



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΝΔΟΣΥΜΒΙΩΤΙΚΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ  
*WOLBACHIA PIRIENSIS* ΣΕ ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ  
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΜΥΓΑΣ ΤΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΟΥ



ΣΑΡΑΚΑΤΣΑΝΟΥ ΑΦΘΟΝΙΑ

**Μεταπτυχιακή Διατριβή** που υποβλήθηκε στο τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μερική υποχρέωση για τη λήψη του Μεταπτυχιακού τίτλου Γεωπονίας

**N. ΙΩΝΙΑ ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ, 2010**



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	σελ 6
ΕΥΡΕΙΑ ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
SUMMARY	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	10
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά του εντόμου	11
1.1.2 Καταγωγή του εντόμου και γεωγραφική εξάπλωση	14
1.1.3 Ξενιστές και οικονομική σημασία του εντόμου	15
1.1.4 Βιολογία	16
1.1.5 Αντιμετώπιση	19
1.2 ΣΥΜΒΙΩΣΗ ΤΩΝ ENTOMΩΝ – ENΔΟΣΥΜΒΙΩΣΗ	32
1.2.1 Γενικά για τους συμβιωτές	32
1.2.2 Ενδοκυτταρικοί συμβιωτές	32
1.2.3 Το βακτήριο <i>Wolbachia</i>	35
1.2.4 Μορφολογική περιγραφή της <i>Wolbachia</i>	37
1.2.5 Επίδραση της <i>Wolbachia</i> στα έντομα ξενιστές της	38
1.2.6 Εφαρμογές της <i>Wolbachia</i>	45
1.2.7 <i>Wolbachia</i> και μύγα της Μεσογείου	46
1.3 Σκοπός της παρούσας εργασίας	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	50
2.1 Υλικά και Μέθοδοι	50
2.2 Συνθήκες Εργαστηρίου	50
2.3 Έντομα που χρησιμοποιήθηκαν	50
2.4 Εκτροφή εντόμων	52
2.5 Στατιστική επεξεργασία	55
2.6 Πειραματική διαδικασία	56
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	62
3.1 Αποτελέσματα	62
3.2 Ανήλικα στάδια	62
3.3 Ενήλικα στάδια - επιβίωση	68
3.4 Ωσπαραγωγή θηλυκών	73
3.5 Επίδραση της <i>Wolbachia</i> σε δύο διαφορετικές φυλές της μύγας της	79

Μεσογείου	
3.5.1 Ανήλικα στάδια	80
3.5.2 Ενήλικα στάδια – επιβίωση	82
3.5.3 Ωοτοκία - Ωοπαραγωγή	85
3.6 Επίδραση δύο διαφορετικών στελεχών <i>Wolbachia</i> σε μία φυλή της μύγας της Μεσογείου.	91
3.6.1 Ανήλικα στάδια	91
3.6.2 Ενήλικα στάδια – επιβίωση	95
3.6.3 Ωοτοκία - Ωοπαραγωγή	97
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	102
4.1 Συζήτηση και συμπεράσματα	102
5. Βιβλιογραφία	105

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΝΔΟΣΥΜΒΙΩΤΙΚΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ  
*WOLBACHIA RIRIENTIS* ΣΕ ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ  
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΜΥΓΑΣ ΤΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΟΥ

Σαρακατσάνου Αφθονία

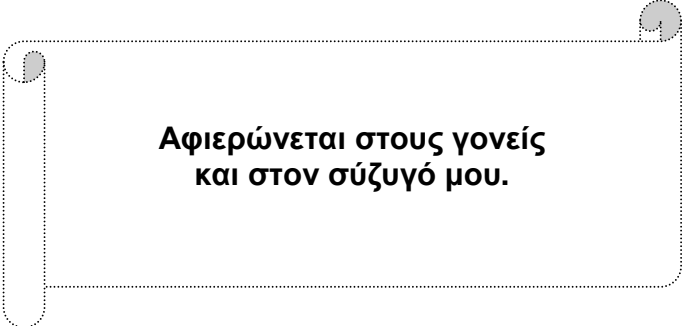
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

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

Εξεταστική Επιτροπή

Ν. Παπαδόπουλος	Αναπληρωτής Καθηγητής	Επιβλέπων
Χ. Αθανασίου	Επίκουρος Καθηγητής	Μέλος
Κ. Μπούρτζης	Καθηγητής	Μέλος

Ν. ΙΩΝΙΑ ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ, 2010



**Αφιερώνεται στους γονείς  
και στον σύζυγό μου.**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στα πλαίσια της Μεταπτυχιακής μου διατριβής αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους όσους συντέλεσαν στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες εκφράζονται στον επιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή Εφαρμοσμένης Εντομολογίας, του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος, κ. Ν. Παπαδόπουλο για την ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής, τη βοήθεια και την πολύτιμη και συνεχή καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων, την ανάλυση των στοιχείων και τη συγγραφή της μεταπτυχιακής εργασίας. Θεωρώντας εξαιρετικής σημασίας τα όσα αποκόμισα, τον ευχαριστώ θερμά.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζονται στον κ. Αλέξανδρο Διαμαντίδη διδάκτορα Εντομολόγο και στις υποψήφιες διδάκτορες κκ. Σ. Παπαναστασίου και Κ. Μωραίτη. Η βοήθειά τους κατά τη διάρκεια διεξαγωγής, καθώς και η επίβλεψή τους καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος ήταν πραγματικά πολύτιμη.

Πολλές ευχαριστίες εκφράζονται και στα μέλη της εξεταστικής επιτροπής. Στον καθηγητή κ. Κ. Μπούρτζη και στον Επίκουρο καθηγητή κ. Χ. Αθανασίου για τις πολύτιμες υποδείξεις και διορθώσεις τους.

Τέλος, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στο σύζυγό μου και στην οικογένειά μου για την υπομονή τους και την συμπαράσταση που μου προσέφεραν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

## ΕΥΡΕΙΑ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελετήθηκε η επίδραση του ενδοκυτταρικού βακτηρίου *Wolbachia pipientis* στη διάρκεια ζωής και την αναπαραγωγή δύο πληθυσμών της μύγας της Μεσογείου *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera : Tephritidae). Η μελέτη αφορούσε την επίδραση της μόλυνσης με ένα στέλεχος *Wolbachia*, το *wCer2* σε δύο φυλές της μύγας της Μεσογείου σε σχέση με τον μάρτυρα (Μπενάκειο και Wol – Med 88.6, Vienna GSS και Vienna E88), καθώς και την επίδραση της μόλυνσης δύο διαφορετικών στελεχών *Wolbachia*, των *wCer2* και *wCer4*, σε μία φυλή της μύγας της Μεσογείου σε σχέση με τον μάρτυρα (Μπενάκειο, Wol – Med 88.6 δηλαδή η φυλή Μπενάκειο μολυσμένη με το *wCer2* στέλεχος *Wolbachia* και Wol – Med S10.3, δηλαδή η φυλή Μπενάκειο μολυσμένη με το *wCer4* στέλεχος *Wolbachia*, που εκτράφηκαν στο εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας για μία γενεά.

Αρχικά μελετήθηκε σε ταυτόσημες εργαστηριακές συνθήκες, ( $25 \pm 1$  °C,  $65 \pm 5\%$  Σ.Υ και 14:10 Φ:Σ) η διάρκεια ανάπτυξης των ανηλικών σταδίων (αυγό – προνύμφη – νύμφη – ενήλικο), η διάρκεια ζωής και η αναπαραγωγική ικανότητα των ενηλικών ( $F_1$  γενεά), για τις πέντε διαφορετικές φυλές της μύγας της Μεσογείου, σε σχέση με τη μόλυνση με τη *Wolbachia*. Σε μία δεύτερη ενότητα μελετήθηκε η επίδραση του στελεχούς *wCer2* της *Wolbachia* στη διάρκεια ανάπτυξης των ανηλικών σταδίων, στην επιβίωση και στην αναπαραγωγική ικανότητα των ενηλικών, για δύο διαφορετικές φυλές της μύγας της Μεσογείου, καθώς και η επίδραση των στελεχών *wCer2* και *wCer4* της *Wolbachia* στα παραπάνω βιολογικά χαρακτηριστικά για μία φυλή της μύγας της Μεσογείου.

Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική επίδραση των στελεχών *wCer2* και *wCer4* *Wolbachia* τόσο για τα ανήλικα όσο και για τα ενήλικα στάδια στις διαφορετικές φυλές της μύγας της Μεσογείου σε σχέση με τα μη μολυσμένα άτομα. Σημαντική ήταν η επίδραση στη διάρκεια ανάπτυξης του αυγού για τη φυλή Μπενάκειο μολυσμένη με τα *wCer2* και *wCer4* στελέχη *Wolbachia*, ενώ μεταξύ των φυλών Μπενάκειο και Vienna GSS μολυσμένων με το στέλεχος *wCer2* δεν παρουσιάστηκε διαφορά. Στο στάδιο της προνύμφης η επίδραση των στελεχών *wCer2* και *wCer4* *Wolbachia* ήταν επίσης σημαντική, με αυξομείωση

της προνυμφικής διάρκειας ανάπτυξης. Στο νυμφικό στάδιο, σημαντική ήταν η επίδραση του στελέχους *wCer2* στη φυλή Μπενάκειο με άμεσο αποτέλεσμα τη μείωση της διάρκειας ανάπτυξης των νυμφών, ενώ το στέλεχος *wCer4* δεν παρουσίασε καμία επίδραση.

Η διάρκεια επιβίωσης των αρσενικών ήταν μεγαλύτερη των θηλυκών σε όλους τους πληθυσμούς του εντόμου, είτε μολυσμένων, είτε μη μολυσμένων. Η μόλυνση με *Wolbachia* (*wCer2* και *wCer4*) προκάλεσε μείωση της διάρκειας ζωής και στα δύο φύλα. Όσον αφορά την διάρκεια της ωοτοκίας, οι πληθυσμοί διέφεραν στην αναπαραγωγική διάρκεια ζωής σε σχέση με την ηλικία. Η μόλυνση με *Wolbachia* μείωσε την περίοδο ωοτοκίας των θηλυκών, όχι όμως και τη διάρκεια προ και μετά την ωοτοκία. Οι μολυσμένοι με τη *Wolbachia* πληθυσμοί, παρουσίασαν μικρότερη μέση και μέγιστη ωοπαραγωγή σε σχέση με τους μη μολυσμένους πληθυσμούς της μύγας της Μεσογείου.

Συζητούνται οι δυνατότητες εφαρμογής των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας για την αντιμετώπιση της μύγας της Μεσογείου και οι προοπτικές για μελλοντικές συναφείς έρευνες.



## SUMMARY

*Wolbachia pipientis* is a wide spread endosymbiont of insects and other arthropods exerting vital biological effects on its hosts. Recent studies have documented effects of *Wolbachia* on the life span and reproduction of few insect species. However, little is known regarding effects of *Wolbachia* on both immature and adult demographic traits of different host populations. Moreover, whether different *Wolbachia* strains exert differential effects on the demographic traits of their hosts remains largely unknown. We studied the effects of (a) the *Wolbachia* strain *wCer2* on fitness components of two laboratory strains of the Mediterranean fruit fly (medfly), *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), and (b) two different *Wolbachia* strains (*wCer2* and *wCer4*) on the same medfly strain. *Wolbachia* infection (*wCer2*) reduces immature (egg – adult) developmental duration of both medfly strains, although it prolongs embryonic developmental duration; however, egg to adult mortality increased only in one of the two strains. *Wolbachia* infection shortens adult life span (though proportionally dissimilar in males and females), and reduces female fecundity. Different *Wolbachia* strains seem to differentially affect immature mortality and developmental duration, and adult longevity and female fecundity. Our findings demonstrate differential (a) response of two medfly strains to *Wolbachia* infection, and (b) effects of different *Wolbachia* strains on the same medfly population. Practical and theoretical implications of our findings are discussed.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

### 1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μύγα της Μεσογείου ή μεσογειακή μύγα των φρούτων, *Ceratitis capitata* (Wiedemann), είναι ένα ολομετάβολο έντομο που ανήκει στην οικογένεια Tephritidae των Διπτέρων, μια οικογένεια με μεγάλη οικονομική σημασία για τη γεωργία. Στη διεθνή βιβλιογραφία το έντομο απαντάται με τα ακόλουθα παλαιότερα ονόματα : *Ceratitis citriperda* MacLeay, *Ceratitis hispanica* De Brême, *Paradalspis asparagi* Bezzi, *Tephritis capitata* Wiedemann, με τη συστηματική κατάταξή του να είναι η ακόλουθη :

<b>Φύλο</b>	:	Αρθρόποδα
<b>Κλάση</b>	:	Έντομα
<b>Υποκλάση</b>	:	Γναθωτά - Κεραιωτά
<b>Διαίρεση</b>	:	Πτερυγωτά
<b>Υποδιαίρεση</b>	:	Ενδοπτερυγωτά
<b>Τάξη</b>	:	Δίπτερα
<b>Υποτάξη</b>	:	Βραχύκερα
<b>Οικογένεια</b>	:	Tephritidae
<b>Γένος</b>	:	<i>Ceratitis</i>

Το γένος *Ceratitis* περιλαμβάνει πάνω από 90 είδη, τα οποία κατάγονται από τροπικές περιοχές της Αφρικής και συγκεκριμένα από τις υποτροπικές περιοχές της ερήμου της Σαχάρα (De Meyer, 2000). Η μύγα της Μεσογείου λόγω : (1) της ευρείας διάδοσής της, (2) της ικανότητάς της να επιβιώνει και να αναπαράγεται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες απ' ότι άλλα είδη Διπτέρων και (3) του πολύ μεγάλου εύρους ξενιστών, θεωρείται ένας από τους σημαντικότερους εχθρούς των καρποφόρων δέντρων σε πολλά μέρη της γης. Στην Ελλάδα η εξάπλωσή της φτάνει από την Κρήτη μέχρι και τη Βόρεια Ελλάδα και οι ζημιές που προκαλεί, εκτός από τα εσπεριδοειδή, αφορούν στα μηλοειδή, τα πυρηνόκαρπα,

τα σύκα, καθώς και άλλα φρούτα, (Παπαδόπουλος 1999, Τζανακάκης & Κατσόγιαννος 2003, Διαμαντίδης 2009).

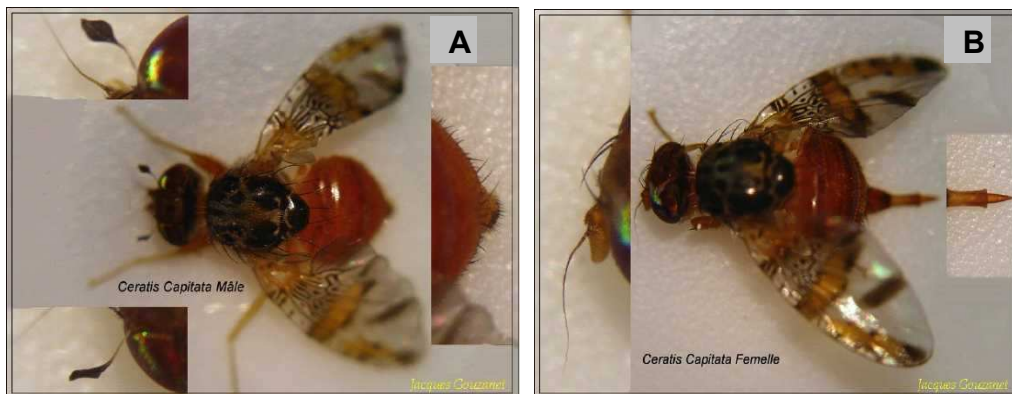
### **1.1.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά του εντόμου**

Το ενήλικο έχει μήκος σώματος 4-6 mm και πλάτος 1,2-2 mm. Η κεφαλή είναι αρκετά μεγάλη, κίτρινη με μία ταινία ανοικτού καστανού χρώματος μεταξύ των δύο σύνθετων οφθαλμών, οι οποίοι είναι χρώματος πρασίνου σμαραγδινού (Εικ. 1). Η διάκριση των αρσενικών από τα θηλυκά γίνεται από ένα ζεύγος έμμισχων κερατοειδών αποφύσεων (orbital blisters) αργυρότεφρου χρώματος στο μέτωπο των αρσενικών (Εικ. 2). Το 2<sup>ο</sup> άρθρο των κεραιών είναι βαθύχρωο, ενώ το 3<sup>ο</sup> πολύ ανοιχτό και φέρει μία χαίτη καστανή, τριπλάσιου μήκους του άρθρου. Ο θώρακας έχει χρώμα αργυρόφαιο με πολλές μαύρες κηλίδες ποικίλων σχημάτων, από τις οποίες οι περισσότερες πλευρικές και οπίσθιες έχουν τη μορφή μακριών σμιρίγγων (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος, 2003). Οι πτέρυγες έχουν μήκος 4,5 mm η καθεμιά, είναι διαφανείς και φέρουν μία κατά μήκος και δύο εγκάρσιες ταινίες χρώματος κίτρινου, καστανέρυθρου. Παρατηρούνται επίσης πολυάριθμες μικρές κηλίδες. Είναι χαρακτηριστικό ότι όταν το έντομο στέκεται ή βαδίζει, κρατάει της πτέρυγές του μισάνοιχτες και με κλίση. Η κοιλία είναι χρώματος κίτρινου υποκαστανού, με δύο φαιές εγκάρσιες κηλίδες, ενώ το μεγαλύτερο μέρος του scutellum είναι μαύρου χρώματος με μια κυματοειδή λευκή ζώνη στο πρόσθιο τμήμα του. Ο ωοθέτης είναι λεπτός και επιμήκης, χαρακτηριστικά προεξέχον από το τελευταίο κοιλιακό τμήμα των θηλυκών και το μήκος του κυμαίνεται μεταξύ 0,9 – 1,3 mm. Τα πόδια είναι κίτρινου – ερυθρού χρώματος και φέρουν κίτρινες, σκληρές τρίχες στο οπίσθιο τμήμα της κνήμης (Papadopoulos, 2004).



**Εικόνα 1.** Ενήλικο της μύγας της Μεσογείου.

(<http://aramel.free.fr/INSECTES15-6.shtml>)



**Εικόνα 2.** (A) Αρσενικό και (B) θηλυκό ενήλικο του *C. capitata*.

(<http://aramel.free.fr/INSECTES15-6.shtml>)

Τα αυγά είναι μικρά, στενόμακρα ελλειπτικού σχήματος, λευκά, λαμπερά και λεία. Έχουν μήκος 0,9 – 1,1 mm και διάμετρο 0,2 – 0,3 mm και εισάγονται μέσα στους ιστούς του ξενιστή.

Οι προνύμφες είναι μικρές άποδες ακέφαλες, (διακρίνεται μόνο μια σκούρα κατά μήκος γραμμή στο ύψος της κεφαλής, ο κεφαλοφαρυγγικός σκελετός), κυλινδρικές, πιο στενές στο πρόσθιο μέρος και έχουν χρώμα λευκοκίτρινο, (Εικ. 3). Τα οπίσθια δύο αναπνευστικά στίγματα, στην άκρη της κοιλίας, αποτελούνται από τρία στενόμακρα σε σχήμα σχισμής ανοίγματα το καθένα. Υπάρχουν τρεις

προνυμφικές ηλικίες που διακρίνονται μεταξύ τους με βάση το σχήμα, το μέγεθος και το χρώμα των στοματικών αγκίστρων (White & Elson – Harris, 1992). Η προνύμφη 1<sup>ης</sup> ηλικίας έχει μήκος 0,17 – 2,2 mm, η 2<sup>ης</sup> 2,3 – 5 mm και η 3<sup>ης</sup> 6 – 10 mm (Paradopoulos, 2004). Οι προνύμφες βρίσκονται πολλές μαζί στη σάρκα των καρπών και η μετακίνησή τους γίνεται με συσπείρωση και προώθηση εντός των καρπών.



**Εικόνα 3.** Προνύμφες της μύγας της Μεσογείου σε ροδάκινο.

(University of Florida, Photograph by: Division of Plant Industry)

Η νύμφη (pupa) είναι βαρελοειδής, με χρώμα που ποικίλει από υπόλευκο έως σκούρο καστανό, ανάλογα με τον ξενιστή στον οποίο αναπτύσσονται οι προνύμφες (Paradopoulos, 2004). Το μήκος τους κυμαίνεται μεταξύ 4 – 4,5 mm και η διάμετρος από 2 – 2,5 mm. Βρίσκονται κυρίως στο έδαφος, (Εικ. 4).



**Εικόνα 4.** Νύμφη – pupa

(<http://aramel.free.fr/INSECTES15-6.shtml>)

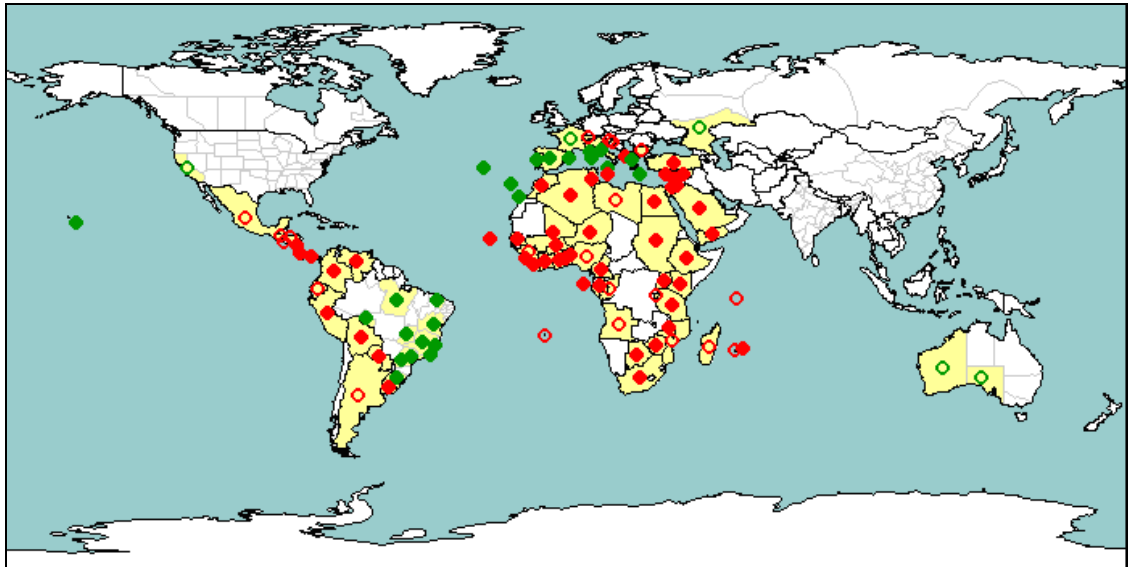
### 1.1.2 Καταγωγή του εντόμου και γεωγραφική εξάπλωση

Η μύγα της Μεσογείου (medfly) αποτελεί ένα από τα πιο κοσμοπολίτικα και επιζήμια έντομα των καλλιεργειών σε όλο τον κόσμο, προσβάλλοντας πάνω από 200 διαφορετικά είδη φρούτων, λαχανικών, ακόμη και καρυδιών. Από την τροπική Αφρική, πιθανή προέλευσή της, γρήγορα επεκτάθηκε και εγκαταστάθηκε σε όλο το κόσμο (De Meyer, 2000). Η εστία εμφάνισής της θα μπορούσε να είναι και η ζώνη της *Argania*, δένδρου της οικογένειας των Sapotaceae, που απαντά αποκλειστικά στο Μαρόκο (Bonemaïson, 1969). Όμως μελέτες της γενετικής των πληθυσμών, δεν επιβεβαιώνουν την παραπάνω άποψη (Διαμαντίδης, 2009).

Η εξάπλωση και εγκατάσταση της μύγας της Μεσογείου σε νέες περιοχές, θεωρείται ότι ξεκίνησε από τη Μεσόγειο και ο εποικισμός της πραγματοποιήθηκε είτε μέσω της κοιλάδας του Νείλου και στη συνέχεια στα παράλια της μέσης Ανατολής και τις υπόλοιπες Μεσογειακές χώρες είτε μέσω των δυτικών παραλιών της Αφρικανικής ηπείρου και από εκεί στις υπόλοιπες χώρες (Paradopoulos, 1999). Σήμερα η παρουσία του εντόμου έχει επιβεβαιωθεί σε όλες τις χώρες της κεντρικής Αμερικής, εκτός από το Μεξικό όπου συντονισμένες προσπάθειες οδήγησαν στην εξάλειψή του. Στη βόρεια Αμερική, σημειώθηκε εμφάνιση της μύγας της Μεσογείου σε περιοχές της Φλώριντα, του Τέξας, από όπου εκριζώθηκε μετά από μεγάλη συστηματική προσπάθεια, ενώ φαίνεται ότι έχει εγκατασταθεί στην Καλιφόρνια, παρά τις αντίθετες απόψεις (Liebhold et al., 2006). Η μύγα της Μεσογείου απαντά σε όλες τις χώρες της νότιας Αμερικής, σε νησιά του Ατλαντικού ωκεανού (Μαδέρες, Αζόρες, Κανάριοι νήσοι), του Ειρηνικού (Χαβάη, 1910) και του Ινδικού ωκεανού (Μαδαγασκάρη). Στη Νέα Ζηλανδία το έντομο εμφανίστηκε στο Ώκλαντ, κατά τη διάρκεια του 1996. Από εκεί και ύστερα ή μύγα της Μεσογείου εξαλείφθηκε και δεν σημειώθηκε περαιτέρω ανίχνευση και καταγραφή της παρουσίας της (Weems et al., 2001).

Άλλες περιοχές όπου ενδημεί το έντομο, είναι οι χώρες της Αφρικής, της μέσης Ανατολής, η κεντρική και νότια Αμερική, τα παράλια της Μεσογείου, ενώ περιστασιακά αναφέρονται πληθυσμοί του σε χώρες της Κεντρικής Ευρώπης, (Αυστρία, Γερμανία, Βέλγιο), στην Ισπανία, Γαλλία, Ιταλία, (Διάγραμμα 1). Στην

Ελλάδα αναφέρεται η παρουσία της μύγας της Μεσογείου σε όλη σχεδόν τη χώρα, ιδιαίτερα στις κεντρικές και νότιες περιοχές όπου καλλιεργούνται εσπεριδοειδή, στα νησιά, αλλά και στη βόρεια Ελλάδα (Παπαδόπουλος, 1999).



Καταγραφή σε εθνικό επίπεδο		Καταγραφή σε τοπικό επίπεδο	
■	Παρουσία	■	Παρουσία
□	Παρουσία σε ορισμένες περιοχές	□	Παρουσία σε ορισμένες περιοχές

### **Διάγραμμα 1.** Γεωγραφική εξάπλωση της μύγας της Μεσογείου.

([http://www.eppo.org/QUARANTINE/insects/Ceratitis\\_capitata/CERTCA\\_map.htm](http://www.eppo.org/QUARANTINE/insects/Ceratitis_capitata/CERTCA_map.htm))

#### **1.1.3 Ξενοστές και οικονομική σημασία του εντόμου**

Η μύγα της Μεσογείου αποτελεί το πλέον πολυφάγο είδος της οικογένειας Tephritidae, προσβάλλοντας ημώριμους, σχεδόν ώριμους ή και ώριμους καρπούς πολλών φυτικών ειδών. Είναι γνωστό ότι προσβάλλει πάνω από 300 είδη φρούτων και φυτικών ειδών. Στη δυτική Αυστραλία και σε εύκρατες περιοχές, ιδιαίτερα στην περιοχή της Μεσογείου, τα πυρηνόκαρπα, τα γιγαρτόκαρπα, τα εσπεριδοειδή (*Citrus spp.*), η μουσμουλιά (*Eriobotrya japonica*), ο λωτός (*Diospyros kaki*) και οι γκουάβες (*Psidium guajava*), είναι

ιδιαίτερα ευαίσθητα είδη. Επίσης, σοβαρές προσβολές προκαλεί και σε καλλιέργειες τροπικών και υποτροπικών περιοχών, σε παπάγια (*Carica papaya*), τομάτα (*Solanum lycopersicum*), καφέ (*Coffea arabica*), μάνγκο (*Manifera indica*), αβοκάντο (*Persea americana*) και άλλα. Στη χώρα μας προκαλεί ιδιαίτερα σημαντικές ζημιές στις νοτιότερες περιοχές και στα νησιά κυρίως στα εσπεριδοειδή, όπως μανταρίνια (*Citrus aurantium*), πορτοκάλια (*Citrus sinensis*), καθώς και σε σύκα (*Ficus carica*), ροδάκινα (*Prunus persica*), βερίκοκα (*Prunus armeniaca*), μήλα (*Malus silvestris*), αχλάδια (*Pyrus communis*), κυδώνια (*Cydonia oblonga*) και άλλα φρούτα (Papadopoulos, 2004).

Η παρουσία και εγκατάσταση της μύγας της Μεσογείου σε μία περιοχή, μπορεί να προκαλέσει σημαντικές οικονομικές απώλειες, όχι μόνο λόγω της άμεσης ζημιάς της στους προσβεβλημένους καρπούς, αλλά και εξαιτίας του κόστους που απαιτείται για την παρακολούθηση, έλεγχο και διατήρηση του πληθυσμού της, κάτω από το όριο οικονομικής ζημίας. Κάθε έτος οι χώρες όπου εμφανίζεται το έντομο, υφίστανται υψηλές οικονομικές απώλειες, μειωμένη διαθεσιμότητα των φρούτων και υψηλές δαπάνες για τον έλεγχό του. Πρόσφατες οικονομικές μελέτες δείχνουν ότι οι άμεσες και έμμεσες απώλειες από τη μύγα της Μεσογείου στην Ιορδανία, στο Ισραήλ και την Παλαιστίνη, ανέρχονται σε 192 εκατομμύρια δολάρια ετησίως (Anonymous, 1997).

#### **1.1.4 Βιολογία**

Η μύγα της Μεσογείου ως πολυκυκλικό είδος, συμπληρώνει πολλές γενεές το έτος ανάλογα με την εκάστοτε γεωγραφική περιοχή, τις κλιματικές συνθήκες (κυρίως θερμοκρασία) και τη διαθεσιμότητα των ξενιστών της (Fletcher, 1989). Στη χώρα μας παρουσιάζει 3 – 7 αλληλοεπικαλυπτόμενες γενεές το χρόνο, ανάλογα με τη χρονιά και την περιοχή, ενώ σε πιο θερμές περιοχές μπορεί να συμπληρώσει και περισσότερες. Διαχειμάζει ως νύμφη στο έδαφος ή ως προνύμφη σε προσβεβλημένους καρπούς που παραμένουν στα δένδρα ή που έχουν πέσει στο έδαφος (Papadopoulos et al., 1996, Papadopoulos et al., 2001). Επίσης, κατά ένα ποσοστό διαχειμάζει και ως ενήλικο, σε κλίματα με ήπιο χειμώνα, όπως η Κρήτη (Μαυρικάκης & συνεργάτες, 1997). Ωστόσο σε



βορειότερες περιοχές της Μεσογείου (Θεσσαλονίκη), το *C. capitata* διαχειμάζει επιτυχώς μόνο ως προνύμφη εντός προσβεβλημένων καρπών (Papadopoulos et al., 1996).

Τα ενήλικα εμφανίζονται την άνοιξη και τρέφονται με σακχαρούχες και αζωτούχες ουσίες, όπως νέκταρ και απεκκρίματα κοκκοειδών. Μπορούν να πετάξουν σε αρκετά μεγάλες, αλλά όχι ιδιαίτερα μακρινές αποστάσεις. Ο βιολογικός τους κύκλος συμπληρώνεται περίπου σε 25 ημέρες, σε θερμοκρασία 24 – 25 °C και σχετική υγρασία 60 – 70 %. Το θηλυκό ωτοκεί στους καρπούς, 1 – 10 (συνήθως έως 6) αυγά, εφόσον η θερμοκρασία δεν είναι χαμηλότερη των 16 °C. Τα θηλυκά εισάγουν τον ωοθέτη τους στο περικάρπιο ή μεσοκάρπιο ώριμου ή ημιώριμου καρπού των ξενιστών τους, όπου δημιουργούν νύγμα διαμέτρου 1mm εντός του οποίου αποθέτουν τα αυγά τους (Papadopoulos et al., 2001), (Εικ. 5-6).

Οι προνύμφες που θα προκύψουν αναπτύσσονται σε βάρος του καρπού. Συνήθως τρέφονται πολλές μαζί στην ίδια περιοχή της σάρκας έως ότου φτάσουν σχεδόν στο τελικό στάδιο ανάπτυξής τους. Μπορεί να συνεχίσουν τη ζημιά στους καρπούς και μετά τη συγκομιδή. Ο καρπός που έχει προσβληθεί από τη μύγα της Μεσογείου, πολύ συχνά μολύνεται από μύκητες, γεγονός που επιτείνει τη ζημιά. Οι αναπτυσσόμενες προνύμφες εγκαταλείπουν τον καρπό, αφήνοντας μία ορατή οπή στην επιδερμίδα του, συνήθως τις πρώτες πρωινές ώρες και νυμφώνονται σε μικρό βάθος στο έδαφος (έως 5 cm). Οι πρώτες προσβολές σημειώνονται σε καρπούς που ωριμάζουν από τέλη Ιουνίου – Ιουλίου, όπως πρώιμες ποικιλίες πορτοκαλιάς και νεραντζιάς. Υψηλότεροι πληθυσμοί και σημαντικότερες προσβολές καταγράφονται σε καρπούς που ωριμάζουν από τον Αύγουστο, έως τον Οκτώβριο. Συνήθως παρατηρείται μείωση της πυκνότητας του πληθυσμού μετά τον Νοέμβριο, λόγω των χαμηλών θερμοκρασιών που επικρατούν κατά τη διάρκεια του χειμώνα, συνθήκες στις οποίες το έντομο κατά πάσα πιθανότητα δεν μπορεί να επιβιώσει. Στη Βόρεια Ελλάδα (Θεσσαλονίκη, Χαλκιδική, Πιερία, Δράμα), η παρουσία του εντόμου διαπιστώνεται από το τέλος καλοκαιριού και το φθινόπωρο (Παπαδόπουλος, 1999).

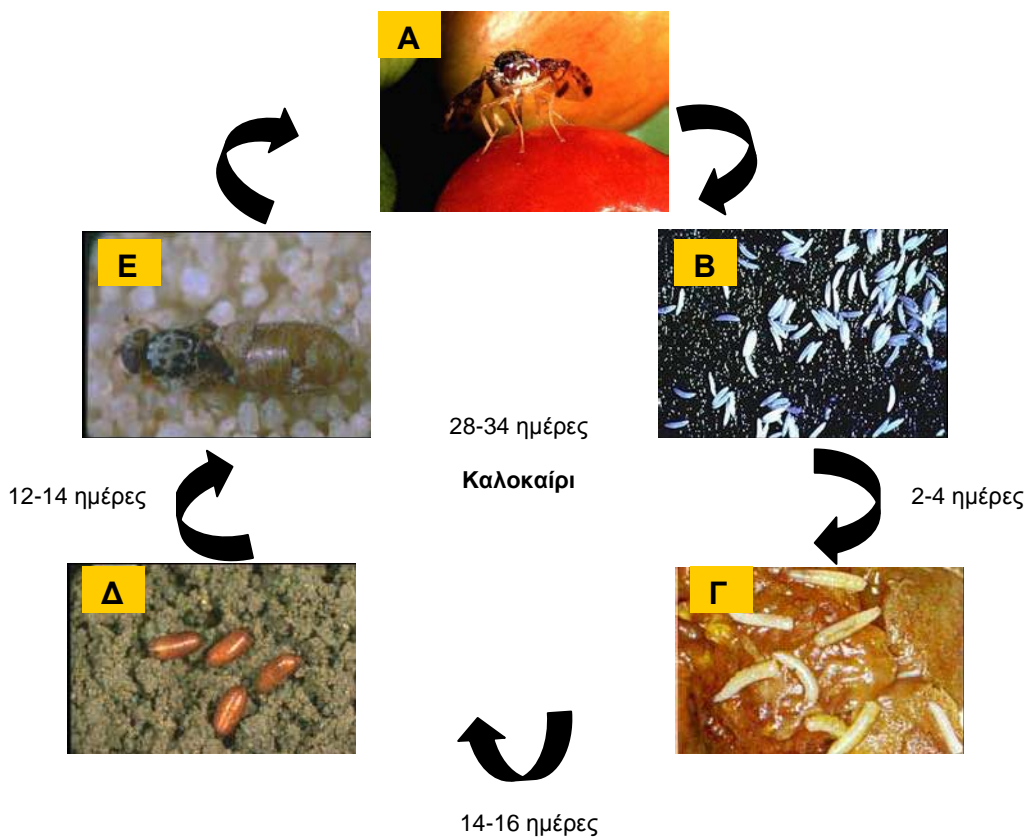
Το *C. capitata* προκαλεί σοβαρές ζημιές στα εσπεριδοειδή, γιγαρτόκαρπα, πυρηγόκαρπα, σύκα, λωτούς και άλλα δένδρα. Στα εσπεριδοειδή ή σπή ωτοκίας είναι χαρακτηριστική και συνήθως ευδιάκριτη. Είναι σκούρα, διαμέτρου 1 mm, ενώ όταν οι καρποί είναι πράσινοι η σπή ωτοκίας περιβάλλεται από μία χλωρωτική κηλίδα διαμέτρου 10 -20 mm. Σε ώριμους καρπούς η χλωρωτική κηλίδα δεν είναι ευδιάκριτη. Μπορεί όμως να είναι ορατό το σκούρο νύγμα ή να εκκρίνεται σταγόνα κόμμεος από το νύγμα, ή το νύγμα να περιβάλλεται από πρασινωπή κηλίδα. Αποτέλεσμα της προσβολής των καρπών από τις προνύμφες, είναι η πρόωρη “ ωρίμανση” – κιτρίνισμά τους, η σήψη και η πτώση τους.

Σύμφωνα με τους Τζανακάκη και Κατσόγιαννο (2003), το *C. capitata* προτιμά για ωτοκία τα νεράντζια και κατά δεύτερο λόγω τα πορτοκάλια. Αναφέρεται ότι η ποικιλία Valencia προσβάλλεται το καλοκαίρι, κατά τον Ιούλιο και οι ομφαλοφόρες ποικιλίες αργά το φθινόπωρο. Τα μανταρίνια ορισμένες φορές αποφεύγουν την προσβολή γιατί είναι επιδεκτικά για ωτοκία στις αρχές του χειμώνα, όταν το έντομο δεν είναι ιδιαίτερος δραστήριο.



**Εικόνα 5.** Στάδια του βιολογικού κύκλου του *C. capitata*, από τα αριστερά προς τα δεξιά: ενήλικο, νύμφη, προνύμφη, αυγά.

(University of Florida Photograph by: USDA)



**Εικόνα 6.** Βιολογικός κύκλος της μύγας της Μεσογείου. (Α) ωτοκία θηλυκού, (Β) στάδιο αυγού – εμβρύου, (Γ) στάδιο προνύμφης, (Δ) στάδιο νύμφης, (Ε) εκκόλαψη ενηλίκου.

(από <http://agspsrv34.agric.wa.gov.au/ento/medfly.htm>, τροποποιημένο)

### 1.1.5 Αντιμετώπιση

Η αντιμετώπιση της μύγας της Μεσογείου βασίζεται κυρίως στην παρακολούθηση του πληθυσμού είτε με τη χρήση παγίδων είτε με δειγματοληψίες καρπών και τη διενέργεια δολωματικών ψεκασμών ή ψεκασμών καλύψεως με οργανοφωσφορικά κυρίως εντομοκτόνα. Εντούτοις, μπορούν να εφαρμοστούν και ορισμένα άλλα μέτρα όπως προληπτικά, βιολογικά, καλλιεργητικά και νομοθετικά. Οι σημαντικότερες μέθοδοι για την αντιμετώπιση της μύγας της Μεσογείου, δίνονται παρακάτω.

**Φυτοϋγειονομικός έλεγχος:** Μία από τις σημαντικότερες δραστηριότητες του κράτους για την αντιμετώπιση εχθρών της γεωργικής παραγωγής είναι ο έλεγχος κατά την εισαγωγή φορτίων φρούτων, μέσω του φυτοϋγειονομικού ελέγχου. Σκοπός του φυτοϋγειονομικού ελέγχου είναι η παρεμπόδιση της εισαγωγής και εξάπλωσης βλαβερών εντόμων, φυτοπαθογόνων οργανισμών, ζιζανίων ή άλλων οργανισμών, ώστε να προστατευθεί η γεωργική και δασική παραγωγή. Ο έλεγχος εκτελείται από τις κρατικές υπηρεσίες ελέγχου (φυτοκαραντίνας) και αφορά τόσο τον έλεγχο όσο και την υγειονομική κάθαρση (απεντόμωση, απολύμανση) του φυτικού υλικού που είτε εισάγεται στη χώρα είτε διακινείται από μία μολυσμένη περιοχή σε μία αμόλυνη. Ο έλεγχος γίνεται στα σημεία εισόδου και εξόδου των προϊόντων από μια χώρα και αφορά κυρίως αντικείμενα όπως φυτά, εμβόλια, μοσχεύματα, βολβούς, υπόγειους γενικά βλαστούς και ρίζες, σπόρους, είδη συσκευασίας γεωργικών και άλλων προϊόντων, ξυλεία και γενικά κάθε διακινούμενο υλικό που είναι πιθανό να έχει ή να περιέχει έντομα, βλαβερά ζώα, ζιζάνια ή παθογόνους μικροοργανισμούς. Κατά τον φυτοϋγειονομικό έλεγχο, δεν ελέγχονται μόνο τα εμπορεύματα και τα μεταφορικά μέσα, αλλά και οι αποσκευές των επιβατών που επιστρέφουν από το εξωτερικό, καθώς ο κίνδυνος για την εισαγωγή βλαβερών εντόμων και μικροοργανισμών είναι εξίσου σημαντικός με αυτόν των εμπορευμάτων (Τζανακάκης, 1995). Ο φυτοϋγειονομικός έλεγχος όσον αφορά στη μύγα της Μεσογείου περιλαμβάνει :

- (1) τον έλεγχο για την τυχόν παρουσία του εντόμου στη χώρα παραγωγής ή προέλευσης των εισαγόμενων καρπών,
- (2) τον έλεγχο στα σημεία εισόδου στη χώρα (σύνορα, λιμάνια, αεροδρόμια),
- (3) την απαγόρευση προϊόντων που δεν έχουν κατάλληλα απεντομωθεί,
- (4) την απεντόμωση των εισαγόμενων ή διακινούμενων προϊόντων για την καταστροφή των προνυμφών με ασφυκτικά εντομοκτόνα,
- (5) την απεντόμωση των υλικών συσκευασίας,
- (6) την κατάσχεση ειδών που τυχόν διακινούνται παράνομα, την καταστροφή τους και την τιμωρία των παραβατών,
- (9) την πιστοποίηση της υγιεινής κατάστασης των προϊόντων και την έκδοση πιστοποιητικών φυτοϋγείας που συνοδεύουν τα εξαγόμενα προϊόντα (Τζανακάκης, 1995).

Τα παραπάνω νομοθετικά μέτρα αντιμετώπισης του *C. capitata*, αφορούν στη θέσπιση αυστηρών κανόνων “καραντίνας”, με σκοπό την αποτροπή της εισαγωγής του εντόμου σε φρουτοπαραγωγικές περιοχές όπου δεν υπάρχει.

**Προληπτικά καλλιεργητικά μέτρα:** Τα καλλιεργητικά μέτρα διακρίνονται σε προσυλλεκτικά (καταστροφή προσβεβλημένων καρπών και μη καλλιεργούμενων άγριων ξενιστών, αποφυγή ωτοκίας με τον εγκλωβισμό ημιώριμων καρπών) και μετασυλλεκτικά (απεντόμωση με χρήση χαμηλών και υψηλών θερμοκρασιών, γ-ακτινοβολίας κλπ.) (Παπαδόπουλος, 1999). Πρωταρχικό προληπτικό μέτρο για την αντιμετώπιση της μύγας της Μεσογείου, καθώς και άλλων επιζήμιων εντόμων αποτελεί και η εγκατάσταση οπωρώνων με ανθεκτικές στο έντομο ποικιλίες. Σε εύκρατες περιοχές με υψηλούς πληθυσμούς του εντόμου, συστήνεται να φυτεύονται βερικοκιές ή πρώιμες ροδακινιές και αχλαδιές. Η συλλογή και η καταστροφή των πεσμένων και προσβεβλημένων καρπών με κάψιμο ή παράχωμα σε στρώμα συμπιεσμένου χώματος πάχους 60 cm, αποτελεί προληπτικό μέτρο για τη μείωση των προσβολών της επόμενης γενεάς (Bonnemaison, 1969).

**Βιολογική καταπολέμηση:** Η βιολογική καταπολέμηση, δηλαδή η χρήση φυσικών εχθρών, είναι μια μέθοδος που δίνει καλά αποτελέσματα σε αρκετά έντομα. Η μέθοδος αυτή αφορά κυρίως την εκτροφή και εξαπόλυση ιθαγενών και εξωτικών παρασιτοειδών, με σκοπό τη μείωση των πληθυσμών του εντόμου στόχου. Μπορεί να συνδυαστεί με επιτυχία με τη μέθοδο εξαπόλυσης στειρωμένων εντόμων (Vreysen et al., 2007). Στη Χαβάη μεταξύ 1947 και 1952 εισήχθησαν τριάντα δύο είδη φυσικών εχθρών των διπτέρων των φρούτων (Vargas et al., 2001). Από αυτά τα περισσότερα ήταν παρασιτοειδή της οικογένειας Tephritidae, τα οποία γεννούν τα αυγά τους, στα αυγά ή στις προνύμφες των διπτέρων και εξέρχονται στο στάδιο της νύμφης. Μόνο τρία είδη παρασίτων έχουν εγκατασταθεί σήμερα, το *Opius longicaudatus* var. *malaiensis* (Fullaway), το *O. vandenboschi* (Fullaway) και το *O. oophilus* (Fullaway). Διάφορα είδη παρασιτοειδών των Tephritidae έχουν εισαχθεί επίσης στη Χαβάη, για να ελέγξουν συγκεκριμένα τις μύγες των φρούτων. Τα σημαντικότερα είναι τα υμενόπτερα της οικογένειας Braconidae, το *Opius humilis* και το *Diachaso tryoni*.

Στις περιοχές της Μεσογείου, παρά τη μακροχρόνια παρουσία του *C. capitata*, λιγιστά είναι τα στοιχεία για την παρουσία ιθαγενών παρασιτοειδών. Κατά το έτος 1999 διαπιστώθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα, η παρουσία του παρασιτοειδούς *Aganaspis daci* (Weld) (Hymenoptera : Eucoilidae), γνωστό ως *Trybliographa*. Το 1999 στην περιοχή της Χίου παρουσιάστηκε υψηλό ποσοστό παρασιτισμού (45%), σε νύμφες της μύγας της Μεσογείου που προέρχονταν από προσβεβλημένα σύκα, από το παραπάνω είδος. Το *A. daci* έχει χρησιμοποιηθεί για τη βιολογική καταπολέμηση της μύγας της Μεσογείου και άλλων εντόμων της οικογένειας Tephritidae, σε ορισμένες χώρες της κεντρικής και βόρειας Αμερικής (Παπαδόπουλος & Κατσόγιαννος, 2001).

Εκτός από τα παρασιτοειδή, στη βιολογική καταπολέμηση της μύγας της Μεσογείου μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι εντομοπαθογόνοι μύκητες *Beauveria bassiana* και *Metarhizium anisopliae*, σε νύμφες και ενήλικα της μύγας (Quesada – Moraga et al., 2006). Ενήλικα που προήλθαν από συλλήψεις στην ύπαιθρο βρέθηκαν να είναι προσβεβλημένα από τους εντομοπαθογόνους μύκητες *Entomophthora muscae* και *Entomophthora schizophorae* (Uziel et al., 2003). Εναντίον του εντόμου έχουν χρησιμοποιηθεί και διάφορα είδη νηματωδών.

**Μαζική παγίδευση:** Η παγίδευση ως μέτρο αντιμετώπισης των εντόμων χρησιμοποιήθηκε πολύ τόσο στο παρελθόν, όσο και σήμερα ως άμεσο και έμμεσο μέτρο ελέγχου. Για τα πιο πολλά είδη, η παγίδευση χρησιμεύει: (1) στην παρακολούθηση της πορείας του πληθυσμού των εντόμων, με σκοπό τον καθορισμό του χρόνου επέμβασης με χημικά ή άλλα μέσα καταπολέμησης και (2) ως άμεσο μέσο καταπολέμησης του ενός ή και των δύο φύλων των εντόμων, με τη χρήση μεγάλου αριθμού παγίδων ανά στρέμμα (μαζική παγίδευση) (Τζανακάκης, 1995). Η μέθοδος της μαζικής παγίδευσης, ως μέτρο αντιμετώπισης της μύγας της Μεσογείου, έχει θετικά αποτελέσματα ειδικά όταν το επίπεδο πληθυσμού του εντόμου είναι χαμηλό (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος, 2003). Η αποτελεσματικότητα των παγίδων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το χρώμα, το σχήμα, το μέγεθος καθώς και τις χρησιμοποιούμενες ελκυστικές ουσίες. Η αντιμετώπιση της μύγας της Μεσογείου με χρήση παγίδων στηρίζεται

στην ανάρτηση μέσα στους σπρωρώνες παγίδων που περιέχουν ελκυστικό υγρό (ουσίες που εκλύουν αμμώνιο) με την προσθήκη μιας τοξικής ουσίας (πυρεθρίνης, μαλαθείου). Οι παγίδες ενηλίκων που χρησιμοποιούνται για τη μύγα της Μεσογείου είναι : (1) φερορμονικές παγίδες τύπου Jackson, για την προσέλκυση των αρσενικών εντόμων, (Εκ.7), (2) τροφικές γυάλινες παγίδες τύπου McPhail, για την προσέλκυση των θηλυκών και αρσενικών εντόμων, (Εικ.8). Οι παγίδες τύπου Jackson, που χρησιμοποιούνται για την προσέλκυση αρσενικών, χρησιμοποιούν ως ελκυστικό την παραφερορμόνη trimedlure. Οι δακοπαγίδες τύπου McPhail, που χρησιμοποιούνται για την προσέλκυση του θηλυκού εντόμου, αποτελούνται από ένα ελκυστικό υγρό που τοποθετείται στο κάτω μέρος της παγίδας. Τα σημαντικότερα ελκυστικά τροφής για τη μαζική παγίδευση των αρσενικών εντόμων της μύγας της Μεσογείου είναι το trimedlure και το medlure, ενώ για τα θηλυκά είναι συνήθως διαλύματα υδρολυμένης πρωτεΐνης, το Nu Lure (πρωτεϊνικό υγρό, πλούσιο σε αμινικά οξέα και πολυπεπτίδια) και υδατικά διαλύματα αμμωνίου (θειικό, χλωριούχο, φωσφορικό, ανθρακικό κ.α), ή άλλες ουσίες που εκλύουν αμμωνία, οξικό οξύ, υγρά διαλύματα πρωτεϊνών φυτικής ή ζωικής προέλευσης, με βόρακα (ως συντηρητικό). Τα παραπάνω ελκυστικά τροφής για ενήλικα θηλυκά έχουν ιδιαίτερη σημασία σε προγράμματα που χρησιμοποιούνται στειρωμένα έντομα (Τζανακάκης, 1995).



**Εικόνα 7.** Παγίδα τύπου Jackson για την προσέλκυση αρσενικών εντόμων.  
(<http://agspsrv34.agric.wa.gov/medfly.htm>)



**Εικόνα 8.** Παγίδα τύπου McPhail για την προσέλκυση θηλυκών εντόμων.  
(<http://agspsrv34.agric.wa.gov/medfly.htm>)

Στην Ελλάδα το 1999, χρησιμοποιήθηκαν δολωματικές παγίδες τύπου McPhail για την προσέλκυση των θηλυκών της μύγας της Μεσογείου με κύρια συστατικά το οξικό αμμώνιο 1,4 διαμινοβουτάνιο και το τριμεθυλαμίνη, με υψηλή αποτελεσματικότητα στην προσέλκυση και παγίδευση των ενήλικων θηλυκών (Katsoyannos et al., 1999).

Για τα αρσενικά της μύγας της Μεσογείου έχει χρησιμοποιηθεί ως προσελκυστικό το trimedlure (0,1 % eugenol & 0,25 % malathion) (Panhwar, 2005). Επίσης στον Μαυρίκιο, χρησιμοποιήθηκε μείγμα οξικού αμμωνίου (AA), με τριμεθυλαμίνης (TMA), πουτρεσκίνης (PT) και μαγιάς (Waste Brewer's Yeast) για την προσέλκυση θηλυκών ενηλίκων της μύγας της Μεσογείου με πολύ θετικά αποτελέσματα (Sookar et al., 2006).

**Εφαρμογές εντομοκτόνων ουσιών:** Χρησιμοποιούνται είτε δολωματικοί ψεκασμοί, είτε ψεκασμοί καλύψεως με οργανοφωσφορικά κυρίως εντομοκτόνα όπως το dimethoate, το phosmet, οι πυρεθρίνες όπως το deltamethrin σε πορτοκαλίες, λεμονιές μανταρινιές, νεραντζιές, καθώς και το *Beauveria bassiana* σε μανταρινιές, (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης & Τροφίμων, 2009). Στους δολωματικούς ψεκασμούς ψεκάζεται τμήμα της κόμης των δένδρων με διάλυμα της εντομοκτόνου ουσίας και ένα ελκυστικό υγρό. Το ελκυστικό υγρό είναι υδρόλυμα πρωτεϊνών, ή φυσικό ή συνθετικό προϊόν αποσύνθεσης πρωτεϊνούχων ουσιών. Η ελκυστικότητά του οφείλεται στην έκλυση αμμωνίας. Τέτοια ελκυστικά υγρά είναι τα alma dacus, dacona, daconyl, entomela κ.α. Για τους δολωματικούς ψεκασμούς αποτελεσματικό είναι και το συμπυκνωμένο εντομοκτόνο Spinosad 0.024% β/ο (Success 0,24 CB). Οι δολωματικοί ψεκασμοί πρέπει να εφαρμόζονται απογευματινές ώρες, σε σταγόνες μεγάλης διαμέτρου (300 cm<sup>3</sup> ψεκαστικό υλικό) και να καλύπτουν μεγάλη επιφάνεια. Η εφαρμογή τους ξεκινάει 15 ημέρες πριν την έναρξη της ωρίμανσης (αλλαγή χρώματος καρπών) και επαναλαμβάνεται ανά 7 ημέρες, ([www.minagric.gr](http://www.minagric.gr)).

Στους ψεκασμούς καλύψεως ψεκάζεται ολόκληρη η κόμη του δένδρου με dimethoate 95% β/β (Dimethoate - Cheminova Agro France 40EC), deltamethrin 2,5% β/ο (Decis 2,5 EC), phosmet 95% β/β (Imidan 50 WP), *beauveria bassiana* 10,7 β/ο (Botanigard 10,7 SC) ή άλλο κατάλληλο και εγκεκριμένο



οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο. Ο πρώτος ψεκασμός γίνεται πριν την ωρίμανση των καρπών και επαναλαμβάνεται ανά 20 περίπου ημέρες εάν χρειάζεται και αν υπάρχει ο αναγκαίος χρόνος ως τη συγκομιδή, ώστε να μην υπάρχουν απαράδεκτα υπολείμματα του εντομοκτόνου στον εμπορεύσιμο καρπό, (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης & Τροφίμων, 2009). Συνιστάμενα εντομοκτόνα για δολωματικούς ψεκασμούς και ψεκασμούς καλύψεως που χρησιμοποιούνται στην Ελλάδα και στην Αυστραλία, δίνονται στους Πίνακες 1 - 2.

**Πίνακας 1.** Εντομοκτόνα δολωματικών ψεκασμών και καλύψεως στην Ελλάδα  
(Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης & Τροφίμων, 2010).

Καλλιεργούμενο είδος	Δραστικές ουσίες	Λήξη Έγκρισης
<b>Εσπεριδοειδή</b>		
Πορτοκάλια	Phosmet 50% β.β	30-11-2011
	Deltamethrin 10% β.ο	13-10-2013
	Deltamethrin 1.5% β.ο	13-10-2013
Γκρεϊπ - Φρουτ	Phosmet 50% β.β	30-11-2011
	Deltamethrin 10% β.ο	13-10-2013
	Deltamethrin 1.5% β.ο	13-10-2013
Λεμόνια	„	„
Μανταρίνια	Phosmet 50% β.β	30-11-2011
	<i>Beauveria bassiana</i> 10.735% β.ο	13-12-2012
Νεράντζια	Deltamethrin 10% β.ο	13-10-2013
	Deltamethrin 1.5% β.ο	13-10-2013
<b>Πυρηνόκαρπα</b>		
Βερίκοκα	Deltamethrin 10% β.ο	31-10-2013
	Deltamethrin 1.5% β.ο	31-10-2013
	Deltamethrin 25% β.ο	31-10-2013
Δαμάσκηνα	„	„
Νεκταρίνια	Deltamethrin 10% β.ο	31-10-2013
	Deltamethrin 1.5% β.ο	31-10-2013
	Deltamethrin 25% β.ο	31-10-2013
	Cyfluthrin 5% β.ο	31-12-2013
Ροδάκινα	Deltamethrin 10% β.ο	31-10-2013
	Deltamethrin 1.5% β.ο	31-10-2013
	Deltamethrin 25% β.ο	31-10-2013
	Cyfluthrin 5% β.ο	31-12-2013
	<i>Beauveria bassiana</i> 10.735% β.ο	13-12-2012

**Πίνακας 2.** Εντομοκτόνα δολωματικών ψεκασμών & καλύψεως στην Αυστραλία (<http://agspsrv34.agric.wa.gov.au/ento/medfly.htm>)

Χημικές Ουσίες	Παραδείγματα Εμπορικών Ονομάτων	Αναλογία εφαρμογής	Συχνότητα εφαρμογής	Σχολιασμός εφαρμογής
Fenthion	Lebaycid @550	<u>Ροδιές,</u> <u>Εσπεριδοειδή</u> : 15 mL σε 10 L νερό <u>Πυρηνόκαρπα</u> : 7.5 mL σε 10 L νερό	Κάθε 7 – 21 ημέρες, ανάλογα με την ποικιλία	Υψηλή τοξικότητα σε πουλιά. Υπολειμματικότητα 7 ημέρες για ροδιές, εσπεριδοειδή & 3 για πυρηνόκαρπα.
	Lebaycid @100	<u>Ροδιές,</u> <u>Εσπεριδοειδή</u> : 80 mL σε 10 L νερό <u>Πυρηνόκαρπα</u> : 40 mL σε 10 L νερό	Εφαρμογή στις 6,3 & 2 εβδομάδες πριν τη συγκομιδή Εφαρμογή στις 2-6 & 1 εβδομάδες πριν τη συγκομιδή	Υπολειμματικότητα 7 ημέρες. Υπολειμματικότητα 3 ημέρες.
Dimethoate	Rogor @100	<u>Ροδιές,</u> <u>Εσπεριδοειδή</u> : 30 mL σε 10 L νερό <u>Πυρηνόκαρπα</u> : 30 mL σε 10 L νερό	Εφαρμογή στις 7, 5 εβδομάδες πριν τη συγκομιδή Εφαρμογή στις 4,2 εβδομάδες πριν τη συγκομιδή	Επικίνδυνο στις μέλισσες. 7 ημέρες υπολειμματικότητα για ροδιές, εσπεριδοειδή, πυρηνόκαρπα. Καταστρεπτικό για πρώιμα δαμάσκηνα, ροδάκινα. Μη εφαρμογή σε λεμόνια Meyer, κουμκουάτ, πορτοκάλια Seville, βερίκοκα, σύκα, μούσμουλα.
	Rogor® 300	<u>Ροδιές,</u> <u>Εσπεριδοειδή</u> : 10 mL σε 10 L νερό <u>Πυρηνόκαρπα</u> : 10 mL σε 10 L νερό	Εφαρμογή στις 7, 5 εβδομάδες πριν τη συγκομιδή Εφαρμογή στις 4,2 εβδομάδες πριν τη συγκομιδή	“
Trichlorfon	David Grays® Σπρέι για λευκές πεταλούδες και λευκές πεταλούδες	<u>Ροδιές,</u> <u>Εσπεριδοειδή</u> : 1 <sup>ος</sup> ψεκασμός 20 mL σε 10 L νερό, επόμενοι ψεκασμοί 10 mL σε 10 L νερό <u>Πυρηνόκαρπα</u> : 1 <sup>ος</sup> ψεκασμός 40 mL σε 10 L νερό, επόμενοι ψεκασμοί με 10 mL	Εφαρμογή στις 6 εβδομάδες πριν τη συγκομιδή, μετά κάθε 7 ημέρες	Υπολειμματικότητα 2 ημερών. Μη κατάλληλο για εσπεριδοειδή.

**Εξαπόλυση στειρωμένων εντόμων:** Η εξαπόλυση στειρωμένων εντόμων, SIT (Sterile Insect Technique), αποτελεί μια φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο, για την αντιμετώπιση ή εξάλειψη εντόμων - εχθρών. Χρησιμοποιήθηκε αρχικά για τον έλεγχο προνυμφών των οικιακών μυγών το 1951. Από το 1967, η SIT έχει χρησιμοποιηθεί ενάντια σοβαρών εντομολογικών εχθρών, όπως το Ρόδινο σκουλήκι (*Pectinophora gossypiella*), τη μύγα της Μεσογείου, την Ευδεμίδα του αμπελιού (*Lobesia botrana*), τις μύγες Τσε – τσε (*Glossina* spp), τα κουνούπια του γένους *Anopheles* (*Anopheles arabiensis*) και τη μύγα των βοοειδών (*Cochliomya hominivorax*). Αποτελεί μέθοδο βιολογικής αντιμετώπισης που χρησιμοποιεί στειρωμένα αρσενικά έντομα για να μειώσει το αναπαραγωγικό ποσοστό ενός είδους εντόμου στόχου. Τα αρσενικά, στειρώνονται με ακτινοβολία γ και απελευθερώνονται στους σπυρώνες. Η στείρωση των εντόμων χρησιμοποιείται σε πολλά είδη εντόμων συμπεριλαμβανομένης και της μύγας της Μεσογείου. Η μέθοδος είναι αποτελεσματική, μόνο εάν τα σεξουαλικά στειρωμένα αρσενικά ανταγωνίζονται επιτυχώς τα άγρια αρσενικά στο ζευγάρι, με τα άγρια θηλυκά. Η αναλογία στειρωμένων αρσενικών, προς φυσικά αρσενικά πρέπει να είναι 100:1 (Knipling, 1955). Σε αρκετές περιπτώσεις είναι απαραίτητη η μείωση του φυσικού πληθυσμού με χρήση εντομοκτόνων, πριν την απελευθέρωση των στειρωμένων αρσενικών εντόμων.

Τον τελευταίο καιρό γίνονται προσπάθειες για την εύρεση κατάλληλων προσελκυστικών ουσιών – παγίδων και μελέτη της αλληλεπίδρασής τους σε προγράμματα διαχείρισης της μύγας της Μεσογείου, με την εξαπόλυση στειρωμένων εντόμων. Συγκεκριμένα, στην Αυστρία, οι Caceres και συνεργάτες (2007) ασχολήθηκαν με την ανάπτυξη και επιβεβαίωση νέων ποιοτικά βελτιωμένων μεθόδων στείρωσης της μύγας της Μεσογείου, με σκοπό τη χρήση των εντόμων σε περιφερειακά προγράμματα αντιμετώπισης, έχοντας ως συνιστάμενη τη μέθοδο S.I.T. Στο Μεξικό, οι Liedo και συνεργάτες (2007) ασχολήθηκαν με τη βελτίωση της σύζευξης στειρωμένων εντόμων της μύγας της Μεσογείου, ύστερα από αλλαγές των συνθηκών μαζικής εκτροφής τους. Η παραπάνω έρευνα είχε να κάνει με τη μελέτη της δημογραφίας και της

ανταγωνιστικότητας μεταξύ στερωμένων και μη στερωμένων αρσενικών εντόμων.

**Περιφερειακά προγράμματα αντιμετώπισης της μύγας της Μεσογείου (Area – wide operational programs):** Η μύγα της Μεσογείου αποτελεί ένα πολύ σημαντικό εντομολογικό εχθρό των καλλιεργειών, για την αντιμετώπιση του οποίου έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία έτη τα λεγόμενα Περιφερειακά προγράμματα, (Robinson et al., 1999). Ουσιαστικά τα προγράμματα αυτά, στηρίζονται στην εφαρμογή μέτρων αντιμετώπισης της μύγας της Μεσογείου σε περιφερειακό επίπεδο, συμπεριλαμβανομένης και της εξαπόλυσης στερωμένων εντόμων (SIT), καθώς και μεθόδων που στηρίζονται στη διαταραχή του ζευγαρώματος. Το 2005 στην Ελλάδα έγινε το πρώτο σεμινάριο Cleanfruit, για την αντιμετώπιση της μύγας της Μεσογείου, σε ευρεία έκταση, με τη χρήση της τεχνικής στείρωσης των εντόμων (SIT). Το πρόγραμμα Cleanfruit, είχε ως στόχο τη δημιουργία ασφαλέστερων και υψηλής ποιότητας φρούτων, με την εφαρμογή εναλλακτικών συστημάτων προστασίας των καλλιεργειών με βάση τη βελτίωση των τεχνικών στείρωσης των εντόμων, για την καταπολέμηση της μύγας της Μεσογείου στη Μεσόγειο (Anonymous, 2005).

Ανάλογα περιφερειακά προγράμματα για τον έλεγχο της μύγας της Μεσογείου, εφαρμόζονται σε διάφορες χώρες στον κόσμο με την υποστήριξη του κοινού τμήματος FAO/IAEA, όπως (1) στη Δυτική Αυστραλία, (2) στο Μεξικό και στη Γουατεμάλα, (3) στην Καλιφόρνια, (4) στην Ισπανία, (5) στο Ισραήλ, (6) στην Αργεντινή, (7) στη Βραζιλία και αλλού. Γίνεται προσπάθεια για εφαρμογή περιφερειακών προγραμμάτων και σε άλλες χώρες όπως στο Πακιστάν, στο Μαρόκο, στη Χιλή, στον Μαυρίκιο (Khattak et al., 2005, Permalloo et al., 2006, Gonzalez & Troncoso 2007).

**Incompatible Insect Technique (IIT):** Η τεχνική της ασυμβατότητας των εντόμων IIT, αποτελεί μία μέθοδο αντιμετώπισης επιζήμιων εντόμων ανάλογη με αυτή της εξαπόλυσης στερωμένων αρσενικών (Sterile Insect Technique). Η IIT στηρίζεται στον μηχανισμό πρόκλησης κυταροπλασματικής ασυμβατότητας (Cytoplasmic incompatibility) με τη χρήση ενδογενών μητρικά κληρονομούμενων βακτηρίων όπως η *Wolbachia*. Ο όρος “IIT” προτάθηκε αρχικά από τον Boller

και τους συναδέλφους του το 1976 κατά τη διάρκεια μελέτης της ασυμβατότητας μεταξύ φυλών στην μύγα των κερασιών, *Rhagoletis cerasi*. Οι ίδιοι πρότειναν ότι η κατευθυνόμενη ασυμβατότητα στο *R. cerasi* οφειλόταν: (1) στη γενετική ασυμβατότητα, (2) στην κυταροπλασματική ασυμβατότητα και (3) στην ασυμβατότητα που προκαλείται από μικροοργανισμούς. Η τεχνική IIT αποτελεί μία μέθοδο γενετικού ελέγχου των εντόμων ανάλογης της SIT, με τη διαφορά ότι η SIT στηρίζεται στην ακτινοβόληση αρσενικών εντόμων, ενώ η IIT χρησιμοποιεί ένα βιολογικό φαινόμενο. Όλες οι υπόλοιπες διεργασίες (μαζική παραγωγή, μαρκάρισμα των εντόμων με χρωστική, διαχείριση, μεταφορά, απελευθέρωση) είναι πανομοιότυπες με την μέθοδο SIT. Η IIT είναι φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο αντιμετώπισης, έχει χαμηλό κόστος εφαρμογής και απαιτεί ένα αποτελεσματικό σύστημα διαχωρισμού των δύο φύλων πριν τη εξαπώληση στον αγρό (Bourtzis & Miller, 2003).

Στο παρελθόν η τεχνική της ασυμβατότητας των εντόμων έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε δοκιμές στο είδος *Culex pipiens* χρηματοδοτούμενες από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, (World Health Organization, WHO). Σήμερα, οι έρευνες στρέφονται στη χρήση της IIT για την αντιμετώπιση της μύγας της Μεσογείου και άλλων επιζήμιων ειδών, όπως ο Δάκος της ελιάς, *Bactocera oleae* και τα είδη κουνουπιών *Aedes aegypti* και *Anopheles sp.* (Zabalou et al., 2009).

**Υγιεινή των φρούτων:** Για την αύξηση της αποτελεσματικότητας της μεθόδου αντιμετώπισης της μύγας της Μεσογείου είναι απαραίτητο να καταστρέφονται τα προσβεβλημένα φρούτα. Η καταστροφή των φρούτων μπορεί να γίνει με εμβάπτισή τους σε νερό, που ολοκληρώνεται με ένα στρώμα κηροζίνης για 4 -5 ημέρες. Οι προνύμφες μπορούν να επιζήσουν στο νερό για μερικές ημέρες, εκτός εάν ο ανεφοδιασμός με οξυγόνο κοπεί, γεγονός που πετυχαίνετε με το στρώμα κηροζίνης. Η ψύξη των φρούτων για μερικές ημέρες, το μαγείρεμα ή η πολτοποίησή τους για χρήση ως τροφή σε πουλερικά και χοίρους, αποτελούν μεθόδους διάθεσης και χρήσης των προσβεβλημένων καρπών. Το παράχωμα των προσβεβλημένων φρούτων δεν συστήνεται, δεδομένου ότι οι προνύμφες της μύγας της Μεσογείου, μπορούν να επιζήσουν και κάτω από το έδαφος

(Κατερίνης & Ζαρταλούδης, 2003). Μετασυλλεκτικά το έντομο μπορεί να ελεγχθεί με την αποθήκευση των φρούτων σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα, καθώς και με την απεντόμωσή τους με χρήση χαμηλών και υψηλών θερμοκρασιών και ακτινοβολίας  $\gamma$  (Mitchell & Saul, 1990).

## 1. 2 ΣΥΜΒΙΩΣΗ ΤΩΝ ENTOMΩΝ – ΕΝΔΟΣΥΜΒΙΩΣΗ

### 1.2.1 Γενικά για τους συμβιώτες

Πολλά ζώα και φυτά περιέχουν ενδοκυτταρικούς συμβιωτικούς οργανισμούς με τους οποίους και αλληλεπιδρούν. Η συμβίωση, η αλληλοεξαρτημένη δηλαδή σχέση μεταξύ δύο ειδών, είναι ένας σημαντικός οδηγός στην καινοτομία της εξέλιξης και της οικολογικής ποικιλότητας. Αποτελεί ένα συγκεκριμένο τύπο συμβίωσης, όπου ένας χαρακτηριστικός μικροβιακός οργανισμός ζει μέσα στον ξενιστή του, εκπροσωπώντας την πιο στενή σχέση μεταξύ των δύο αυτών αλληλεπιδρώντων οργανισμών. Τα έντομα αποτελούμενα περίπου από 1.000.000 διαφορετικά είδη, συχνά αναφέρονται ως η πιο ποικίλη ομάδα ζώων, όπου εμφανίζονται διάφορων ειδών ενδοσυμβιωτικές σχέσεις, κυμαινόμενες από την υποχρεωτική συνύπαρξη, μέχρι τον προαιρετικό παρασιτισμό (Yoshitomo K., 2009).

### 1.2.2 Ενδοκυτταρικοί συμβιωτές

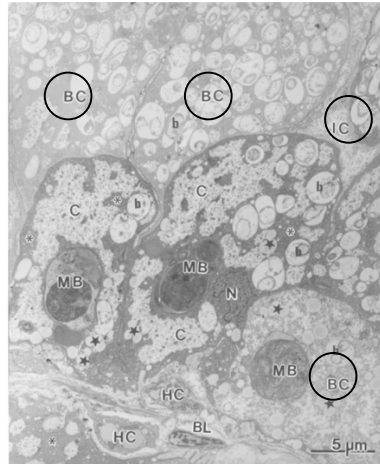
Ο όρος συμβίωση (από την ελληνική λέξη συμβιώνω), πρωτοαναφέρθηκε το 1879 από τον Anton de Bary, ως η διαδικασία όπου δύο ή περισσότερα είδη ζουν σε στενή σχέση το ένα με το άλλο, πάνω ή μέσα στο σώμα του ξενιστή τους. Συγκεκριμένα ο ίδιος συμπεριέλαβε τον παρασιτισμό (μορφή συμβίωσης όπου το ένα είδος – παράσιτο, ωφελείται σε βάρος του ξενιστή του) ως ένα τύπο συμβίωσης. Οι περισσότεροι ερευνητές θεωρούν ότι η συμβίωση λαμβάνει χώρα μόνο όταν και οι δύο οργανισμοί ωφελούνται από την αλληλεπίδραση. Ο Douglas το 1994 επιβεβαίωσε τον όρο συμβίωση στις σχέσεις στις οποίες τουλάχιστον ο ένας οργανισμός παρέχει κάποιο όφελος στον άλλο με κάποιο είδος καινοφανούς μεταβολικής διεργασίας. Στις περισσότερες εκ των περιπτώσεων, το ένα μέλος της αλληλεπίδρασης είναι ένας ευκαρυωτικός οργανισμός. Σε αντίθεση με τους περισσότερους προκαρυωτικούς οργανισμούς, οι ευκαρυωτικοί έχουν μάλλον περιορισμένες μεταβολικές ικανότητες με αποτέλεσμα η συμβίωση με τους προκαρυωτικούς οργανισμούς να προσφέρει



μια εξελικτική στρατηγική, μέσω τις οποίας ευκαρυωτικοί οργανισμοί έχουν πρόσβαση σε ένα ευρύ φάσμα μεταβολικών πηγών (Sabater et al., 2001).

Με βάση τα παραπάνω εκτιμάται ότι η αδιαμφισβήτητα μεγαλύτερη κατηγορία των ασπονδύλων, τα έντομα (Insecta), συμμετέχει σε κάποιο τύπο συμβίωσης με τις περισσότερες σχέσεις να αναφέρονται με τα βακτήρια. Συγκεκριμένα, πάνω από το 10% των ειδών των εντόμων φιλοξενούν προκαρυωτικούς ενδοσυμβιωτικούς οργανισμούς σε διάφορα στάδια τους. Οι συμβιωτικές αυτές σχέσεις των ξενιστών εντόμων με τους υποχρεωτικά συνυπάρχοντες προκαρυωτικούς οργανισμούς χρονολογούνται εδώ και 200 - 250 εκ. χρόνια και έχουν καταδειχθεί για διάφορα συστήματα εντόμων, όπως στις αφίδες, στις μύγες tse - tse, στα μυρμήγκια, στις ψύλλες, στις κατσαρίδες και σε διάφορα άλλα αρθρόποδα (Welburn et al., 1987). Η υποχρεωτική αμοιβαιότητα των εντόμων με τα βακτήρια θεωρείται ότι επιτρέπει τους ξενιστές - έντομα να επιζούν σε περιοριστικές συνθήκες διατροφής όπου τους παρέχονται θρεπτικά συμπληρώματα που δεν μπορούν τα ίδια να συνθέσουν όπως αμινοξέα, λιπαρά οξέα και βιταμίνες Β, ή μεταβολίζοντας άχρηστες ουσίες τους σε μη τοξικές μορφές (Buchner, 1965, Nogge, 1981). Η απώλεια της συμβίωσης με τους αντίστοιχους συμβιωτές συχνά έχει σημαντικές συνέπειες για τον ξενιστή, όπως στειρότητα, μειωμένη αρμοστικότητα (fitness), εξασθένηση της αύξησης-ανάπτυξης και μικρότερη διάρκεια ζωής (Bourtzis & Miller, 2003).

Οι συμβιώτες – παράσιτα μπορεί να ζουν πάνω στην επιφάνεια του σώματος του ξενιστή (εκτοπαράσιτα), ή μέσα σε κύτταρα του σώματος του ξενιστή (ενδοπαράσιτα). Τα αμοιβαία συνυπάρχοντα βακτήρια ζουν μέσα σε εξειδικευμένα κύτταρα των εντόμων ξενιστών καλούμενα *bacteriocytes* - (*mycetocytes*), τα οποία κληρονομούνται από τη μητέρα στους απογόνους (Εικ. 9).



**Εικόνα 9.** Κύτταρα (*Bacteriocytes*) στα οποία βρίσκονται τα βακτήρια της *Wolbachia* (από Graf, 2003).

Τα βακτήρια μοιάζουν με κυπελοειδή όργανα και περιβάλλονται από μια μεμβράνη που προέρχεται από κύτταρο του ξενιστή εντόμου, διαμορφώνοντας μια κύστη, καλούμενη συμβίωση (symbiosome). Τα αμινοξέα που παράγονται από το βακτηριακό συμβίωτη, απελευθερώνονται και λαμβάνονται από τα κύτταρα των ξενιστών. Όντας ενδοκυτταρικά, τα βακτήρια, αυτά στηρίζονται στον ξενιστή τους για την εξασφάλιση της μεταφοράς τους στην επόμενη γενεά, παρέχοντας απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία στα έντομα, τα οποία με τη σειρά τους παρέχουν σε αυτά το κατάλληλο περιβάλλον για την ανάπτυξη και επιβίωσή τους. Μερικά βακτήρια είναι επιζήμια για τον οργανισμό του εντόμου, ή ακόμη και θανατηφόρα και αναφέρονται ως παράσιτα ή παθογόνα, ενώ άλλα παίζουν πρωταρχικό ρόλο στους ξενιστές τους και είναι γνωστά ως αμοιβαίοι συμβιωτές (Bourtzis & Miller, 2003).

Όλα τα έντομα φιλοξενούν ενδοσυμβιωτικά βακτήρια, τα οποία μεταβιβάζονται από τη μητέρα στους απογόνους. Ένας μεγάλος αριθμός τέτοιων βακτηρίων ανήκουν στις οικογένειες: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Chlamydiae* και *Firmicutes* (*Mollicutes*), επιδρώντας σε κύτταρα του εντέρου και σε άλλα εξειδικευμένα κύτταρα. Παραδείγματα ενδοκυτταρικών συμβιωτικών βακτηρίων αποτελούν το είδος *Buchnera* στις αφίδες, το *Wigglesworthia* στις μύγες τσε-τσε,

το *Blochmannia* στους σκώρους, το *Baumannia* στα ορθόπτερα (Sharpshooters) και η *Wolbachia* σε διάφορα αρθρόποδα, νηματώδεις και μη μολυσμένα έντομα (Yoshitomo K., 2009).

Συγκεκριμένα τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει αυξηθεί εκθετικά για το είδος *Wolbachia pipientis*, μιας και αυτό ίσως είναι το πιο διαδεδομένο συμβιωτικό βακτήριο στη γη. Η *Wolbachia* αποτελεί ένα ενδοκυτταρικό μητρικά κληρονομούμενο βακτήριο, που μπορεί να εισβάλλει και να διατηρείται σε πλήθος ειδών αρθροπόδων (έντομα, καρκινοειδή, αράχνες, ακάρεα, νηματώδεις). Το είδος αυτό προκαλεί μια σειρά αναπαραγωγικών ανωμαλιών στους ξενιστές της, όπως θηλυκοποίηση (Feminization), παρθενογένεση (Parthenogenesis), θανάτωση αρσενικών (Male - killing), με σημαντικότερη την κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (Cytoplasmic Incompatibility, CI), η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην αντιμετώπιση επιζήμιων εντόμων, τόσο για την γεωργική παραγωγή, όσο και για τη δημόσια υγεία (Bourtzis et al., 2003). Ο βαθμός επίδρασης του ενδοσυμβιωτικού βακτηρίου της *Wolbachia*, όσο και των άλλων ειδών, καθορίζεται από μία αλληλοεξαρτώμενη σχέση με τον ξενιστή τους, που μπορεί να καθορίσει τη διαφορά μεταξύ της αμοιβαίας επιλογής του ξενιστή και του συμβιωτικού οργανισμού, με επιπλοκές στην εξέλιξη και των δύο συμμετεχόντων.

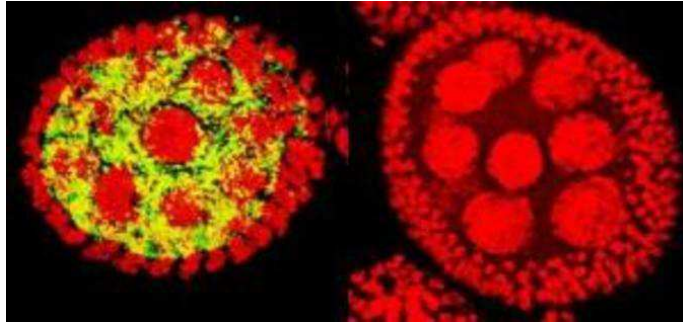
### 1.2.3 Το βακτήριο *Wolbachia*

Η *Wolbachia* αποτελεί μια κοινή και διαδεδομένη ομάδα μητρικά κληρονομούμενων βακτηρίων, που βρίσκονται στους αναπαραγωγικούς ιστούς των αρθροπόδων. Την τελευταία δεκαετία έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών, λόγω του ρόλου της σε βασικές εξελικτικές διαδικασίες, όπως η συμβίωση και η ειδογένεση. Επιπρόσθετα, η *Wolbachia* θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για το γενετικό μετασχηματισμό των εντόμων, τα οποία προκαλούν βλάβες στον τομέα της γεωργίας και της υγείας. Τα είδη του γένους *Wolbachia* (Εικ. 10) είναι ενδοκυτταρικά, μητρικά κληρονομούμενα βακτήρια, τα οποία φιλοξενούνται σε ένα πλήθος αρθροπόδων. Σύμφωνα με

πρόσφατες αναλύσεις το 16,9% των νεοτροπικών εντόμων, το 35,7% των διπτέρων, το 35 – 40% των ακάρεων και πάνω από το 46,3% των ισοπόδων (καρκινοειδή), είναι μολυσμένα με τη *Wolbachia*. Πρόσφατα βρέθηκε ότι η *Wolbachia* μπορεί να προσβάλει τα περισσότερα είδη νηματώδων, που προκαλούν ασθένειες γνωστές ως φιλαριάσεις. Κατά συνέπεια η *Wolbachia* προσβάλει τουλάχιστον δύο ζωικά φύλα (Αρθρόποδα και Νηματώδεις) και εμφανίζεται σε μεγάλη συχνότητα, μεταξύ των δύο πιο εξειδικευμένων ζωικών ομάδων τα έντομα και τα ακάρεα (Kun –Hsien Tsai et al., 2004).

Η ανάλυση της αλληλουχίας του 16SrRNA γονιδίου, έδειξε ότι η *Wolbachia* ανήκει στην α-υποομάδα των πρωτεοβακτηρίων (Proteobacteria) της οικογένεια Rickettsiaceae και συγγενεύει στενά με τα ενδοκυτταρικά βακτηριακά είδη : *Anaplasma*, *Cowdria*, *Ehrlichia* και *Rickettsia* (Areerate et al., 2003). Υπάρχουν τουλάχιστον οκτώ ταξινομικές υποομάδες (supergroups) στις οποίες διαχωρίζεται το είδος της *Wolbachia*, καλούμενες (A – H). Η ταξινόμηση αυτή βασίζεται σε φυλογενετικές αναλύσεις, χρησιμοποιώντας την αλληλουχία των εξής γονιδίων: *ftsZ*, *groEl*, *gltA* και *dnaA*. Οι A και B υποομάδες διαχωρίστηκαν περίπου πριν από 60 εκατομμύρια χρόνια και εμφανίζονται μόνο σε αρθρόποδα. Οι C και D υποομάδες είναι χαρακτηριστικές μόνο στους νηματώδεις της φιλαριάσης και διαχωρίστηκαν από τους κοινούς προγόνους των A και B υποομάδων, πριν από 100 εκατομμύρια χρόνια. Η F υποομάδα ανιχνεύτηκε σε νηματώδεις και αρκετά είδη αρθροπόδων (Σκορπιούς, Τερμίτες, Κολεόπτερα, Ημίπτερα, Δίπτερα, Κατσαρίδες και Νευρόπτερα). Οι E και H υποομάδες είναι λιγότερο διαδεδομένες, με την E να εμφανίζεται μέχρι στιγμής στα Collembola και την H σε ένα είδος τερμιτών (Isoptera), (Ros et al., 2008). Τα διάφορα είδη αρθροπόδων μπορεί να είναι κάλλιστα προσβεβλημένα με μόνο μία ή και περισσότερες υποομάδες *Wolbachia* (Bourtzis & Miller, 2003). Μερικές αποκλίσεις της προέλευσης των παραπάνω υποομάδων *Wolbachia* δεν έχουν καθοριστεί ακόμη. Λόγω όμως του υψηλού ερευνητικού ενδιαφέροντος, της πιθανής ανακάλυψης περισσότερων στελεχών *Wolbachia* σε περισσότερους ξενιστές, ο αριθμός των υποομάδων πιθανόν να αυξηθεί στο προσεχές μέλλον (Ros et al., 2008).

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον για το βακτήριο της *Wolbachia* έχει αυξηθεί, καθώς αποτελεί ένα κοινό μολυσματικό παράσιτο που εκμεταλλεύεται τη σεξουαλική ζωή των ξενιστών της για δικό της όφελος, δημιουργεί καινούργια είδη και μπορεί τέλος να χρησιμοποιηθεί ως όπλο για την καταπολέμηση επιζήμιων εχθρών που βλάπτουν τη γεωργία και τη δημόσια υγεία (Knight 2001 & Zimmer, 2001).



**Εικόνα 10.** Ωοθήκες μύγας της Μεσογείου προσβεβλημένες με *Wolbachia*.  
(από [B. Keim, 2007](#))

Τα βακτήρια του γένους *Wolbachia* πρωτοαναφέρθηκαν στη βιβλιογραφία το 1924, από τους Hertig και Wolbach, ως βακτήρια που μοιάζουν με ρικέτσιες (*Rickettsiaceae*) και προσβάλλουν τις ωοθήκες του κοινού οικιακού κουνουπιού *Culex pipiens*. Το είδος ονομάστηκε επίσημα *Wolbachia pipientis* το 1936 από τον Hertig. Στη δεκαετία του 1950, οι Laven (1951) και Ghelelovitch (1952), ανακάλυψαν ότι ορισμένες διασταυρώσεις μεταξύ κουνουπιών *Culex pipiens* ήταν ασύμβατες, δηλαδή δεν άφηναν απογόνους. Ο Laven το 1959, παρατήρησε ότι ο παράγοντας ασυμβατότητα κληρονομούνταν κυτταροπλασματικά, δηλαδή μέσω της μητέρας και ονόμασε αυτό το φαινόμενο κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (CI). Οι δύο αυτές ανακαλύψεις συνδέθηκαν ύστερα από 12 περίπου χρόνια, όταν οι Yen και Barr το 1971, έδειξαν ότι η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα σχετιζόταν με βακτήρια του γένους των ρικετσιών, που οδηγούσαν σε αποτυχημένες γενετικές διασταυρώσεις.

#### 1.2.4 Μορφολογική περιγραφή της *Wolbachia*

Τα γενικά χαρακτηριστικά των βακτηρίων *Wolbachia* είναι αυτά των ρικετσιών. Είναι διμορφικά, με ραβδοειδείς (0,5 -1,3 μm μήκος) ή κοκκοειδείς σχηματισμούς (0,25 -1,5 μm διάμετρο), (Εικ. 11). Μερικές φορές δημιουργούν σύμπλοκα των δύο ή και περισσότερων βακτηρίων μαζί. Η *Wolbachia pipientis* βρίσκεται μέσα σε κυστίδια που περιβάλλονται από τρεις μεμβράνες: (1) την εξωτερική μεμβράνη που προέρχεται από το κύτταρο του ξενιστή, (2) την ενδιάμεση που είναι το βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα και (3) την εσωτερική που είναι η μεμβράνη του βακτηρίου (Louis & Nigro, 1989). Συνήθως, είναι παρούσα στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων των αναπαραγωγικών οργάνων, ωοθηκών και όρχεων. Έχει επίσης παρατηρηθεί, σε μαλπιγγειανά σωληνάρια, μυϊκό και νευρικό ιστό, καθώς και σε αιμοκύτταρα, ενώ ο αριθμός τους ανά ξενιστή ποικίλει, μεταξύ εκατοντάδων και εκατομμυρίων (Bourtzis et al., 1996).



**Εικόνα 11.** Το βακτήριο *Wolbachia pipientis*.

(<http://www.nature.com/news/1998/020923/full/news020923-11.html>)

#### 1.2.5 Επίδραση της *Wolbachia* στα έντομα ξενιστές της

Στις περισσότερες περιπτώσεις που έχουν ερευνηθεί, η *Wolbachia* φαίνεται να δρα ως παράσιτο που χειρίζεται τον ξενιστή της με τέτοιο τρόπο, ώστε να ευνοείται η μετάδοσή της στους απογόνους, προκαλώντας συγχρόνως σημαντική απώλεια στην αρμοστικότητα (fitness) του ξενιστή, καθώς και άλλες αναπαραγωγικές κυρίως ανωμαλίες. Η πρώτη αναφορά πάνω στις ανωμαλίες αυτές έγινε από τους Yen και Barr το 1971, οι οποίοι ανακάλυψαν ότι η

ασυμβατότητα που είχε παρατηρηθεί στις διασταυρώσεις ανάμεσα στα κουνούπια *Culex ripiens*, σχετιζόταν άμεσα με τη μόλυνση με τη *Wolbachia*. Η ασυμβατότητα αυτή ονομάστηκε κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (Cytoplasmic incompatibility, CI) και στην απλούστερη μορφή της, είναι ο θάνατος των εμβρύων που προέρχονται από μη μολυσμένα θηλυκά, που έχουν γονιμοποιηθεί από μολυσμένα αρσενικά. Στη συνέχεια διαπιστώθηκε ότι τα βακτήρια προκαλούν και άλλες ανωμαλίες στην αναπαραγωγή των ξενιστών τους, όπως παρθενογένεση, θηλυκοποίηση και θανάτωση αρσενικών. Τέλος, βρέθηκε ένα στέλεχος *Wolbachia* το οποίο δεν φαίνεται να προκαλεί αναπαραγωγικές ανωμαλίες, αλλά μειώνει τη διάρκεια ζωής των ξενιστών. Το στέλεχος αυτό, που απαντάται στη *Drosophila melanogaster*, προκαλεί βλάβες στο νευρικό και στο μυϊκό ιστό του ξενιστή, οδηγώντας τα άτομα σε πρόωρο θάνατο (Min & Benzer, 1997).

Σε μερικές περιπτώσεις πλην των ανωμαλιών που προκαλεί η *Wolbachia*, φαίνεται να ωφελεί την αρμοστικότητα των ξενιστών της. Για παράδειγμα, το Υμενόπτερο *Asorbia tabida* διατηρεί μια αμοιβαία σχέση με το βακτήριο της *Wolbachia*, με την απομάκρυνση της οποίας παρεμποδίζεται η ωογένεση. Η μόλυνση του κουνουπιού *Aedes albopictus* με το βακτήριο, όχι μόνο προκαλεί CI, αλλά ωφελεί τα μολυσμένα θηλυκά άτομα, αυξάνοντας την μακροβιότητα, την ωοπαραγωγή και την εκκόλαψη των αυγών, συγκριτικά με μη μολυσμένα θηλυκά. Πρόσφατες έρευνες δείχνουν, ότι η *Wolbachia* προκαλεί κάποιο όφελος σε εργαστηριακά μολυσμένα είδη του *D. melanogaster*, μειώνοντας την πρόκληση βλαβερών μεταλλάξεων (Bourtzis & Miller, 2003).

Πλην των ωφελειών που μπορεί να προκαλέσει η *Wolbachia* στους ξενιστές της, οι σημαντικότερες επιπτώσεις της είναι οι ακόλουθες :

- **Κυτταροπλασματική ασυμβατότητα**

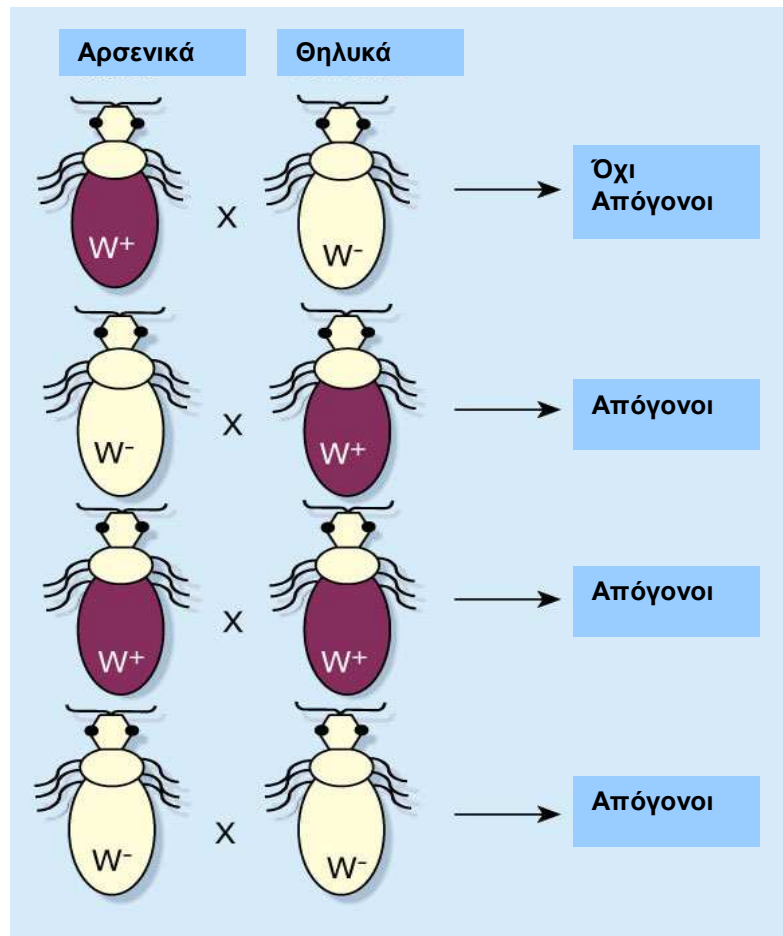
Η *Wolbachia* προκαλεί στειρότητα των αρσενικών ατόμων, γνωστή ως κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (CI). Η ασυμβατότητα αυτή, εμφανίζεται στις περισσότερες από τις βασικές τάξεις εντόμων, όπως δίπτερα, κολεόπτερα, υμενόπτερα, ορθόπτερα, λεπιδόπτερα και ημίπτερα, σε μερικά ισόποδα και ακάρεια. Η CI αναφέρεται ως μία μορφή εμβρυϊκής θνησιμότητας σε

διασταυρώσεις μεταξύ μολυσμένων αρσενικών εντόμων (με ένα ή περισσότερα στελέχη *Wolbachia*), με μη μολυσμένα θηλυκά διαφορετικής μολυσματικής κατάστασης, (μη μολυσμένα, ή μολυσμένα με διαφορετικό στέλεχος της *Wolbachia*). Μέχρι σήμερα λίγα πράγματα είναι γνωστά, όσον αφορά αυτόν τον μηχανισμό. Εντούτοις, ύστερα από γενετικές και κυτταρολογικές μελέτες, φαίνεται ότι το βακτήριο τροποποιεί τα πατρικά χρωμοσώματα κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, επηρεάζοντας τη συμπεριφορά τους κατά την πρώτη μιτωτική διαίρεση. Αντίθετα, τα μητρικά χρωμοσώματα συμπυκνώνονται και διαχωρίζονται φυσιολογικά. Η τροποποίηση αυτή διασώζεται και μεταδίδεται από το βακτηριακό στέλεχος στο αυγό και οδηγεί σε κανονική ανάπτυξη του εμβρύου (Εικ. 12). Η αντίστροφη διασταύρωση, καθώς και οι διασταυρώσεις μεταξύ ατόμων της ίδιας μολυσματικής κατάστασης είναι απόλυτα συμβατές. Αυτό σημαίνει ότι τα μολυσμένα θηλυκά έχουν ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα και μπορούν να συζευχθούν αποτελεσματικά, τόσο με μολυσμένα, όσο και με μη μολυσμένα αρσενικά, οδηγώντας στην εξάπλωση του βακτηρίου στους πληθυσμούς (Tram et al., 2006).

Η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα μπορεί να είναι μονόδρομη ή αμφίδρομη. Η μονόδρομη CI, εκφράζεται όταν συζευχθεί ένα μολυσμένο αρσενικό, με ένα μη μολυσμένο θηλυκό και εμπλέκεται ένα βακτηριακό στέλεχος. Η αντίστροφη διασταύρωση είναι πλήρως συμβατή, όπως οι διασταυρώσεις μεταξύ μολυσμένων ενηλίκων. Η αμφίδρομη CI, εκφράζεται συνήθως σε συζεύξεις μεταξύ μολυσμένων ενηλίκων στο εργαστήριο και όταν εμπλέκονται παραπάνω από ένα στελέχη της *Wolbachia* (Sinkins & Gould, 2006).

Η *Wolbachia* επαγόμενη κυτταροπλασματική ασυμβατότητα αναφέρεται στις περισσότερες σημαντικές οικογένειες και τάξεις εντόμων (πίνακας 3) και είναι η πιο συχνή και ευρέως διαδεδομένη επίδραση, στον φαινότυπο των εντόμων. Φαίνεται ότι διαφορετικά στελέχη της *Wolbachia*, οδηγούν σε διαφορετικούς φαινοτύπους (Boutzris & Miller, 2003).





**Εικόνα 12.** *Wolbachia* και διάφορες μορφές κυτταροπλασματικού αυμβίβαστου.

(από [www.nature.com/.../v7/n6/images/nrg1870-i2.jpg](http://www.nature.com/.../v7/n6/images/nrg1870-i2.jpg), τροποποιημένο)

**Πίνακας 3.** *Wolbachia* και κυτταροπλασματική ασυμβατότητα σε διάφορες οικογένειες και τάξεις εντόμων.

(από Boutrzis & Miller, 2003 τροποποιημένο)

Τάξη	Οικογένεια	Κοινό Όνομα
Orthoptera	Gryllidae	Γρύλοι
Hemiptera	Aleyrodidae Delphacidae	Λευκές Πεταλούδες Πηδητικά Φυτοφάγα Έντομα
Hymenoptera	Figitidae Proctotrupoidae Pteromalidae	Σφήγκες Παρασιτικές Σφήγκες Παρασιτικές Σφήγκες
Coleoptera	Tenebrionidae Curculionidae	Μαύρα Σκαθάρια Ρυγχίτες
Lepidoptera	Pyralidae	Νυκτόβια Λεπιδόπτερα, Λεπιδόπτερα Αγρωστωδών
Diptera	Culicidae Drosophilidae Tephritidae	Κουνούπια Μύγες Ξυδιού Μύγες των Φρούτων

- **Παρθενογένεση**

Σε μερικά ασπόνδυλα, η *Wolbachia* προκαλεί παρθενογένεση σε προσβεβλημένα θηλυκά άτομα. Ο Stouthamer και συνεργάτες (1990), ανακάλυψαν ότι η *Wolbachia* επιφέρει παρθενογένεση σε διάφορα είδη Υμενοπτέρων και συγκεκριμένα θηλητόκο παρθενογένεση σε Υμενόπτερα του γένους *Trichogramma*, σε θρίπες και σε ένα είδος ρυγχίτη, τον *Naupactus tessellatus*, (Werren, 1997). Η *Wolbachia* προκαλεί επίσης παρθενογένεση σε ένα γένος φυτοφάγων ακάρεων (Weeks & Breeuwer, 2001) και σε ένα είδος

θυσανόπτερων (Arakaki et al., 2001). Τα είδη αυτά έχουν ένα ιδιαίτερο σύστημα φυλοκαθορισμού (αρρενοτοκία), κατά το οποίο τα αρσενικά προέρχονται από απλοειδή αυγά (μη γονιμοποιημένα), ενώ τα θηλυκά από διπλοειδή (γονιμοποιημένα). Το βακτήριο τροποποιεί την πρώτη μιτωτική διαίρεση στα μη γονιμοποιημένα αυγά, και συγκεκριμένα την ανάφαση, με αποτέλεσμα τη δημιουργία διπλοειδούς πυρήνα και την περαιτέρω ανάπτυξη αυτών σε θηλυκά, αντί αρσενικά άτομα (Stouthamer & Kazmer 1994).

Η πρόκληση παρθενογένεσης σε Υμενόπτερα μέσω της *Wolbachia*, μπορεί να παρέχει όφελος στις βιολογικές στρατηγικές αντιμετώπισης παρασιτικών εντόμων. Εάν τα θηλυκά αναπαράγονταν παρθενογενετικά, όλοι οι απόγονοι θα ήταν θηλυκά άτομα. Εντούτοις, ο παραπάνω τύπος αναπαραγωγής, σε συνδυασμό με την έλλειψη σεξουαλικών συντρόφων, μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση επιβλαβών αλληλόμορφων γονιδίων και στην απώλεια γενετικής παραλλακτικότητας (Stouthamer et al., 1999).

- **Θηλυκοποίηση**

Είναι γνωστό επίσης, ότι πολλά ισόποδα (crustacea – καρκινοειδή), φιλοξενούν κυταροπλασματικά κληρονομούμενα βακτήρια που προκαλούν θηλυκοποίηση. Έχει αποδειχθεί, ότι το βακτήριο της *Wolbachia* προκαλεί θηλυκοποίηση σε ένα είδος μικρού καρκινοειδούς το *Armadillidium vulgare*, (Werren, 1997), καθώς και στο λεπιδόπτερο *Ostrinia furnacalis*, (Lepidoptera: Crambidae) (Kageyama, 2002).

Τα ισόποδα αναπτύσσονται σε θηλυκά, εκτός και εάν ο ανδρογενετικός αδένας εκφράσει μία ορμόνη, η οποία επάγει αρσενική διαφοροποίηση. Τα βακτήρια στα είδη αυτά εμποδίζουν την ανάπτυξη του αδένα, με αποτέλεσμα άτομα γενετικά καθορισμένα ως αρσενικά, να συμπεριφέρονται ως θηλυκά, ευνοώντας την μετάδοση των βακτηρίων, όπως και παραπάνω (Werren, 1997).

- **Θάνατος αρσενικών εντόμων**

Πολλά συγγενικά είδη βακτηρίων, έχουν αναπτύξει την ικανότητα της θανάτωσης αρσενικών απογόνων μολυσμένων θηλυκών, φαινόμενο γνωστό ως θανάτωση αρσενικών (male – killing). Ο θάνατος των αρσενικών απογόνων, σχετίζεται με την επίδραση ενδοκυτταρικών βακτηρίων, σε διάφορους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι το ενδοκυτταρικό βακτήριο της *Wolbachia* προκαλεί θάνατο αρσενικών εμβρύων σε λεπιδόπτερα, κολεόπτερα και σε ένα είδος *Drosophila*. Το 2006 ο Charlat και συνεργάτες μελέτησαν την επίδραση της *Wolbachia* σε αρσενικά λεπιδόπτερα του είδους *Hypolimnas bolina*, τόσο στο εμβρυικό, όσο και στο νυμφικό στάδιο. Η έρευνα οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η *Wolbachia*, μπορεί να προκαλέσει μια πρόωρη θανάτωση αρσενικών στο εμβρυικό στάδιο, άλλα και μία μετέπειτα θανάτωση στο στάδιο της νύμφης.

- ***Wolbachia* στους νηματώδεις**

Το βακτήριο της *Wolbachia* έχει αναπτύξει αμοιβαία συμβιωτική σχέση με ένα είδος παρασιτικών νηματωδών που προκαλούν ασθένειες, γνωστές ως φιλαριάσεις. Η *Wolbachia* φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στις παραπάνω ασθένειες, αφού το μεγαλύτερο μέρος της νοσηρότητας των νηματωδών, οφείλεται στην αντίδρασή τους με το βακτήριο. Συνήθως, το αποτέλεσμα της επίδρασης της *Wolbachia* με τους νηματώδεις της φιλαρίασης, είναι ο θάνατος ή η στειρότητα (Hoerauf et al., 2003).

- **Ειδογένεση**

Διάφορες μελέτες, που έγιναν στο παρελθόν, δείχνουν την πιθανή συμβολή της *Wolbachia* στη δημιουργία νέων ειδών. Στο παρασιτικό υμενόπτερο *Nasonia* έχει αποδειχθεί ότι η αμφίδρομη κυτταροπλασματική ασυμβατότητα σχετίζεται με τη δημιουργία νέων ειδών, μιας και η χορήγηση αντιβιοτικών σε διαφορετικά είδη μολυσμένων εντόμων, οδηγεί στην παραγωγή βιώσιμων και γόνιμων υβριδίων (Bordenstein et al., 2001). Παρά το πλήθος των ερευνητικών στοιχείων για την

εμπλοκή του βακτηρίου σε φαινόμενα ειδογένεσης, η επίδρασή του προς αυτή την κατεύθυνση παραμένει υπό διερεύνηση.

### 1.2.6 Εφαρμογές της *Wolbachia*

Το έντονο ενδιαφέρον για την εύρεση εναλλακτικών μεθόδων καταπολέμησης επιζήμιων εντόμων που να επιβαρύνουν λιγότερο το περιβάλλον, οδηγεί στην εξέταση των συμβιωτικών μικροοργανισμών. Πιθανές εφαρμογές της *Wolbachia* στην αντιμετώπιση των εντόμων είναι οι εξής:

α) Στην εξάπλωση επιθυμητών γονιδίων σε φυσικούς πληθυσμούς εντόμων, (π.χ. γονίδια που θα εμποδίζουν τη μετάδοση παθογόνων μικροοργανισμών από βλαβερά έντομα σε ανθρώπους, ζώα ή σε φυτά). Κάθε παράγοντας (π.χ. γονίδια, μιτοχόνδρια, συμβιωτικοί οργανισμοί ή ιοί) που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και είναι μητρικά μεταδιδόμενος, θα εξαπλώνεται μαζί με τη *Wolbachia*. Συνεπώς, αν κατάλληλα γονίδια εκφραστούν από τη *Wolbachia* ή από οποιαδήποτε άλλη μητρικά κληρονομούμενη οντότητα (π.χ. ένα άλλο συμβιωτικό οργανισμό), τότε τα γονίδια αυτά θα εξαπλωθούν στον πληθυσμό μαζί με τη *Wolbachia*. Είναι επίσης δυνατό να χρησιμοποιήσουμε τη *Wolbachia* για να διασπείρουμε γονίδια που έχουν τοποθετηθεί στα χρωμοσώματα των ειδών εντόμων - στόχων. Αυτή η προσέγγιση μπορεί να πραγματοποιηθεί όταν τα γονίδια της *Wolbachia* που είναι υπεύθυνα για το φαινόμενο της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας, απομονωθούν και ενσωματωθούν στα χρωμοσώματα των εντόμων - στόχων. Θεωρητικές μελέτες έχουν δείξει ότι εάν αυτά τα γονίδια εκφραστούν κατάλληλα, τότε θα εξαπλωθούν στους πληθυσμούς των εντόμων μαζί με κάθε άλλο στενά συνδεδεμένο γονίδιο (Bourtzis & O' Neill, 1998).

β) Με την άμεση αντιμετώπιση φυσικών πληθυσμών βλαβερών εντόμων, μέσω της *Wolbachia* - επαγόμενης κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας. Η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν με τρόπο ανάλογο της τεχνικής στείρωσης των εντόμων (S.I.T), ως μέθοδος αντιμετώπισης πληθυσμών κουνουπιών και λεπιδοπτέρων με μεγάλη επιτυχία, τόσο στη φύση όσο και στο εργαστήριο. Η ενσωμάτωση των τεχνικών της S.I.T. και της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας έχει οδηγήσει με επιτυχία στον έλεγχο

πληθυσμών του κουνουπιού *C. pipiens* σε εργαστηριακό επίπεδο, (Subbarao, 1982). Η δυνατότητα δημιουργίας συνδυασμών "εντόμου - *Wolbachia*" με διπλές ή και πολλαπλές μολύνσεις με αμοιβαία ασύμβατα στελέχη *Wolbachia*, καθώς και κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας "δύο κατευθύνσεων", μας επιτρέπει την επανειλημμένη χρησιμοποίηση του μηχανισμού της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας, σε πληθυσμούς που ήδη έχουν μολυνθεί με το βακτήριο.

γ) Η ύπαρξη της *Wolbachia* στους σωματικούς ιστούς παρέχει την δυνατότητα χρησιμοποίησής της, όχι μόνο ως μηχανισμού αντιμετώπισης επιζήμιων εντόμων, αλλά ταυτόχρονα ως φορέα ελέγχου διαφόρων ασθενειών στον άνθρωπο. Σε τροπικές περιοχές η ελονοσία μεταδίδεται από το είδος *Anopheles gambiae* και ο πυρετός του Δυτικού Νείλου (εγκεφαλίτιδα), από τα είδη *Aedes aegypti* και *Aedes albopictus*. Ο γενετικός χειρισμός αυτών των εντόμων – φορέων των ασθενειών, με τη *Wolbachia*, μπορεί να οδηγήσει στη μείωση των προσβολών στον άνθρωπο, με άμεσο αποτέλεσμα τον έλεγχο των παραπάνω ασθενειών (Rasgon, 2003).

### 1.2.7 *Wolbachia* και μύγα της Μεσογείου

Όπως σημειώθηκε παραπάνω, η *Wolbachia* έχει εντοπισθεί σε ένα ευρύ φάσμα αρθροπόδων. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι πιθανώς πάνω από το 16% διαφόρων ειδών εντόμων, είναι μολυσμένα με αυτό το βακτήριο, καθιστώντας αυτό το βακτήριο τον πιο διαδεδομένο συμβιωτικό οργανισμό στα αρθρόποδα. Παρά την εκτενή κατανομή της *Wolbachia*, σημαντικά βλαβερά είδη εντόμων δεν είναι μολυσμένα. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται η μύγα της Μεσογείου, ο Δάκος της ελιάς, η Ευδεμίδα της αμπέλου *L. botrana*, το Κουνούπι φορέας της ελονοσίας *Anopheles gambiae* (Werren, 1997).

Το 2004 οι Zabalou και συνεργάτες, εισήγαγαν το βακτήριο της *Wolbachia* σε εργαστηριακές σειρές της μύγας της Μεσογείου, χρησιμοποιώντας ως δότη τη ραγγολέτιδα των κερασιών. Οι φυσικοί πληθυσμοί του *R. cerasi* είναι μολυσμένοι από ένα στέλεχος της *Wolbachia*, το *wCer1*, είτε από δύο, τα *wCer1* και *wCer2*. Αναπαραγωγικό Ασυμβίβαστο παρατηρήθηκε μεταξύ των μολυσμένων αρσενικών και των μη μολυσμένων (ή μολυσμένων με διαφορετικό στέλεχος) θηλυκών. Η

μόλυνση λοιπόν της μύγας της Μεσογείου με *Wolbachia* προκάλεσε κυταροπλασματική ασυμβατότητα, γεγονός που ενισχύει τη χρήση του βακτηρίου ως νέο φιλικό προς το περιβάλλον μέσο, για την αντιμετώπισή της. Τα αποτελέσματα ενθαρρύνουν επίσης την εισαγωγή της *Wolbachia* σε έντομα ή ζώα μεγάλης οικονομικής και υγιεινής σημασίας, για τη διαχείριση των φυσικών πληθυσμών της.

Το 2005 οι Rocha και συνεργάτες, διαπίστωσαν ότι η *Wolbachia* εμφανίζεται ως ενδοσυμβιωτικό βακτήριο σε μύγες της Μεσογείου στην Βραζιλία. Οι ίδιοι μελέτησαν την ύπαρξή της σε τρία δείγματα του εντόμου.

Το 2009 οι Coscrato και συνεργάτες, μελέτησαν την επίδραση της *Wolbachia* στα έντομα *Anastrepha* spp. και *C. capitata*. Τα έντομα που χρησιμοποιήθηκαν συλλέχθηκαν από περιοχές της Βραζιλίας, του Εκουαδόρ και του Guayaquil. Όλα τα έντομα που μελετήθηκαν ήταν προσβεβλημένα από το βακτήριο της *Wolbachia* της A υποομάδας. Φυλογενετικές αναλύσεις έδειξαν ότι ένα κατάλληλο γονίδιο για τη μελέτη της σχέσης μεταξύ διαφορετικών φυλών της *Wolbachia* ήταν το *wsp*. Η αλληλουχία των βακτηρίων που εντοπίστηκαν στα παραπάνω είδη μυγών των φρούτων, ήταν παρόμοια με αυτή της *wMel* που έχει αναφερθεί σε άλλα είδη διπτέρων.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η μύγα της Μεσογείου από μόνη της δεν περιέχει το βακτήριο της *Wolbachia* (Bourtzis et al., 1994), με μία εξαίρεση φυσικών πληθυσμών της στη Βραζιλία (Rocha et al., 2005). Η διαθεσιμότητα μαζικής εκτροφής του εντόμου και γενετικών μεταλλαγών σε διάφορες φυλές, έχει οδηγήσει σε περαιτέρω έρευνες σχετικά με τη χρήση του βακτηρίου σε αυτό το είδος μύγας. Αρχικά, το βακτήριο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα σύστημα έκφρασης κατάλληλων γονιδίων, που θα μειώνει την αρμοστικότητα της μύγας της Μεσογείου, με αποτέλεσμα την ελαχιστοποίηση των ζημιών σε ευαίσθητες καλλιέργειες. Δεύτερον, η προκαλούμενη CI (Cytoplasmic incompatibility), μπορεί να αξιοποιηθεί στη μεταφορά γονιδίων σε φυσικούς πληθυσμούς (Xi et al., 2005) και Τρίτον, η CI μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόκληση στειρότητας σε πληθυσμούς στον αγρό, μέσω της μεθόδου ITT (Incompatible insect technique).

Προς αυτή τη κατεύθυνση οι Zabalou και συνεργάτες αρχικά έκαναν εισαγωγές – εκχύσεις σε έμβρυα μύγας της Μεσογείου, διαφορετικών φυλών *Wolbachia*, από είδη εντόμων όπου το βακτήριο ζει ως συμβιώτης, όπως η *D. melanogaster*, η *D. simulans* (μολυσμένη με το wRi) και η *C. (Ephestia) cautella*. Οι προσπάθειες αυτές δεν ήταν επιτυχείς, λόγω της μη προσαρμογής του βακτηρίου στο νέο ξενιστή, και των ελλιπών γνώσεων σχετικά με την προέλευση της *Wolbachia* (ξενιστή από τον οποίο προήλθε) (Zabalou et al., 2004). Ως επακόλουθο αποδείχθηκε ότι φυλές της *Wolbachia* από ξενιστή που συγγενεύει περισσότερο με τη μύγα της Μεσογείου, δηλαδή το *R. cerasi*, οδηγούν σε σταθερές εκχύσεις του βακτηρίου στο *C. capitata*. Εισαγωγές διαφορετικών συνδυασμών του βακτηρίου από Αυστριακούς και Ιταλικούς πληθυσμούς του *R. cerasi*, στο *C. capitata* και σύζευξη αυτών, έδωσε υψηλά ποσοστά ασυμβατότητας (θνησιμότητα σε έμβρυα). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η προκαλούμενη CI από το βακτήριο της *Wolbachia* στην μύγα της Μεσογείου δίνει τη δυνατότητα αξιοποίησής της στον έλεγχο των πληθυσμών του εντόμου (Zabalou et al., 2009).

### 1.3 Σκοπός της παρούσας εργασίας

Η εφαρμογή της μεθόδου IIT, όπως και της SIT βασίζονται στην αποτελεσματική εκτροφή, στελεχών της μύγας της Μεσογείου και την εκδήλωση της τυπικής συμπεριφοράς τους, μετά την εξάπλωση. Συνεπώς, η μελέτη της επίδρασης του βακτηρίου της *Wolbachia* σε διαφορετικές φυλές της μύγας της Μεσογείου και ιδιαίτερα στην αρμοστικότητά της, είναι μεγάλης σημασίας.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν να μελετηθεί σε διαφορετικές φυλές της μύγας της Μεσογείου, η επίδραση του βακτηρίου της *Wolbachia* στην επιβίωση των ανηλικών και ενηλικών ατόμων, καθώς και στην ωοπαραγωγή των θηλυκών εντόμων. Συγκεκριμένα, στο εργαστήριο μελετήθηκε, το ποσοστό εκκόλαψης, νύμφωσης και ενηλικίωσης πέντε διαφορετικών φυλών της μύγας της Μεσογείου, (δύο φυλών χωρίς το βακτήριο της *Wolbachia*, των στελεχών - μαρτύρων και τριών φυλών, με το βακτήριο), καθώς και η διάρκεια επιβίωσης αρσενικών – θηλυκών ατόμων και ωοπαραγωγής. Στα κεφάλαια που ακολουθούν, δίνονται γενικά εισαγωγικά στοιχεία για τις φυλές της μύγας της Μεσογείου που



χρησιμοποιήθηκαν και γίνεται μια συνοπτική περιγραφή των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν και μεθόδων που ακολουθήθηκαν, κατά την εκτέλεση των πειραμάτων. Στη συνέχεια δίνονται τα αποτελέσματα της επίδρασης της *Wolbachia* στη μύγα της Μεσογείου, δηλαδή τα βιολογικά χαρακτηριστικά των ανηλίκων (εκκόλαψη, νύμφωση, ενηλικίωση) και ενηλίκων (επιβίωση, ωοτοκία, ωοπαραγωγή). Τέλος, γίνεται μια γενική ανακεφαλαίωση και εξάγονται γενικά συμπεράσματα που προκύπτουν από το σύνολο της διατριβής, ενώ γίνεται αναφορά και στη μελλοντική χρήση του βακτηρίου ως μια νέα μέθοδο βιολογικής αντιμετώπισης επιζήμιων εντόμων, (Zabalou et al.,2009).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### 2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 2.2 Συνθήκες Εργαστηρίου

Τα πειράματα της παρούσας Μεταπτυχιακής Διατριβής πραγματοποιήθηκαν στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος και πιο συγκεκριμένα στους χώρους του Εργαστηρίου Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας, από τον Μάρτιο του 2009 έως τον Ιανουάριο του 2010. Στους εργαστηριακούς χώρους επικρατούσε θερμοκρασία  $25 \pm 1$  °C, σχετική υγρασία  $65 \pm 5\%$  και φωτοπερίοδος 14 : 10 (Φ:Σ), με τη φωτόφαση από τις 07:00, έως και τις 21:00 h. Ο φωτισμός στο χώρο των πειραμάτων προερχόταν από λαμπτήρες φθορισμού (day light type), καθώς και από φυσικό φωτισμό, που διέρχονταν στο χώρο από τέσσερα παράθυρα που βρίσκονταν στην οροφή του δωματίου. Η ένταση του φωτός στο επίπεδο όπου διατηρούνταν οι κλωβοί με τα έντομα, κυμαίνονταν από 800, έως 1000 lux. Οι αποικίες με τις φυλές της μύγας της Μεσογείου οι οποίες δεν περιείχαν το βακτήριο της *Wolbachia*, διατηρούνταν σε διαφορετικούς θαλάμους, σε σχέση με αυτές που ήταν μολυσμένες με το βακτήριο. Στις φυλές στις οποίες απουσίαζε το βακτήριο, ο φωτισμός προερχόταν αποκλειστικά από λαμπήρες φθορισμού, με ένταση φωτός να κυμαίνεται από 1500, έως 2000 lux. Αντιθέτως, στις φυλές όπου είχαν το βακτήριο ο φωτισμός προερχόταν από λαμπήρες φθορισμού, με ένταση φωτός από 800, έως 1000 lux και από φυσικό φωτισμό των παραθύρων της οροφής.

#### 2.3 Έντομα που χρησιμοποιήθηκαν

Χρησιμοποιήθηκαν πέντε διαφορετικές φυλές της μύγας της Μεσογείου: (1) η Μπενάκειο, (2) η Vienna GSS, (3) η Vienna E88, (4) η Wol – Med 88.6 και (5) η Wol – Med S10.3. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 4 που ακολουθεί, οι δύο από τις παραπάνω φυλές δεν ήταν μολυσμένες από το βακτήριο της *Wolbachia* (μάρτυρες - control) και οι τρεις ήταν μολυσμένες με το βακτήριο.

**Πίνακας 4.** Χρησιμοποιούμενες φυλές και στελέχη *Wolbachia*

Στέλεχος μύγας Μεσογείου	Πληροφορίες	Μόλυνση	Στέλεχος <i>Wolbachia</i>
<b>Μπενάκειο</b>	Άγριος τύπος εντόμων, που χρησιμοποιήθηκε σε δύο πρόσφατες εργασίες (Zabalou et al, 2004 & Zabalou et al, 2009).	ΟΧΙ	-
<b>Vienna GSS</b> (genetic sexing strain) ή αλλιώς Vienna 8	Έχει υποστεί γενετική τροποποίηση, ώστε οι λευκές πούπες να δίνουν θηλυκά άτομα και οι καφέ αρσενικά άτομα. Επίσης τα θηλυκά άτομα είναι ευαίσθητα στις υψηλές θερμοκρασίες, (Zabalou et al, 2009).	ΟΧΙ	-
<b>Wol – Med S10.3</b>	Η φυλή Μπενάκειο strain μολυσμένη με ένα στέλεχος <i>Wolbachia</i> , (Zabalou et al, 2004).	ΝΑΙ	<i>wCer4</i>
<b>Wol – Med 88.6</b>	Η φυλή Μπενάκειο strain μολυσμένη με ένα στέλεχος <i>Wolbachia</i> , (Zabalou et al, 2004).	ΝΑΙ	<i>wCer2</i>
<b>Vienna E88</b>	Η φυλή Vienna 8 GSS μολυσμένη με ένα στέλεχος <i>Wolbachia</i> , (Zabalou et al, 2009).	ΝΑΙ	<i>wCer2</i>

\* Τα στελέχη *Wolbachia wCer2* και *wCer4* απαντούν στο είδος *Rhagoletis cerasi*.

Όλες οι φυλές παραχωρήθηκαν από τον καθηγητή κ. Κώστα Μπούρτζη, Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Ελλάδας.

## 2.4 Εκτροφή εντόμων

Η αρμοστικότητα των ανηλικών και ενηλικών σταδίων της μύγας της Μεσογείου, μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες, (περιβαλλοντικούς κ.α). Για τους λόγους αυτούς στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν έντομα που εκτράφηκαν μία γενεά στο Εργαστήριό μας κάτω από ίδιες συνθήκες. Οι αποικίες των διαφορετικών φυλών ξεκινούσαν από το στάδιο της νύμφης (πούπα) που στάλθηκαν στο Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας, από το IMBB (Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας & Βιοποικιλότητας). Οι νύμφες περιέχονταν σε τρυβλία με βαμβάκι για την προφύλαξή τους, όπου αναγράφονταν η ημερομηνία νύμφωσής τους, καθώς και αυτή της αποστολής τους στο εργαστήριό μας (Εικ.13).

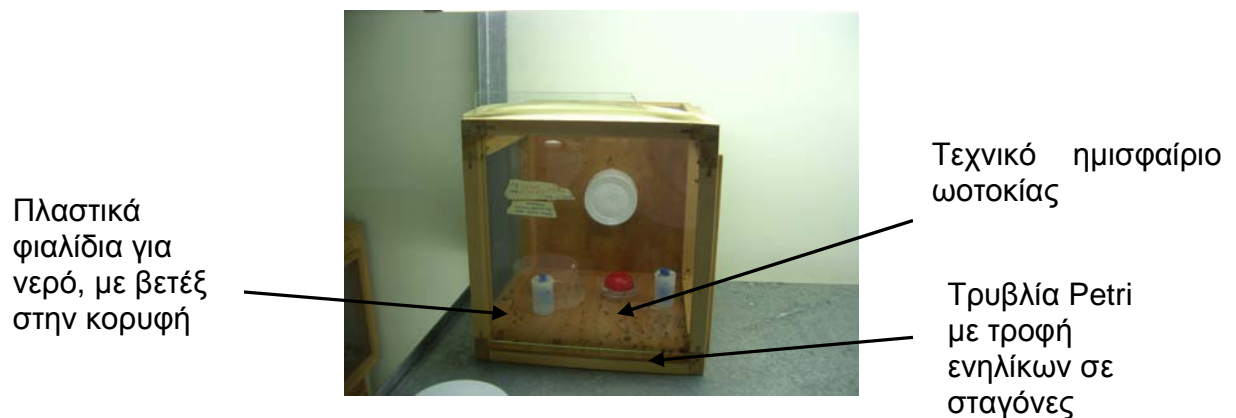


**Εικόνα 13.** Τρυβλία με νύμφες για την εγκατάσταση της αποικίας.

Στη συνέχεια οι νύμφες τοποθετούνταν σε ξύλινα κλουβιά διαστάσεων 30 x 30 x 30 cm, τα οποία είχαν τις τρεις πλευρές καλυμμένες με συρμάτινο πλέγμα, τη μία με γυαλί και τις άλλες δύο με ξύλο. Η οπίσθια ξύλινη πλευρά είχε κυκλικό άνοιγμα για τον έλεγχο των εντόμων, η οποία καλύπτονταν με τον πάτο κυκλικού πλαστικού κυπέλλου. Σε κάθε ξύλινο κλουβί, και για κάθε φυλή, τοποθετούνταν

νερό σε πλαστικά φιαλίδια με σπογγοπετσέτα (βετέξ) για την παροχή νερού και τροφή ενηλίκων, η οποία αποτελούνταν από μείγμα υδρολυμένης πρωτεΐνης, (MP Biomedical, Ohio, USA), ζάχαρης και νερού σε αναλογία 1:4:5 αντίστοιχα, υπό μορφή σταγόνων πάνω σε τέσσερα τρυβλία. Δέκα περίπου ημέρες από την τοποθέτηση των νυμφών στα κλουβιά εξέρχονταν τα ενήλικα. Τότε στο κέντρο του κλουβιού τοποθετούνταν τεχνικά υποστρώματα ωτοκίας, πλαστικά ημισφαίρια, κόκκινου χρώματος, πάχους 1,5 mm και διαμέτρου 5 cm. Τα υποστρώματα αυτά έφεραν 40 – 50 οπές ομοιόμορφα κατανεμημένες, διαμέτρου 1 mm, εντός των οποίων τα θηλυκά τοποθετούσαν τον ωothήτη τους και απέθεταν τα αυγά τους στο εσωτερικό κοίλωμά τους. Το κάθε ημισφαίριο είχε προσαρμοστεί σε κυκλική οπή διαμέτρου 5 cm και τοποθετούνταν μέσα σε τρυβλίο Petri διαμέτρου 5,5 cm. Εντός του τρυβλίου είχε τοποθετηθεί νερό, για τη διατήρηση της υγρασίας σε επιθυμητά επίπεδα για την ωτοκία, καθώς και πλαστικό φιαλίδιο με φρέσκο χυμό πορτοκαλιού για την προσέλκυση των θηλυκών και τη διέγερση της ωτοκίας τους (Εικ.14).

Δύο ημέρες μετά την ενηλικίωση, παρατηρούνταν σεξουαλική δραστηριότητα τόσο των αρσενικών, όσο και των θηλυκών, ενώ από την τρίτη ημέρα και μετά, ωτοκία των θηλυκών στα κόκκινα ημισφαίρια. Στο πλαϊνό μέρος των κλουβιών αναγραφόταν με αυτοκόλλητη ταινία η ημερομηνία νύμφωσης των εντόμων, ενηλικίωσης και ωτοκίας τους.



**Εικόνα 14.** Ξύλινο κλουβί που χρησιμοποιήθηκε για την εκτροφή των πέντε φυλών της μύγας της Μεσογείου.

Κατά το διάστημα της μέγιστης ωοπαραγωγής γινόταν συλλογή των αυγών από τα ημισφαίρια των τεχνικών υποστρωμάτων ωτοκίας. Τα αυγά μεταφέρονταν με μαλακό πινέλο σε θρεπτικό υπόστρωμα, κατάλληλο για την εκκόλαψη και ανάπτυξή τους. Το υπόστρωμα αποτελούνταν από δίσκους βαμβακιού διαμέτρου 5 cm, οι οποίοι είχαν εμποτιστεί με 10 ml ημίρρευστης τεχνητής τροφής για προνύμφες. Η τροφή αποτελούνταν από 100 g ζάχαρης, 100 g μαγιά μπύρας, 50 g αλευριού σόγιας, 8 g ασκορβικού οξέος, 8 g κιτρικού οξέος, 2 g μίγματος αλάτων και 1,5 g προπιονικού νατρίου. Το μείγμα των παραπάνω συστατικών διαλύονταν σε 500 ml νερού και τοποθετούνταν σε αποστειρωμένο με αλκοόλη πλαστικό δοχείο νερού έτοιμο για κάθε χρήση. Σε κάθε δίσκο από βαμβάκι, ο οποίος εμποτιζόταν με το παραπάνω μείγμα τροφής τοποθετούνταν περίπου 100 – 150 αυγά. Στη συνέχεια οι δίσκοι αυτοί με την τροφή και τα αυγά από πάνω τοποθετούνταν μέσα σε τρυβλία Petri διαμέτρου 9 cm, τα οποία είχαν αποστειρωθεί με αλκοόλη. Για κάθε μία από τις πέντε φυλές φτιάχνονταν τρεις τέτοιοι δίσκοι από 100 – 150 αυγά ο καθένας. Τα τρυβλία κλείνονταν και τοποθετούνταν σε διάφανες πλαστικές σακούλες για να αποφευχθεί η απώλεια υγρασίας, αναγράφονταν η ημερομηνία συλλογής τους και τοποθετούνταν σε πλαστικά δοχεία.

Μετά από τρεις περίπου ημέρες από την τοποθέτηση των αυγών στα δισκία εκκολάπτονταν οι προνύμφες. Οι δίσκοι βάμβακος με τις προνύμφες μεταφέρονταν σε πλαστικά κύπελλα διαμέτρου 9 cm, των οποίων η πάνω επιφάνεια καλύπτονταν με λεπτή οργαντίνη και αναγραφόταν η ημερομηνία εκκόλαψής τους. Καθημερινά και μέχρι την ολοκλήρωση της ανάπτυξης των προνυμφών, σε κάθε δίσκο βάμβακος γινόταν προσθήκη επιπλέον 3 ml τροφής ανηλίκων.

Σε έξι με επτά ημέρες στους 25 °C μετά την εκκόλαψη των αυγών, η ανάπτυξη των προνυμφών ολοκληρωνόταν. Τότε γινόταν αφαίρεση της οργαντίνης από τα κύπελλα και αυτά τοποθετούνταν μέσα σε πλαστικές λεκάνες, επάνω σε στρώμα στεγνής αποστειρωμένης άμμου, πάχους 0,5 – 1 cm. Οι αναπτυγμένες προνύμφες εξέρχονταν από τα πλαστικά κύπελλα και νυμφώνονταν στην άμμο.

Μετά τη νύμφωση, η άμμος απομακρυνόταν με κοσκίνισμα και οι νύμφες συλλέγονταν και τοποθετούνταν σε πλαστικά τρυβλία Petri διαμέτρου 9 cm, έως και την έξοδο των ενηλίκων, η οποία σημειώθηκε μετά από περίπου δέκα ημέρες. Τα ενήλικα στη συνέχεια τοποθετούνταν στα ξύλινα κλουβιά για τη συνέχιση της ανάπτυξης της επόμενης γενεάς, με την ίδια ακριβώς διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω.

## 2.5 Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 15.0 (SPSS, Chicago, IL., USA) και χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικές μέθοδοι. Σε αυτές περιλαμβάνεται η ανάλυση της παραλλακτικότητας (ANOVA) και το κριτήριο One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test για τον έλεγχο της κανονικότητας. Χρησιμοποιήθηκε επίσης το μοντέλο ανάλογων κινδύνων του Cox (Cox proportional hazards model) και του Kaplan – Meyer (KM) για την ανάλυση της επιβίωσης. Οι γραφικές παραστάσεις έγιναν στο πρόγραμμα του Microsoft Excel.

Με το μοντέλο ανάλογων κινδύνων του Cox έγινε σύγκριση της επίδρασης ενός στελέχους *Wolbachia* (*wCer2*) σε δύο διαφορετικές φυλές της μύγας της Μεσογείου σε σχέση με τους μάρτυρες (Μπενάκειο – μάρτυρας, Vienna GSS – μάρτυρας, Wol – Med 88.6, Vienna E88) καθώς και της επίδρασης δύο διαφορετικών στελεχών *Wolbachia* (*wCer2* και *wCer4*) σε μία φυλή σε σχέση με τον μάρτυρα, [(Μπενάκειο - μάρτυρας, Wol – Med 88.6 (*wCer2*), Wol – Med S10.3 (*wCer4*)].

Ο Kaplan – Meyer, εκτιμητής της συνάρτησης επιβίωσης χρησιμοποιήθηκε για τη μοντελοποίηση των περιόδων πρωτοκίας, ωτοκίας και μετά την ωτοκία, καθώς και για τη σύγκριση της πορείας επιβίωσης στα ενήλικα και της διάρκειας στα ανήλικα στάδια.

Συγκρίσεις στο μέσο όρο των αυγών ανά θηλυκό άτομο (net fecundity rate) έγιναν με την ANOVA.

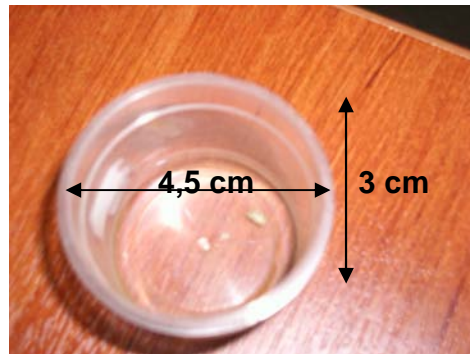
Το κριτήριο One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της κανονικότητας της ωτοκίας (fecundity).

## 2.6 Πειραματική διαδικασία

Η επίδραση της μόλυνσης από τη *Wolbachia*, αφορά τόσο τα ανήλικα, όσο και τα ενήλικα άτομα της μύγας της Μεσογείου. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε : (1) η επίδραση της *Wolbachia* στα ανήλικα της μύγας της Μεσογείου, (2) η επιβίωση και διάρκεια ανάπτυξης των ανηλίκων και (3) η δημογραφία των ενηλίκων.

**Επίδραση της *Wolbachia* στα ανήλικα:** Για τη μελέτη της επίδρασης της *Wolbachia* στην επιβίωση και διάρκεια ανάπτυξης των ανηλίκων έγινε συλλογή 200 αυγών από την F<sub>1</sub> γενεά για κάθε φυλή. Σε κάθε ξύλινο κλουβί της F<sub>1</sub> γενεάς τοποθετούνταν για διάστημα τριών περίπου ωρών 8:00 – 10:30 π.μ κόκκινο πλαστικό ημισφαίριο ωτοκίας (dom), με πλαστικό φιαλίδιο γεμάτο με προσελκυστικό χυμό πορτοκαλιού. Στη συνέχεια μεταξύ 10:30 με 11:00 π.μ. με τη βοήθεια ενός μαλακού υγρού πινέλου που είχε αποστειρωθεί με αλκοόλη, γινόταν συλλογή από το dom των αυγών, τοποθέτησή τους σε πλαστικό δίσκο καλυμμένο από μαύρο ύφασμα για διάκριση των μικρών λευκών αυγών και τοποθέτηση τους ένα – ένα σε 200 ατομικά μικρά πλαστικά αποστειρωμένα κύπελλα διαμέτρου 4,5 cm, (Εικ. 15). Τα κύπελλα πριν τη χρήσης τους παρέμεναν για μία ημέρα σε λεκάνες με νερό και καθαρό οινόπνευμα. Κάθε κύπελλο είχε αριθμηθεί από το 1 έως το 200 με αυτοκόλλητη μικρή ταινία στο πλάι. Στη βάση κάθε κυπέλλου τοποθετούνταν δίσκος βάμβακος διαμέτρου 4 cm, εμποτισμένος με τεχνητή τροφή για προνύμφες (Ενότητα 2.4). Κάθε κύπελλο κλείνονταν με καπάκι, το οποίο έφερνε 50 – 60 ομοιόμορφα κατανεμημένες οπές, διαμέτρου 1 mm, για την είσοδο του οξυγόνου στο εσωτερικό του και τοποθετούνταν πάνω σε πλαστικούς δίσκους και κάτω από λαμπήρες φθορισμού, με ένταση φωτός να κυμαίνεται από 1500, έως 2000 lux. Με τη βοήθεια στερεοσκοπίου γινόταν για τρεις περίπου συνεχόμενες ημέρες έλεγχος της εκκόλαψης των αυγών και καταγραφή σε ειδικά πρωτόκολλα της ημερομηνίας συλλογής και εκκόλαψής τους. Καθημερινώς, γινόταν επίσης έλεγχος της τροφής και της υγρασίας στα δίσκια βάμβακος, για καθένα από τα 200 πλαστικά κύπελλα, καθώς και για την τυχόν ανάπτυξη επιβλαβών βακτηριδίων. Συνολικά έγινε συλλογή 1000 αυγών από 5 φυλές, (Εικ. 16).





**Εικόνα 15.** Πλαστικό κύπελλο που χρησιμοποιήθηκε για την εκτροφή της  $F_1$  γενεάς των πέντε διαφορετικών φυλών του πειράματος.



**Εικόνα 16.** Έλεγχος σε στερεοσκόπιο της εκκόλαψης των αυγών της μύγας της Μεσογείου.

Μετά από περίπου 6 – 7 ημέρες και αφού οι προνύμφες είχαν αναπτυχθεί πλήρως, το μικρό κύπελλο διαμέτρου 4,5 cm και με το υπόστρωμα τροφής, τοποθετούνταν μέσα σε μεγαλύτερα πλαστικά διαφανή κύπελλα διαμέτρου 6 cm, που κλείνονταν με το καπάκι τους, το οποίο έφερνε μικρές τρύπες για αερισμό. Στα κύπελλα αυτά είχε τοποθετηθεί στρώμα στεγνής αποστειρωμένης άμμου πάχους 1 – 2 cm. Όλα τα κύπελλα τοποθετούνταν πάνω σε πλαστικούς δίσκους

και κάτω από τους ίδιους λαμπήρες φθορισμού που τοποθετούνταν και τα αυγά για εκκόλαψη. Οι ανεπτυγμένες προνύμφες εξέρχονταν από τα πλαστικά κύπελλα, έπεφταν στο στρώμα άμμου και νυμφώνονταν. Στη συνέχεια, οι νύμφες τοποθετούνταν ατομικά σε πλαστικά δοχεία, έως την έξοδο των ενηλίκων (Εικ. 17-18). Για όλες τις φυλές υπολογίστηκε η διάρκεια των ανηλικών σταδίων (αυγό – προνύμφη – νύμφη).



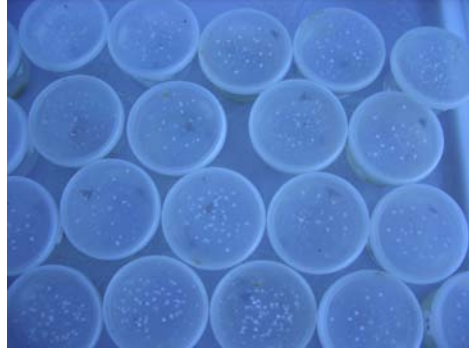
**Εικόνα 17.** Πλαστικά δοχεία για τη νύμφωση των προνυμφών.



**Εικόνα 18.** Νύμφη της μύγας της Μεσογείου.

**Επίδραση της *Wolbachia* στα ενήλικα:** Για την επίδραση της *Wolbachia* στα ενήλικα, καταγράφονταν η ημερομηνία εξόδου και το φύλο (αρσενικό – θηλυκό), (Εικ. 19). Τα άτομα που για οποιοδήποτε λόγο δεν έφταναν στο στάδιο της πούπας ή του ενηλίκου, καταγράφονταν εντός (Nh = δεν εκκολάφθηκαν, NP = δεν

νυμφώθηκαν, NE = δεν ενηλικιώθηκαν). Γενικά η διάρκεια του βιολογικού κύκλου των εντόμων από αυγό σε ενήλικο διαρκούσε είκοσι (20) περίπου ημέρες.

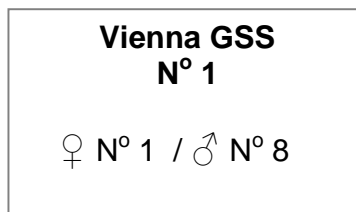


**Εικόνα 19.** Έξοδος των ενηλίκων από τις νύμφες μέσα στα πλαστικά κύπελλα.

#### **Επίδραση της *Wolbachia* στα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ενηλίκων :**

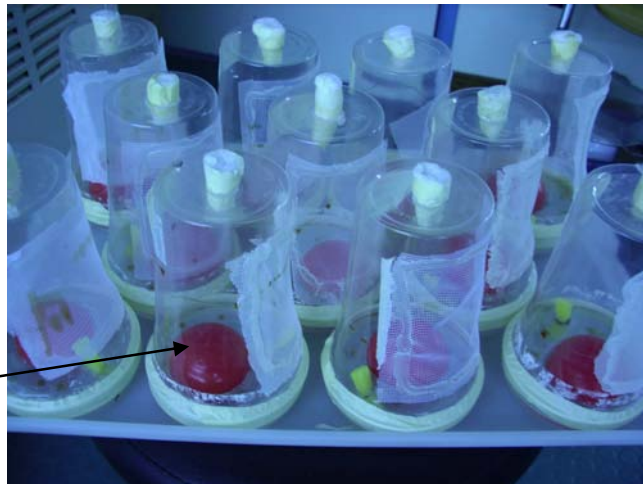
Για τον προσδιορισμό των δημογραφικών παραμέτρων των ενηλίκων χρησιμοποιήθηκαν διαφανή, πλαστικά ποτήρια χωρητικότητας 400 ml, με διάμετρο βάσης 9 cm, διάμετρο κορυφής 5 cm και ύψος 12 cm (Εικ. 20).

Σε αυτά τοποθετούνταν αμέσως μετά την έξοδό τους από τις νύμφες, ένα ζεύγος ενηλίκων, αποτελούμενο από ένα αρσενικό και ένα θηλυκό άτομο. Επάνω στα ποτήρια αναγραφόταν ο αύξοντας αριθμός του ποτηριού, καθώς και ο αριθμός του καθενός από τα δύο άτομα, για τη μελέτη των δημογραφικών παραμέτρων για το ζεύγος, αλλά και για κάθε άτομο χωριστά. Για παράδειγμα το ποτήρι με αύξοντα αριθμό N<sup>ο</sup>1, που μέσα είχε τοποθετηθεί το θηλυκό άτομο N<sup>ο</sup>1 και το αρσενικό N<sup>ο</sup>8 είχε κολλητική ταινία της παρακάτω μορφής.



Στη βάση κάθε κλουβιού είχε προσαρμοστεί με κολλητική ταινία το κάλυμμα ενός τρυβλίου Petri διαμέτρου 9 cm, το οποίο έφερνε σε ειδική σπή ένα τεχνητό υπόστρωμα ωτοκίας (κόκκινο πλαστικό ημισφαίριο). Στο τρυβλίο είχε επίσης προσαρμοστεί φυτίλι από σπόγγο vetex που εφάπτονταν στη βάση του τρυβλίου, η οποία ήταν γεμάτη με νερό. Η παροχή της τροφής των ενηλίκων στο εσωτερικό των κλουβιών, γινόταν με τη μορφή ρευστών σταγόνων με τη βοήθεια μικροπιπέτας, που τοποθετούνταν στα πλευρικά τοιχώματα του κλουβιού, καθώς και στη βάση αυτού. Στην πλευρική επιφάνεια του κλουβιού, υπήρχε για αερισμό άνοιγμα 25 cm<sup>2</sup> το οποίο ήταν καλυμμένο με λεπτό τούλι. Κάτω από το τεχνητό υπόστρωμα ωτοκίας, τοποθετούνταν ένα κυλινδρικό φυαλίδιο το οποίο περιείχε 3 – 5 ml φυσικό χυμό πορτοκαλιού, για τη διέγερση της ωτοκίας των θηλυκών. Κάθε δεύτερη ημέρα γινόταν αντικατάσταση του χυμού με φρέσκο.

Υπόστρωμα  
ωτοκίας



**Εικόνα 20.** Πλαστικά κύπελλα ενηλίκων ζευγαριών της μύγας της Μεσογείου, για την καταγραφή των δημογραφικών παραμέτρων.

Καθημερινά γινόταν καταγραφή σε ειδικά πρωτοκόλλα, της ωοπαραγωγής των θηλυκών για κάθε ζεύγος ενηλίκων, καθώς και της επιβίωσης τόσο των αρσενικών, όσο και των θηλυκών. Η συλλογή από το υπόστρωμα ωτοκίας και καταμέτρηση των αυγών, γινόταν με ένα υγρό πινέλο και τοποθετήσή τους πάνω σε δίσκο καλυμμένο με ένα υγρό μαύρο ύφασμα για τη διάκρισή τους. Για τη φυλή

Μπενάκειο, χρησιμοποιήθηκαν 50 επαναλήψεις ζευγαριών, για τη Vienna GSS, 42 επαναλήψεις ζευγαριών (13 αρχικά και 39 επαναληπτικά), για τη Vienna E88, 23 επαναλήψεις, για τη Wol – Med 88.6, 40 επαναλήψεις και για τη Wol – Med S10.3, 31 επαναλήψεις. Για όλες τις παραπάνω φυλές, οι παράμετροι που υπολογίστηκαν ήταν:

- 1) Η μέση αναμενόμενη διάρκεια ζωής (επιβίωση), στις ηλικίες 0 και 100, τόσο των αρσενικών όσο και των θηλυκών ατόμων.
- 2) Η μέγιστη ωοπαραγωγή κάθε θηλυκού ατόμου, δηλαδή ο συνολικός αριθμός αυγών ανά θηλυκό που ζει ως τη θεωρητικά τελευταία ημέρα ζωής του.
- 3) Η μέση ωοπαραγωγή, δηλαδή ο μέσος αριθμός αυγών ανά θηλυκό στη διάρκεια της ζωής του.
- 4) Η ημερήσια παραγωγή αυγών.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### 3.1 Αποτελέσματα

### 3.2 Ανήλικα στάδια

Για τα ανήλικα στάδια αυγό – προνύμφη – νύμφη προσδιορίστηκε η χρονική διάρκεια ανάπτυξης μεταξύ των ανηλικών σταδίων για κάθε μία από τις πέντε φυλές και έγινε στατιστική ανάλυση με το μοντέλο ανάλογων κινδύνων του Cox, για τον έλεγχο τυχόν διαφοράς στην επιβίωση των ανηλικών ατόμων μεταξύ των πέντε φυλών. Το μοντέλο εφαρμόστηκε διαδοχικά πέντε φορές, μελετώντας ξεχωριστά την επίδραση της φυλής (με και χωρίς τη *Wolbachia*) και του φύλου στη διάρκεια ανάπτυξης των αυγών, προνυμφών και νυμφών. Στις αναλύσεις αυτές η φυλή βρέθηκε να έχει σημαντική επίδραση, ενώ αντίθετα η επίδραση του φύλου (sex), βρέθηκε να μην είναι σημαντική. Όλες οι συμμεταβλητές είναι δείκτρες – συναρτήσεις, με τους παράγοντες πληθυσμός (1), πληθυσμός (2), πληθυσμός (3), πληθυσμός (4), να λαμβάνουν την τιμή 1 όταν το αυγό, προνύμφη, νύμφη προέρχονται από τη φυλή Wol – Med 88.6, Wol – Med S10.3, Vienna GSS και Vienna E88 αντίστοιχα (διαφορετικά 0), με τη φυλή Μπενάκειο να αποτελεί την κατηγορία αναφοράς. Ο Kaplan – Meyer (KM) εκτιμητής της συνάρτησης επιβίωσης χρησιμοποιήθηκε για τη μοντελοποίηση των περιόδων εμβρυικής, προνυμφικής και νυμφικής ανάπτυξης, καθώς και της συνολικής διάρκειας ανάπτυξης των ανηλικών σταδίων (αυγό – ενήλικο).

Η μέση διάρκεια ανάπτυξης των ανηλικών σταδίων για τα αρσενικά και θηλυκά αντίστοιχα των πέντε φυλών της μύγας της Μεσογείου που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα, (αυγό – προνύμφη – νύμφη – ενήλικο), δίνεται στον Πίνακα 5 που ακολουθεί.

Επειδή το φύλο δεν είχε σημαντική επίδραση στη διάρκεια ανάπτυξης των ανηλικών σταδίων, οι συγκρίσεις μεταξύ των φυλών ως προς τη διάρκεια ανάπτυξης των ανηλικών σταδίων, πραγματοποιήθηκαν συμπεριλαμβάνοντας αρσενικά και θηλυκά μαζί. Όπως φαίνεται από τον παρακάτω πίνακα, οι πέντε φυλές δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στη διάρκεια ανάπτυξης του αυγού, η οποία κυμάνθηκε από 2.00 έως 3.00 ημέρες ( $P > 0.05$ ). Αντίθετα, σημαντικές

διαφορές παρατηρήθηκαν, στη διάρκεια του σταδίου της προνύμφης. Η διάρκεια ανάπτυξης των προνυμφών ήταν βραχύτερη στις φυλές Wol – Med 88.6 και Vienna E88, σε σχέση με τις άλλες τρεις φυλές που δεν διέφεραν μεταξύ τους. Σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στη διάρκεια του σταδίου της νύμφης στη φυλή Vienna GSS ( $P < 0.05$ ). Η επιβίωση από αυγό έως ενήλικο διέφερε σημαντικά για τις φυλές Wol – Med 88.6 και Vienna E88, σε σχέση με τις άλλες τρεις φυλές. Στον Πίνακα 6 δίνεται η επί της εκατό (%) επιβίωση των ανηλίκων σταδίων.

**Πίνακας 5.** Μέση διάρκεια ανάπτυξης ανηλίκων σταδίων των πέντε φυλών της μύγας της Μεσογείου, που αναπτύχθηκαν σε τεχνητή τροφή στο εργαστήριο (25°C).

<b>Διάρκεια ανάπτυξης (ημέρες ± SE)</b>				
<b>Πληθυσμός</b>	<b>Αυγό</b>	<b>Προνύμφη</b>	<b>Νύμφη</b>	<b>Αυγό - Ενήλικο</b>
Μπενάκειο	2.00 ± 0.02	9.00 ± 0.08	10.00 ± 0.07	21.00 ± 0.09
Wol – Med 88.6	2.64 ± 0.03	6.46 ± 0.23	9.68 ± 0.18	18.49 ± 0.25
Wol – Med S10.3	2.31 ± 0.04	8.00 ± 0.16	10.91 ± 0.17	20.98 ± 0.15
Vienna GSS	2.00 ± 0.03	9.00 ± 0.18	7.00 ± 0.15	21.00 ± 0.16
Vienna E88	2.00 ± 0.03	7.00 ± 0.10	9.00 ± 0.08	18.00 ± 0.18

**Πίνακας 6.** Επί τοις εκατό (%) επιβίωσης ανηλίκων σταδίων των πέντε φυλών της μύγας της Μεσογείου, που αναπτύχθηκαν σε τεχνητή τροφή στο εργαστήριο (25°C).

Φυλή	Επιβίωση (%)			
	Αυγό	Προνύμφη	Νύμφη	Αυγό - Ενήλικο
Μπενάκειο	86	90.1	96.7	48.3
Wol – Med 88.6	70	87.1	82.7	41.3
Wol – Med S 10.3	45	77.7	92.8	46.4
Vienna GSS	68.7	43.6	89.1	44.5
Vienna E88	62	72.5	65.5	32.75

Το μοντέλο ανάλογων κινδύνων του Cox έδειξε σημαντική επίδραση της φυλής και του φύλου (sex) στη συνολική διάρκεια ανάπτυξης των ανηλίκων σταδίων, (αυγό – προνύμφη – νύμφη - ενήλικο), ( $P < 0.00$ ) (Πίνακας 7). Σημαντικές διαφορές στη διάρκεια ανάπτυξης των ανηλίκων παρατηρήθηκαν μεταξύ των φυλών Wol – Med 88.6 και Vienna E88, σε αντίθεση με τις Wol – Med S10.3 και Vienna GSS που δεν είχαν σημαντικές διαφορές.



**Πίνακας 7.** Μεταβλητές του μοντέλου ανάλογων κινδύνων του Cox για την επιβίωση ανηλικών σταδίων (αυγό – ενήλικο), μεταξύ των πέντε φυλών της μύγας της Μεσογείου, που αναπτύχθηκαν σε τεχνητή τροφή στο εργαστήριο (25°C).

Πηγή παραλλακτικότητας	$\beta$	Τυπικό σφάλμα (SE)	Exp( $\beta$ )	<i>P</i>
<b>Φύλο (sex)</b>	0.619	0.100	1.857	< 0.000
<b>Φυλή</b>				< 0.000
Wol – Med 88.6	1.671	0.141	5.316	< 0.000
Wol – Med S10.3	0.175	0.149	1.192	0.240
Vienna GSS	0.403	0.132	1.496	0.002
Vienna E88	1.745	0.167	5.728	< 0.000

### 1) Στάδιο του αυγού

Στο στάδιο του αυγού, το φύλο (sex) δεν είχε σημαντική επίδραση στη διάρκεια ανάπτυξης ( $P > 0.715$ ), ενώ αντίθετα η φυλή ήταν σημαντική (Πίνακας 8). Η διάρκεια ανάπτυξης του αυγού διέφερε σημαντικά μεταξύ των φυλών Wol – Med 88.6 και Μπενάκειο και μεταξύ Vienna E88 και Μπενάκειο, ενώ δεν παρουσιάστηκαν διαφορές μεταξύ των Wol – Med S10.3 και Vienna GSS.

**Πίνακας 8.** Μεταβλητές του μοντέλου ανάλογων κινδύνων του Cox για την επίδραση του πληθυσμού στη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης (αυγό) των πέντε φυλών της μύγας της Μεσογείου. Τα αυγά από το Μπενάκειο – strain αποτέλεσαν τον πληθυσμό αναφοράς (baseline).

Πηγή παραλλακτικότητας	$\beta$	Τυπικό σφάλμα (SE)	Exp( $\beta$ )	<i>P</i>
<b>Φυλή</b>				< 0.002
Wol – Med 88.6	-0.417	0.117	0.659	< 0.000
Wol – Med S10.3	-0.057	0.129	0.944	0.658
Vienna GSS	-0.117	0.098	0.889	0.230
Vienna E88	-0.312	0.119	0.732	< 0.009

### 1) Στάδιο της προνύμφης

Στο στάδιο της προνύμφης, τόσο το φύλο (sex), όσο και η φυλή ήταν σημαντικοί εκτιμητές της διάρκειας της προνυμφικής ανάπτυξης ( $P < 0.00$ ), (Πίνακας 9).

**Πίνακας 9.** Μεταβλητές του μοντέλου ανάλογων κινδύνων του Cox για την επίδραση του πληθυσμού στη διάρκεια της προνυμφικής ανάπτυξης των πέντε φυλών της μύγας της Μεσογείου. Οι προνύμφες από τη φυλή Μπενάκειο αποτέλεσαν τον πληθυσμό αναφοράς (baseline).

Πηγή παραλλακτικότητας	$\beta$	Τυπικό σφάλμα (SE)	Exp( $\beta$ )	<i>P</i>
<b>Φύλο (sex)</b>	0.487	0.099	1.628	< 0.000
<b>Φυλή</b>				< 0.000
Wol – Med 88.6	1.826	0.148	6.210	< 0.000
Wol – Med S 10.3	0.343	0.150	1.410	< 0.022
Vienna GSS	0.275	0.132	1.316	< 0.038
Vienna E88	1.583	0.166	4.871	< 0.000

## 2) Στάδιο της νύμφης

Σύμφωνα με το μοντέλου ανάλογων κινδύνων του Cox, στο στάδιο της νύμφης το φύλο (sex), δεν επηρέασε τη διάρκεια της νυμφικής ανάπτυξης μεταξύ των πέντε φυλών της μύγας της Μεσογείου ( $P > 0.143$ ), όμως η φυλή ήταν πάλι σημαντική. Η διάρκεια ανάπτυξης της νύμφης διέφερε μεταξύ των Wol – Med S10.3 και Μπενάκειο και Vienna E88 και Μπενάκειο, ενώ δεν παρουσιάστηκαν διαφορές μεταξύ των Wol – Med 88.6 και Vienna GSS (Πίνακας 10).

**Πίνακας 10.** Μεταβλητές του μοντέλου ανάλογων κινδύνων του Cox για την επίδραση του πληθυσμού στη διάρκεια της νυμφικής ανάπτυξης των πέντε φυλών της μύγας της Μεσογείου. Οι νύμφες από το Μπενάκειο αποτέλεσαν τον πληθυσμό αναφοράς (baseline).

Πηγή παραλλακτικότητας	$\beta$	Τυπικό σφάλμα (SE)	Exp( $\beta$ )	$P$
<b>Φυλή</b>				<0.000
Wol – Med 88.6	0.122	0.129	1.130	0.345
Wol – Med S 10.3	-0.397	0.154	0.672	<0.010
Vienna GSS	-0.004	0.126	0.996	0.977
Vienna E88	0.493	0.154	1.637	<0.001

### 3.3 Ενήλικα στάδια - επιβίωση

Οι διαφορές μεταξύ των πέντε φυλών στη μέση αναμενόμενη διάρκεια ζωής στην ηλικία μηδέν (0), τόσο μεταξύ των θηλυκών, όσο και των αρσενικών ατόμων ήταν μεγάλες. Στον Πίνακα 11 δίνεται η μέση και η μέγιστη διάρκεια ζωής, τόσο για τα αρσενικά όσο και για τα θηλυκά των διαφορετικών φυλών. Η διάρκεια ζωής μειώθηκε σημαντικά τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά της φυλής του Μπενάκειο που ήταν μολυσμένη με τα στελέχη *wCer2* και *wCer4* της *Wolbachia*. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και στη φυλή Vienna GSS, όσον αφορά τα θηλυκά. Όμως στα αρσενικά δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές.

**Πίνακας 11.** Μακροβιότητα αρσενικών και θηλυκών ατόμων των πέντε φυλών της μύγας της Μεσογείου.

Φυλή	Μέση διάρκεια ζωής $\pm$ SE		Μέγιστη διάρκεια ζωής	
	Αρσενικά	Θηλυκά	Αρσενικά	Θηλυκά
Μπενάκειο	89.00 $\pm$ 4.4	39.64 $\pm$ 1.8	168	57
Wol – Med 88.6	48.00 $\pm$ 4.7	30.8 $\pm$ 2.9	120	64
Wol – Med S10.3	61.00 $\pm$ 3.9	28.9 $\pm$ 2.5	93	52
Vienna GSS	111.00 $\pm$ 7.1	26.4 $\pm$ 1.7	149	55
Vienna E88	98.00 $\pm$ 5.5	12.8 $\pm$ 1.7	153	36

Οι καμπύλες επιβίωσης για τα αρσενικά και θηλυκά άτομα των πέντε διαφορετικών φυλών που χρησιμοποιήθηκαν, δίνονται στα Διαγράμματα 2 - 4 που ακολουθούν. Στο Διάγραμμα 2 δίνεται συγκριτικά η επιβίωση των θηλυκών ατόμων και για τις πέντε φυλές, με τα θηλυκά της φυλής Wol – Med 88.6 να παρουσιάζονται ως τα μακροβιότερα, ενώ αυτά της φυλής Vienna E88, να παρουσιάζονται ως τα πιο βραχύβια. Τα θηλυκά της φυλής Μπενάκειο,

παρουσίασαν σταθερή επιβίωση μέχρι την 11<sup>η</sup> ημέρα και από τη 12<sup>η</sup> και μετά σταθερή μείωση, μέχρι την 58<sup>η</sup> ημέρα θανάτου του μακροβιότερου θηλυκού ατόμου. Η επιβίωση των θηλυκών της Vienna GSS ήταν σταθερή μέχρι την 6<sup>η</sup> ημέρα και μετά μειώθηκε μέχρι την τελευταία ημέρα της ζωής τους. Στη φυλή Wol – Med S10.3 τα θηλυκά παρουσίασαν σταθερή μείωση της επιβίωσης μέχρι την 52<sup>η</sup> ημέρα, όπως και της Wol – Med 88.6 μέχρι την 64<sup>η</sup> ημέρα. Τέλος, τα θηλυκά της φυλής Vienna E88 είχαν την πιο έντονη μείωση στην επιβίωση να ξεκινά από την 2<sup>η</sup> κιόλας ημέρα.

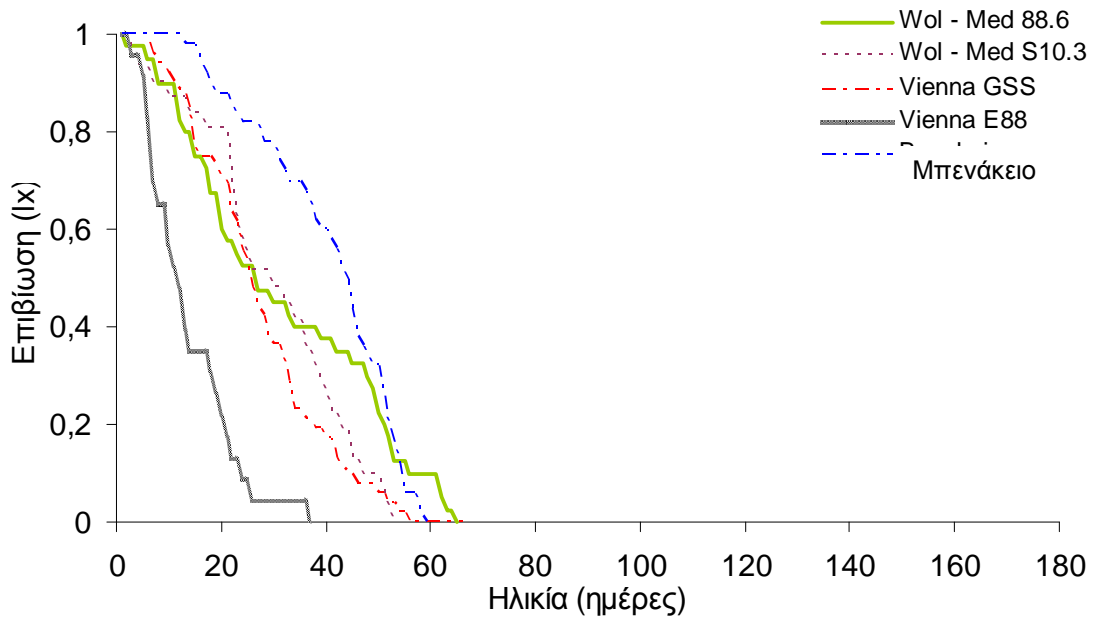
Στο Διάγραμμα 3 δίνεται η συγκριτική επιβίωση των αρσενικών ατόμων, με τα αρσενικά της φυλής Μπενάκειο να διαγράφονται ως τα πιο μακρόβια, ενώ αυτά της φυλής Wol – Med S10.3 ως τα πιο βραχύβια. Η επιβίωση στα αρσενικά της φυλής Μπενάκειο ήταν 100% από την 1<sup>η</sup> έως την 18<sup>η</sup> ημέρα και 94% από την 25<sup>η</sup> έως την 51<sup>η</sup>, με σταθερή πτωτική τάση στη συνέχεια. Η επιβίωση στη φυλή Vienna GSS ήταν σταθερή μέχρι την 18<sup>η</sup> ημέρα και από την 33<sup>η</sup> έως την 50<sup>η</sup>, ενώ έντονη ήταν η μείωση από την 67<sup>η</sup> ημέρα και μετά. Στις φυλές Wol – Med S10.3 και Vienna E88 η μείωση της επιβίωσης των αρσενικών ήταν εξίσου απότομη και για τις δύο φυλές, με την S10.3 να παρουσιάζεται ως η πιο βραχύβια. Τέλος, η φυλή Wol – Med 88.6, είχε απότομη μείωση της επιβίωσης από την 5<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ενηλίκων.

Στο Διάγραμμα 4, δίνεται συγκριτικά η επιβίωση μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων για τις πέντε φυλές. Και στις πέντε φυλές φαίνεται ξεκάθαρα η διαφορά στην επιβίωση των αρσενικών και θηλυκών ατόμων, με τα αρσενικά να είναι πάντα μακροβιότερα των θηλυκών. Η μεγαλύτερη διαφορά διακρίνεται στη φυλή Vienna E88, με τα θηλυκά να έχουν απότομη μείωση της επιβίωσης από την 2<sup>η</sup> ημέρα, σε σχέση με τα αρσενικά από την 22<sup>η</sup> ημέρα. Στη Wol – Med 88.6 η μείωση της επιβίωσης ήταν απότομη και για τα δύο φύλα, από την 4<sup>η</sup> ημέρα. Τα θηλυκά άτομα στη φυλή Μπενάκειο είχαν πιο απότομη μείωση της επιβίωσης, σε σχέση με τα αρσενικά, των οποίων η μείωση της επιβίωσης ήταν σταθερή. Παρόμοια μείωση της επιβίωσης παρουσίασαν και τα άτομα της Vienna GSS. Τέλος, στη φυλή Wol – Med S10.3 η μείωση της επιβίωσης για τα αρσενικά και

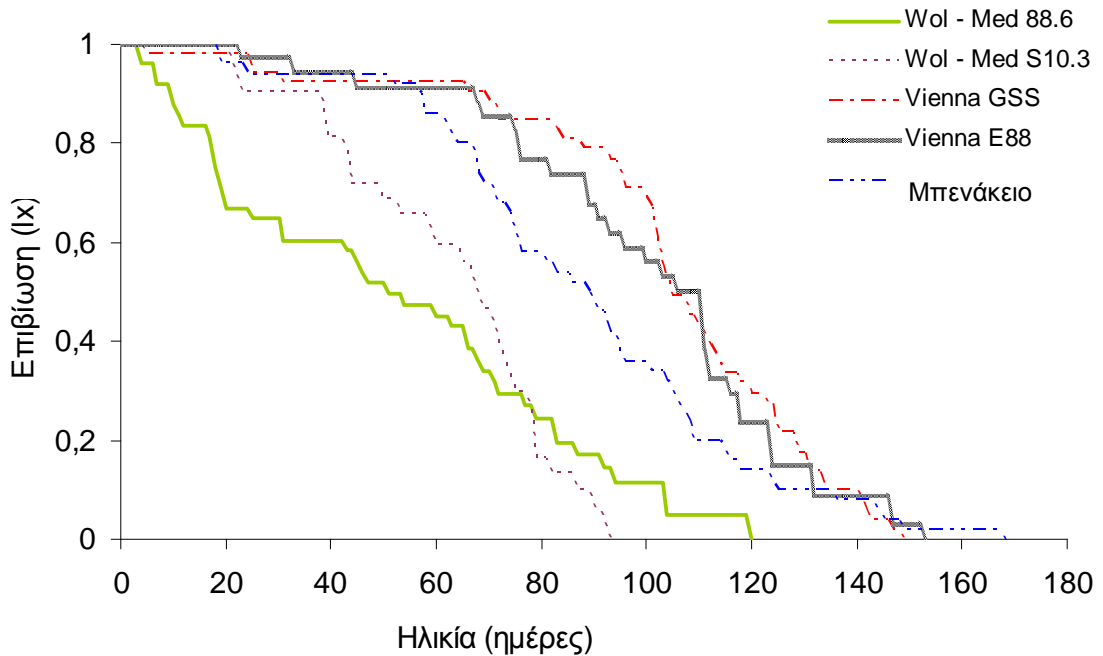
θηλυκά άτομα ήταν σταθερή, με τα αρσενικά να ζουν ως και 40 ημέρες περισσότερο από τα θηλυκά.

Η επίδραση του πληθυσμού και του φύλου στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων προσδιορίστηκαν με το μοντέλο ανάλογων κινδύνων του Cox (Cox proportional hazards model) (Collet, 2003). Όλες οι συμμεταβλητές είναι δείκτρες - συναρτήσεις με τον παράγοντα φύλο (sex), να λαμβάνει την τιμή 1 για το αρσενικό άτομο (διαφορετικά λαμβάνει την τιμή 0), την τιμή 2 για το θηλυκό και τους παράγοντες πληθυσμός (1), πληθυσμός (2), πληθυσμός (3), πληθυσμός (4), να λαμβάνουν την τιμή 1 όταν το άτομο προέρχεται από τη φυλή Wol – Med 88.6, Wol – Med S10.3, Vienna GSS και Vienna E88 αντίστοιχα (διαφορετικά 0), με τη φυλή Μπενάκειο να αποτελεί την κατηγορία αναφοράς, (baseline).

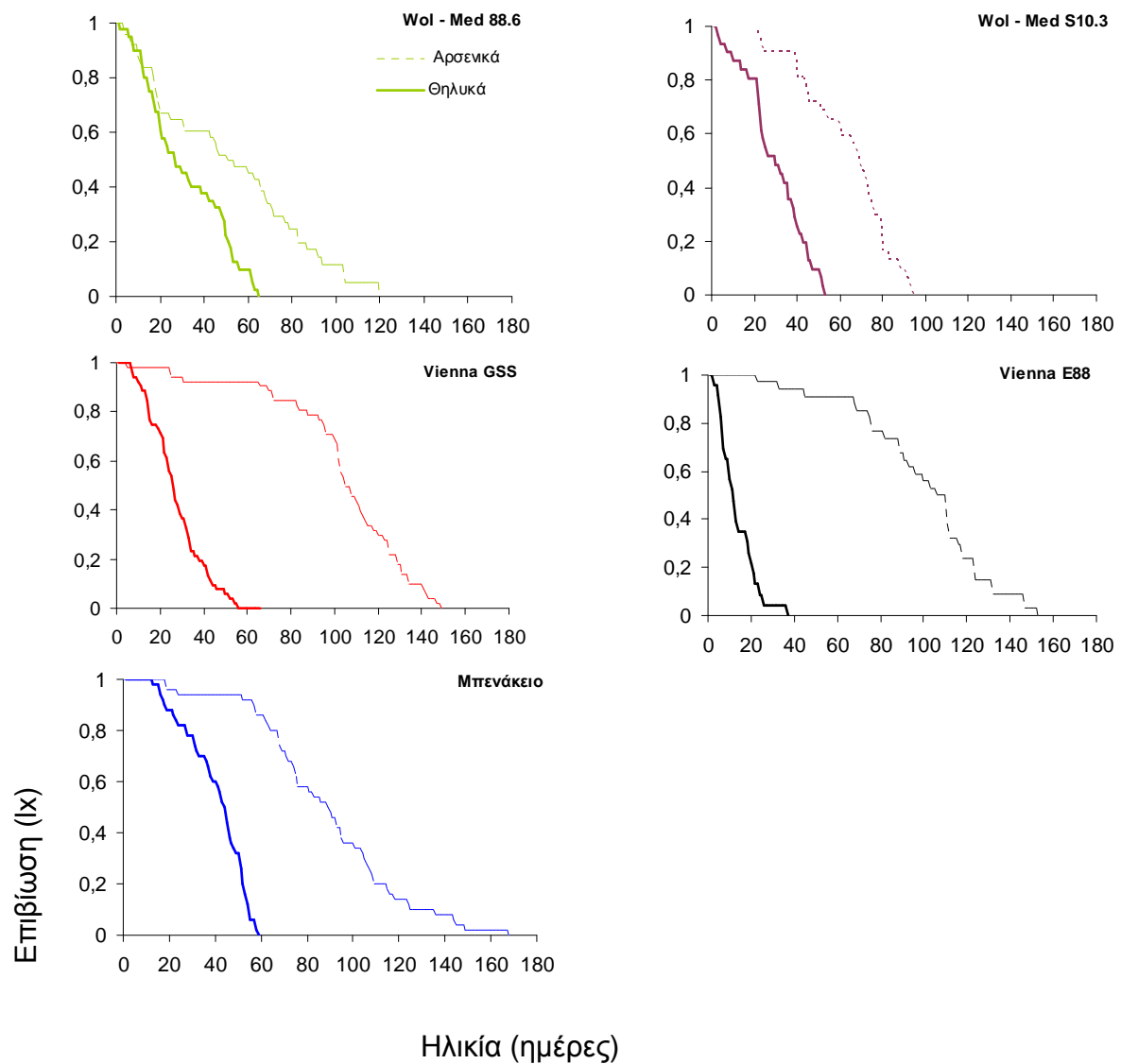
Ο υπολογισμός των συντελεστών β, (Πίνακας 12), δείχνει σημαντική επίδραση του φύλου, του πληθυσμού (φυλή) και της αλληλεπίδρασης φύλο x πληθυσμός στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων, ( $P < 0.000$ ). Σημαντική διαφορά παρουσιάστηκε μεταξύ των φυλών Vienna E88 και Vienna GSS, σε σχέση με το Μπενάκειο, σε αντίθεση με τις Wol – Med 88.6 και Wol – Med S10.3 που δεν είχαν σημαντική διαφορά με τη φυλή αναφοράς Μπενάκειο. Η αλληλεπίδραση της φυλής με το φύλο (sex), ήταν σημαντική για τις φυλές Vienna E88 και Vienna GSS, ενώ οι φυλές τις Wol – Med 88.6 και Wol – Med S10.3 δεν παρουσίασαν σημαντική διαφορά.



**Διάγραμμα 2.** Επιβίωση θηλυκών για τις πέντε διαφορετικές φυλές της μύγας της Μεσογείου, σε σχέση με την ηλικία.



**Διάγραμμα 3.** Επιβίωση αρσενικών για τις πέντε διαφορετικές φυλές της μύγας της Μεσογείου, σε σχέση με την ηλικία.



**Διάγραμμα 4.** Πορεία επιβίωσης σε σχέση με την ηλικία αρσενικών και θηλυκών για κάθε μία από τις πέντε φυλές, της μύγας της Μεσογείου.



**Πίνακας 12.** Μεταβλητές του μοντέλου ανάλογων κινδύνων του Cox (Cox proportional hazards model) για τις πέντε φυλές της μύγας της Μεσογείου. Τα άτομα από το Μπενάκειο αποτελούν τη φυλή αναφοράς (baseline).

Πηγή παραλλακτικότητας	$\beta$	Τυπικό σφάλμα (SE)	Exp( $\beta$ )	P
<b>Φυλή</b>				
Wol – Med 88.6	0.206	0.218	1.228	0.345
Wol – Med S 10.3	0.521	0.231	1.684	0.024
Vienna GSS	0.659	0.202	1.934	0.001
Vienna E88	1.780	0.268	5.927	0.000
<b>Φυλή x Φύλο</b>				
Wol – Med 88.6 x φύλο	1.226	0.305	3.407	0.000
Wol – Med S 10.3 x φύλο	0.788	0.339	2.199	0.020
Vienna GSS x φύλο	-0.958	0.283	0.384	0.001
Vienna E88 x φύλο	-2.059	0.348	0.128	0.000

### 3.4 Ωοπαραγωγή θηλυκών.

Η μοντελοποίηση των περιόδων προωτοκίας, ωοτοκίας και μετά την ωοτοκία έγιναν με τον εκτιμητή της συνάρτησης επιβίωσης Kaplan – Meier (KM). Σύγκριση μεταξύ KM εκτιμητών έγινε με τη χρήση του ελέγχου long – rank (Mantel – Cox). Για τις συγκρίσεις των μέσων όρων των αυγών ανά θηλυκό άτομο (net fecundity rate) χρησιμοποιήθηκε η παραμετρική ANOVA. Η επίδραση του πληθυσμού και του φύλου στη διάρκεια ζωής προσδιορίστηκε με το μοντέλο ανάλογων κινδύνων του Cox (Cox proportional hazards model). Όλες οι συμμεταβλητές είναι δείκτριες συναρτήσεις με τον παράγοντα φύλο (sex) να λαμβάνει την τιμή 1 για το αρσενικό άτομο (διαφορετικά λαμβάνει την τιμή 0) και τους παράγοντες πληθυσμός (1),

πληθυσμός (2), πληθυσμός (3), πληθυσμός (4), να λαμβάνουν την τιμή 1 όταν το άτομο προέρχεται από τη φυλή Wol – Med 88.6, Wol – Med S10.3, Vienna GSS και Vienna E88 αντίστοιχα (διαφορετικά 0), ενώ τα θηλυκά από τη φυλή Μπενάκειο να αποτελούν την κατηγορία αναφοράς, (baseline).

Για τα θηλυκά υπολογίστηκε η μέγιστη ωοπαραγωγή (gross fecundity) κάθε θηλυκού, δηλαδή ο συνολικός αριθμός αυγών ανά θηλυκό που ζει ως τη θεωρητικά τελευταία ημέρα ζωής του, καθώς και η μέση ωοπαραγωγή (net fecundity), δηλαδή ο μέσος αριθμός αυγών ανά θηλυκό στη διάρκεια της ζωής του. Επιπλέον, υπολογίστηκε το ποσοστό της συνολικής διάρκειας ζωής των θηλυκών που αναλογεί σε κάθε μία από τις τρεις υποπεριόδους (προ-μετα-ωοτοκία) για κάθε φυλή. Τα ποσοστά αυτά υπολογίστηκαν διαιρώντας τον αριθμό των ημερών που αντιπροσωπεύει κάθε μια από τις τρεις αυτές περιόδους για κάθε άτομο, με τη συνολική διάρκεια ζωής του.

Οι περίοδοι αναπαραγωγής συγκριτικά για κάθε φυλή σε σχέση με την ηλικία, δίνονται στον Πίνακα 13 που ακολουθεί. Οι φυλές Μπενάκειο, Wol – Med 88.6 και Wol – Med S10.3 παρουσίασαν παρόμοια περίοδο προωοτοκίας να κυμαίνεται από 3.98, 3.90 και 3.00 αντίστοιχα, με τις φυλές Vienna GSS και Vienna E88 να εμφανίζουν τη μικρότερη διάρκεια προωοτοκίας 2.37 και 1.96 αντίστοιχα. Παρόμοιο ήταν και το ποσοστό της διάρκειας ζωής που δαπανούν τα θηλυκά στην ωοτοκία για τις φυλές Μπενάκειο (33.04 ημέρες), Wol – Med 88.6 (25.68 ημέρες), Wol – Med S10.3 (24.18 ημέρες). Η φυλή Vienna GSS (23.57 ημέρες) και η Vienna E88 (7.50 ημέρες), είχαν τη μικρότερη διάρκεια ωοτοκίας. Η μετα-αναπαραγωγική διάρκεια ζωής, ήταν παρόμοια για της φυλές Μπενάκειο και Wol – Med S10.3. Η φυλή Wol – Med 88.6, ενώ είχε μεγάλη περίοδο προωοτοκίας και ωοτοκίας, παρουσίασε μικρότερη μετα-αναπαραγωγική διάρκεια ζωής. Αντίθετα, η Vienna GSS ενώ είχε μικρή περίοδο προωοτοκίας και ωοτοκίας σε σχέση με τις υπόλοιπες φυλές παρουσίασε μεγαλύτερη μετα-αναπαραγωγική διάρκεια ζωής. Τέλος, η Vienna E88 παρουσίασε τη μικρότερη περίοδο ωοτοκίας από όλες τις φυλές.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, όσον αφορά τη μέση ωοπαραγωγή (net fecundity), δηλαδή το μέσο αριθμό αυγών ανά θηλυκό στη διάρκεια της ζωής

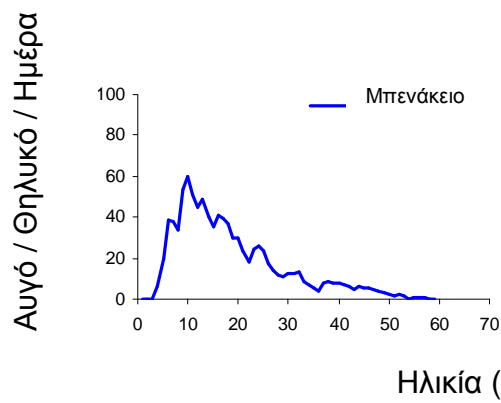
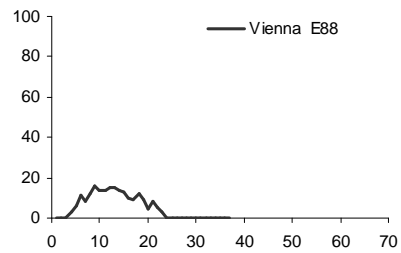
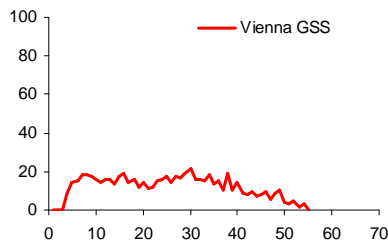
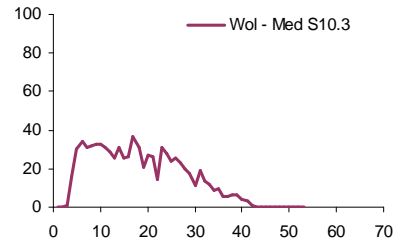
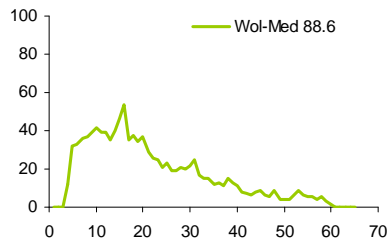
του, η φυλή Μπενάκειο παρουσίασε τη μεγαλύτερη ωοπαραγωγή (860.66) αυγά / θηλυκό, με ακόλουθη τη Wol – Med 88.6 (717.375) και Wol – Med S10.3 (593.35), ενώ η φυλές Vienna GSS και Vienna E88 είχαν τη μικρότερη (349.577 και 95.043 αντίστοιχα).

Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα για τη μέγιστη ωοπαραγωγή κάθε θηλυκού ατόμου, (gross fecundity), δηλαδή για τον συνολικό αριθμό αυγών ανά θηλυκό που ζει ως τη θεωρητικά τελευταία ημέρα ζωής του. Τη μεγαλύτερη μέγιστη ωοπαραγωγή παρουσίασε η Wol – Med 88.6, με ακόλουθες τις Μπενάκειο και Wol – Med S10.3, ενώ οι φυλές Vienna GSS και Vienna E88, όπως και παραπάνω είχαν τη μικρότερη διάρκεια μέγιστης ωοπαραγωγής.

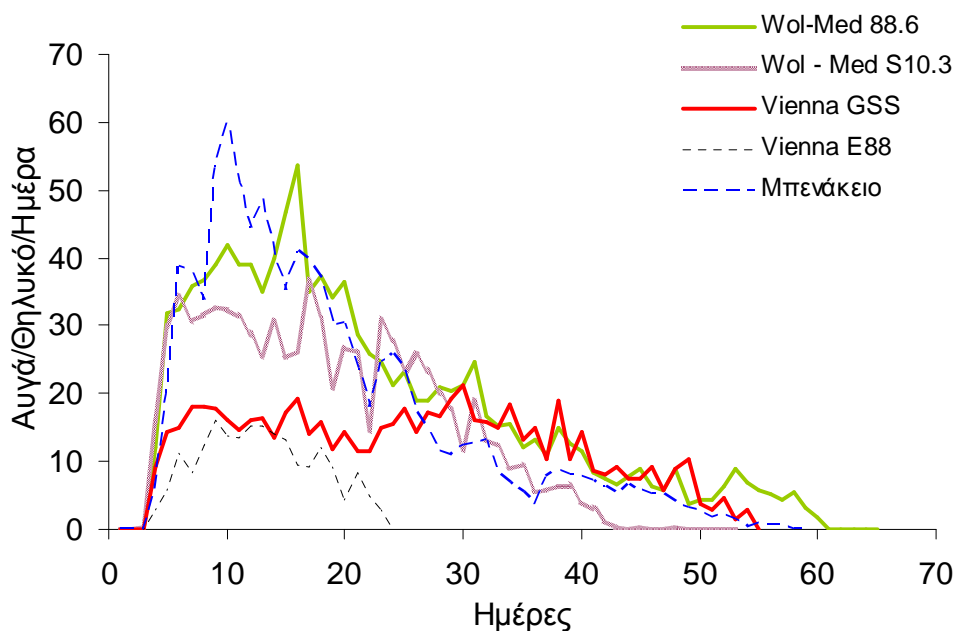
Στα Διαγράμματα 4 - 5, δίνονται οι γραφικές παραστάσεις της ωοπαραγωγής σε σχέση με την ηλικία ξεχωριστά και συγκριτικά για κάθε φυλή. Κάθε μία από τις πέντε φυλές παρουσιάζουν ένα μέγιστο αναπαραγωγής (peak). Μετά το μέγιστο της αναπαραγωγής, παρατηρήθηκε προοδευτική μείωση. Φαίνεται ξεκάθαρα ότι τη μεγαλύτερη διάρκεια ωοπαραγωγής είχε η Wol – Med 88.6 και το Μπενάκειο, ενώ η Vienna E88 τη μικρότερη.

**Πίνακας 13.** Παράμετροι ωοπαραγωγής της μύγας της Μεσογείου στο εργαστήριο (25 °C), από τις πέντε διαφορετικές φυλές. Τα θηλυκά ωοτοκούσαν σε κοίλα πλαστικά ημισφαίρια.

Φυλή	Περίοδο ωοτοκίας (ημέρες ± SE)			Ωοπαραγωγή (αυγά/θηλυκό)	
	Πρωωοτοκία	Ωοτοκία	Μετά την ωοτοκία	Μέση (net fecundity)	Μέγιστη (gross fecundity)
Μπενάκειο	3.98 ± 0.12	33.04 ± 1.77	2.62 ± 0.55	860.66 ± 44.82	968.87
Wol – Med 88.6	3.90 ± 0.33	25.68 ± 2.88	1.76 ± 0.50	717.37 ± 75.78	1117.06
Wol – Med S10.3	3.00 ± 0.21	24.18 ± 2.34	2.79 ± 0.81	593.35 ± 67.47	807.08
Vienna GSS	2.37 ± 0.26	23.57 ± 2.37	2.89 ± 0.90	349.55 ± 58.76	643.55
Vienna E88	1.96 ± 0.53	7.50 ± 1.89	1.60 ± 0.78	95.04 ± 37.64	202.08



**Διαγράμματα 4 .** Καμπύλες ωοπαραγωγή σε σχέση με την ηλικία για τις πέντε φυλές της μύγας της Μεσογείου. Τα θηλυκά ωοτοκούσαν σε κοίλα πλαστικά ημισφαίρια στους 25°C στο εργαστήριο.



**Διάγραμμα 5.** Συγκριτική καμπύλη ωοπαραγωγή σε σχέση με την ηλικία, για τις πέντε φυλές της μύγας της Μεσογείου.

Η σύγκριση της αλληλεπίδρασης της κάθε μία από τις πέντε φυλές (Vienna GSS, Μπενάκειο, Vienna E88, Wol – Med 88.6 και Wol – Med S10.3), στην ωοπαραγωγή έγινε με το μη παραμετρικό μοντέλο Kaplan – Meier, (εκτιμητής της συνάρτησης επιβίωσης). Με το μοντέλο αυτό εκτιμήθηκαν οι περίοδοι πρωτοκίας, ωοτοκίας και μετά την ωοτοκία. Ο μέσος όρος των αυγών ανά θηλυκό άτομο (net fecundity rate) έγινε με την παραμετρική ANOVA. Τέλος ο έλεγχος της κανονικότητας της ωοτοκίας (fecundity), έγινε με το κριτήριο One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test. Σύμφωνα με την ANOVA σημαντικές ήταν οι διαφορές στην ωοπαραγωγή μεταξύ των πέντε φυλών της μύγας της Μεσογείου ( $P < 0.05$ ). Οι μολυσμένες με *Wolbachia* φυλές παρουσίασαν μειωμένη ωοπαραγωγή σε σχέση με τις μη μολυσμένες, με τη μικρότερη να σημειώνεται από τη φυλή Vienna E88, μολυσμένης με την *wCer2 Wolbachia*.

### 3.5 Επίδραση της *Wolbachia* σε δύο διαφορετικές φυλές της μύγας της Μεσογείου.

Στην παρούσα ενότητα αναλύονται τα στοιχεία με έμφαση στην επίδραση του στελέχους *wCer2* της *Wolbachia* σε δύο διαφορετικές φυλές της μύγας της Μεσογείου σε σχέση με τον μάρτυρα, αλλά και στην αλληλεπίδραση μεταξύ των φυλών. Οι χρησιμοποιούμενες φυλές δίνονται στον Πίνακα 14 που ακολουθεί.

**Πίνακας 14.** Επίδραση του στελέχους *wCer2* της *Wolbachia* σε δύο διαφορετικές φυλές της μύγας της Μεσογείου.

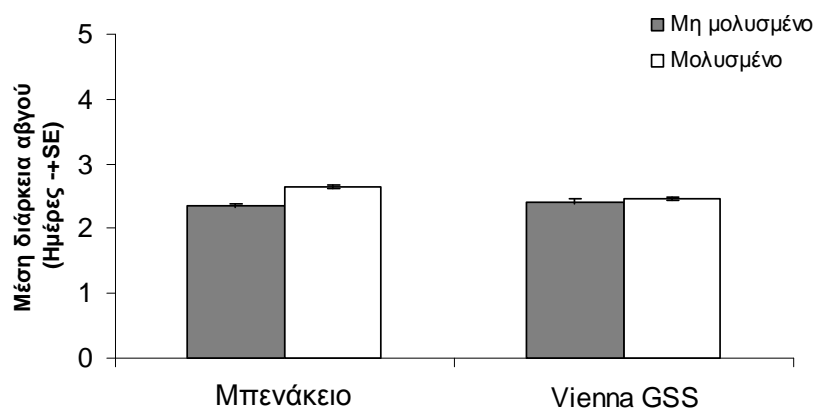
Στέλεχος μύγας Μεσογείου	Πληροφορίες	Μόλυνση	Στέλεχος <i>Wolbachia</i>
<b>Μπενάκειο</b>	Άγριος τύπος εντόμων, που χρησιμοποιήθηκε σε δύο πρόσφατες εργασίες (Zabalou et al, 2004 & Zabalou et al, 2009).	ΟΧΙ	-
<b>Wol – Med 88.6</b>	Η φυλή Μπενάκειο strain μολυσμένη με ένα στέλεχος <i>Wolbachia</i> , (Zabalou et al, 2004).	ΝΑΙ	<i>wCer2</i>
<b>Vienna GSS</b> (genetic sexing strain) ή αλλιώς Vienna 8	Έχει υποστεί γενετική τροποποίηση σε υψηλή θερμοκρασία, ώστε οι λευκές πούπες να δίνουν θηλυκά άτομα και οι καφέ αρσενικά άτομα, (Zabalou et al, 2009).	ΟΧΙ	-
<b>Vienna E88</b>	Η φυλή Vienna 8 GSS μολυσμένη με ένα στέλεχος <i>Wolbachia</i> , (Zabalou et al, 2009).	ΝΑΙ	<i>wCer2</i>

### 3.5.1 Ανήλικα στάδια

Για τα ανήλικα στάδια αυγό – προνύμφη – νύμφη έγινε στατιστική ανάλυση με το μοντέλο ανάλογων κινδύνων του Cox, για τον έλεγχο τυχόν διαφοράς στην επιβίωση των ανηλικών ατόμων μεταξύ των φυλών. Το μοντέλο εφαρμόστηκε διαδοχικά τρεις φορές, μελετώντας ξεχωριστά την επίδραση της κάθε φυλής και της μόλυνσης με το ίδιο στέλεχος *wCer2* της *Wolbachia*, στη διάρκεια ανάπτυξης των αυγών, προνυμφών και νυμφών. Όλες οι συμμεταβλητές είναι δείκτριες συναρτήσεις με τους παράγοντες πληθυσμός (1), πληθυσμός (3), πληθυσμός (4), να λαμβάνουν την τιμή 1 όταν το αυγό, προνύμφη, νύμφη προέρχονται από τη φυλή Wol – Med 88.6, Vienna GSS και Vienna E88 αντίστοιχα (διαφορετικά 0), με τη φυλή Μπενάκειο να αποτελεί την κατηγορία αναφοράς.

#### 1) Αυγό

Η διάρκεια ανάπτυξης του αυγού, δεν επηρεάστηκε ούτε από τη φυλή, ούτε από το στέλεχος *wCer2* της *Wolbachia* ( $P > 0.05$ ). Στο Διάγραμμα 6, δίνεται η διάρκεια ανάπτυξης του αυγού για τις δύο φυλές της μύγας της Μεσογείου.

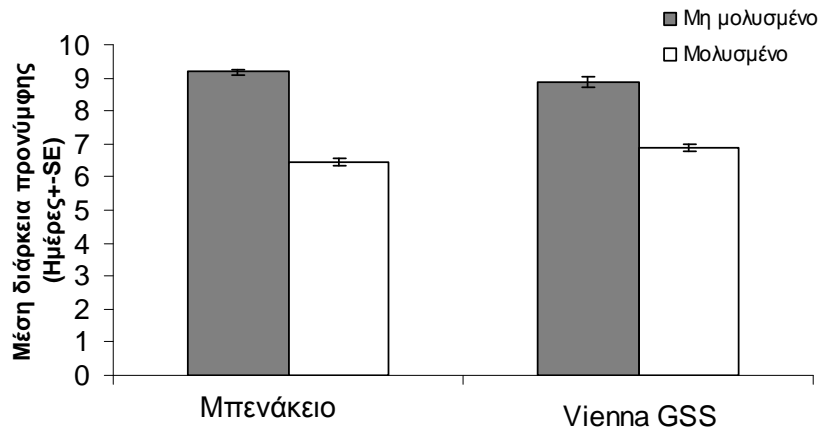


**Διάγραμμα 6.** Επίδραση του στελέχους *wCer2* της *Wolbachia* στη διάρκεια ανάπτυξης του αυγού, σε δύο διαφορετικές φυλές της μύγας της Μεσογείου.



## 2) Προνύμφη

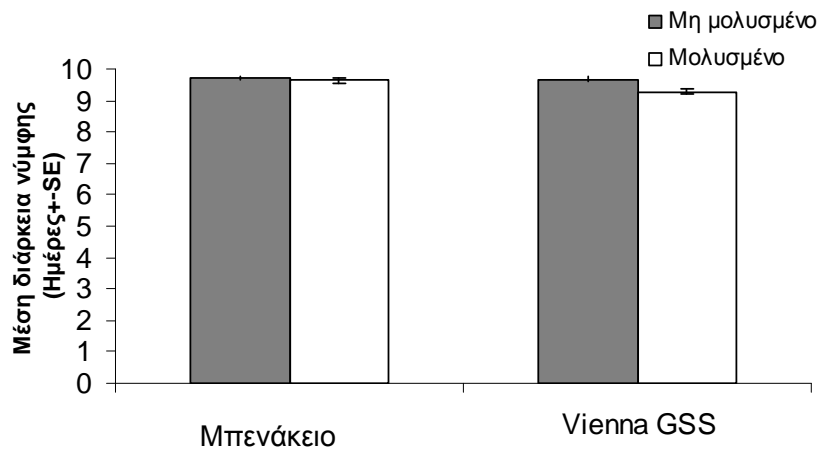
Στο στάδιο της προνύμφης δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ των φυλών όσον αφορά τη διάρκεια ανάπτυξης ( $P > 0.05$ ). Αντίθετα, η μόλυνση με το στέλεχος *wCer2* της *Wolbachia* ήταν σημαντικός εκτιμητής της διάρκειας της προνυμφικής ανάπτυξης ( $P < 0.05$ ). Η διάρκεια ανάπτυξης των προνυμφών των Wol – Med 88.6 και Vienna E88, που ήταν μολυσμένες με το *wCer2* στέλεχος της *Wolbachia*, ήταν μειωμένη σε σχέση με τις μη μολυσμένες προνύμφες των φυλών Μπενάκειο και Vienna GSS, (Διάγραμμα 7).



**Διάγραμμα 7.** Επίδραση του στελέχους *wCer2* της *Wolbachia* στη διάρκεια ανάπτυξης της προνύμφης, σε δύο διαφορετικές φυλές της μύγας της Μεσογείου.

## 2) Νύμφη

Στο στάδιο της νύμφης δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ των φυλών όσον αφορά τη διάρκεια ανάπτυξης ( $P > 0.05$ ), ενώ η μόλυνση με το στελέχος *wCer2* της *Wolbachia* ήταν σημαντικός εκτιμητής της διάρκειας της νυμφικής ανάπτυξης ( $P < 0.05$ ), (Διάγραμμα 8).



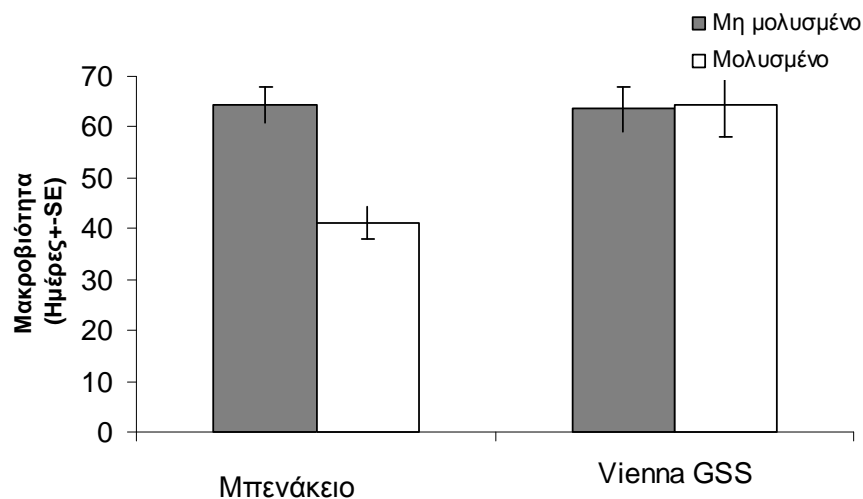
**Διάγραμμα 8.** Επίδραση του στελέχους *wCer2* της *Wolbachia* στη διάρκεια ανάπτυξης της νύμφης, σε δύο διαφορετικές φυλές της μύγας της Μεσογείου.

### 3.5.2 Ενήλικα στάδια – επιβίωση

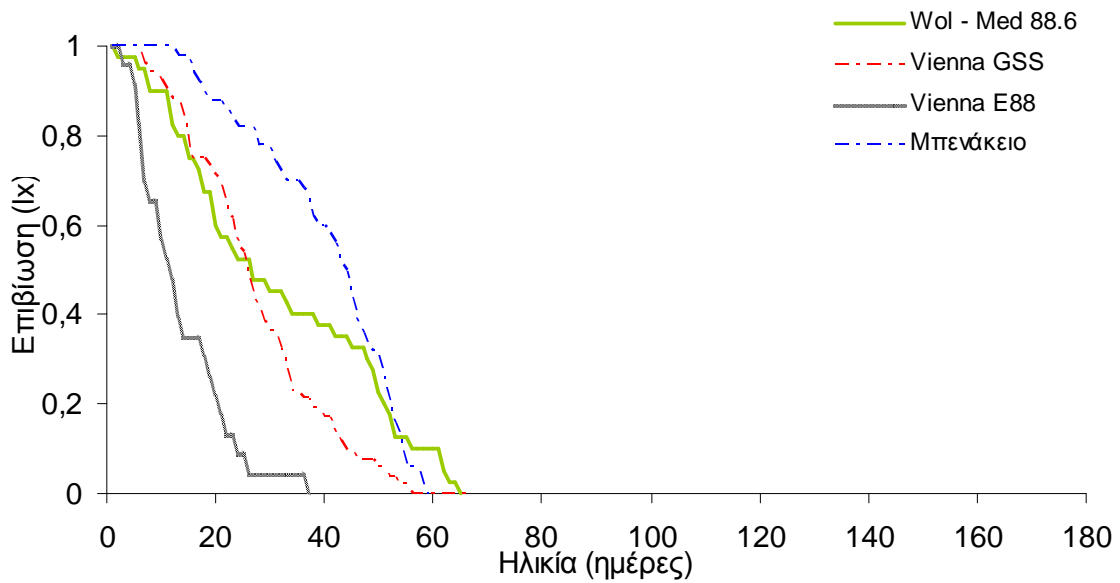
Οι διαφορές μεταξύ των δύο φυλών στη μέση αναμενόμενη διάρκεια ζωής στην ηλικία μηδέν (0), τόσο μεταξύ των θηλυκών, όσο και των αρσενικών ατόμων ήταν μεγάλες. Η επίδραση του πληθυσμού και του φύλου στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων προσδιορίστηκαν με το μοντέλο ανάλογων κινδύνων του Cox. Όλες οι συμμεταβλητές είναι δείκτριες συναρτήσεις με τον παράγοντα φύλο (sex), να λαμβάνει την τιμή 1 για το αρσενικό άτομο (διαφορετικά λαμβάνει την τιμή 0), την τιμή 2 για το θηλυκό και τους παράγοντες πληθυσμός (1), πληθυσμός (3), πληθυσμός (4), να λαμβάνουν την τιμή 1 όταν το άτομο προέρχεται από τη φυλή

Wol – Med 88.6, Vienna GSS και Vienna E88 αντίστοιχα (διαφορετικά 0), με τη φυλή Μπενάκειο να αποτελεί την κατηγορία αναφοράς (baseline).

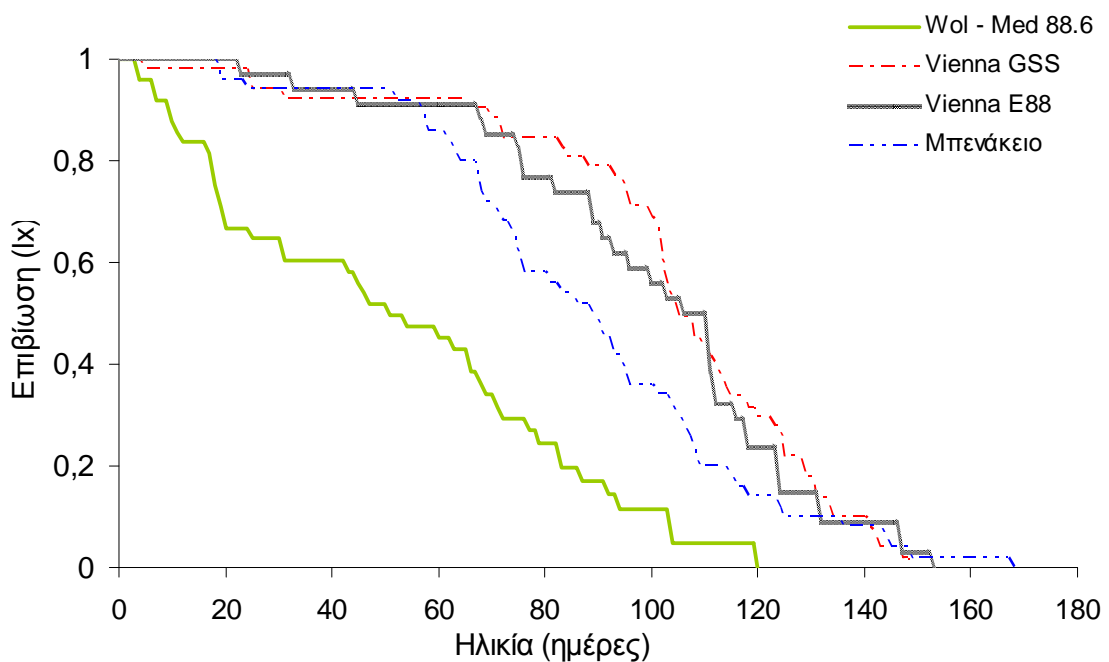
Η φυλή επιδρά στην επιβίωση των ενηλίκων, ( $P < 0.05$ ) με τα αρσενικά να επιβιώνουν για μακρότερο χρονικό διάστημα από τα θηλυκά και στις δύο φυλές. Τόσο τα μολυσμένα αρσενικά, όσο και τα θηλυκά των Wol – Med 88.6 και Vienna E88, είχαν μικρότερη διάρκεια επιβίωσης σε σχέση με τα μη μολυσμένα των Μπενάκειο και Vienna GSS. Η μόλυνση με τη *Wolbachia* (*wCer2*) και το φύλο (*sex*) είχαν σημαντική επίδραση στη διάρκεια ζωής, ( $P < 0.05$ ), (Διάγραμμα 9 - 11).



**Διάγραμμα 9.** Επίδραση του στελέχους *wCer2* της *Wolbachia* στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων, σε δύο διαφορετικές φυλές της μύγας της Μεσογείου.



**Διάγραμμα 10.** Επίδραση της *wCer2 Wolbachia* στην αθροιστική επιβίωση θηλυκών δύο διαφορετικών φυλών της μύγας της Μεσογείου.



**Διάγραμμα 11.** Επίδραση της *wCer2 Wolbachia* στην αθροιστική επιβίωση αρσενικών δύο διαφορετικών φυλών της μύγας της Μεσογείου.

### 3.5.3 Ωοτοκία - Ωοπαραγωγή

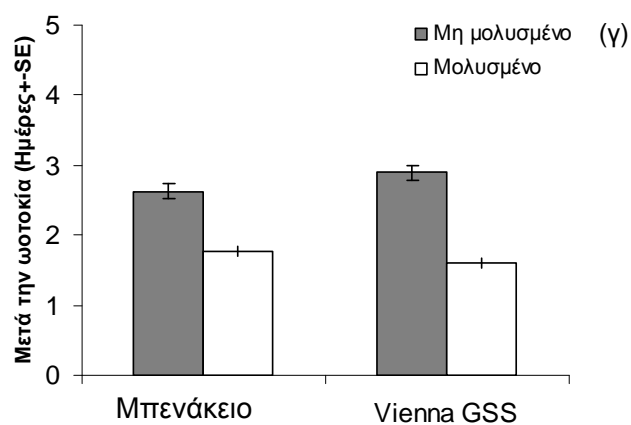
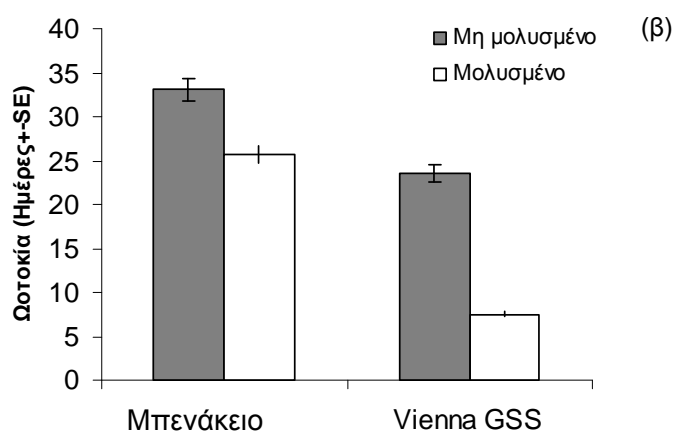
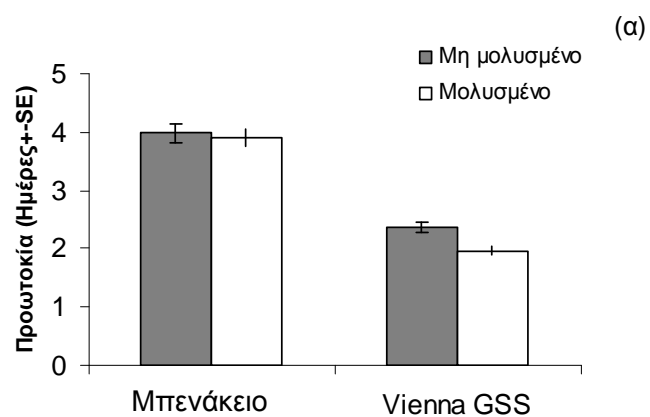
Υπολογίστηκε η επίδραση της μόλυνσης από το στέλεχος *wCer2* της *Wolbachia* και της φυλής στην ωοτοκία και ωοπαραγωγή των θηλυκών στις δύο φυλές της μύγας της Μεσογείου. Επιπλέον, υπολογίστηκε το ποσοστό της συνολικής διάρκειας ζωής των θηλυκών που αναλογεί σε κάθε μία από τις τρεις υποπεριόδους (προ-μετα-ωοτοκία) για κάθε φυλή. Τα ποσοστά αυτά υπολογίστηκαν διαιρώντας τον αριθμό των ημερών που αντιπροσωπεύει κάθε μια από τις τρεις αυτές περιόδους για κάθε άτομο, με τη συνολική διάρκεια ζωής του.

Σύμφωνα με το μοντέλο ανάλογων κινδύνων του Cox, στην περίοδο πρωτοκίας, οι δύο φυλές δεν διαφέρουν μεταξύ τους και δεν υπάρχει σημαντική επίδραση της μόλυνσης από το στέλεχος *wCer2* της *Wolbachia* στην περίοδο αυτή ( $P > 0.05$ ). Στην περίοδο ωοτοκίας, οι δύο φυλές διαφέρουν μεταξύ τους ( $P < 0.05$ ) με την μόλυνση από τη *Wolbachia* να μην έχει επίδραση στην περίοδο αυτή ( $P > 0.05$ ). Τέλος δεν υπάρχει επίδραση της *wCer2 Wolbachia* στην περίοδο μετά την ωοτοκία, με τις δύο φυλές να μη διαφέρουν μεταξύ τους ( $P > 0.05$ ), (Διάγραμμα 12).

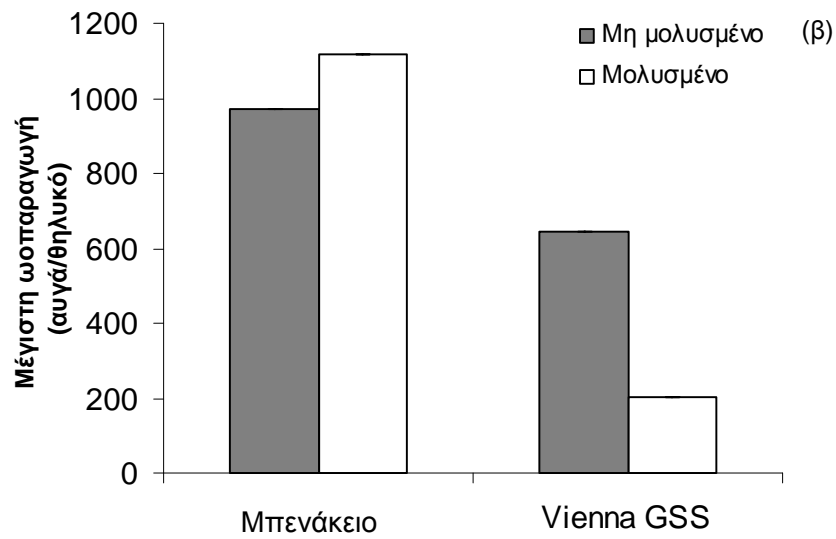
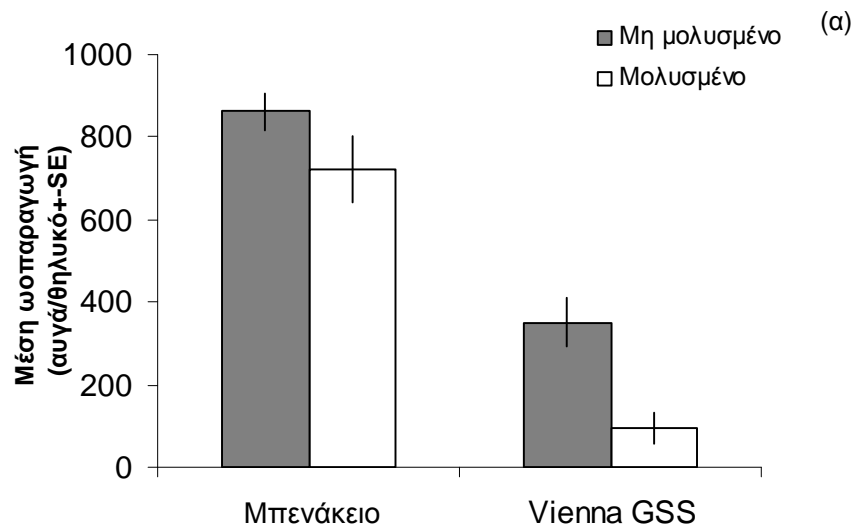
Η ανάλυση της παραλλακτικότητας (ANOVA), έδειξε ότι οι φυλές διαφέρουν σημαντικά όσον αφορά τη μέση ωοπαραγωγή, σε σχέση με τον μάρτυρα. Η επίδραση της μόλυνσης με το στέλεχος *wCer2* της *Wolbachia*, είναι ίδια για την ωοπαραγωγή και για τις δύο φυλές. Ανεξάρτητα από το εάν ήταν μολυσμένες οι φυλές ή όχι, υπήρχε σημαντική διαφορά στην ωοπαραγωγή μεταξύ των δύο φυλών Μπενάκειο και Vienna GSS. Επίσης, ανεξάρτητα από τη φυλή, οι μη μολυσμένες είχαν μεγαλύτερη διάρκεια ωοτοκίας από τις αντίστοιχες μολυσμένες. Συνεπώς, η μόλυνση είχε σημαντική επίδραση και στις δύο φυλές, με χαρακτηριστική μείωση της διάρκειας ωοτοκίας και ωοπαραγωγής για τις μολυσμένες φυλές Wol – Med 88.6 και Vienna E88, σε σχέση με τις μη μολυσμένες φυλές Μπενάκειο και Vienna GSS. Ιδιαίτερα για τη φυλή της Vienna η μείωση της διάρκειας ωοτοκίας και ωοπαραγωγής ήταν πολύ μεγαλύτερη, ( $P < 0.05$ ). Η επίδραση του *wCer2 Wolbachia*, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της μέσης ωοπαραγωγής στις φυλές Wol - Med 88.6 και Vienna E88, με τη δεύτερη να παρουσιάζει τη μικρότερη μέση ωοπαραγωγή. Η φυλή Μπενάκειο μολυσμένη

με το στέλεχος *wCer2 Wolbachia*, παρουσίασε μεγαλύτερη μέγιστη ωοπαραγωγή, σε σχέση με τον μάρτυρα, σε αντίθεση με τη φυλή Vienna, μολυσμένη με το στέλεχος *wCer2 Wolbachia* που είχε πολύ μικρότερη μέγιστη ωοπαραγωγή. Όσον αφορά τη μέγιστη ωοπαραγωγή, το στέλεχος *wCer2* της *Wolbachia* είχε σημαντική επίδραση στη φυλή της Vienna GSS, με χαρακτηριστική μείωση της μέγιστης ωοπαραγωγής στη μολυσμένη φυλή, σε αντίθεση με τη φυλή Μπενάκειο όπου η μόλυνση με το *wCer2* έδωσε μεγαλύτερη μέγιστη ωοπαραγωγή από τη μη μολυσμένη, (Διάγραμμα 13 - 14).

Η λεπτομερειακή αποτύπωση της ωοτοκίας των θηλυκών (event history diagram), (Carey et al., 1998) για τις μολυσμένες και μη μολυσμένες φυλές της μύγας της Μεσογείου με το στέλεχος *wCer2* της *Wolbachia* δίνεται στο Διάγραμμα 15 που ακολουθεί. Σημαντικές διαφορές υπάρχουν στην κατανομή της ωοπαραγωγής σε σχέση με την ηλικία μεταξύ των μη μολυσμένων και μολυσμένων πληθυσμών με το στέλεχος *wCer2* της *Wolbachia*. Και για τις δύο φυλές (μολυσμένες και μη) ο ρυθμός ωρίμανσης, ο οποίος καθορίζεται από την ηλικία της ωοτοκίας για κάθε άτομο ξεκινάει από την 5<sup>η</sup> ημέρα. Συγκεκριμένα, στη φυλή Μπενάκειο παρατηρήθηκε υψηλή και ομοιόμορφη κατανεμημένη ωοπαραγωγή > 30 αυγά, από την 5 – 20<sup>η</sup> ημέρα, σε αντίθεση με τη φυλή της Vienna GSS, όπου η ωοπαραγωγή ήταν σαφώς μικρότερη να κυμαίνεται από την 5 – 20<sup>η</sup> ημέρα. Στις αντίστοιχα μολυσμένες φυλές, η Wol – Med 88.6 εμφάνισε μικρότερη ωοπαραγωγή σε σχέση με τη μη μολυσμένη (Μπενάκειο), ενώ χαρακτηριστική ήταν η μείωση της ωοπαραγωγής στην Vienna E88 με την υψηλή ωοπαραγωγή > 30 να παρατηρείται από την 5-15 ημέρα της ζωής των ενηλίκων.

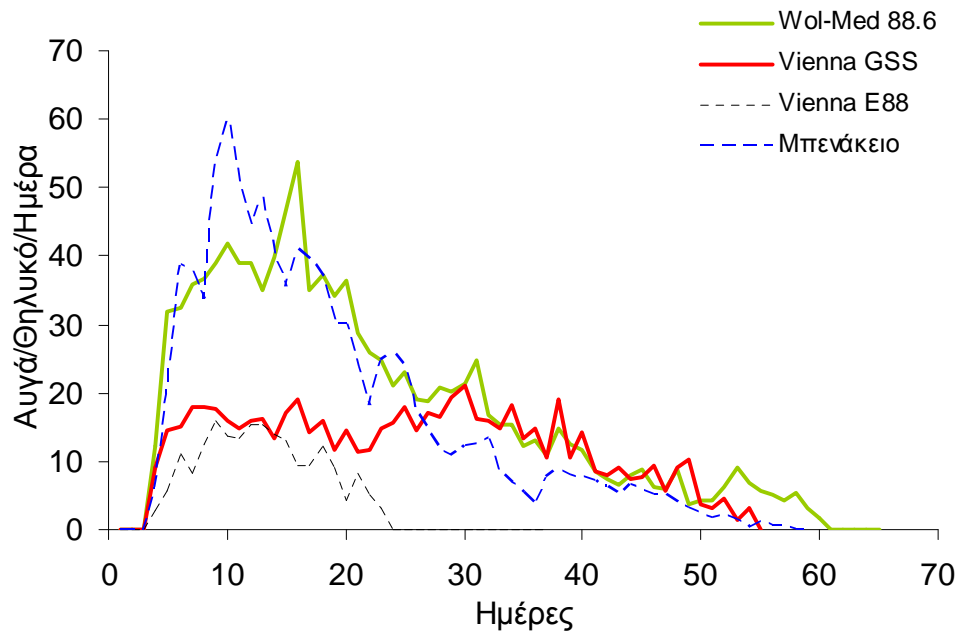


**Διάγραμμα 12.** Επίδραση της *wCer2 Wolbachia* στις περιόδους(α) πρωτοκία, (β) ωοτοκία και (γ) μετά την ωοτοκία, σε δύο διαφορετικές φυλές της μύγας της Μεσογείου.

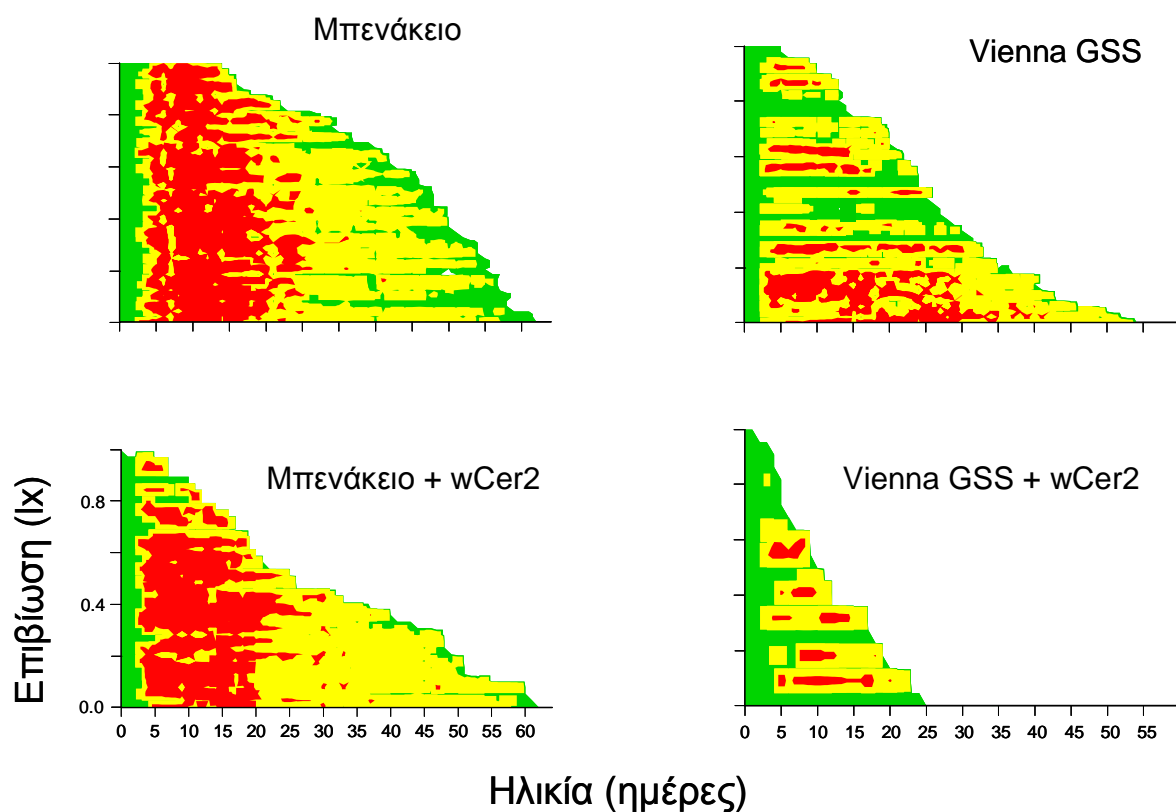


**Διάγραμμα 13.** Επίδραση της *wCer2 Wolbachia* στην (α) μέση και (β) μέγιστη ωοπαραγωγή σε δύο διαφορετικές φυλές της μύγας της Μεσογείου.





**Διάγραμμα 14.** Επίδραση της *wCer2 Wolbachia* στην ωοπαραγωγή των θηλυκών σε σχέση με την ηλικία, σε δύο διαφορετικές φυλές της μύγας της Μεσογείου.



**Διάγραμμα 15.** Λεπτομερής αποτύπωση της ωτοκίας των θηλυκών (event history diagram) για την επίδραση της *wCer2 Wolbachia* σε δύο διαφορετικές φυλές της μύγας της Μεσογείου. Κάθε οριζόντια γραμμή απεικονίζει τη διάρκεια ζωής ενός θηλυκού και τα διαφορετικά χρώματα δείχνουν τα επίπεδα ωοπαράγωγής σε κάθε ηλικία. Πράσινο: 0 αυγά, κίτρινο: 1-30 αυγά, κόκκινο: > 30 αυγά. Χρησιμοποιήθηκαν 23 με 50 άτομα για κάθε πληθυσμό.

### 3.6 Επίδραση δύο διαφορετικών στελεχών *Wolbachia* σε μία φυλή της μύγας της Μεσογείου.

Στην παρούσα ενότητα αναλύονται τα στοιχεία με βάση την επίδραση δύο στελεχών της *Wolbachia* των *wCer2* και *wCer4*, σε μία φυλή της μύγας της Μεσογείου σε σχέση με τον μάρτυρα. Οι χρησιμοποιούμενες φυλές δίνονται στον Πίνακα 15 που ακολουθεί.

**Πίνακας 15.** Επίδραση των στελεχών *wCer2* και *wCer4* της *Wolbachia* σε μία φυλή της μύγας της Μεσογείου.

Στέλεχος μύγας Μεσογείου	Πληροφορίες	Μόλυνση	Στέλεχος <i>Wolbachia</i>
<b>Μπενάκειο</b>	Άγριος τύπος εντόμων, που χρησιμοποιήθηκε σε δύο πρόσφατες εργασίες (Zabalou et al, 2004 & Zabalou et al, 2009).	ΟΧΙ	-
<b>Wol – Med 88.6</b>	Η φυλή Μπενάκειο strain μολυσμένη με ένα στέλεχος <i>Wolbachia</i> , (Zabalou et al, 2004).	ΝΑΙ	<i>wCer2</i>
<b>Wol – Med S10.3</b>	Η φυλή Μπενάκειο strain μολυσμένη με ένα στέλεχος <i>Wolbachia</i> , (Zabalou et al, 2004).	ΝΑΙ	<i>wCer4</i>

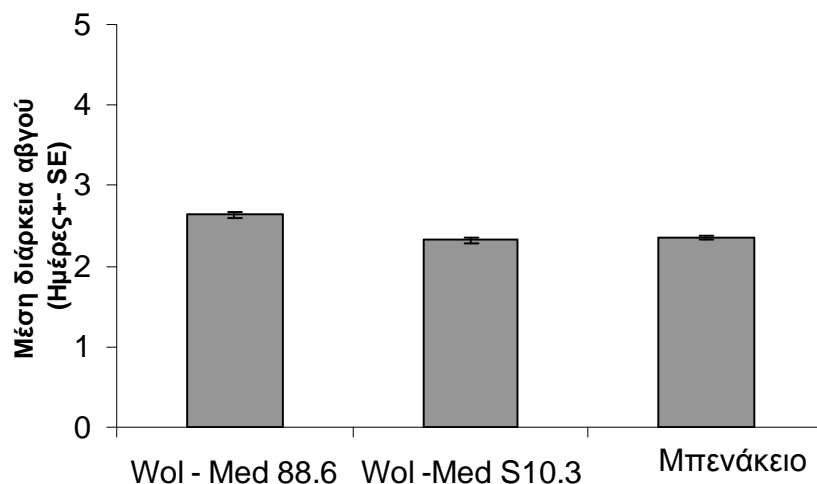
#### 3.6.1 Ανήλικα στάδια

Για τα ανήλικα στάδια αυγό – προνύμφη – νύμφη έγινε στατιστική ανάλυση με το μοντέλο ανάλογων κινδύνων του Cox, για τον έλεγχο τυχόν διαφοράς στην επιβίωση των ανηλικών ατόμων μεταξύ των διαφορετικών στελεχών *Wolbachia*.

Το μοντέλο εφαρμόστηκε διαδοχικά τρεις φορές, μελετώντας ξεχωριστά την επίδραση της μόλυνσης με τα δύο διαφορετικά στελέχη *wCer2* και *wCer4* της *Wolbachia*, στη διάρκεια ανάπτυξης των αυγών, προνυμφών και νυμφών.

### 1) Αυγό

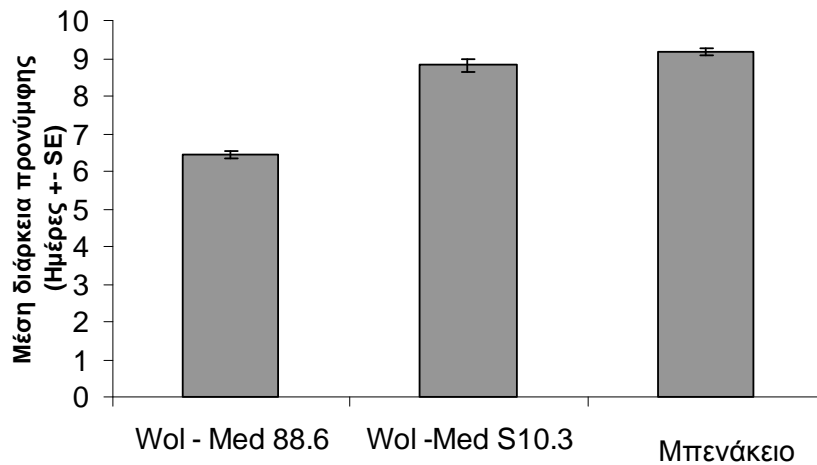
Η διάρκεια ανάπτυξης του αυγού, διέφερε σημαντικά μεταξύ των φυλών Μπενάκειο, Wol – Med 88.6 και Wol – Med S10.3, ( $P < 0.05$ ). Η μόλυνση με το στέλεχος *wCer4* αύξησε σημαντικά τη διάρκεια ανάπτυξής του αυγού. Στο Διάγραμμα 16, δίνεται η διάρκεια ανάπτυξης του αυγού για τη φυλή Μπενάκειο της μύγας της Μεσογείου, που είναι μολυσμένη με τα στελέχη *wCer2* και *wCer4* της *Wolbachia*.



**Διάγραμμα 16.** Επίδραση των στελεχών *wCer2* και *wCer4* της *Wolbachia* στη διάρκεια ανάπτυξης του αυγού, σε μία φυλή της μύγας της Μεσογείου.

## 2) Προνύμφη

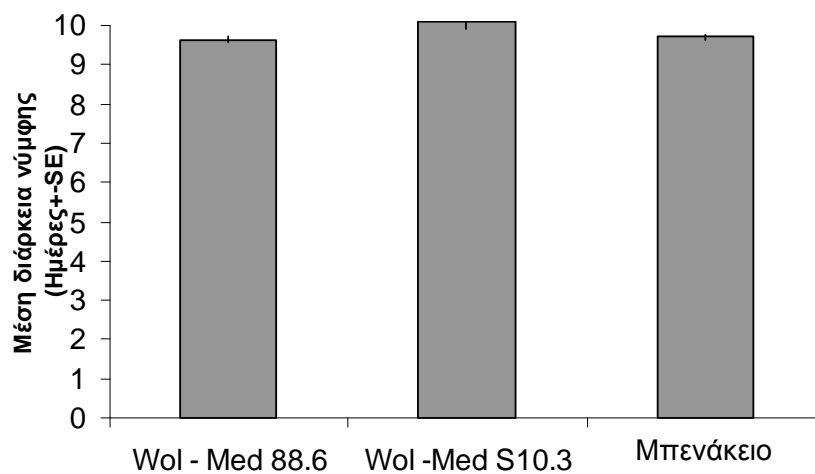
Η διάρκεια ανάπτυξης της προνύμφης διέφερε σημαντικά μεταξύ των δύο στελεχών *Wolbachia*, ( $P < 0.05$ ). Η φυλή Μπενάκειο που ήταν μολυσμένη με το στέλεχος *wCer2* (Wol – Med 88.6), παρουσίασε τη μικρότερη διάρκεια ανάπτυξης των προνυμφών, με τη φυλή Μπενάκειο μολυσμένη με το *wCer4* στέλεχος (Wol – Med S10.3) να ακολουθεί (Διάγραμμα 17).



**Διάγραμμα 17.** Επίδραση των στελεχών *wCer2* και *wCer4* της *Wolbachia* στη διάρκεια ανάπτυξης της προνύμφης, σε μία φυλή της μύγας της Μεσογείου.

### 3) Νύμφη

Στο στάδιο της νύμφης υπήρξε σημαντική διαφορά του στελέχους *wCer4* *Wolbachia* σε σχέση με τον μάρτυρα της φυλής Μπενάκειο ( $P < 0.05$ ). Το στέλεχος *wCer2* δεν επηρέασε σημαντικά τη διάρκεια ανάπτυξης των νυμφών (Διάγραμμα 18).

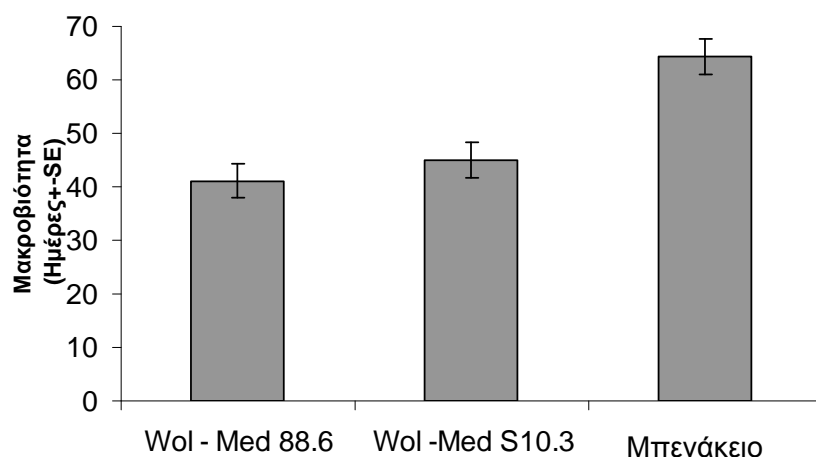


**Διάγραμμα 18.** Επίδραση των στελεχών *wCer2* και *wCer4* της *Wolbachia* στη διάρκεια ανάπτυξης της νύμφης, σε μία φυλή της μύγας της Μεσογείου.

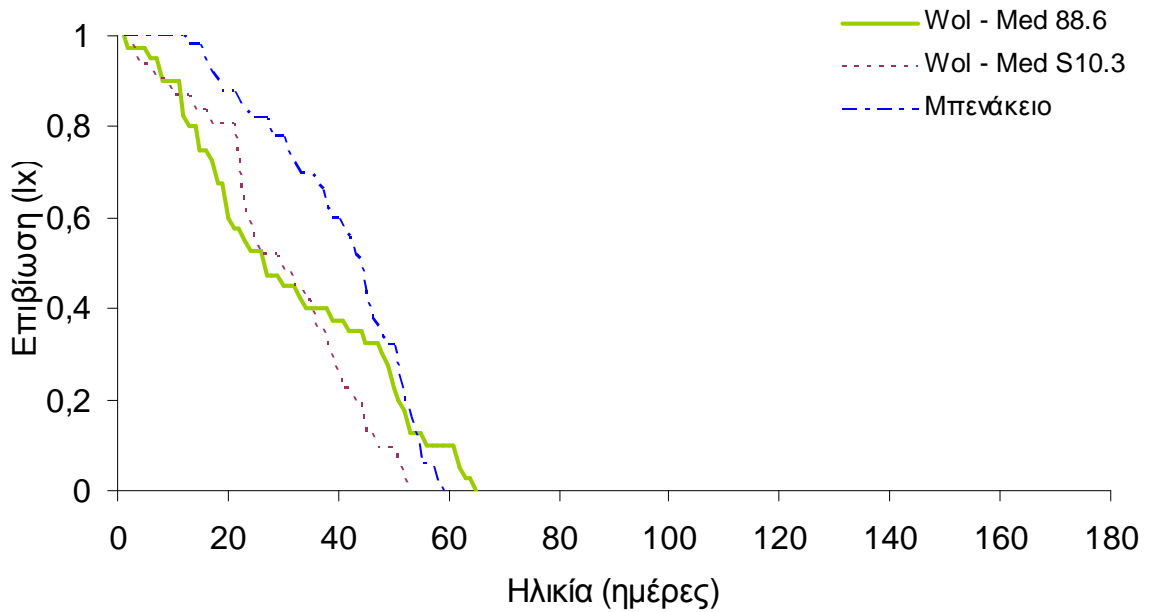
### 3.6.2 Ενήλικα στάδια – επιβίωση

Οι διαφορές μεταξύ των δύο φυλών στη μέση αναμενόμενη διάρκεια ζωής στην ηλικία μηδέν (0), τόσο μεταξύ των θηλυκών, όσο και των αρσενικών ατόμων ήταν μεγάλες. Η επίδραση του πληθυσμού και του φύλου στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων προσδιορίστηκαν με το μοντέλο ανάλογων κινδύνων του Cox. Όλες οι συμμεταβλητές είναι δείκτριες συναρτήσεις με τον παράγοντα φύλο (sex), να λαμβάνει την τιμή 1 για το αρσενικό άτομο (διαφορετικά λαμβάνει την τιμή 0), την τιμή 2 για το θηλυκό και τους παράγοντες πληθυσμός (1), πληθυσμός (2), να λαμβάνουν την τιμή 1 όταν το άτομο προέρχεται από τη φυλή Wol – Med 88.6 και Wol – Med S10.3 αντίστοιχα (διαφορετικά 0), με τη φυλή Μπενάκειο να αποτελεί την κατηγορία αναφοράς (baseline).

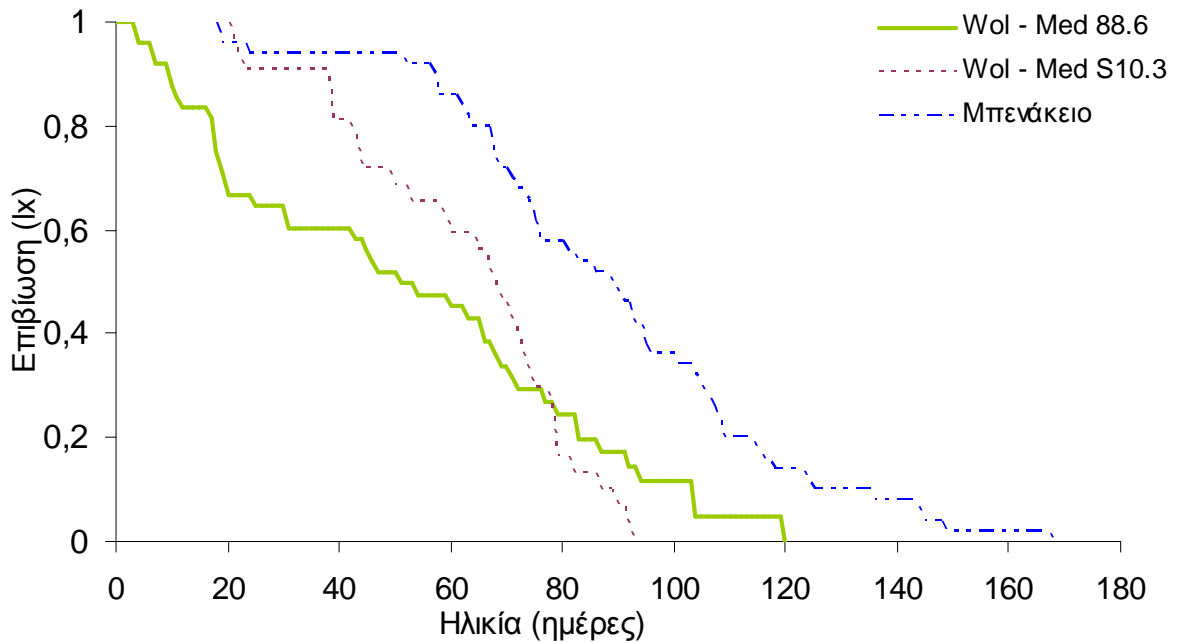
Το φύλο επιδρά στην επιβίωση των ενηλίκων ( $P < 0.05$ ) με τα αρσενικά να είναι μακροβιότερα των θηλυκών. Τόσο τα αρσενικά, όσο και τα θηλυκά που ήταν μολυσμένα με τα δύο στελέχη *wCer2* και *wCer4* *Wolbachia*, είχαν μικρότερη διάρκεια επιβίωσης σε σχέση με τα μη μολυσμένα της φυλής Μπενάκειο. Η φυλή Wol – Med 88.6 που ήταν μολυσμένη με το στέλεχος *wCer2*, παρουσίασε τη μικρότερη διάρκεια επιβίωσης (Διαγράμματα 19 - 21). Συνεπώς, τα στελέχη *wCer2* και *wCer4* είχαν σημαντική επίδραση στη διάρκεια ανάπτυξης των ενηλίκων.



**Διάγραμμα 19.** Επίδραση των στελεχών *wCer2* και *wCer4* της *Wolbachia* στη συνολική διάρκεια επιβίωσης των ενηλίκων, σε μία φυλή της μύγας της Μεσογείου.



**Διάγραμμα 20.** Επίδραση των *wCer2* και *wCer4* στελεχών *Wolbachia* στη διάρκεια ζωής των θηλυκών στη φυλή Μπενάκειο της μύγας της Μεσογείου.



**Διάγραμμα 21.** Επίδραση των *wCer2* και *wCer4* στελεχών *Wolbachia* στη διάρκεια ζωής των αρσενικών στη φυλή Μπενάκειο της μύγας της Μεσογείου.

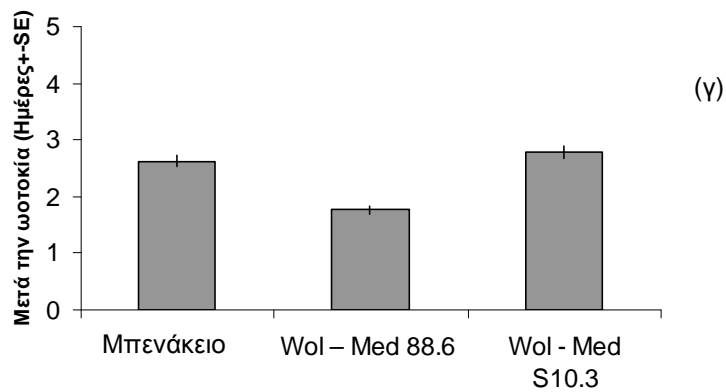
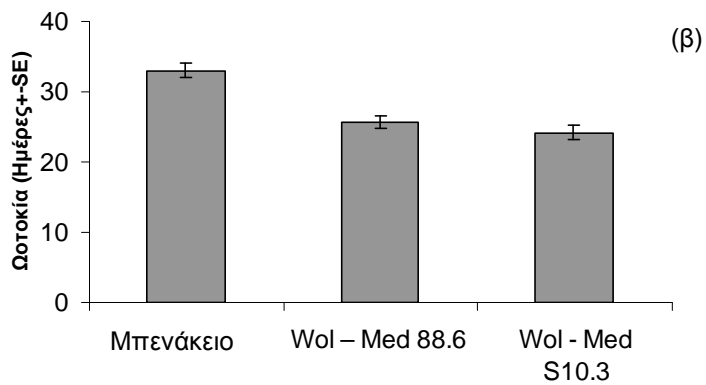
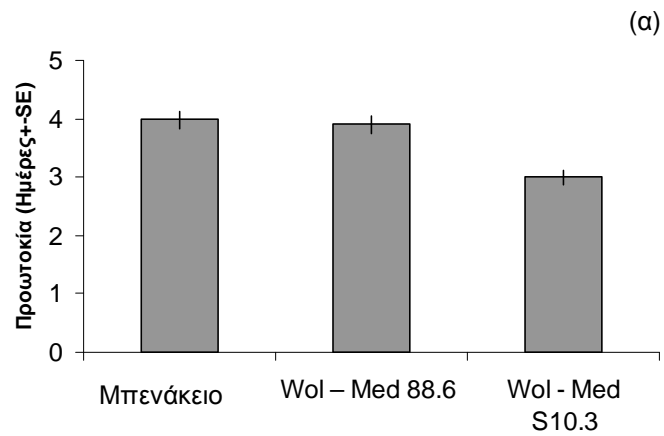


### 3.6.3 Ωοτοκία – Ωοπαραγωγή

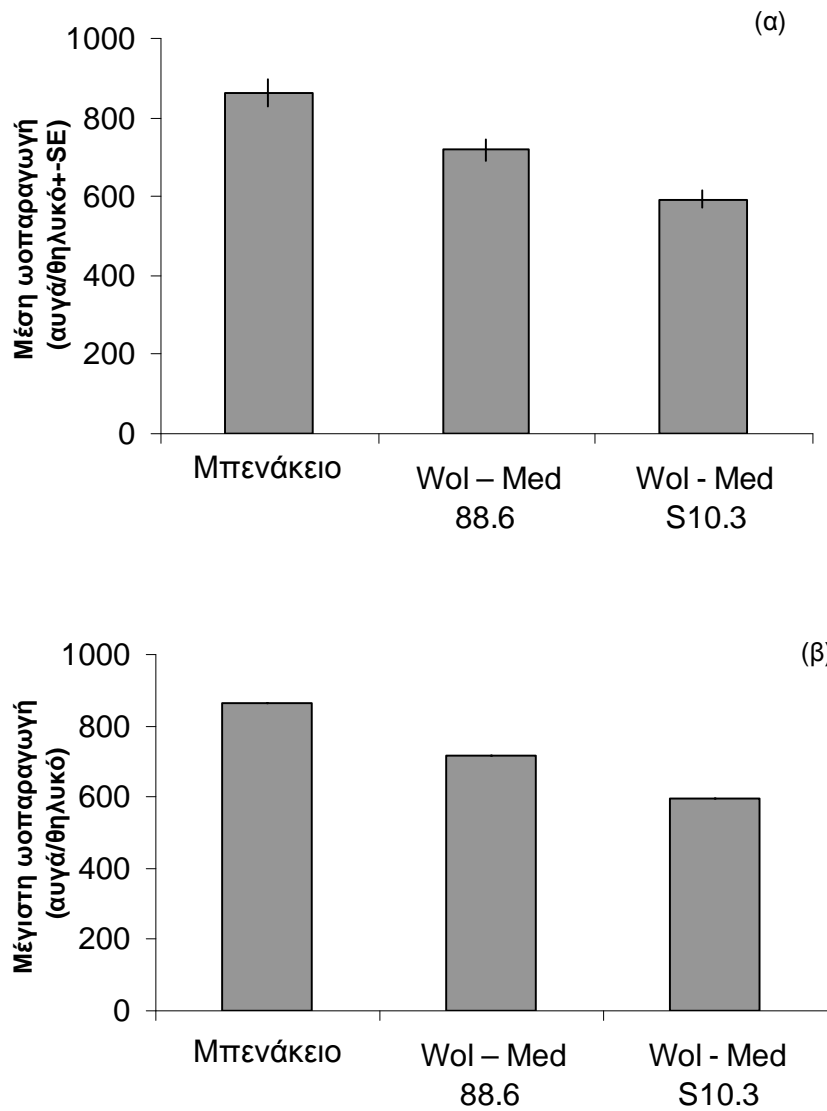
Σύμφωνα με το μοντέλο ανάλογων κινδύνων του Cox, στην περίοδο πρωτοκίας, δεν υπάρχει σημαντική επίδραση της μόλυνσης από το στέλεχος *wCer2* και *wCer4* της *Wolbachia* ( $P > 0.05$ ). Στην περίοδο ωοτοκίας σημαντική είναι η επίδραση του στελέχους *wCer4* *Wolbachia* σε σχέση με τον μάρτυρα, με τη μολυσμένη φυλή Wol – Med S10.3, να παρουσιάζει τη μικρότερη περίοδο ωοτοκίας, ( $P < 0.05$ ). Η μολυσμένη με το στέλεχος *wCer2* φυλή, η Wol – Med 88.6 δεν είχε σημαντική διαφορά στην περίοδο αυτή σε σχέση με τον μάρτυρα ( $P > 0.05$ ). Τέλος, δεν ήταν σημαντική η επίδραση του στελέχους *wCer2* και *wCer4* *Wolbachia* στην περίοδο μετά την ωοτοκία, ( $P > 0.05$ ), (Διάγραμμα 22).

Σύμφωνα με την ANOVA, η επίδραση της μόλυνσης με τα στελέχη *wCer2* και *wCer4* της *Wolbachia* στην ωοπαραγωγή ήταν σημαντική ( $P < 0.05$ ). Η μόλυνση της φυλής Μπενάκειο με το στέλεχος *wCer4* (Wol – Med S10.3), έδωσε τη μικρότερη μέση ωοπαραγωγή και ακολούθησε η μόλυνση με το στέλεχος *wCer2* (Wol – Med 88.6), ( $P < 0.05$ ).

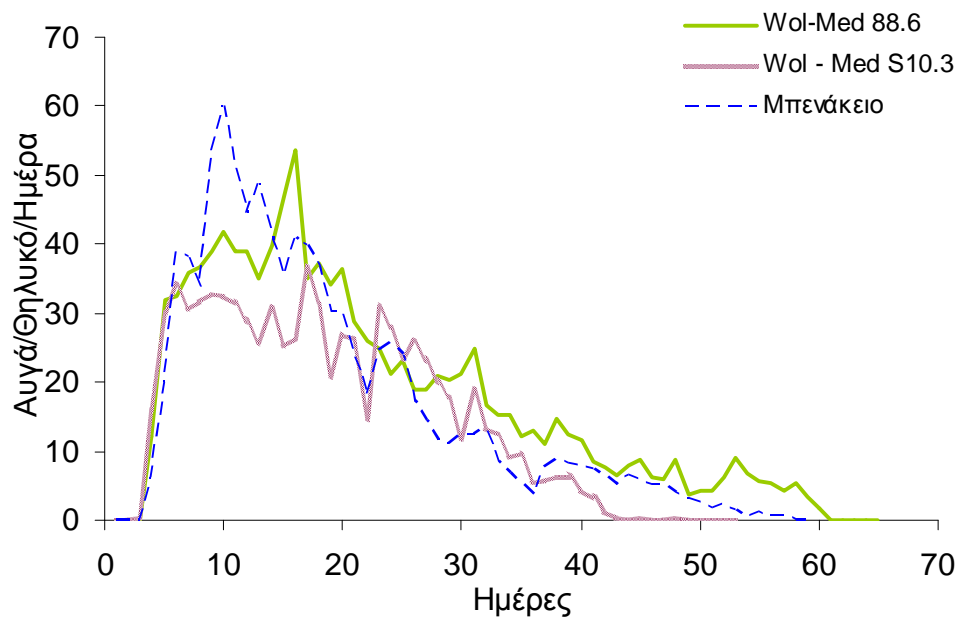
Η λεπτομερειακή αποτύπωση της ωοτοκίας των θηλυκών (event history diagram), για τη μολυσμένη και μη μολυσμένη φυλή της μύγας της Μεσογείου με το στέλεχος *wCer2* και *wCer4* της *Wolbachia* δίνεται στο Διάγραμμα 25 που ακολουθεί. Σημαντικές διαφορές υπάρχουν στην κατανομή της ωοπαραγωγής σε σχέση με την ηλικία μεταξύ της μη μολυσμένης και μολυσμένης φυλής Μπενάκειο με το στέλεχος *wCer2* και *wCer4* της *Wolbachia*. Συγκεκριμένα, στη φυλή Μπενάκειο παρατηρήθηκε υψηλή και ομοιόμορφη κατανεμημένη ωοπαραγωγή  $> 30$  αυγά, από την 5 – 20<sup>η</sup> ημέρα, σε αντίθεση με τις μολυσμένες με τη *Wolbachia* φυλές Wol – Med 88.6 και Wol – Med S10.3, όπου η ωοπαραγωγή ήταν σαφώς μικρότερη. Η Wol – Med 88.6 μολυσμένη με το στέλεχος *wCer2* της *Wolbachia*, εμφάνισε μικρότερη αλλά ομοιόμορφα κατανεμημένη ωοπαραγωγή σε σχέση με τη μη μολυσμένη (Μπενάκειο), με τη μέγιστη ωοπαραγωγή να κυμαίνεται από την 5-25<sup>η</sup> ημέρα. Η φυλή Wol – Med S10.3 μολυσμένη με το στέλεχος *wCer4* της *Wolbachia* παρουσίασε τη μικρότερη ωοπαραγωγή, μη ομοιόμορφα κατανεμημένη σε σχέση με την Wol – Med 88.6 και Μπενάκειο.



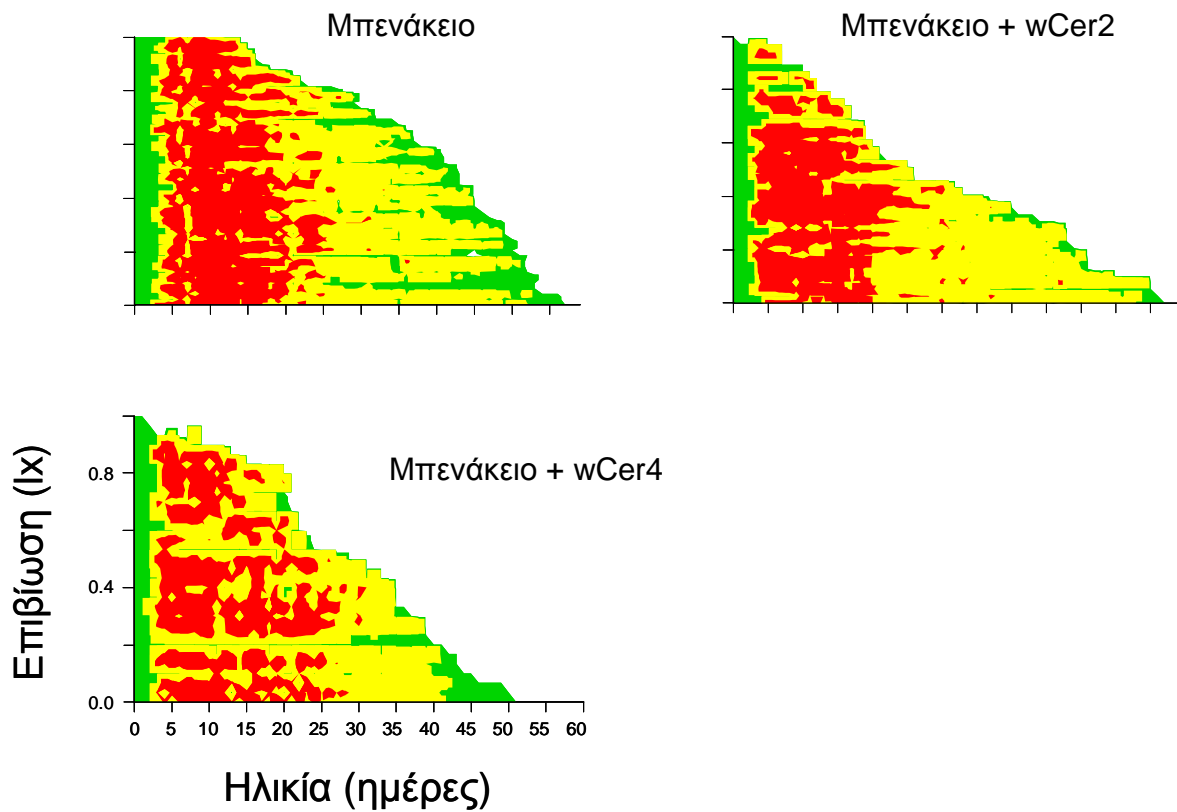
**Διάγραμμα 22.** Επίδραση της *wCer2* και *wCer4 Wolbachia* στην (α) πρωτοκία, (β) ωοτοκία και (γ) μετά την ωοτοκία, στη φυλή Μπενάκειο της μύγας της Μεσογείου.



**Διάγραμμα 23.** Επίδραση της *wCer2* και *wCer4* *Wolbachia* στην (α) μέση και (β) μέγιστη ωοπαραγωγή στη φυλή Μπενάκειο της μύγας της Μεσογείου.



**Διάγραμμα 24.** Επίδραση των στελεχών *wCer2* και *wCer4* *Wolbachia* στην ωοπαραγωγή των θηλυκών σε σχέση με την ηλικία, στη φυλή Μπενάκειο της μύγας της Μεσογείου.



**Διάγραμμα 25.** Λεπτομερής αποτύπωση της ωτοκίας των θηλυκών (event history diagram) για την επίδραση της *wCer2* και *wCer4* *Wolbachia* σε μία φυλή της μύγας της Μεσογείου. Κάθε οριζόντια γραμμή απεικονίζει τη διάρκεια ζωής ενός θηλυκού και τα διαφορετικά χρώματα δείχνουν τα επίπεδα ωοπαραγωγής σε κάθε ηλικία. Πράσινο: 0 αυγά, κίτρινο: 1-30 αυγά, κόκκινο: > 30 αυγά. Χρησιμοποιήθηκαν 23 με 50 άτομα για κάθε πληθυσμό.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### 4.1 Συζήτηση και συμπεράσματα

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα της επίδρασης του στελέχους *wCer2 Wolbachia* σε δύο διαφορετικές φυλές της μύγας της Μεσογείου και των *wCer2* και *wCer4* σε μία φυλή, προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

(A) Η μόλυνση με τη *Wolbachia* προκαλεί υψηλό κόστος στην αρμοστικότητα της μύγας της Μεσογείου.

1. Μειώνει την επιβίωση των ανηλίκων μόνο στη μία φυλή, (Μπενάκειο).
2. Μειώνει τη διάρκεια ανάπτυξης των ανηλίκων και στις δύο φυλές, (Μπενάκειο και Vienna GSS).
3. Μειώνει τη διάρκεια ζωής με σημαντική επίδραση στα αρσενικά.
4. Διαφορετικές φυλές αντιδρούν διαφορετικά στη μόλυνση με τη *Wolbachia*
5. Μειώνει την ωοπαραγωγή των θηλυκών.

(B) Διαφορετικά στελέχη *Wolbachia* προκαλούν διαφορετική επίδραση.

Όσον αφορά την επίδραση του στελέχους *wCer2 Wolbachia* σε δύο διαφορετικές φυλές της μύγας της Μεσογείου, φαίνεται ότι η φυλή Μπενάκειο (μολυσμένη ή μη μολυσμένη με *Wolbachia*), εμφανίζεται πιο σταθερή από τη φυλή Vienna GSS, υπό τις πειραματικές συνθήκες του εργαστηρίου μας. Η Vienna GSS εμπεριέχει δύο μεταλλάξεις (το θερμοκρασιακό θανατηφόρο γονίδιο και το λευκό χρωματισμό των νυμφών), επιθυμητά χαρακτηριστικά για την αξιοποίηση της σε προγράμματα στείρωμένων εντόμων SIT. Παρόλο που η μόλυνση με τη *Wolbachia* μείωσε τη διάρκεια επιβίωσης των ανηλίκων (αρσενικών) στη φυλή Μπενάκειο, αύξησε σημαντικά την επιβίωση των ενηλίκων (αρσενικών) στη φυλή Vienna GSS. Και στις δύο φυλές υπήρξε μείωση των περιόδων ανάπτυξης των ανηλίκων (αυγό-προνύμφη-νύμφη), με συνέπεια την επιτάχυνση της ανάπτυξης του σταδίου της νύμφης σε 2 – 2,5 ημέρες. Όσον αφορά τα ενήλικα, οι δύο φυλές αντέδρασαν διαφορετικά στη μόλυνση με *Wolbachia*, με σημαντική μείωση της διάρκειας ζωής (20 και 50% στη φυλή Μπενάκειο και Vienna GSS αντίστοιχα), καθώς και της ωοπαραγωγής και για τις δύο φυλές. Παρόλα αυτά, φαίνεται ότι τα ενήλικα αρσενικά της Vienna GSS ήταν μακροβιότερα του Μπενάκειου, τα οποία

είχαν σημαντική μείωση στο 47%. Σε παρόμοια συμπεράσματα, της αρνητικής επίδρασης της *Wolbachia* στην αρμοστικότητα των εντόμων, κατέληξαν ο Dean (2006) και ο Carrington et al. (2010). Ο Weeks et al. (2007) έχουν αναφέρει τις αρνητικές επιδράσεις της *Wolbachia* στην *Drosophila simulans*.

Κατά την επίδραση διαφορετικών στελεχών *wCer2* και *wCer4* *Wolbachia* σε μία φυλή της μύγας της Μεσογείου, φαίνεται ότι και τα δύο στελέχη μείωσαν τη διάρκεια επιβίωσης των ανηλικών σταδίων. Παρόλα αυτά υπήρχαν διαφορές στη θνησιμότητα των ανηλικών με το στέλεχος *wCer4* να δίνει την υψηλότερη θνησιμότητα (50%) σε σχέση με το *wCer2* (33%). Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα σχετικά με την μακροβιότητα των ενηλικών και την ωοπαραγωγή των θηλυκών, με το στέλεχος *wCer4* να επιδρά περισσότερο. Ανεξάρτητα από το στέλεχος της *Wolbachia* και το γενότυπο της μύγας της Μεσογείου, η ωοπαραγωγή περιορίζεται σημαντικά υπό την επίδραση του ενδοσυμβιωτικού βακτηρίου. Σε παρόμοια συμπεράσματα της επίδρασης της *Wolbachia* στην ωοπαραγωγή των θηλυκών κατέληξαν το 2002 ο Perrot-Minot et al. Οι Zabalou και συνεργάτες (2004), ανέφεραν υψηλή εμβρυική θνησιμότητα σε συζεύξεις μεταξύ μολυσμένων αρσενικών με μη μολυσμένα θηλυκά της φυλής Vienna GSS ή Vienna 8. Η *Wolbachia* προκάλεσε CI και οι παραπάνω συζεύξεις οδήγησαν σε 100 % θνησιμότητα των αυγών και για τα δύο στελέχη *wCer2* και *wCer4*.

Οι μελέτη των αλληλεπιδράσεων διαφορετικών γενοτύπων της μύγας της Μεσογείου μολυσμένων με διαφορετικά στελέχη *Wolbachia*, έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για περαιτέρω έρευνα και αξιοποίηση των αποτελεσμάτων σε επίπεδο αντιμετώπισης του εντόμου. Βασιζόμενοι στα παραπάνω συμπεράσματα του πειράματος, παρακάτω δίνονται ορισμένες προτεινόμενες πρακτικές εφαρμογές αξιοποίησής τους:

(1) Η επιτυχημένη εφαρμογή της ITT μεθόδου, απαιτεί εκτός των άλλων την μαζική εκτροφή των διαφορετικών μολυσμένων (φυλών) της μύγας της Μεσογείου με το βακτήριο της *Wolbachia* στο εργαστήριο και κυρίως της τροποποιημένης φυλής Vienna GSS ή Vienna 8 (Zabalou et al. 2009). Σκοπός είναι, τα παραγόμενα έντομα να επιβιώνουν για κάποιο εύλογο χρονικό διάστημα, να συζευγνύονται, ώστε να εκφράζεται στους απογόνους το κυταροπλασματικό

ασυμβίβαστο προκαλούμενο από τη *Wolbachia*. Προς αυτή τη κατεύθυνση απαραίτητη είναι η εκτροφή της μολυσμένης με *Wolbachia* μύγας της Μεσογείου στο εργαστήριο, η μελέτη και άλλων χαρακτηριστικών του εντόμου όπως η αρμοστικότητα, η σεξουαλική συμπεριφορά, η διασπορά του εντόμου στον αγρό, ώστε να έχουμε μία πλήρη εικόνα της επίδρασης της *Wolbachia*.

(2) Η μύγα της Μεσογείου μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως οργανισμός πρότυπο για την κατανόηση των επιδράσεων της *Wolbachia* στη βιολογία των ξενιστών της.

(3) Φαίνεται ότι η μόλυνση διαφορετικών φυλών της μύγας της Μεσογείου με τη *Wolbachia*, μπορεί να αξιοποιηθεί στην ανάπτυξη θεωρητικών προτάσεων και στην αξιολόγηση νέων στρατηγικών ελέγχου, (συνδυασμός με την IIT) για την βιολογική αντιμετώπιση των προσβολών από το έντομο.

Περαιτέρω μελέτες και από άλλες επιστημονικές περιοχές, (ανάπτυξη της βιολογίας του *C.capitata*), όσον αφορά την κατανόηση των παραπάνω επιδράσεων των στελεχών της *Wolbachia* και σε άλλες φυλές της μύγας της Μεσογείου, καθώς και περιγραφή επιπρόσθετων επιδράσεων και καινούργιων τύπων αναπαραγωγικών χειρισμών, απαιτούνται για την ολοκληρωμένη μελέτη των επιδράσεων του βακτηρίου.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Βενέτη Ζωή (2003)**, Κυτταροπλασματική Ασυμβατότητα, Συγκριτική μελέτη στελεχών *Wolbachia* στη *Drosophila*. Διδακτορική Διατριβή Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- Διαμαντίδης Δ. Α. (2009)**, Μελέτη της βιοποικιλότητας και της συμπεριφοράς διαφορετικών πληθυσμών της μύγας της Μεσογείου *Ceratitis capitata* (Diptera : Tephritidae). Διδακτορική Διατριβή Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Μαυρικάκης, Π., Α. Π. Οικονομόπουλος, και J. Carey. 1997.** Διαχείριση της μύγας Μεσογείου στην περιοχή Ηρακλείου Κρήτης. Περιλήψεις Ανακοινώσεων, 7<sup>ου</sup> Πανελληνίου Εντομολογικού Συνεδρίου, (Καβάλα, 21-24 Οκτωβρίου 1997).
- Παπαδόπουλος Ν. (1999)**, Μελέτη της Βιολογίας και της Οικολογίας της μύγας της Μεσογείου *Ceratitis capitata* (Diptera : Tephritidae) στη Βόρεια Ελλάδα. Διδακτορική Διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- Παπαδόπουλος Ν. Θ. & Κατσόγιαννος Β.Ι (2001)**, Παρασιτισμός προνυμφών της μύγας της Μεσογείου από το *Aganaspis daci* (Hymenoptera : Eucoilidae) στην Χίο και πρώτα στοιχεία της βιολογίας και εκτροφής του παρασιτοειδούς στο εργαστήριο, Πρακτικά Ζ Πανελληνίου Εντομολογικού Συνεδρίου, Γιάννενα 13-16 Νοεμβρίου.
- Παππός Σάββας (2004)**, Το WSTY στέλεχος του βακτηρίου *Wolbachia* και οι σχέσεις του με του ξενιστές του. Πτυχιακή Διατριβή, ΤΕΙ Κρήτης.
- Τριγώνης Εμμανουήλ (2006)**, Μεταφορά του male-killing στελέχους του βακτηρίου *Wolbachia* στη *Drosophila simulans* με σκοπό την πιθανή χρήση του στην βιολογική καταπολέμηση επιβλαβών εντόμων. Πτυχιακή Εργασία, ΑΤΕΙ Κρήτης.
- Κατερίνης Σ.Ε. & Ζαρταλούδης Ζ.Δ. (2003)**, Έντομα Εσπεριδοειδών, Φυτοπροστασία & Θρέψη, Εκδόσεις Γεωργική Τεχνολογία, Θεσσαλονίκη, No 2 / 6-9: 101-106.
- Τζανακάκης Μ.Ε. (1995)**, Εντομολογία. University Studio Press, Θεσσαλονίκη.
- Τζανακάκης Μ.Ε. & Κατσόγιαννος Β.Ι. (2003)**, Έντομα Καρποφόρων Δέντρων και Αμπέλου, Εκδόσεις Αγρότυπος, Αθήνα.

- Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης & Τροφίμων (2010)**, Δ/ση Προστασίας Φυτικής Παραγωγής, Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα και Βιοκτόνα.
- Anonymous (1997)**, FAO/IAEA Experts Meeting, STI/PUB/1020, IAEA Vienna.
- Anonymous (2005)**, Cleanfruit Seminar, Area Wide Control of Mediterranean Fruit Fly Using the Sterile Insect Technique (SIT), Experience, Planning and Implementation, Athens – Greece.
- Anton de Bary (1879)**, The Phenomenon of Symbiosis, Strasbourg: Karl J. Trubner.
- Arakaki, N., T. Miyoshi, and H. Noda. (2001).** *Wolbachia*-mediated parthenogenesis in the predatory thrips *Franklinothrips vespiformis* (Thysanoptera: Insecta), Proc R Soc B 268: 1011-6.
- Areerate T.R., Kyttayapong P., Baimai V. & O'Neill S.L. (2003)**, Molecular Phylogeny of *Wolbachia* Endosymbionts in Southeast Asian Mosquitoes (Diptera: Culicidae) Based on *wsp* Gene Sequences, J.Med.Entomol. 40: 1-5.
- Baumann P, NA Moran & L Baumann (1997)**, The evolution and genetics of aphid endosymbionts, BioScience. 47:12-20.
- Boller E.F. & Prokopy R.J. (1976)**, Bionomics and Management of Rhagoletis Annual Review of Entomology, Vol. 21: 223-246.
- Bonnemaison L. (1969)**, Οι ζωικοί εχθροί των καλλιεργειών φυτών & δασών, Θεσσαλονίκη, 3<sup>ος</sup> τόμος, 68-76.
- Bordenstein, S. R., F. P. O'Hara, and J. H. Werren. (2001)**, *Wolbachia*-induced incompatibility precedes other hybrid incompatibilities in *Nasonia*. Nature 409: 707-10.
- Bourtzis, K., A. Nirgianaki, G. Markakis, and C. Savakis. (1996)**, *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* species. *Genetics* 144: 1063-73.
- Bourtzis K., & Miller T.A. (2003)**, Insect Symbiosis, CRC Press, Florida USA, vol2, chapter 14 : 226-237.
- K. Bourtzis, H.R. Braig and T.L. (2003).** Cytoplasmic Incompatibility. In: K. Bourtzis, T. Miller, eds. Insect Symbiosis. CRC Press, Florida, USA chapter 13: 217-246.

- Bourtzis K., & Miller T.A. (2006)**, Insect Symbiosis vol 2, CRC Press, Florida USA,chapter 10 : 176-288.
- Bourtzis, K., A. Nirgianaki, P. Onyango and C. Savvakis (1994)**, A prokaryotic *dnaA* sequence in *Drosophila melanogaster*: *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility among laboratory strains, *Insect Mol Biol* 3: 131-142.
- Boyle, L., S. L. O'Neill, H. M. Robertson, and T. L. Karr., (1993)**, Interspecific and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila*. *Science* 260: 1796-9.
- Buchner P. (1965)**, Endosymbiosis of animals with plant microorganisms, John Wiley & Sons, New York.
- Caceres C., Mc Innis., Shelly T., Jang E., Robinson A., & Hendichs J. (2007)**, Quality Management Systems For Fruit Fly (Diptera : Tephritidae) Sterile Insect Technique, *Florida Entomologist* 90 (1): 2-6.
- Charlat S., Davies N., Roderick G.K. & Hurst G. D.D (2006)**, Disrupting the timing of *Wolbachia*-induced male-killing, *Biol Lett.*, 3 (2): 154–156.
- Coscocrato V.E, Braz A.S, perondini A.L.P, Selivon D. & marino C.L. (2009)**, *Wolbachia* in *Anastrepha* Fruit Flies (Diptera : Tephritidae), Sao Paulo Brazil, Springer Science + Business Media, LLC.
- De Meyer M. (2000)**, Phylogeny of the genus *Ceratitidis* (Dacinae : Ceratitidini) in Fruit flies (Tephritidae) : Phylogeny and evolution of behavior, CRP Press, Boca Raton, Florida. (eds M. Aluja & A.L. Norrbon): 409-428.
- Douglas P.Z. (1994)**, Prioritizing Symbiosis to Sustain Biodiversity: Are Symbionts Keystone Species? Vol.4, Springer Netherlands: 3-12.
- Fletcher B.S. (1989)**, Life history strategies of Tephritidae fruit flies. In *Fruit Flies: Their biology, Natural Enemies and Control* (eds A.S.Robinson & G.Hooper), Vol. A : 195-208, Elsevier, Amsterdam.
- Ghelelovitch, S. (1952)**, Sur la determinisme genetique de la sterilité dans le croisement entre différentes souches de *Culex autogenicus* Roubaud. *C. R. Acad. Sci. Paris* 24: 2386-88.
- González J. and Troncoso P. (2007)**, The Fruit Fly Programme In Chile, *Biochemical Life Science*, Springer Netherlands:641-651.

- Graf J. (2003)**, The Nutritional Symbiosis of Buchnera and Aphids, University of California, Davis.
- Hertig, M. (1936)**, The Rickettsia, *Wolbachia pipiensis* (Gen. et sp. n.) and associated inclusions of the mosquito, *Culex pipiens*. Parasitology 28: 453-486.
- Hertig, M., and S. B. Wolbach. (1924)**, Studies on rickettsia-like microorganisms in insects. J. Med. Res. 44.
- Hoerauf A, Mand S, Fischer K, et al. (2003)**, "Doxycycline as a novel strategy against bancroftian filariasis-depletion of *Wolbachia* endosymbionts from *Wuchereria bancrofti* and stop of microfilaria production". Med. Microbiol. Immunol. 192 (4): 211-6.
- Hurst, L. D. (1993)**, The incidences, mechanisms and evolution of cytoplasmic sex ratio distorters in animals. Biol. Rev. 68: 121-98.
- Katsogiannos B.I, Papadopoulos N.T, Heth R.R, Hendrichs J. & Koulousis N.A, (1999)**, Evaluation of synthetic food-based attractants for female Mediterranean fruit flies (Dipt., Tephritidae) in Mc Phail type traps, J.Appl.Ent. 123: 607-612.
- Kageyama D., Nishimura G., Hoshizaki S. & Ishikawa Y. (2002)**, Feminization *Wolbachia* in an insect *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera : Grambidae), Tokyo, Japan.
- Keim B. (2007)**, Entire genome of one species Discovered Inside Another's, Wired Science.com.
- Kikuchi Y. (2009)**, Endosymbiotic Bacteria in Insects : Their Diversity and Culturability Microbes, Tsukuba, Japan, Environ.Vol 24, No 3 : 195-204.
- Khattak S. U., Khan, A. U. Sattar, A. Zeb, A. Farid, A. Salihah, Z. (2005)**, Area-wide Control of Fruit Fly Using Male Annihilation Technique in NWF Province of Pakistan, FAO/IAEA international conference on area-wide control of insect pests: Integrating the sterile insect and related nuclear and other techniques Vienna (Austria).
- Knight J. (2001)**, Meet the Herod bug, Nature 412: 12-4.
- Knipling, (1955)**, Sterile Insect and Parasite Augmentation Techniques: Unexploited Solutions for Many Insect Pest Problems, Florida Entomologist 81 (1).

- Laven H. (1951)**, Crossing experiments with *Culex* strains, Hem burg Germany, Evolution vol. 5, No. 4 : 370-375
- Laven H. (1959)**, Speciation by cytoplasmic isolation in the *Culex pipiens* complex. London, Cold Spring Harbor Symp, Quant. Biol. 24:166-73.
- Liebholt .M, Work T.T, McCullough D.G & Cavey J.F (2006)**, Airline Baggage as a Pathway for Alien Insect Species Invading the United States, American Entomologist, 52: 48-54.
- Liedo P., Salgado S., Oropeza A. & Toledo J., (2007)**, Improving Mating Performance of Mass – Reared Sterile Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae), thru Changes In Adult Holding Condition : Demography and Mating Competitiveness, Tsiapas Mexiko, Florida Entomologist 90(1):33-40.
- Lincoln S. Rocha, Rodrigo O. Mascarenhas, André L.P. Perondini & Denise Selivon (2005)**, Occurrence of *Wolbachia* in Brazilian samples of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), Sao Paulo, Neotrop. Entomol. 34 (6): 1013-15.
- Louis C. & L. Nigro. (1989)**, Ultrastructural evidence of *Wolbachia* Rickettsiales in *Drosophila simulans* and their relationships with unidirectional cross-incompatibility. Journal of Invertebrate Pathology 54: 39-44.
- Legrand J. J., E. Legrand-Hamelin, & P. Juchault. (1987)**, Sex determination in Crustacea. Biol. Rev. 62: 439-70.
- Min K. T., and S. Benzer (1997)**, *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 10792-6.
- Mitchell W.C. & Saul S.H. (1990)**, Current control methods for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, and their application in the USA. Review of Agriculture Entomology, 78: 923-940.
- Nogge, G. (1981)**, Significance of symbionts for the maintenance of an optimal nutritional state for successful reproduction in haematophagous arthropods. Parasitology 82: 101-104.
- Panhwar F. (2005)**, Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) attack on fruit and its control in Sindh Pakistan, Digitalverlag GmbH, Germany : 1-11.

- Papadopoulos N. (2004)**, Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). In Encyclopedia of Entomology, Kluwer Academic Press, (ed J. Caminera), Vol.2: 1367-1370.
- Papadopoulos N.T., Carey J.R., Katsoyannos B.I., & Kouloussis N.A., (1996)**, Overwintering of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in northern Greece. Annals of the Entomological Society of America, 89:526-534.
- Papadopoulos N.T., Katsoyannos B.I., Carey J.R., & Kouloussis N.A., (2001)**, Seasonal and annual occurrence of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in northern Greece. Annals of the Entomological Society of America, 94: 41-50.
- Permalloo S., Seewooruthun S., Sookar P., Alleck M. and Gungah B. (2006)**, Area-wide Fruit Fly Control in Mauritius, 7<sup>th</sup> International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, Salvador, Brazil.
- M.J. Perrot-Minnot B.Cheval, A.Migeon, M. Navajas (2002)**, Contrasting effects of *Wolbachia* on cytoplasmic incompatibility and fecundity in the haplodiploid mite *Tetranychus urticae*, France, Journal of Evolution Biology 15 (5): 808-17.
- Quesada-Moraga, E.; Ruiz-García, A.; Santiago-Álvarez, C. (2006)**, Laboratory Evaluation of Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* Against Puparia and Adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), Journal of Ecology Entomology, 99: 1955-1966.
- Rasgon J. L., Styer L.M. & Scott T.W. (2003)**, Wolbachia – Induced Mortality as a Mechanism to Modulate Pathogen Transmission by Vector Arthropods, J.Med. Entomol. 40: 125-132.
- Robinson A. S., G. Franz, & K. Fisher, (1999)**, Genetic sexing strains in the medfly, *Ceratitis capitata* development, mass rearing and field application. Trends Entomol. 2: 81–104.
- Rocha L.S., Mascarenhas R.O., Perondini A.L.P, Selivon D. (2005)**, Occurrence of *Wolbachia* in Brazilian samples of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera : Tephritidae), Sao Paulo Brazil, Neotrop. Entomol. vol.34.(6) : 1013-15.
- Ros V.I.D, Fleming V.M, Feil E.J & Breeuwer A.J. (2008)**, How Diverse Is the Genus *Wolbachia*? Multiple-Gene Sequencing Reveals a Putatively New

*Wolbachia* Supergroup Recovered from Spider Mites (Acari: Tetranychidae), Amsterdam, The Netherlands Organ. For Scientific Research: 03-25.

**Sabater B., R. C.H.J. van Ham, Martínez-Torres D., Silva F., Latorre A., & Moya A. (2001)**, Molecular Evolution Of Aphids and their Primary (*Buchnera* sp.) and Secondary Endosymbionts : Implications for the role of symbiosis in insect evolution, Caracas, Interciencia 26(10):508.

**Sinkins S.P. & Gould F. (2006)**, *Wolbachia* and CI, Natural Reviews Genetics 7: 427-435.

**Sookar P., Permalloo S., Alleck M. & Seewooruthun S.I (2006)**, Development of improved attractants and their integration into fruit fly management programmes, 7th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance 10-15 September 2006, Salvador, Brazil: 71-79.

**Stouthamer, R. and D. J. Kazmer. (1994)**, Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. Heredity 73: 317-327.

**Stouthamer, R., J. A. Breeuwer, and G. D. Hurst. (1999)**, *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. Annu Rev Microbiol 53: 71-102.

**Stouthamer R., Luck R.F. Hamilton W.D. (1990)**, Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera : Trichogrammatidae) to revert to sex, Proc.Natl. Acad.Sci. USA 87:2424-27.

**Subbarao S.K. (1982)**, Cytoplasmic incompatibility in mosquitoes. In *Recent developments in the genetics of insect disease vectors*, pp. 313-342. Edited by W. W. M. Steiner, W. J. Tabachnick, K. S. Rai & S. Narang, Champaign,IL: Stipes.

**Tram U, Fredrick K, Werren JH, Sullivan W. (2006)**, Paternal chromosome segregation during the first mitotic division determines *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility phenotype. J Cell Sci. 119: 3655-63.

**Tsai K.H., Lien J.C., Huang C.G., Wu W.J. & Chen W.J. (2004)**, Molecular (Sub) Grouping of Endosymbiont *Wolbachia* Infection Among Mosquitos of Taiwan, J.Med.Entomol. 41(4) : 677-683.

**Uziel A., Levy K., & Yuval B. (2003)**, Infection of *Ceratitis capitata* by two species of the *Entomophthora muscae* species complex (Zygomycetes : Entomophthorales) in the field, *Phytoparasitica*, 31: 204-206.

**Vargas R.I, Peck S.L., McQuate G.T. Jackson C.G., Stark J.D., & Armstrong J.W. (2001)**, Potential of areawide intergrated management of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) with a braconid parasitoid and a novel bait spray, *Journal of Economic Entomology*, 94: 817-825.

**Vreysen M.J.B., Robinson A.S., & Hendrichs J., (2007)**, *Area-Wide Control of Insects Pests*. Springer, Doedrecht, The Netherlands.

**Wadjinny J. & Bounfour M., (2005)**, Management of the Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* (Wied.) in the Gharb Area in Morocco, Book of extended synopses of FAO/IAEA International Conference on Area-Wide Control of Insect Pest, Vienna (Austria): 386.

**Weeks A.R, Breeuwer J.A.J. (2001)**, *Wolbachia*-induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites. Amsterdam, *Proc Biol Sci*. 268(1482): 2245–2251.

**A.R. Weeks, M. Turelli, W. R. Harcombe, K. T. Reynolds, A. A. Hoffmann (2007)**, From Parasite to Mutualist: Rapid Evolution of *Wolbachia* in Natural Populations of *Drosophila*, Melbourne Australia, *PloS Biology* 5(5): 114.

**Weems H.V, Jr., J.B. Heppner & Gary J. Steck, (2001)**, Mexican Fruit Fly, *Anastrepha ludens* (Loew) (Insecta: Diptera: Tephritidae), Florida, *DPI Entomology Circulars* 16: 260 & 391.

---

**Welburn, S.C., Maudlin, I., and Ellis, D.S. (1987)**, In vitro cultivation of rickettsia-like organisms from *Glossina* spp. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 81: 331-335.

**Werren, JH (1997)**, Biology of *Wolbachia*. *Annu. Rev. Entomol.* 42: 587- 609.

**White I.M. & Elson –Harris M.M.(1992)**, *Fruit Flies of Economic Significance, Their Identification and Bionomics* C.A.B. INTERNATIONAL, Wallingford, England, UK.

**Xi, Zhiyong; Dean, Jeffry L.; Khoo, Cynthia; Dobson, Stephen. L. (2005)**, "Generation of a novel *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus* (Asian tiger mosquito) via embryonic microinjection". *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35 (8): 903–910.



**Yen, J. H., and A. R. Barr. (1971)**, New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. Nature 232: 657-658.

**Yoshitomo K., (2009)**, Endosymbiotic Bacteria in Insects: Their Diversity and Culturability, Microbes and Environments, Vol 24, No3: 195-204.

**Zabalou S., Apostolaki A., Livadaras I., , G. Franz , A. S. Robinson , C. Savakis & K. Bourtzis, (2009)**, Incompatible insect technique: incompatible males from a *Ceratitis capitata* 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, Athens, The National Academy of Sciences 101 (42) : 15042-45.

**Zimmer C. (2001)**, *Wolbachia*. A tale of sex and survival, Science 292 : 1093-1095.

<http://aramel.free.fr/INSECTES15-6.shtml>

[www.ars.usda.gov/.../dshoemaker\\_research04.jpg](http://www.ars.usda.gov/.../dshoemaker_research04.jpg)

[University of Florida, Photograph by: Division of Plant Industry](#)

[University of Florida Photograph by: USDA](#)

[www.nature.com/.../v7/n6/images/nrg1870-i2.jpg](http://www.nature.com/.../v7/n6/images/nrg1870-i2.jpg)

[www.minagric.gr](http://www.minagric.gr)

[http://www.eppo.org/QUARANTINE/insects/Ceratitis capitata/CERTCA map.htm](http://www.eppo.org/QUARANTINE/insects/Ceratitis_capitata/CERTCA_map.htm)

<http://www.nature.com/news/1998/020923/full/news020923-11.html>

