερμοκρασίες (15 °C, 20 °C, 25 °C).

Θερμοκρασία	Πληθυσμός	Αρσενικά		Θηλυκά	
		Μετα-διαπαιτική ανάπτυξη (ημέρες)		Μετα-διαπαιτική ανάπτυξη (ημέρες)	
		N	μ.ο. \pm SE	N	μ.ο. \pm SE
15°C	Θεσσαλονίκη	47	46.7 \pm 0.3 (43, 52)*	59	46.0 \pm 0.2 (42, 51)
	Δάφνη	80	47.4 \pm 0.3 (43, 55)	81	46.0 \pm 0.2 (41, 51)
	Ράχη	77	46.5 \pm 0.2 (43, 52)	67	45.8 \pm 0.3 (41, 53)
	Καλλιπεύκη	60	49.1 \pm 0.4 (44, 59)	70	48.2 \pm 0.4 (43, 61)
	Dossenheim	81	48.9 \pm 0.3 (44, 57)	81	48.1 \pm 0.3 (43, 58)
20°C	Θεσσαλονίκη	45	28.2 \pm 0.3 (25, 37)	54	27.3 \pm 0.2 (25, 32)
	Δάφνη	83	29.3 \pm 0.3 (25, 37)	67	28.2 \pm 0.2 (25, 35)
	Ράχη	70	28.0 \pm 0.3 (25, 37)	96	27.3 \pm 0.3 (23, 41)
	Καλλιπεύκη	50	29.8 \pm 0.4 (26, 43)	58	29.2 \pm 0.4 (25, 37)
	Dossenheim	48	29.9 \pm 0.3 (26, 42)	80	29.2 \pm 0.3 (26, 41)
25°C	Θεσσαλονίκη	43	22.7 \pm 0.2 (20, 27)	53	22.3 \pm 0.1 (20, 24)
	Δάφνη	79	23.6 \pm 0.3 (20, 31)	63	23.6 \pm 0.3 (20, 30)
	Ράχη	77	22.7 \pm 0.2 (20, 33)	82	21.8 \pm 0.2 (19, 30)
	Καλλιπεύκη	37	24.3 \pm 0.4 (20, 29)	51	24.2 \pm 0.4 (19, 30)
	Dossenheim	66	24.4 \pm 0.3 (20, 32)	81	23.4 \pm 0.2 (21, 33)

* Σε παρένθεση δίνονται οι ημέρες για την έξοδο του πρώτου και τελευταίου ενηλίκου του δείγματος.



Διάγραμμα 7Π. Αθροιστική έξοδος αρσενικών ατόμων (%) που προέρχονταν από πρώιμους και όψιμους πληθυσμούς της ραγολέτιδας της κερασιάς με διαφορετικά επίπεδα γονιδιακής ροής και εξήλθαν από νύμφες με διάπαυση ενός έτους. Νύμφες 2^{ης} περιόδου εκτέθηκαν στους 15°C, 20°C ή 25°C για να ολοκληρώσουν τη μεταδιαπαιτική τους ανάπτυξη.



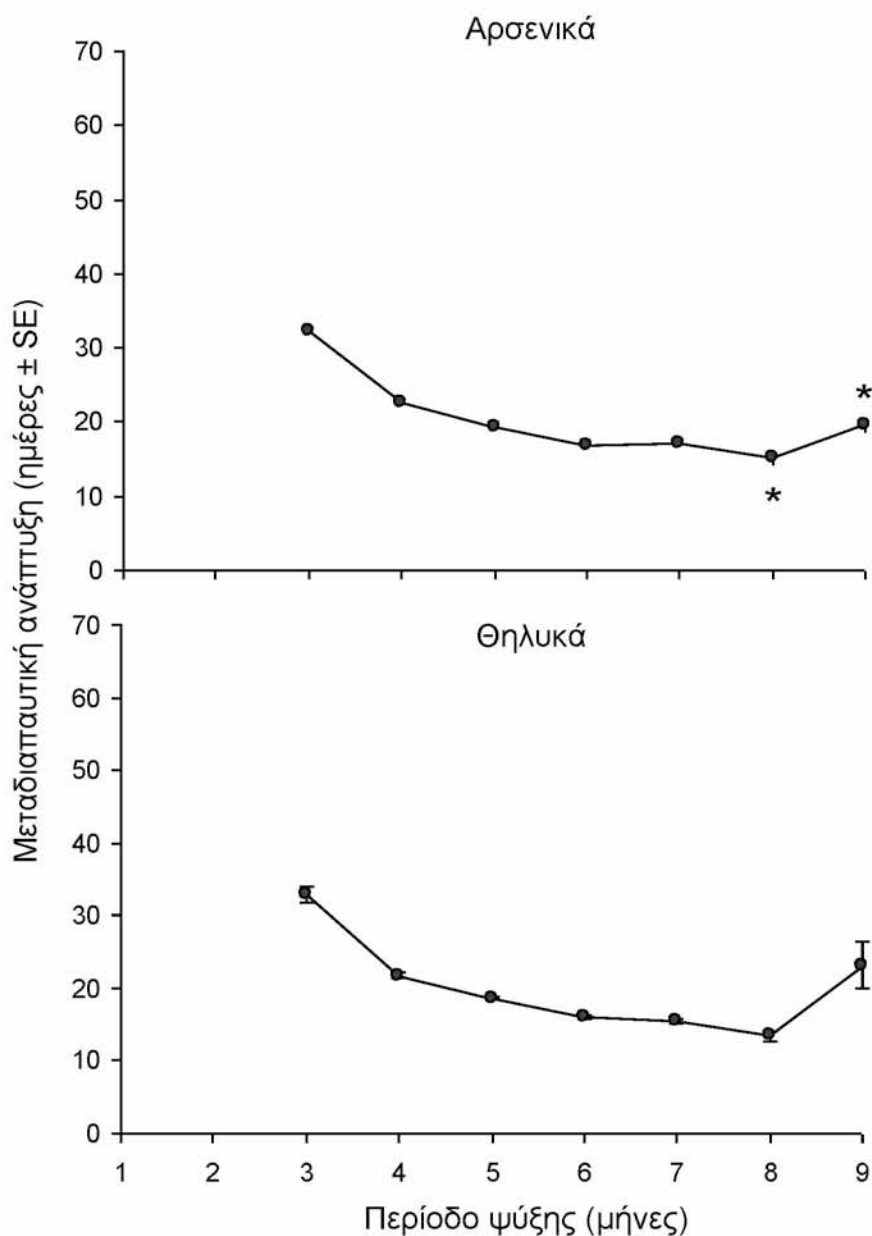
Διάγραμμα 8Π. Αθροιστική έξοδος θηλυκών ατόμων (%) που προέρχονταν από πρώιμους και όψιμους πληθυσμούς της ραγολέτιδας της κερασιάς με διαφορετικά επίπεδα γονιδιακής ροής και εξήλθαν από νύμφες με διάπαυση ενός έτους. Νύμφες 2^{ης} περιόδου εκτέθηκαν στους 15°C, 20°C ή 25°C για να ολοκληρώσουν τη μεταδιαπαιτική τους ανάπτυξη.

Πίνακας 4Π. Μεταδιαπαυτική ανάπτυξη (ημέρες \pm SE) αρσενικών και θηλυκών ατόμων της ραγολέτιδας της κερασιάς που προέρχονταν από γενετικά απομονωμένους πληθυσμούς με διαφορετική φαινολογία ενηλίκων και εξήλθαν από νύμφες με παρατεταμένη διάπαυση.

Πληθυσμός	Αρσενικά		Θηλυκά	
	Μεταδιαπαυτική ανάπτυξη (ημέρες)		Μεταδιαπαυτική ανάπτυξη (ημέρες)	
	N	μ.ο. \pm SE	N	μ.ο. \pm SE
Θεσσαλονίκη	67	22.4 \pm 0.2 (19, 27)	59	21.8 \pm 0.2 (19, 25)
Περτούλι	59	22.8 \pm 0.2 (21, 31)	58	22.2 \pm 0.3 (19, 33)
Καμάρι	51	22.2 \pm 0.1 (21, 24)	74	21.7 \pm 0.2 (19, 27)
Κερνίτσα	83	22.5 \pm 0.1 (20, 27)	128	21.8 \pm 0.1 (18, 25)

Πίνακας 5Π. Μεταβλητές του μοντέλου ανάλογων κινδύνων (μοντέλο Cox) για την επίδραση του πληθυσμού και του φύλου στη μεταδιαπαιτική ανάπτυξη των νυμφών της ραγολέτιδας της κερασιάς που προέρχονται από πρώιμους πληθυσμούς της Θεσσαλονίκης, του Καμαρίου και της Κερνίτσας και τον όψιμο πληθυσμό του Περτουλίου. Ο πληθυσμός της Κερνίτσας θεωρείται γενετικά απομονωμένος από τους υπόλοιπους πληθυσμούς. Δείγμα 260 – 390 νυμφών από κάθε πληθυσμό παρέμεινε στους $25 \pm 1^\circ\text{C}$ για περίπου 3 μήνες και έπειτα τοποθετήθηκε στους $3 \pm 1^\circ\text{C}$ για 6 μήνες. Νύμφες 1^{ης} περιόδου μεταφέρθηκαν στους $25 \pm 1^\circ\text{C}$ για να εξέλθουν τα ενήλικα. Το ποσοστό ενηλικίωσης ήταν 43%, 21%, 28% και 14% για τους πληθυσμούς της Θεσσαλονίκης, του Περτουλίου, του Καμαρίου και της Κερνίτσας, αντίστοιχα. Ο πληθυσμός από τη Κερνίτσα αποτελεί τον πληθυσμό αναφοράς. Το φύλο δεν αποτελεί σημαντικό εκτιμητή της μεταδιαπαιτικής ανάπτυξης των νυμφών ($\chi^2 = 0.721$, $df = 1$, $P = 0.396$), σε αντίθεση με τον πληθυσμό ($\chi^2 = 42.441$, $df = 3$, $P < 0.001$).

Πηγή παραλλακτικότητας	β	Τυπικό σφάλμα	Exp (B)	P
Πληθυσμός				<0.001
Θεσσαλονίκη	1.039	0.161	2.826	<0.001
Περτούλι	0.676	0.195	1.967	0.001
Καμάρι	0.762	0.172	2.142	<0.001



Διάγραμμα 9Π. Διάρκεια μεταδιαπαιτικής ανάπτυξης (ημέρες ± SE) αρσενικών και θηλυκών ατόμων της ραγολέτιδας της κερασιιάς που προέρχονταν από τον πληθυσμό των Καλών Νερών Μαγνησίας. Οι νύμφες εκτέθηκαν στους $5 \pm 1^\circ\text{C}$ για διάστημα 1-9 μηνών και έπειτα μεταφέρθηκαν στους $25 \pm 1^\circ\text{C}$ μέχρι να ολοκληρωθεί η έξοδος των ενηλίκων (Κεφάλαιο 4). Με αστεράκι σημειώνονται οι μεταχειρίσεις όπου ενηλικιώθηκαν λιγότερο από 10 άτομα. Παρατηρείται ότι, μετά από 9 μήνες έκθεσης στις χαμηλές θερμοκρασίες, η διάρκεια της μεταδιαπαιτικής περιόδου παρουσιάζει τάση αύξησης.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνοματεπώνυμο : **Μωραΐτη Κλεοπάτρα**
Διεύθυνση : Προποντίδος 11, Ν. Ιωνία Βόλου, Τ.Κ. 38445, Μαγνησία
Τηλέφωνο : (0030)6946168737, (00357)96789988
Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο : cmoraiti@gmail.com
Ημερομηνία γέννησης : 14 Ιανουαρίου 1981

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΠΕΙΡΑ

- 15/5/2012- έως σήμερα: Εξωτερικός Ερευνητικός συνεργάτης (Εντομολόγος) του Πανεπιστημίου Frederick στο πλαίσιο της υλοποίησης του έργου «*Improving the conservation status of the priority habitat type 9560* (Endemic forests with Juniperus spp.) in Cyprus*» (πρόγραμμα LIFE+).
- 28/7/2008 -4/12/2008 : Γεωπόνος στον Οργανισμό Πληρωμών και Έλεγχου Κοινοτικών Ενισχύσεων Προσ/μου και εγγυήσεων (ΟΠ.Ε.Κ.Ε.Π.Ε) Περιφερειακή Διεύθυνση Στερεάς Ελλάδας.
- 1/5/2008 – 1/11/2008: Επιστημονικός συνεργάτης στο ερευνητικό πρόγραμμα «Χωρική κατανομή και εποχική εξέλιξη των πληθυσμών της μύγας της Μεσογείου στην περιοχή των Λεχωνίων Μαγνησίας και εφαρμογές στην αντιμετώπισή της».
Φορέας χρηματοδότησης: Νομαρχιακή Αυτοδιοίκηση Νομού Μαγνησίας
Επιστημονικός υπεύθυνος: Αναπληρωτής καθηγητής κ. Ν. Τ. Παπαδόπουλος.
- 5/10/2007 -31/12/2008: Γεωπόνος ως Μελετητής-Εξωτερικός Συνεργάτης στην εταιρεία MIC Σύμβουλοι Οργάνωσης Καινοτομίας & Μάρκετινγκ.
Μελετητικά έργα : 1. « Μελέτη για καταχώρηση της ονομασίας 'Εξαιρετικό Παρθένο Ελαιόλαδο Σέλινου Κρήτης' ως Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης (ΠΟΠ) ».
2. « Διαπίστευση Κτηνιατρικών Εργαστηρίων Λάρισας, Χανίων και Ηρακλείου κατά το πρότυπο ISO17025:2005 ».
- 1/7/2005 -31/12/2006 : Γεωπόνος στα Δημοτικά διαμερίσματα του Δήμου Κάρλας Μαγνησίας.
Σύμβαση εργασίας ορισμένου χρόνου μερικής απασχόλησης.
- 2/11/2004 – 30/6/2005 : Γεωπόνος ως Μελετητής στην εταιρεία MIC Σύμβουλοι Οργάνωσης Καινοτομίας & Μάρκετινγκ.
Μελετητικά έργα : 1. «Διαπίστευση εργαστηρίων του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. κατά το πρότυπο ISO 17025:2005».
2. « Ανάπτυξη και παρακολούθηση εφαρμογής Συστήματος Ολοκληρωμένης Διαχείρισης στην ελαιοκαλλιέργεια κατά τα πρότυπα Agro 2.1 και

Agro 2.2. κατά την υλοποίηση πρότασης της Ε.Ο.Π.
ΕΛΑΙΟΥΡΓΙΚΗ στο πλαίσιο των κανονισμών Ε.Κ.».

ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΠΕΙΡΑ

1/10/2007 – 25/2/2008: Εργαστηριακός Συνεργάτης του τμήματος Φυτικής Παραγωγής – Σχολή
Τεχνολογίας Γεωπονίας – ΤΕΙ Ηπείρου.
Τομέας: Οπωροκηπευτικών – Φυτοπροστασίας.
Μαθήματα : 1. Εργαστήριο Ολοκληρωμένης Φυτοπροστασίας. 4 ώρες/εβδομάδα.
2. Εργαστήριο Ζωικών Εχθρών. 6 ώρες/εβδομάδα.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. **Μωραΐτη Κ**, Κουνατίδης Η, Σαπουντζής Π, Σιώζιος Σ, Μαυραγάνη Π, Παπαδόπουλος Ν, Μπούρτζης Κ. 2007. Το συμβιωτικό βακτήριο *Wolbachia* σε είδη της οικογένειας Tephritidae. Πρακτικά 12^ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο, Λάρνακα, Κύπρος, 13 -16 Νοεμβρίου 2007, σελ.146 – 147.
2. Sapountzis P., **Moraiti C**, Kounatidis I, Siozos S, Mavragani-Tsipidou P, Papadopoulos NT, Bourtzis K. 2008. *Wolbachia* symbiosis in Tephritidae. First Meeting of Tephritid Workers of Europe, Africa and the Middle East (TEAM), Palma of Mallorca, Spain, 7–8 April 2008, p.13.
3. **Μωραΐτη Κ**, Παπαναστασίου Σ, Διαμαντίδης Α, Κουνατίδης Η, Μαυραγάνη – Τσιπίδου Π, Μπούρτζης Κ, Παπαδόπουλος ΝΘ. 2008. Γεωγραφική κατανομή και δυναμική πληθυσμών του *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae) στην Ελλάδα. 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο των Ελληνικών Επιστημονικών Εταιρειών Οικολογίας, Ζωολογίας, Βοτανικής και Φυκολογίας, Βόλος, Ελλάδα, 9 – 12 Οκτωβρίου 2008.
4. Papadopoulos NT, **Moraiti C**, Papanastasiou S, Diamantidis A, Kounatidis I, Mavragani P, Bourtzis K, Katsoyannos BI. 2008. Geographical distribution and population dynamics of the European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae) in Greece. VII International Conference on Integrated Fruit Production, Avignon France, 27 – 30, October 2008, p.217.
5. **Μωραΐτη Κ**, Παπαδόπουλος Ν. 2009. Δημογραφικές παράμετροι ενηλίκων διαφορετικών πληθυσμών της μύγας της κερασιάς, *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae). Πρακτικά 13^ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο, Αλεξανδρούπολη, Ελλάδα, 3-6 Νοεμβρίου 2009, σελ.15 – 17.
6. **Moraiti CA**, Papadopoulos NT. 2010. Prolonged pupae diapause affects vital fitness components of *Rhagoletis cerasi* adults. 8th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, Valencia, Spain, 26th September – 1st October 2010. p.159.
7. **Μωραΐτη ΚΑ**, Μαργαριτόπουλος ΙΤ, Ζάρπας ΚΔ, Τσιτσιπής ΙΑ. Η αφίδα του αμπελιού, *Aphis illinoisensis* (Homoptera: Aphisidae): Θερμικές απαιτήσεις ανάπτυξης και δημογραφικές παράμετροι σε έξι ποικιλίες αμπελιού. Πρακτικά 14^ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο, Ναύπλιο Ελλάδα, 11-14 Οκτωβρίου 2011, σελ. 55-57.
8. **Μωραΐτη ΚΑ**, Νάκας Χ, Παπαδόπουλος ΝΘ. Επίδραση της θερμοκρασίας στην περάτωση της διάπαυσης διαφορετικών πληθυσμών της ραγολέτιδας της κερασιάς. Πρακτικά 14^ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο, Ναύπλιο Ελλάδα, 11-14 Οκτωβρίου 2011, σελ. 58-59.

9. **Moraiti CA**, Nakas CT, Papadopoulos NT. Geographic variation in diapause intensity in *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae). 2nd International Meeting of Tephritid Workers for Europe, Africa and the Middle East (TEAM), Kolymbari (Crete), Greece, 3rd July – 6st July 2012. p.37.
10. **Μωραΐτη ΚΑ**, Νάκας ΧΘ, Παπαδόπουλος ΝΘ. Παρατεταμένη εποχική αδράνεια των νυμφών της ραγολέτιδας της κερασιάς, *Rhagoletis cerasi* (Diptera:Tephritidae). Πρακτικά 15^ο Πανελληνίου Εντομολογικού Συνέδριου, Καβάλα Ελλάδα, 22-25 Οκτωβρίου 2013, σελ. 9.
11. **Μωραΐτη ΚΑ**, Καδής Κ, Σταυρινίδης ΜΧ. Καρποφάγα αρθρόποδα του είδους *Juniperus foetidissima* (Cupressaceae) της περιοχής του όρους Τρόδου, Κύπρος. Πρακτικά 15^ο Πανελληνίου Εντομολογικού Συνέδριου, Καβάλα Ελλάδα, 22-25 Οκτωβρίου 2013, σελ. 35.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. **Moraiti CA**, Margaritopoulos JT, Zarpas KD, Tsitsipis JI. 2012. The grapevine aphid, *Aphis illinoisensis* (Hemiptera: Aphididae): thermal requirements for development and its performance on six grapevine cultivars. *Bulletin of Insectology* **65**: 29-35.
2. **Moraiti CA**, Nakas CT, Köppler K, Papadopoulos NT. 2012. Geographic variation in adult life-history traits of the European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae). *Biological Journal of the Linnean Society* **107**: 137-152.
3. **Moraiti CA**, Nakas CT, Papadopoulos NT. 2012. Prolonged pupal dormancy is associated with significant fitness costs for adults of *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Insect Physiology* **58**: 1128-1135.
4. Augustinos A.A, Asimakopoulou AK, **Moraiti CA**, Mavragani-Tsipidou P, Papadopoulos NT, Bourtzis K. 2013. Microsatellite and *Wolbachia* analysis in *Rhagoletis cerasi* natural populations: population structuring and multiple infections. *Ecology and Evolution*, in press.
5. **Moraiti CA**, Nakas CT, Papadopoulos NT. 2013. Diapause termination of *Rhagoletis cerasi* pupae is regulated by local adaptation and phenotypic plasticity: escape in time through bet-hedging strategies. *Journal of Evolutionary Biology*, DOI: 10.1111/jeb.

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

26/3/2008 έως 5/12/2013 : Διδάκτωρ του Δ.Π.Μ.Σ της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τίτλος διατριβής : «Μελέτη της βιο-οικολογίας και της συμπεριφοράς διαφορετικών πληθυσμών της μύγας κερασιάς, *Rhagoletis cerasi* (Diptera:Tephritidae)».

13/10/2005 – 24/7/2007 : Μεταπτυχιακό Διατμηματικού Π.Μ.Σ. της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τίτλος Π.Μ.Σ. «Σύγχρονα συστήματα αγροτικής παραγωγής στο μεσογειακό χώρο με έμφαση στην αειφορική παραγωγή και τη χρησιμοποίηση νέων τεχνολογιών».

Κατεύθυνση : « Σύγχρονη Φυτοπροστασία».

Βαθμός: 8,51 (Άριστα).

- *Μεταπτυχιακή διατριβή: «Μελέτη της βιοικολογίας της νεοεισαχθείσας στην Ελλάδα αφίδας του αμπελιού, *Aphis illinoisensis*».* Βαθμός : 10.

6/10/1999 – 6/10/2004 : Πτυχίο Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας.

Βαθμός πτυχίου: 8,63 (Άριστα).

- *Πτυχιακή μελέτη: « Ανταγωνιστική δράση βακτηρίων κατά παθογόνων μυκήτων».* Βαθμός : 10.
- *Πρακτική εξάσκηση : 1. Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο Κηφισιάς (1/7/2002 – 19/8/2002).
2. Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γ.Π.Α. (18/7/2003 – 30/9/2003)*

Σύνολο ημερών πρακτικής εξάσκησης : 125.

1996 -1998 : 3^ο Γενικό Λύκειο Βόλου

1995-1996 : Γενικό Λύκειο Καναλιών Μαγνησίας
Βαθμός απολυτηρίου: 18.

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ / ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

30/1/2012 έως 8/10/2012: Παρακολούθηση του Εκπαιδευτικού Αντικειμένου *‘Ασφάλεια (HACCP) και ποιότητα τροφίμων: Πρότυπα ISO2200:2005 & ISO9001:2008’* του Προγράμματος Συμπληρωματικής εξ Αποστάσεως Εκπαίδευσης του ΚΕΚ του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.
Κατοχή πιστοποιητικού επιμόρφωσης.

6/7/2007 έως 8/7/2007 : Σεμινάριο *«Συστήματα Ποιότητας στην Γεωργία σύμφωνα με τα πρότυπα Agro 2.1 & 2.2 και το Πρωτόκολλο Eurepgar».*
Διάρκεια 25 ώρες (20 ώρες Agro 2.1 & 2.2).
Eurocert-ΓΕΩΤΕΕ, Λάρισα.

12/6/2006 έως 15/1/2007 : Παρακολούθηση του Εκπαιδευτικού Αντικειμένου *‘Project Management’* του Προγράμματος Συμπληρωματικής εξ Αποστάσεως Εκπαίδευσης του ΚΕΚ του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.
Κατοχή πιστοποιητικού επιμόρφωσης.

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά : Άριστη Γνώση : Certificate of Proficiency in English (Ιούνιος '03)

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΕΣ

17/1/2005 : ECDL Core Certificate.

ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ / ΒΡΑΒΕΙΑ

- 2004-2005 : Βραβείο Ι.Κ.Υ. για το ακαδημαϊκό έτος 2003-04 (5^ο έτος).
2002 : Βραβείο Καθηγητού Κωνσταντίνου Α. Νιαβή.
Βραβείο επίδοσης στα μαθήματα Μορφολογίας Φυτών και Φυσιολογίας Φυτών κατά τα ακαδημαϊκά έτη: 1999-2000 & 2000-2001.

ΑΛΛΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- Κατοχή άδειας άσκησης επαγγέλματος ΓΕΩΠΟΝΟΥ από 9/12/2004 (ΓΕΩΤΕΕ)
- Κατοχή άδειας άσκησης επαγγέλματος ΓΕΩΠΟΝΟΥ από 1/1/2011 (ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ ΓΕΩΠΟΝΩΝ ΚΥΠΡΟΥ_ΑΜ: 906)
- Κατοχή άδειας οδήγησης αυτοκινήτου.

