



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Επίδραση της μόλυνσης από το βακτήριο *Wolbachia* και της έκθεσης σε αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού στην ανταγωνιστικότητα σύζευξης αρσενικών της μύγας της Μεσογείου, που τρέφονται με ζάχαρη.**

Επιβλέπων καθηγητής: Παπαδόπουλος Νικόλαος

Κουμιωτάκη Αναστασία

Βόλος 2019

Επίδραση της μόλυνσης από το βακτήριο *Wolbachia* και της έκθεσης σε αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού στην ανταγωνιστικότητα σύζευξης αρσενικών της μύγας της Μεσογείου, που τρέφονται με ζάχαρη.

Κουμιωτάκη Αναστασία

### **Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή**

Νικόλαος Παπαδόπουλος, Καθηγητής (Επιβλέπων)

Χρήστος Αθανασίου, Καθηγητής (Μέλος)

Χρήστος Νάκας, Αναπληρωτής καθηγητής (Μέλος)

## **Ευχαριστίες**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον καθηγητή μου κ. Νικόλαο Παπαδόπουλο, καθώς και τον διδάκτορα κ. Χαραλάμπη Ιωάννου για την πολύτιμη καθοδήγηση τους κατά την διάρκεια των πειράματων, της συγγραφής και της διόρθωσης της πτυχιακής μου διατριβής. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και την αγαπημένη μου φίλη Κασσιανή Μουρατίδου για τη στήριξή τους.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα πειράματα της παρούσας πτυχιακής διατριβής, πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από τον Οκτώβριο του 2016 έως και τον Δεκέμβριο του 2017. Οι συνθήκες του εργαστηρίου κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν 14 ώρες φωτός και 10 ώρες σκότους, με σχετική υγρασία  $65\% \pm 5\%$  και θερμοκρασία  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Σκοπός της εργασίας ήταν να μελετηθεί η επίδραση του ενδοκυτταρικού βακτηρίου *Wolbachia pipientis* και η έκθεση των αρσενικών της μύγας της Μεσογείου σε αιθέρια έλαια πορτοκαλιού στην σεξουαλική ανταγωνιστικότητα των αρσενικών σε τρεις διαφορετικές φυλές του εντόμου. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν η φυλή 88:6 (μολυσμένη από το στέλεχος wCer2 του βακτηρίου *Wolbachia*), η S10.3 (μολυσμένη από το στέλεχος wCer4) και η Μπενάκειο (μη μολυσμένη εργαστηριακή φυλή). Κατά τη διάρκεια του πρώτου κύκλου πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν αρσενικά και θηλυκά από την S10.3, την 88:6 και την Μπενάκειο αντίστοιχα. Αντίθετα στον δεύτερο κύκλο πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν για τα αρσενικά οι φυλές 88:6, S10.3 και Μπενάκειο, ενώ τα θηλυκά που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από φυσικό πληθυσμό που εγκαταστάθηκε πρόσφατα στο εργαστήριο. Οι διαδικασίες που ακολουθήθηκαν από την αρχή μέχρι και την τελευταία ημέρα του πειράματος αφορούσαν την εκτροφή των αρσενικών και των θηλυκών, τον διαχωρισμό των δύο φύλων, το μαρκάρισμα των αρσενικών στο θώρακα με διαφορετικό χρώμα (μάρτυρας ή εκτεθειμένο σε έλαιο), την έκθεση των αρσενικών σε αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού και την καταγραφή των απαραίτητων δεδομένων την τελευταία ημέρα του πειράματος. Για τις συζεύξεις που προέκυπταν σε κάθε πειραματικό κύκλο σημειώθηκαν με ακρίβεια τα παρακάτω στοιχεία: η ώρα εισαγωγής των δύο αρσενικών (εκτεθειμένου και μάρτυρα) στα ατομικά κλουβιά, η χρονική στιγμή που ξεκίνησε και τελείωσε η σύζευξη, καθώς και το αρσενικό που επιλέχθηκε για σύζευξη από το θηλυκό, δηλαδή ο μάρτυρας ή το εκτεθειμένο σε αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού. Τα αποτελέσματα του πρώτου κύκλου πειραμάτων διέφεραν σημαντικά από τον δεύτερο κύκλο. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι τα ποσοστά συζεύξεων των αρσενικών των εργαστηριακών φυλών που συζεύχθηκαν με τα αντίστοιχα θηλυκά ήταν πολύ μεγαλύτερα σε σχέση με τον δεύτερο κύκλο πειραμάτων, που χρησιμοποιήθηκαν θηλυκά που προέρχονταν από

φυσικό πληθυσμό. Η έκθεση σε αιθέρια έλαια φαίνεται να αύξησε σημαντικά την σεξουαλική ανταγωνιστικότητα των αρσενικών της φυλής S10.3 προς τα θηλυκά της αντίστοιχης φυλής και των αρσενικών της φυλής Μπενάκειο, έναντι των θηλυκών του φυσικού πληθυσμού. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η συμπεριφορά των άγριων θηλυκών, τα οποία τείνουν να ζευγαρώνουν περισσότερο με τα αρσενικά της S10.3 σε σχέση με αυτά της 88.6.

## SUMMARY

The experiments of this thesis were carried out at the Laboratory of Entomology and Agricultural Zoology of the University of Thessaly from October 2016 to January 2017. The laboratory conditions during the experiments were 14 hours light and 10 hours dark, relative humidity  $65\% \pm 5\%$  and temperature  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . The aim of this study was the effect of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis* and the exposure of Mediterranean fruit fly males to sweet orange essential oils on the sexual competitiveness of males in three different strains. Specifically, the strains that we used were 88: 6 (infected with *Wolbachia* strain wCer2), S10.3 (infected with wCer4 strain of *Wolbachia*) and Benakeio. During the first round of experiments, males and females from the same strains were used, namely S10.3, 88:6 and Benakeio. In contrast to the second cycle of experiments, the strains were 88:6, S10.3 and Benakeio for the males and the females that we used were wild. The procedures, from the first until the last day of the experiment concerned the rearing of males and females, the separation of the sexes, the marking of the males in their thorax, their exposure to the sweet essential oil and the monitoring of mating during the last day of the experiment. For the matings that occurred in each experimental cycle, we accurately noted the following data: the time of insertion of the male that exposed to the sweet essential oil and the no-exposed male, into the individual cages, the time that the mating began and ended and the male that the female choose, especially the non-exposed or the exposed male to the sweet orange essential oil. Significant differences were found regarding the total mating rates between the first and second set of experiments. Specifically, females of the laboratory strains were mated at higher rates than wilds. Male exposure to the odor of orange essential oil significantly increased their mating competitiveness in the case of S10.3 strain for the respective females. Increased mating competitiveness was also found for Benakio males for wild females. Is very interesting the fact that the wild female tend to mate more with S10.3 males than with 88.6 males.













## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	iii
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	iv
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Συστηματική κατάταξη-Γεωγραφική εξάπλωση.....	3
1.2 Σημασία Ξενιστές.....	4
1.3 Μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	4
1.4 Βιολογία.....	6
1.5 Σεξουαλική συμπεριφορά.....	7
1.6 Επίδραση των αιθέριων ελαίων στη σεξουαλική συμπεριφορά της μύγας της Μεσογείου.....	8
1.7 Αντιμετώπιση.....	10
1.8 Επίδραση της τροφής στη σεξουαλική συμπεριφορά της μύγας της Μεσογείου.....	14
1.9 Το ενδοκυτταρικό βακτήριο <i>Wolbachia ripientis</i> .....	15
1.9.1 Γενικά στοιχεία.....	15
1.9.2 Μηχανισμοί διάδοσης.....	16
1.9.3 <i>Wolbachia</i> και Μύγα Μεσογείου.....	17
1.10 Επίδραση αιθέριων ελαίων εσπεριδοειδών στη συμπεριφορά της μύγας της Μεσογείου.....	18
1.11 Σκοπός της εργασίας.....	20
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	21
2.1 Συνθήκες εργαστηρίου και μέθοδος εκτροφής των εντόμων.....	21
2.2 Επίδραση των αιθέριων ελαίων του πορτοκαλιού στην ανταγωνιστικότητα σύζευξης των αρσενικών των εργαστηριακών φυλών προς θηλυκά της αντίστοιχης φυλής.....	23
2.3 Επίδραση των αιθέριων ελαίων του πορτοκαλιού στην ανταγωνιστικότητα σύζευξης των αρσενικών των εργαστηριακών φυλών προς άγρια θηλυκά.....	26

2.4 Στατιστική ανάλυση.....	26
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	27
3.1 Επίδραση των αιθέριων ελαίων του πορτοκαλιού στην ανταγωνιστικότητα σύζευξης των αρσενικών των εργαστηριακών φυλών για θηλυκά της αντίστοιχης φυλής.....	27
3.2 Επίδραση των αιθέριων ελαίων του πορτοκαλιού στην ανταγωνιστικότητα σύζευξης των αρσενικών των εργαστηριακών φυλών προς τα άγρια θηλυκά.....	30
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	32
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	37

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Συστηματική κατάταξη-Γεωγραφική εξάπλωση

Αρκετές μύγες των φρούτων του γένους *Ceratitis*, αποτελούν εχθρούς για ένα μεγάλο φάσμα ξενιστών (De Mayer 2000). Συγκεκριμένα η μύγα της Μεσογείου, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), είναι το πιο γνωστό από τα 65 είδη του γένους *Ceratitis* (Papadopoulos 2008). Ανήκει στην τάξη των δίπτερων, στην οικογένεια Tephritidae στο άθροισμα Ceratibini (De Mayer 2000). Ως το πιθανότερο μέρος προέλευσης του είδους αναφέρεται η Ανατολική Αφρική και συγκεκριμένα η Κένυα, εξαιτίας της μεγάλης γενετικής παραλλακτικότητας του είδους εκεί (Bonizzoni et al. 2000, Papadopoulos 2014). Η μεταφορά του *C. capitata* στη Μεσόγειο σύμφωνα με τις μέχρι τώρα πληροφορίες έγινε μέσω της κοιλάδας του Νείλου ή της δυτικής ακτής της Αφρικής (De Breme 1842, Malacrida et al. 2007, Papadopoulos 2014). Η μύγα της Μεσογείου είναι κοινό είδος στην περιοχή της Μεσογείου ενώ η παρουσία του εκεί χρονολογείται από τις αρχές του 19ου αιώνα (De Breme 1842, Παπαδόπουλος 2012). Στη Ελλάδα το *C. capitata* καταγράφηκε πρώτη φορά το έτος 1915 στην Αττική και στην Πελοπόννησο (Παπαγεωργίου 1915, Μουρίκης 1965, Παπαδόπουλος 2012), ενώ το έτος 1959 αναφέρθηκε για πρώτη φορά σε ψυχρότερα τμήματα της χώρας (Μακεδονία) (Τζίμος 1961, Παπαδόπουλος 2012).

Πλέον η παρουσία του εντόμου αναφέρεται σχεδόν σε όλη την Αφρική, τη Μέση Ανατολή, τη Μεσόγειο και σε γειτονικές της χώρες, στην Δυτική Αυστραλία και στην κεντρική και νότια Αμερική, εκτός του Μεξικού όπου αναφέρετε ότι έχει εξαλειφθεί (Hendrichs et al. 1983, Παπαδόπουλος 2012). Καθώς και στα νησιά της Καραϊβικής, του Ατλαντικού, στα νησιά Χαβάη και Μαριάνα του Ειρηνικού, στη Μαδαγασκάρη και σε άλλα νησιά του Ινδικού ωκεανού (Παπαδόπουλος 2012).

## 1.2 Σημασία-Ξενιστές

Η μύγα της Μεσογείου, είναι πολυφάγο έντομο μεγάλης οικονομικής σημασίας. Οι απώλειες που μπορεί να προκαλέσει σε φρούτα και λαχανικά τοπικών καλλιεργειών μπορούν να φθάσουν σε υψηλά επίπεδα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μη εμπορεύσιμων καρπών που οδηγεί τους αγρότες πολλές φορές σε οικονομική ζημιά. Η σημασία του εντόμου συνδέεται άμεσα με τις ζημιές που προκαλεί η προνύμφη στο εσωτερικό του καρπού, καθώς επίσης και με τα νύγματα που δημιουργούνται και αποτελούν εστία μόλυνσης από μύκητες και άλλους μικροοργανισμούς προκαλώντας σήψεις. Επίσης, όταν ο καρπός αρχίζει να σαπίζει, νέα παράσιτα αρχίζουν να ωοτοκούν εκεί, όπως *Drosophila* spp και *Carpophilus* spp, επιτείνοντας έτσι την απώλεια της παραγωγής (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003).

Η ποικιλία ξενιστών που προσβάλλει, η μύγα της Μεσογείου ανέρχεται περίπου στα 350 είδη φυτών, τα οποία ανήκουν σε 67 διαφορετικές οικογένειες. Πιο συγκεκριμένα το 40 % των οικογενειών αυτών, ανήκει στις οικογένειες Myrtaceae (6%), Rosaceae (10%), Rutaceae (9%), Sapotaceae (9%) και Solanaceae (6%) (Liquidó et al. 1991, Papadopoulos 2008). Στην Ελλάδα προσβάλλει κυρίως καρπούς από πορτοκαλιές, μανταρινιές, λεμονιές, νεραντζιές, συκιές, βερικοκές, αχλαδιές και λιγότερο συχνά ροδιές και μηλιές (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003). Μπορεί να προσβάλλει και τροπικούς, υποτροπικούς καρπούς, όπως λωτό, αβοκάντο, μπανάνα, bittermelon, carambola, καφέ, guava, μάνγκο, παπάγια, πιπεριά και πολλά είδη κολοκυνθοειδών (Papadopoulos 2008).

## 1.3 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Το ενήλικο της μύγας της Μεσογείου έχει μήκος 4-6mm και πλάτος 1,2-2mm. Ο θώρακας και οι πτέρυγες είναι χρωματισμένες με μαύρες, καστανές και κίτρινες κηλίδες. Οι πτέρυγες είναι διαφανείς, με μήκος 4,5mm η καθεμία. Η κοιλιακή του επιφάνεια είναι κίτρινη, πορτοκαλί με δύο κόκκινες, καφέ εγκάρσιες ρίγες και ο ωοθέτης των θηλυκών είναι κιτρινέρυθρος, στην άκρη καστανός και μήκους 0.9-1,3mm. Η κεφαλή του είναι

κίτρινου χρώματος με μαύρες τρίχες ανάμεσα στους λαμπερούς σύνθετους οφθαλμούς ενώ οι κεραίες είναι καστανέρυθρες (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003). Οι σύνθετοι οφθαλμοί έχουν έντονο ιριδίζων μοβ προς μπλε-πρασινωπό χρώμα και καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος του κεφαλιού. Το αρσενικό μπορεί να διαχωριστεί από το θηλυκό εύκολα γιατί φέρει στο μέτωπο του δυο λεπτά, κερατοειδή αιχμηρά, γκρι-μαύρα εξαρτήματα (Paradourios 2008). Τα πόδια είναι κιτρινέρυθρα και οι οπίσθιες κνήμες έχουν κίτρινες σκληρές τρίχες. Όταν τα ενήλικα βρίσκονται σε ηρεμία ή περπατούν οι πτέρυγες είναι σχεδόν ανοιχτές με κλίση προς το οπίσθιο τμήμα του σώματος (Paradourios 2008). Το αυγό είναι λείο λευκό στενόμακρο διαστάσεων 0,9-1,1 X 0.2 mm (Εικόνα 1). Η προνύμφη του είναι ακέφαλη στενή στο πρόσθιο μέρος και σχεδόν κυλινδρική στο οπίσθιο (Εικόνα 2). Έχει χρώμα λευκοκίτρινο με διαστάσεις 7-9 X 1,5-2 mm. Η νύμφη είναι ελλειψοειδής με ανοιχτό έως και σκοτεινό καστανό χρώμα με διαστάσεις 4-4,5 X 2,5mm (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003).



Εικόνα 1. Ωά της μύγας της Μεσογείου





Εικόνα 2. Προνυμφικό στάδιο της μύγας της Μεσογείου

#### 1.4 Βιολογία

Το *C. capitata* είναι πολυκυκλικό είδος με 3 έως 7 γενεές το έτος. Ο αριθμός των γενεών εξαρτάται από τη γεωγραφική περιοχή, τις καιρικές συνθήκες, τα είδη φυτών που προσβάλλει και τους ξενιστές που βρίσκονται στο περιβάλλον που αναπτύσσεται το έντομο. Σε τροπικά και υποτροπικά κλίματα καθώς και στις νότιες ακτές της Μεσογείου το είδος αναπτύσσεται καθ' όλη τη διάρκεια του έτους με βραδύτερους αναπτυξιακούς ρυθμούς όσο η θερμοκρασία μειώνεται (Papadopoulos 2008). Στην Ελλάδα διαχειμάζει κυρίως ως προνύμφη κατά τη διάρκεια του χειμώνα μέσα στους καρπούς ή ως νύμφη στο έδαφος. Σε περιοχές που ο χειμώνας είναι ήπιος (π.χ Κρήτη), ένα μέρος του πληθυσμού μπορεί να διαχειμάζει ως ενήλικο. Τα ενήλικα εμφανίζονται την άνοιξη και τρέφονται, σπογγίζοντας με τη μυζητική προβοσκίδα τους υγρές ζαχαρούχες και αζωτούχες ουσίες. Αφού τραφούν και ωριμάσουν σεξουαλικά, συζευγνύονται (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003).

Στην συνέχεια τα θηλυκά, ηλικίας 7 έως 10 ημερών, αρχίζουν να ψάχνουν κατάλληλους ώριμους ή ημιώριμους καρπούς ώστε να ωτοκήσουν τα αυγά τους. Αφού επιλέξουν

έναν καρπό ελέγχουν την καταλληλότητα του μέσω της σκληρότητας της σάρκας, της συγκέντρωσης των σακχάρων και των φυτικών μεταβολιτών της (Díaz-Fleischer et al. 200, Lorena Suárez et al. 2018). Στη συνέχεια, δημιουργούν ένα χαρακτηριστικό νύγμα στον καρπό με τη βοήθεια του ωοθέτη και τοποθετούν εκεί 1-9 ωά. Η οπή γίνεται στο εξωκάρπιο (flavendo) και μπορεί να φτάσει έως και το μεσοκάρπιο (albendo). Η προνύμφη θα τραφεί από τους χυμούς του φρούτου και λίγο πριν ξεκινήσει η διαδικασία της νύμφωσης θα εγκαταλείψει τον καρπό δημιουργώντας μια οπή εξόδου. Θα μετακινηθεί προς το έδαφος όπου εκεί θα νυμφωθεί σε βάθος έως και 5 εκατοστά (Paradopoulos 2008).

Σύμφωνα με τον Carey (1984), όταν χρησιμοποιήθηκαν ως ξενιστές 15 διαφορετικά είδη καρπών, κάποια ωά και προνύμφες θανατώθηκαν. Οι πιθανές αιτίες ήταν η ανικανότητα των νέων προνυμφών να διεισδύσουν από το εξωκάρπιο στο εσωτερικό του καρπού (πχ στα εσπεριδοειδή), ή ο φλοιός του ξενιστή ήταν αρκετά σκληρός για τις νεαρές προνύμφες (πχ μήλα και κυδώνια) ή ο φλοιός και η σάρκα ήταν πολύ υδαρής ώστε να γίνει η εκκόλαψη των αυγών με επιτυχία (πχ σταφύλια, τομάτες). Η διάρκεια του σταδίου των αυγών βρέθηκε στις 49,2 ώρες στους 25 βαθμούς κελσίου. Το προνυμφικό στάδιο κυμάνθηκε από 1 εβδομάδα (πχ για το μάνγκο και τη τομάτα) έως και 3 εβδομάδες (πχ για το κυδώνι). Το στάδιο της νύμφης διήρκησε πάνω κάτω το ίδιο σε όλα τα φρούτα με μέσο όρο ανάπτυξης 12,37 ημέρες.

### 1.5 Σεξουαλική συμπεριφορά

Τόσο τα αρσενικά όσο και τα θηλυκά άτομα, για να ωριμάσουν σεξουαλικά θα πρέπει να τραφούν κατάλληλα. Τα θηλυκά τρέφονται με πρωτεϊνούχες και άλλες θρεπτικές ουσίες ώστε να ωριμάσουν τα ωά τους ενώ τα αρσενικά με σακχαρούχες και πρωτεϊνούχες ουσίες για να εκδηλώσουν με επιτυχία το σεξουαλικό κάλεσμα (Christenson and Foote 1960, Ιωάννου 2014). Αφού ωριμάσουν σεξουαλικά, τα θηλυκά θα συζευχθούν με ένα αρσενικό (μονογαμικά), ή με περισσότερα (ολιγογαμικά), ενώ τα αρσενικά θα συζευχθούν με πολλά θηλυκά (πολυγαμικά) (Paradopoulos et al. 2008). Ο λόγος που κάποια θηλυκά μπορεί να συζευχθούν με περισσότερα από ένα αρσενικά

οφείλεται σε περιβαλλοντικούς, γενετικούς και φυσιολογικούς παράγοντες (Bonizzoni et al. 2002, Kraaijeveld et al. 2005, Gavriel et al. 2009, Sabrina Berdina et al. 2010).

Τα αρσενικά της μύγας της Μεσογείου δημιουργούν συναθροίσεις γνωστές ως 'lek' κάτω από ένα φύλλο του ξενιστή τους και υπερασπίζονται το μέρος αυτό από τα υπόλοιπα αρσενικά που μπορεί να το διεκδικούν (Papadopoulos 2008). Μετέπειτα το αρσενικό παράγει και εκλύει τη σεξουαλική φερομόνη μέσω της οποίας προσελκύει θηλυκά για σύζευξη (Prokopy and Hendrichs 1979, Lorna et al. 1989). Αρχικά συστρέφει την κοιλιά του προς τα πάνω και στη συνέχεια εκθέτει την φερομόνη σε μορφή σταγόνας στο ακραίο τμήμα του εδρικού επιθυλίου (Lloste and Roche 1960, Arita and Kaneshiro 1986, Lorna et al. 1989). Όταν το θηλυκό θα πλησιάσει το κάτω μέρος του φυλλώματος το αρσενικό τοποθετεί την κοιλιακή του χώρα στο κάτω μέρος του σώματος του ενώ ταυτόχρονα κουνάει το κεφάλι του και αυξάνει τις δονήσεις των πτερυγών του (Féron 1962, Prokopy and Hendrichs 1979). Στη συνέχεια αλλάζει θέση στις πτέρυγες του ώστε να είναι στραμμένες προς τα εμπρός και πλησιάζει το θηλυκό. Στο τέλος θα πηδήξει στη ράχη του θηλυκού και θα επιχειρήσει να συζευχθεί μαζί του. Σε κάθε περίπτωση είτε πριν το αρσενικό πλησιάσει το θηλυκό είτε μετά, το θηλυκό είναι σε θέση να απομακρυνθεί από το φύλλο ή ακόμη και να σταματήσει τη σύζευξη που έχει ξεκινήσει (Lorna et al, 1989). Μία επιτυχημένη σύζευξη κατά τη διάρκεια της οποίας γίνεται μεταφορά σπέρματος διαρκεί 2-3 ώρες (Whittier et al. 1992, Papadopoulos 2008).

#### 1.6 Επίδραση των αιθέριων ελαίων στη σεξουαλική συμπεριφορά της μύγας της Μεσογείου.

Οι φυτικές χημικές ουσίες, προερχόμενες από ξενιστές και μη, επηρεάζουν σημαντικά τη σεξουαλική συμπεριφορά της μύγας της Μεσογείου. Χαρακτηριστική απόδειξη αποτελεί η έρευνα των Shelly και McInnis (2001), όπου στείρα αρσενικά που είχαν εκτεθεί σε έλαιο πιπερόριζας ανταγωνίστηκαν επιτυχώς τα μη εκτεθειμένα άγρια αρσενικά. Η ουσία που αρχικά θεωρήθηκε υπεύθυνη για την αύξηση ανταγωνισμού από

τα εκτεθειμένα αρσενικά ήταν το σεσκιτερπένιο *a-coraene* (Shelly and McInnis 2001). Η ουσία αυτή αποτελεί συστατικό του ελαίου πιπερόριζας, των σπόρων αγγελικής και των καρπών και φύλλων των εσπεριδοειδών. Αργότερα, αποδείχθηκε ότι αιθέρια έλαια ή μίγματα ουσιών που δεν περιέχουν την *a-coraene* μπορούν να είναι εξίσου αποτελεσματικά. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι μίγμα των ουσιών *geraniol*, *a-pinene*, *limonene*, *b-myrcene* και *linalool* σε αναλογία 1:1:1:1:1, επάγουν αντίστοιχα φαινόμενα με εκείνα του *a-coraene*. Τα παραπάνω συστατικά είναι λιγότερο ακριβά ενώ ταυτόχρονα βρέθηκε ότι μπορούν να οδηγήσουν σε καλύτερα αποτελέσματα (Koulousis et al. 2013). Επιπρόσθετα, η *a-coraene* πολύ πιθανόν να μην χρησιμοποιείται από τα αρσενικά για τη σύνθεση της σεξουαλικής φερομόνης. Διότι δεν αποτελεί χημικό συστατικό της, ούτε υπάρχει στο μείγμα της ουσία παρόμοια με αυτήν της *a-corane* (Nishida et al. 2000, Papadopoulos et al. 2006, Koulousis et al. 2013). Αντιθέτως, πολλές χημικές ουσίες από τα αιθέρια έλαια των εσπεριδοειδών είναι κοινές με αυτές της σεξουαλικής φερομόνης, και πιθανόν χρησιμοποιούνται από τα αρσενικά για την παραγωγή καλύτερων εκπομπών της (Koulousis et al. 2013).

Σύμφωνα με τους Juan Blasco et al. (2013) βρέθηκε ότι, τόσο η ουσία *linalool* όσο και το αιθέριο έλαιο πιπερόριζας (όταν χρησιμοποιήθηκε μόνο του είτε όταν προστέθηκε στην διατροφή των ενηλίκων) αύξησαν τις συζεύξεις των στείρων αρσενικών της φυλής Vienna 8. Σε αντίθεση η μεμονωμένη χρήση της ουσίας *limonene* δεν επηρέασε θετικά τα ποσοστά σύζευξης σε σχέση με αυτά των μη εκτεθειμένων αρσενικών παρά το γεγονός ότι αποτελεί το βασικό συστατικό στα αιθέρια έλαια εσπεριδοειδών.

Παρά το εύρος των ερευνών που έχουν πραγματοποιηθεί, δεν έχουν βρεθεί ακόμη οι φυσιολογικοί μηχανισμοί που προκαλούν την αύξηση συχνότητας του σεξουαλικού καλέσματος. Ως πιθανή αιτία έχει αναφερθεί η ενεργοποίηση ενδοκρινικών μηχανισμών που με τη σειρά τους ενεργοποιούν ορμόνες, όπως είναι η νεανική ορμόνη, που σχετίζεται με την παραγωγή της σεξουαλικής φερομόνης (Koulousis et al. 2017)

## 1.7 Αντιμετώπιση

Για την καταπολέμηση της μύγας της Μεσογείου χρησιμοποιούνται κυρίως χημικά μέσα και εκτενής εφαρμογή εντομοκτόνων. Οι ψεκασμοί που εφαρμόζονται μπορεί να είναι δολωματικοί ή καλύψεως. Πριν την εφαρμογή των ψεκασμών, για να εκτιμηθεί η πυκνότητα του πληθυσμού των ενήλικων ατόμων τοποθετούνται παγίδες ενηλίκων στον αγρό. Με αυτό τον τρόπο προσδιορίζεται η χρονική περίοδος και τα σημεία που θα γίνουν οι εφαρμογές. Οι παγίδες τύπου McPhail και Jackson είναι οι πιο κοινές. Συνήθως αναρτούνται στα δέντρα λίγο πριν οι καρποί αποκτήσουν το μέγεθος που είναι κατάλληλο για ωοτοκία. Στις παγίδες τύπου McPhail χρησιμοποιείται ως ελκυστικό οι ουσίες ammonium acetate, putrescine και trimethylamine που βρίσκονται εντός ειδικών διανεμητών. Ενώ στις παγίδες τύπου Jackson χρησιμοποιείται η παραφερομόνη trimedlure (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003).

Στους ψεκασμούς καλύψεως πραγματοποιείται καθολικός ψεκασμός της επιφάνειας του δέντρου με σκοπό το εντομοκτόνο να βρεθεί σε όλες τις πιθανές θέσεις που βρίσκεται το έντομο στόχος. Αντίθετα στους δολωματικούς ψεκασμούς χρησιμοποιείται μια ουσία που είναι ελκυστική, φαγοδιεγερτική ή σταθμευτική για το έντομο με αποτέλεσμα να το οδηγήσει σε επαφή με αυτό ή στην κατάποση του. Συνήθως η μέθοδος των δολωματικών ψεκασμών προτιμάται καθώς μπορεί να γίνει χρήση μικρότερης ποσότητας εντομοκτόνου και να έχουμε μεγαλύτερο ποσοστό θανάτωσης εντόμων.

Στους δολωματικούς ψεκασμούς εφαρμόζουμε το εντομοκτόνο στην νοτιοδυτική πλευρά του δέντρου, όπου η ένταση του φωτός είναι μεγαλύτερη κατά της διάρκεια της ημέρας. Το σύστημα που ακολουθείται είναι συνήθως είτε ψεκασμός σε ένα τμήμα της κόμης του δέντρου, και το επόμενο να μένει απέκαστο είτε η μια σειρά δέντρων να ψεκάζεται και η επόμενη σειρά να μένει απέκαστη. Το ψεκαστικό υγρό περιέχει εκτός από το εντομοκτόνο και ελκυστικό υγρό σε ποσότητα 0,2%. Είναι συνήθως υδρόλυμα πρωτεϊνών ή φυσικό ή συνθετικό προϊόν αποσύνθεσης πρωτεϊνούχων ουσιών. Η ελκυστικότητα του οφείλεται στην έκλυση αμμωνίας, ενώ τα αμινοξέα δρουν κυρίως ως φαγοδιεγερτικά. Τέτοια ελκυστικά σκευάσματα που κυκλοφορούν και στην Ελληνική αγορά είναι τα Alma Dacus, Buminal, Dacona, Daconyl, Dacus Bait, Entomela, Nulure

κ.α. Ενώ ως εντομοκτόνο χρησιμοποιείται συνήθως το dimethoate ή fenthion 0,3% ή 0,5% malathion. Ο πρώτος δολωματικός ψεκασμός γίνεται 15 ημέρες πριν την ωρίμανση των καρπών καθώς παρατηρείτε η αλλαγή χρώματος του καρπού και επαναλαμβάνεται κάθε 7-10 ημέρες. Οι ψεκασμοί καλύψεως ξεκινάνε όταν αρχίζει η ωρίμανση των καρπών και επαναλαμβάνονται κάθε 20 ημέρες και ανάλογα με την υπολειμματική διάρκεια του χρησιμοποιούμενου σκευάσματος. Το ψεκαστικό υγρό περιέχει 0,03% dimethoate, fenthion ή άλλο οργανοφωσφορούχο εντομοκτόνο (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003).

Εκτός από τη χημική καταπολέμηση έχουν χρησιμοποιηθεί και βιολογικά μέσα για την αντιμετώπιση της μύγας της Μεσογείου. Σ'αυτά ανήκει η εισαγωγή και απελευθέρωση παρασιτοειδών και αρπακτικών, η χρήση εντομοπαθογόνων μικροοργανισμών και η εξαπόλυση στειρωμένων εντόμων. Ένα από τα είδη που χρησιμοποιείται σήμερα σε προγράμματα βιολογικής καταπολέμησης της μύγας της Μεσογείου είναι το παρασιτοειδές *Diachasmimorpha longicaudata*, (Hymenoptera: Braconidae). Τα ενήλικα θηλυκά χρησιμοποιώντας το μακρύ τους ωοθέτη τοποθετούν το αυγό τους σε προνύμφες τρίτου σταδίου του *C. capitata* (Segura et al. 2012, Harbi et al. 2019). Οι προνύμφες του παρασιτοειδούς τρέφονται με τους ιστούς των προνυμφών και των νυμφών της μύγας της Μεσογείου τις οποίες και θανατώνουν. Επίσης, το παρασιτοειδές *Aganaspis dacii* (Hymenoptera: Figitidae) αποτελεί φυσικό εχθρό πολλών ειδών της οικογένειας Τεφριτίδων. Στην Ελλάδα βρέθηκε στη Χίο, σε νύμφες της μύγας της Μεσογείου σε προσβεβλημένα σύκα. Η έρευνα που ακολούθησε έδειξε ότι η συνολική θνησιμότητα των νυμφών (62-65%) της μύγας της Μεσογείου μπορεί να οδηγήσει σε αποτελεσματική αντιμετώπιση του πληθυσμού. Όμως, πρέπει να γίνουν επιπλέον μελέτες για την απελευθέρωση και εκτροφή του παρασιτοειδούς σε μεγάλες κλίμακες. (Papadopoulos and Katsoyannos 2003).

Για την βιολογική αντιμετώπιση του εντόμου έχει προταθεί η χρήση εντομοπαθογόνων μυκήτων όπως είναι ο *Beauveria bassiana* (Qazzaz et al. 2015), ο *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces fumosoroseus* και ο *Aspergillus ochraceus* (Castillo et al. 2000) μέσω της εφαρμογής τους στο στάδιο της νύμφης και του ενηλίκου. Άλλο ένα

παράδειγμα αποτελεί το στέλεχος του μύκητα *Bacillus cereus* που έφερε υψηλά ποσοστά θνησιμότητα σε νεαρές προνύμφες και μείωσε την ανάπτυξη των ενηλίκων (Ruiu et al. 2015) καθώς και η χρήση του βιολογικού σκευάσματος spinosad που περιέχει το βακτήριο *Saccharopolyspora spinosa* (Vargas et al. 2002). Άλλοι οργανισμοί, που φέρουν θετικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση της μύγας της Μεσογείου είναι κάποια είδη νηματωδών όπως ο *Heterorhabditis bacteriophora*, ο *Steinernema feltiae* και ο *Steinernema carpocapsae* (Karagoz et al. 2009).

Η εξαπόλυση στέρων εντόμων (sterile insect technique, SIT) είναι μία βιολογική, κατ' άλλους βιοτεχνική μέθοδος για την καταπολέμηση της μύγας της Μεσογείου και άλλων ειδών της οικογένειας Tephritidae. Για την εφαρμογή της μεθόδου μεγάλες εργαστηριακές μονάδες παράγουν δισεκατομμύρια έντομα κάθε εβδομάδα τα οποία εκτίθενται σε ραδιενεργό ακτινοβολία-γ στο στάδιο της νύμφης, και στη συνέχεια αποστέλλονται ακολουθώντας ειδικά πρωτόκολλα σε προορισμούς ειδικών εγκαταστάσεων όπου εκεί τρέφονται και αναπτύσσονται σε κατάλληλες συνθήκες, έως ότου τα απελευθερώσουν στο φυσικό περιβάλλον (FAO/IAEA 2007, Pereira et al. 2011). Στη συνέχεια τα στείρα αρσενικά συζευγνύονται με τα άγρια θηλυκά, τα αυγά δεν εκκολάπτονται, εξαιτίας της στειρότητας των αρσενικών από την ακτινοβολία που έχουν υποστεί και έτσι ο άγριος πληθυσμός μειώνεται σταδιακά (Pereira et al. 2011).

Για την απελευθέρωση μόνο των αρσενικών έχουν δημιουργηθεί δύο τύποι γενετικού διαχωρισμού του φύλου. Ο πρώτος τύπος ανακαλύφθηκε από τον Rössler το 1979, ο οποίος κατάφερε την αλλαγή του χρώματος της θηλυκής νύμφης, από καφέ σε άσπρο, μέσω της μεταφοράς ενός αυτοσωμικού γονιδιακού τμήματος στο Y φυλετικό χρωμόσωμα (white pupae, wp). Ο δεύτερος τύπος αναπτύχθηκε όταν το αυτοσωμικό γονίδιο που φέρει ένα κυρίαρχο άγριου τύπου αλληλογμορφο για το όριο της ευαισθησίας στην θερμοκρασία (temperature sensitive lethal, tsl) μεταφέρθηκε στο Y χρωμόσωμα (Franz and Kerremans 1994, Caceres et al. 2004, Dyck et al, 2006). Σε αυτή την περίπτωση τα θηλυκά έμβρυα θανατώνονται σε θερμοκρασίες άνω των 34 βαθμών κελσίου σε 24 ώρες. (Fisher and Caceres 2000, Caceres 2002). Η ανακάλυψη των παραπάνω μεταλλάξεων βοήθησαν στη δημιουργία στελεχών γενετικού

διαχωρισμού του φύλου (GSS: Genetic Sexing Strains), όπως είναι το εργαστηριακό στέλεχος Vienna 8, αυξανοντας έτσι την αποτελεσματικότητα των προγραμμάτων των στείρων εντόμων σε πρακτικό και οικονομικό επίπεδο (Augoustinos et al. 2016).

Για να συμφέρουν οικονομικά τα προγράμματα εξαπόλυσης στείρων εντόμων θα πρέπει τα στείρα αρσενικά που εκτρέφονται να ωριμάζουν σεξουαλικά πρόωρα, να ανταγωνίζονται σεξουαλικά τα άγρια αρσενικά και να έχουν αυξημένη βιωσιμότητα ώστε να ζευγαρώνουν με όλο και περισσότερα άγρια θηλυκά (Blasco et al. 2011). Οι συνθήκες συνωστισμού κατά τη μαζική εκτροφή τους καθώς και η χρήση της ακτινοβολίας-γ μειώνουν την επιτυχία σύζευξης με τα άγρια θήλυκα (Shelly et al. 1994, Blasco et al. 2011). Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος προτάθηκαν και υιοθετήθηκαν νέοι τρόποι για την αύξηση της σεξουαλικής ανταγωνιστικότητας. Για παράδειγμα η έκθεση σε οσμές προερχόμενες από το φυτό πιπερόριζας και εσπεριδοειδών βρέθηκε ότι αυξάνουν την ανταγωνιστικότητα σύζευξης στερημένων αρσενικών έναντι των άγριων (Shelly et al. 2007, Koyloysis et al. 2013). Καθώς επίσης η μέθοδος της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας, η οποία προκαλεί εμβρυική θνησιμότητα όταν αναπαραχθούν μη μολυσμένα θηλυκά με μολυσμένα αρσενικά από το βακτήριο *Wolbachia* (Zabalou et al. 2009).

Αξιόλογα αποτελέσματα έχει δώσει και η χρήση μεθόδου της μαζικής παγίδευσης που αφορά την τοποθέτηση μεγάλου αριθμού παγίδων στον αγρό για την προσέλκυση και θανάτωση των ενηλίκων. Στην περιοχή της Κορινθίας τα πειράματα που έγιναν έδωσαν θετικά αποτελέσματα (Ζέρβας και συνεργάτες 1997, Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003). Ενώ όσον αφορά τις ελκυστικές ουσίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την προσέλκυση των θηλυκών, βρέθηκε ότι σε παγίδες τύπου McPhail η χρήση ουσιών όπως το οξεικό αμμώνιο, 1,4-διαμυνοβουτάνιο και η τριμεθυλαμίνη ήταν πολύ πιο ελκυστικές σε σχέση με ουσίες όπως το Nulure (Κατσόγιαννος και Παπαδόπουλος 1997, Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003).

Σημαντικά είναι και τα καλλιεργητικά μέτρα για την αντιμετώπιση της μύγας της Μεσογείου. Σε αυτά περιλαμβάνεται η απομάκρυνση και καταστροφή προσβεβλημένων



καρπών και η αντιμετώπιση των ζιζανίων που πιθανόν προσβάλλονται από τη μύγα της Μεσογείου (Papadopoulos 2008).

Επιπλέον έχουν ληφθεί νομοθετικά μέτρα που χρησιμοποιούνται αυστηρά σε πολλές χώρες για την αποφυγή εισαγωγής του εντόμου σε νέες περιοχές μέσω μολυσμένων καρπών. Γι αυτό και σε αρκετές αγορές γίνεται εισαγωγή φρούτων από χώρες μόνο μετά από αυστηρούς ελέγχους που έχουν εξασφαλίσει την θνησιμότητα του εντόμου σε ποσοστό 99,9968% (Papadopoulos 2008).

#### 1.8 Επίδραση της τροφής στη σεξουαλική συμπεριφορά της μύγας της Μεσογείου.

Όπως προαναφέρθηκε, τα ενήλικα της μύγας της Μεσογείου για να ωριμάσουν σεξουαλικά θα πρέπει να τραφούν αρχικά με ένα μείγμα πρωτεϊνικών και ζαχαρούχων τροφών. Η ίδια διατροφή μπορεί να ενισχύσει ενεργειακά, τόσο τα αρσενικά για την εύρεση και την υπεράσπιση του χώρου τους στις συναθροίσεις 'lek', την παραγωγή και έκλυση σεξουαλικής φερομόνης, όσο και τα θηλυκά για την επιλογή του κατάλληλου αρσενικού και του ασφαλούς καρπού που θα εναποθέσουν τα ωά τους. (Prokopy & Hendrichs 1979).

Άμεσα συνδεδεμένη με τη διατροφή είναι η σεξουαλική συμπεριφορά καθώς και η επιβίωση των ενήλικων. Κατά τους Koulousis et al. (2017), όσα αρσενικά είχαν εκτεθεί σε αιθέριο έλαιο εσπεριδοειδών και είχαν τραφεί με πρωτεΐνη και ζάχαρη έζησαν λιγότερο σε σχέση με τα εκτεθειμένα που τράφηκαν μόνο με ζάχαρη, αλλά είχαν καλύτερα αποτελέσματα εκπομπής σεξουαλικής φερομόνης. Το σεξουαλικό κάλεσμα των αρσενικών της μύγας της Μεσογείου απαιτεί υψηλά ενεργειακά αποθέματα κρίνοντας από τη χρονική διάρκεια που καταλαμβάνει μέσα στη μέρα. Πιθανόν η έκθεση των αρσενικών σε αιθέρια έλαια να ενίσχυσε σε μεγάλο βαθμό την παραγωγή σεξουαλικής φερομόνης, με αποτέλεσμα η επιβίωση του εντόμου να επωφεληθεί ενεργειακά ελάχιστα μέσω της πλούσιας διατροφής.

Αντίθετα σύμφωνα με την Παπαναστασίου (2014), όταν τα αρσενικά τράφηκαν με πρωτεΐνη και ζάχαρη, αλλά δεν είχαν εκτεθεί σε αιθέρια έλαια, ο μέσος όρος ηλικίας τους ήταν μεγαλύτερος και εκδήλωναν συχνότερα σεξουαλικό κάλεσμα, μέσα στη μέρα, σε σχέση με τα αρσενικά που τράφηκαν μόνο με ζάχαρη. Αποδεικνύοντας έτσι την ενεργειακή αξία της πρωτεϊνικής διατροφής τόσο στο σεξουαλικό κάλεσμα όσο και στην επιβίωση τους. Η πλούσια διατροφή επηρεάζει θετικά και τα θηλυκά, τα οποία παρουσίασαν αυξημένη ωοπαραγωγή σε σχέση με όσα τρέφονταν μόνο με ζάχαρη. Παρ'όλα αυτά η ενέργεια τους φαίνεται να ενίσχυσε μόνο την παραγωγή ωών και όχι την επιβίωση τους. Αντίθετα όσα τράφηκαν με ζάχαρη έζησαν περισσότερο (Παπαναστασίου 2014).

## 1.9 Το ενδοκυτταρικό βακτήριο *Wolbachia pipientis*.

### 1.9.1 Γενικά

Το βακτήριο *Wolbachia pipientis* ανήκει στα αρνητικά κατά gram βακτήρια στην υποομάδα των πρωτεοβακτηρίων της οικογένειας ρικετσιών (Rickettsiaceae) και σχετίζεται με τα γένη των βακτηρίων *Anaplasma*, *Cowdria*, *Ehrlichia*, και *Rickettsia* (O'Neill et al. 1992, Rousset et al. 1992, Taylor et al. 2000, Areerate et al. 2003). Πρόκειται για ένα υποχρεωτικό ενδοκυττάριο βακτήριο, μητρικά κληρονομούμενο το οποίο μολύνει κυρίως ακάρεα, αράχνες, έντομα, νηματώδεις και καρκινοειδή (Cookand and Rokas 2000, Taylor et al. 2000, Areerate et al. 2003). Το γένος *Wolbachia* ταξινομείται με βάση 8 υποομάδες μετά από φυλογενετικές αναλύσεις που συνέβησαν. Στις υποομάδες A και B περιλαμβάνονται βακτήρια που μολύνουν μόνο τα αρθρόποδα, στις C και D μόνο τους νηματώδεις της φιλαρίωσης, στην F υποομάδα μολύνουν νηματώδεις και αρθρόποδα, στην E παρασιτούν στα *Colembola* και στην H ένα είδος τερμιτών (Ros et al. 2008).

Αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1924 από τους Marshall Hertig και Simeon Burt Wolbach στις ωοθήκες του κουνουπιού *Culex pipiens* και επισήμως από τον Marshal Hertig το 1936 (Hertig 1936, Areerate et al. 2003). Το 1950 οι Ghelelovitch και Laven

κατέληξαν, μετά από ορισμένες διασταυρώσεις που έγιναν σε ενήλικα του γένους *Culex*, ότι δεν προέκυπταν απόγονοι ή ήταν ελάχιστοι. Στη συνέχεια ο Laven διαπίστωσε ότι η ασυμβατότητα αυτή κληρονομείται κυτταροπλασματικά από την μητέρα και ονόμασε το φαινόμενο κυτταροπλασματική ασυμβατότητα. Μετά το 1971, ο Janice Yen και ο Ralph Barr ανακάλυψαν, μέσα από πειράματα με τη χρήση αντιβιοτικών, ότι η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα που προκαλείται σε κουνούπια του γένους *Culex* οφείλεται στην παρουσία του βακτηρίου *Wolbachia* (Warren 1997).

### 1.9.2 Μηχανισμοί διάδοσης

Το ενδοκυτταρικό βακτήριο *Wolbachia* πρόκειται για μητρικά κληρονομούμενο παράσιτο. Μεταδίδεται 'κάθετα' στους απόγονους των πληθυσμών μέσω του κυτταροπλάσματος των αυγών. Ενώ ο μηχανισμός της οριζόντιας μετάδοσης του παραμένει άγνωστος (Warren et al. 1997). Για να επιτευχθεί η 'κάθετη' διάδοση, το βακτήριο επιφέρει κάποιες αναπαραγωγικές ανωμαλίες στους ξενιστές του. Αυτές είναι η θανάτωση των αρσενικών εμβρύων, η θηλυκοποίηση, η θηλυτόκος παρθενογένεση και η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (Stouthamer et al. 1993, Hoffmann and Turelli 1997, O'Neill et al. 1997, Stouthamer et al. 1999, Κυρίτσης 2016).

Η θανάτωση των αρσενικών εμβρύων βρέθηκε να προκύπτει εξαιτίας της μόλυνσης των θηλυκών από το βακτήριο *Wolbachia*. Σύμφωνα με τους Charlat et al. (2007) βρέθηκε ότι προκαλείται θανάτωση στο στάδιο των αρσενικών εμβρύων και στο νυμφικό στάδιο.

Ως θηλυκοποίηση ορίζεται η διαδικασία στην οποία γενετικά αρσενικά άτομα αναπτύσσονται μορφολογικά και συμπεριφέρονται ως θηλυκά. Η παρουσία του βακτηρίου *Wolbachia* καταστέλλει την ανάπτυξη ενός ανδρογόνου αδένα ο οποίος παράγει την ορμόνη που επάγει την αρρενοποίηση (Werren 1997).

Η θηλυτόκος παρθενογένεση είναι το φαινόμενο παραγωγής θηλυκών ατόμων από μη γονιμοποιημένα μολυσμένα θηλυκά. Η θηλυτοκία στα είδη αυτά εμφανίζεται παρουσία

του βακτηρίου, εν απουσία του προκύπτουν αρσενικά (αρρενοτοκία) (Stouthamer & Kazmer 1994).

Η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα αφορά την αδυναμία των μη μολυσμένων θηλυκών που συζευγνύονται με μολυσμένα αρσενικά από το βακτήριο *Wolbachia* να δώσουν βιώσιμα ωά. Το *Wolbachia* φαίνεται να μεταλλάσσει τα πατρικά χρωμοσώματα κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης. Αυτή η τροποποίηση μπορεί να εξουδετερωθεί μόνο αν το ίδιο βακτηριακό στέλεχος είναι παρών και στον θηλυκό γονέα. Η ανάπτυξη του εμβρύου διακόπτεται λόγω της μη κανονικής συμπεριφοράς των πατρικών χρωμοσωμάτων στις πρώτες μιτωτικές διαιρέσεις πριν τη γονιμοποίηση (O'Neill & Karr, 1990, Tram & Sullivan, 2002). Η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα χωρίζεται στην κυτταροπλασματική ασυμβατότητα μονής κατεύθυνσης (unidirectional CI) και της διπλής κατεύθυνσης (bidirectional CI). Στην πρώτη περίπτωση διασταυρώνονται μολυσμένα αρσενικά με μη μολυσμένα θηλυκά και προκύπτουν μη βιώσιμοι απόγονοι. Ενώ στη δεύτερη περίπτωση και τα δύο φύλα είναι μολυσμένα, αλλά με διαφορετικά στελέχη του βακτηρίου *Wolbachia* οδηγώντας ξανά σε εμβρυική θνησιμότητα. (Werren et al, 1997)

Η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα που προκαλείται από τη μεταφορά του βακτηρίου *Wolbachia*, έχει φέρει έως και σήμερα θετικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση επιβλαβών εντόμων για τη γεωργία αλλά και την υγεία του ανθρώπου. Σήμερα χρησιμοποιείται μέσω της τεχνικής ασύμβατου εντόμου, μέθοδος που έχει ανάλογη χρήση με αυτή της τεχνικής των στείρων εντόμων. Σκοπός της απελευθέρωσης μολυσμένων αρσενικών, είναι η πραγματοποίηση συζεύξεων με τα άγρια θηλυκά ώστε να προκύψουν μη βιώσιμοι απόγονοι και να μειωθεί ο αρχικός πληθυσμός (Zabalou 2009).

### 1.9.3 *Wolbachia* και μύγα της Μεσογείου

Το βακτήριο *Wolbachia pipientis* δεν υπάρχει σε φυσικούς πληθυσμούς του *C. capitata*. Μπορεί όμως να μεταφερθεί μετά από εργαστηριακές διαδικασίες με τη χρήση

εμβρυϊκών μικροέγχυσεων στο κυτταρόπλασμα από μολυσμένα είδη. Με αυτό τον τρόπο, χρησιμοποιώντας ως δότη μολυσμένα άτομα του *R. cerasi* έγινε μεταφορά δύο στελεχών του βακτηρίου, του wCer4 και του wCer2 στη μύγα της Μεσογείου. Οι δημιουργηθέντες πληθυσμοί, προκάλεσαν 100%, πλήρη κυτταροπλασματική ασυμβατότητα μετά την αναπαραγωγή τους με μη μολυσμένα θηλυκά. Τα νέα εργαστηριακά στελέχη που προέκυψαν μετά την μόλυνση με τα στελέχη του βακτηρίου *Wolbachia*, wCer4 και του wCer2, είναι αντίστοιχα το S10.3 και το 88:6 (Zabalou et al. 2004). Πλήρης κυτταροπλασματική ασυμβατότητα έχει συμβεί άλλη μια φορά όταν χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ασύμβατου εντόμου για το κουνούπι *Culex* (Laven 1967, Werren, 1997). Σε έρευνες που ακολούθησαν από την ίδια ερευνητική ομάδα, έγινε μεταφορά του wCer2, αυτή τη φορά από το στέλεχος 88:6 σε άτομα ενός φυλετικού γενετικού στελέχους του Vienna 8. Στα αποτελέσματα του πειράματος εκφράστηκε 100% η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (Zabalou et al, 2009). Έτσι δόθηκε η βάση για μια μελλοντική επιτυχημένη χρήση της τεχνικής ασύμβατου εντόμου στην αντιμετώπιση του είδους *Ceratitis capitata*.

1.10 Επίδραση αιθέριων ελαίων εσπεριδοειδών στη συμπεριφορά της μύγας της Μεσογείου.

Φαίνεται ότι η μύγα της Μεσογείου έχει αναπτύξει ισχυρές αλληλεπιδράσεις με τα διάφορα είδη εσπεριδοειδών, παρά το γεγονός ότι προέρχονται από διαφορετικές ηπείρους. Οι σχέσεις αυτές εμφανίζονται τόσο κατά τη διάρκεια του ενήλικου όσο και του προνυμφικού σταδίου. Τα αρσενικά έλκονται από οσμές που προέρχονται από τα φυτικά αιθέρια έλαια των ξενιστών και στη συνέχεια επιλέγουν το κατάλληλο σημείο για τη δημιουργία των συναθροίσεων 'lek' (Hendrichs and Hendrichs 1990, Shelly and Villalobos 2004, Papadopoulos et al. 2015). Αρχικά ως σημαντική ελκτική ουσία για τα αρσενικά βρέθηκε η trimedlure (Beroza et al. 1961, Shelly et al. 1993, Katsoyannos et al. 1997) και αργότερα η ουσία  $\alpha$ -copranane, αν και η συγκεκριμένη δεν βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση στα αιθέρια έλαια των εσπεριδοειδών (Nishida et al. 2000). Εκτός από την έλξη που μπορεί να προκαλέσουν διάφορες πτητικές ουσίες στα αρσενικά, σημαντική είναι και η επίδραση τους στην αύξηση των συζεύξεων τους μετά την έκθεση τους σε αυτές. Ως αιτία αυτής της συμπεριφοράς έχει προταθεί η αύξηση έκλυσης της

σεξουαλικής φερομόνης (Papadopoulos et al. 2006). Εκτός από τις οσμές των αιθέριων ελαίων πορτοκαλιού (Koulousis et al. 2010), σημαντικά αποτελέσματα έδωσε και η εφαρμογή του ίδιου ελαίου στην κοιλιά των στείρων αρσενικών, αφού τα ποσοστά σύζευξης ήταν σχεδόν διπλάσια έναντι των μη εκτεθειμένων αρσενικών (61% : 39%). Ως πιθανή αιτία θεωρείται η χρήση ουσιών του αιθέριου ελαίου πορτοκαλιού για τη σύνθεση της σεξουαλικής φερομόνης (Papadopoulos et al. 2006).

Τα θηλυκά έχουν αναπτύξει την ικανότητα να αντιλαμβάνονται πόσο κατάλληλος είναι ένας καρπός για να ωοτοκήσουν με βάση τη χημική του σύσταση σε αιθέρια έλαια (Ιωάννου 2014). Κάθε ουσία των αιθέριων ελαίων προκαλεί έλξη διαφορετικού βαθμού στα θηλυκά με βάση τα ποιοτικά χαρακτηριστικά της, π.χ το limonene βρέθηκε να προκαλεί διεγερτικά αποτελέσματα, τα myrcene και  $\alpha$ -pinene μέτρια, ενώ το linalool αρνητικά εξαιτίας της αυξημένης τοξικότητας του (Papachristos et al. 2009). Αν και το limonene είναι το βασικό συστατικό των ελαίων των εσπεριδοειδών η επιλογή καρπού για ωοτοκία δεν κρίνεται μεμονωμένα από αυτό, αλλά προκύπτει μέσα από την συνεργηστική του δράση με τις υπόλοιπες ουσίες. Εκτός από τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των οσμών που εκπέμπουν οι καρποί των εσπεριδοειδών, σημαντική είναι επίσης και η ποσότητα στην οποία βρίσκονται. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αύξηση των δόσεων του αιθέριου ελαίου πορτοκαλιού (άνω των 1μl) που είχε αποτρεπτικό αποτέλεσμα στην ωοτοκία των θηλυκών (Ιωάννου 2014).

Αφού εκκολαφθούν τα ωά, οι προνύμφες για να αναπτυχθούν και να επιβιώσουν θα πρέπει να μετακινηθούν στην σάρκα του καρπού. Πρώτα θα έρθουν αντιμέτωπες με φραγμούς του εξωκαρπίου όπως είναι κάποιες ουσίες που εμφανίζουν τοξική δράση (citral, linalool, linalyl acetate, geranyl acetate,  $\alpha$ -terpineol), ενώ λιγότερο τοξικές είναι οι limonene,  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinenes, myrcene,  $\gamma$ -terpinene και valencene (Papachristos et al., 2009). Μετέπειτα βρέθηκε ότι η προσθήκη ουσιών στο περιβάλλον που αναπτύσσονται οι προνύμφες μπορούν να επιφέρουν ανάλογα αποτελέσματα, αργότερα στην ωοπαραγωγή των θηλυκών. Δηλαδή οι διεγερτικές ουσίες προκάλεσαν αυξημένη ωοπαραγωγή, οι μέτρια διεγερτικές έδωσαν μέτρια αποτελέσματα ενώ οι αποτρεπτικές ουσίες μείωσαν αντίστοιχα την ωοπαραγωγή. Ο ακριβής μηχανισμός που εμπλέκεται

στη μεταφορά πληροφοριών από το προνυμφικό στο ενήλικο στάδιο παραμένει άγνωστος (Ιωάννου 2014).

### 1.11 Σκοπός της εργασίας

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση τριών παραγόντων στην συμπεριφορά σύζευξης των αρσενικών. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση της έκθεσης σε αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού (πρώτος παράγοντας) που ως γνωστόν αυξάνει την ανταγωνιστικότητα σύζευξης των αρσενικών, της μόλυνσης με το βακτήριο *Wolbachia* (δεύτερος παράγοντας) και του είδους του θηλυκού (της ίδιας με το αρσενικό ή άγριου πληθυσμού) στην επιτυχία σύζευξης αρσενικών που τρέφονταν σε φτωχό διατροφικό περιβάλλον. Συγκεκριμένα τα αρσενικά σε όλη την ενήλικη ζωή τρέφονταν με ζάχαρη μόνο.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Συνθήκες εργαστηρίου και μέθοδος εκτροφής των εντόμων

Το πείραμα της παρούσας πτυχιακής διατριβής πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από τον Οκτώβριο του 2016 έως και τον Ιανουάριο του 2017. Οι συνθήκες που επικρατούσαν εντός του εργαστηρίου κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ήταν σταθερές με θερμοκρασία ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ ), σχετική υγρασία ( $65\% \pm 5\%$ ) και φωτοπερίοδο 14 ώρες φως : 10 ώρες σκότος με φωτόφαση από τις 7:00 π.μ μέχρι τις 21:00 μ.μ. Το φως προερχόταν τόσο από λάμπες φθορίου όσο και από φυσικό φως που εισέρχεται στο χώρο από τέσσερα παράθυρα που βρίσκονται στην οροφή του εργαστηρίου. Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω εργαστηριακά στελέχη του *C. capitata*: Μπενάκειο (εργαστηριακή φυλή που δεν είναι μολυσμένη με κάποιο στέλεχος της *Wolbachia*), S10.3 (η φυλή Μπενάκειο μολυσμένη με το στέλεχος *wCer4* της *Wolbachia*), 88.6 (φυλή Μπενάκειο μολυσμένη με το στέλεχος *wCer2* της *Wolbachia*) και φυσικός πληθυσμός που έχει εγκατασταθεί πρόσφατα στο εργαστήριο.

Τα ωά από τα παραπάνω στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα προήλθαν από ενήλικα που είχαν διατηρηθεί σε ξύλινα κλουβιά διαστάσεων 30x30x30cm. Οι τρεις πλευρές των κλουβιών ήταν καλυμμένες με συρμάτινο πλέγμα για τον καλύτερο αερισμό, η μπροστινή πλευρά ήταν γυάλινη και οι άλλες δύο ξύλινες. Η πίσω ξύλινη πλευρά είχε ένα άνοιγμα για τον έλεγχο των εντόμων, που ήταν καλυμμένο με πλαστικό κύπελο. Για την σωστή ανάπτυξη των εντόμων χρησιμοποιήθηκε νερό σε πλαστικά φιαλίδια με σπόγγο για την εύκολη χρήση του νερού από τα ενήλικα και τροφή υδρολυμένης πρωτεΐνης, ζάχαρης και νερού (1:4:5) σε μορφή σταγόνων πάνω σε πλαστικά τρυβλία petri διαμέτρου 9cm. Για την ωοτοκία χρησιμοποιήθηκαν ημικυκλικά κύλα πλαστικά κόκκινου χρώματος (domes) με 100 τρύπες στην επιφάνεια τους για την εναπόθεση του ωοθέτη. Τα 'domes' προσαρμόστηκαν σε κυκλική πλαστική μορφή 5cm διαμέτρου που τοποθετήθηκε μέσα σε πλαστικά τρυβλία petri διαμέτρου 5,5cm. Στο



εσωτερικό των τρυβλίων τοποθετήθηκε νερό για την διατήρηση της υγρασίας σε κατάλληλα επίπεδα για την ωτοκία καθώς και χυμός πορτοκαλιού σε πλαστικό φιαλίδιο για την αυξημένη προσέλκυση των θηλυκών.

Στη συνέχεια πριν ξεκινήσει η μεταφορά των ωών, γυάλινα τρυβλία petri αποστειρώθηκαν με καθαρό οινόπνευμα. Έπειτα, μεταφέρθηκαν στο εσωτερικό τους τρυβλία βάμβακος διαμέτρου 5 cm που είχαν εμποτιστεί με τεχνητή τροφή (100 gr ζάχαρη, 100 gr μαγιά μπύρας, 50 gr αλεύρι σόγιας, 8 gr ασκορβικό οξύ, 8 gr κιτρικό οξύ, 2 gr μίγμα αλάτων και 1.5 gr προπιονικό νάτριο). Για την εύκολη μεταφορά των ωών από τα 'domes' χρησιμοποιήθηκε πινέλο, που είχε τοποθετηθεί προηγουμένως σε νερό. Η μεταφορά των ωών έγινε με απαλές κινήσεις του πινέλου πάνω στο τρυβλίο βάμβακος. Τέλος τοποθετήθηκε άλλο ένα τρυβλίο petri στο πάνω μέρος του αρχικού και μεταφέρθηκε σε πλαστικές κατασκευές, στο εσωτερικό των οποίων υπήρχε αποστειρωμένη στεγνή άμμο πάχους 1-2 cm (Εικόνα 3). Η εκκόλαψη των ωών και η ανάπτυξη των προνύμφων έγινε σε συνθήκες εργαστηρίου, όπως προαναφέρθηκε . Κατά τη διάρκεια του προνυμφικού σταδίου (7-8 ημέρες) προστέθηκε επιπλέον τροφή μέσω μιας πλαστικής πιπέτας όσες φορές κρίθηκε απαραίτητο. Την 7η ή 8η ημέρα τα τρυβλία ανοίγονταν ώστε οι ανεπτυγμένες προνύμφες να εξέλθουν για να νυμφωθούν στην άμμο. Δύο με τρεις ημέρες μετά τη νύμφωση τους η άμμος κοσκινιζόταν και οι νύμφες τοποθετούνταν σε πλαστικά τρυβλία petri. Η έξοδος των ενηλίκων γινόταν 9 με 10 ημέρες μετά.



Εικόνα 3. Γυάλινα τρυβλία μέσα σε αποστειρωμένη άμμο όπου διατηρούνται κλειστά μέχρι και λίγο πριν την έναρξη νύμφωσης

## 2.2 Επίδραση των αιθέριων ελαίων του πορτοκαλιού στην ανταγωνιστικότητα σύζευξης των αρσενικών των εργαστηριακών φυλών προς θηλυκά της αντίστοιχης φυλής.

Με την έναρξη εξόδου των ενηλίκων τα τρυβλία ανοίχτηκαν και τοποθετήθηκαν στο εσωτερικό κλουβιών Plexiglass 20x20x20 cm έως ότου διαχωρισθούν όλα τα θηλυκά από τα αρσενικά. Η αναγνώριση του φύλου γινόταν με βάση δύο διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά τους. Τον ωσθέτη που φέρει το θηλυκό ή τα κερατοειδή εξαρτήματα που φέρει το αρσενικό. Κατά τη διάρκεια διαχωρισμού τους στα κλουβιά είχε τοποθετηθεί ζάχαρη σε πλαστικό τρυβλίο petri και νερό σε πλαστικό φιαλίδιο. Ο διαχωρισμός ξεκίνησε την ίδια ημέρα που ξεκίνησε η έξοδος των ενηλίκων, μέσω της αναρροφητικής συσκευής (aspirator). Για τα θηλυκά χρησιμοποιήθηκαν ανά πείραμα 2 Plexiglass 20x20x20 που το κάθε ένα περιείχε 60 ενήλικα, με πρωτεΐνη και νερό. Μετά από δύο ημέρες ξεκίνησε η μεταφορά τους σε 100 ατομικά κλουβιά χωρητικότητας 400 ml. Η κατασκευή των οποίων ήταν από πλαστικά ποτήρια, με άνοιγμα 5x8 cm το οποίο είχε καλυφθεί με λεπτή μουσελίνα. Το φυσικά ανοιχτό μέρος του ποτηριού χρησιμοποιήθηκε ως βάση αφού πρώτα καλύφθηκε με πλαστικό τρυβλίο petri

διαμέτρου 9 cm. Στη βάση αυτή είχε δημιουργηθεί μία μικρή τρύπα μέσω της οποίας διερχόταν το νερό από ένα μικρό φιλί ενώ στην επιφάνεια της μουσελίνας απλώθηκε μία μικρή ποσότητα μίγματος πρωτεΐνης και ζάχαρης. Στην άνω επιφάνεια του ατομικού κλουβιού είχε δημιουργηθεί μία τρύπα που καλυπτόταν με φελλό μέσω της οποίας γινόταν η μεταφορά των εντόμων από το aspirator (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Ατομικά κλουβιά

Τα ενήλικα αρσενικά μεταφέρθηκαν επίσης σε κλουβιά Plexiglass 20x20x20 cm. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν 4 κλουβιά, και το καθένα περιείχε 60 αρσενικά (Εικόνα 5). Ως τροφή χρησιμοποιήθηκε κρυσταλική ζάχαρη μέσα σε πλαστικά τρυβλία και νερό σε φιαλίδια με ένα κομμάτι σφουγγαριού. Την επόμενη ημέρα έγινε η επισήμανση στο θώρακα τους ώστε να διαχωρίζονται τα αρσενικά που ήταν εκτεθειμένα σε έλαια γλυκού πορτοκαλιού από τα μη εκτεθειμένα. Η επισήμανση στο θώρακα έγινε με πινέλο χρησιμοποιώντας υδατοδιαλυτά μη τοξικά χρώματα (κυρίως άσπρο και κόκκινο).



Εικόνα 5. Διαφανή πλαστικά κλουβιά με νερό και τροφή. (πάνω αριστερά αναγράφεται σε λευκό χαρτί η ονομασία φυλής, η ημερομηνία συλλογής των ωών και ο αριθμός των ενήλικων αρσενικών)

Τέσσερις ημέρες μετά την έξοδο των ενήλικων τα μισά αρσενικά εκτέθηκαν σε αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού. Η μεταφορά του ελαίου έγινε μέσω των κατασκευών 'domes' (σαν αυτές που χρησιμοποιήθηκαν για την ωτοκία). Στο εσωτερικό τους τοποθετήθηκε ένα πλαστικό φιαλίδιο που έφερε 4 στρώσεις διηθητικού χαρτιού και εμποτίστηκε με 20μL αιθέριου ελαίου γλυκού πορτοκαλιού μέσω μίας πιπέτας. Στη βάση της κατασκευής και πάνω στο πλαστικό τρυβλίο τοποθετήθηκαν 3ml νερού. Στα άλλα δύο κλουβιά του μάρτυρα έγινε χρήση των domes αλλά στο εσωτερικό τους τοποθετήθηκε μόνο νερό. Τα κλουβιά με το αιθέριο έλαιο τοποθετήθηκαν σε διαφορετικό δωμάτιο ώστε να μην επηρεάσουν την συμπεριφορά των μη εκτεθειμένων αρσενικών. Τα πειράματα ξεκινούσαν νωρίς το πρωί της 6<sup>ης</sup> ενήλικης ημέρας τους. Αρχικά μεταφέροντας σε κάθε ατομικό κλουβί ένα εκτεθειμένο αρσενικό και ένα μη εκτεθειμένο ενώ ταυτόχρονα σημειώνονταν η ώρα που έγινε η διεργασία αυτή, μετέπειτα η ώρα που ξεκινούσε η σύζευξη και το αρσενικό που επιλέχθηκε από το θηλυκό, δηλαδή τον μάρτυρα ή το εκτεθειμένο σε έλαιο αρσενικό. Καθ' όλη την διάρκεια των παρατηρήσεων

καταγράφηκαν τυχόν αλλαγές κατά τη διάρκεια της σύζευξης. Τέλος αναγράφηκε η ώρα λήξης της σύζευξης τους. Η παραπάνω περιγραφή του πειράματος εφαρμόστηκε για την παρατήρηση της επίδρασης του αιθέριου ελαίου πορτοκαλιού στον ανταγωνισμό σύζευξης των αρσενικών που ανήκουν στα στελέχη Μπενάκειο, S10.3 και 88:6 προς τα αντίστοιχα θηλυκά της ίδιας φυλής.

2.3 Επίδραση των αιθέριων ελαίων του πορτοκαλιού στην ανταγωνιστικότητα σύζευξης των αρσενικών των εργαστηριακών φυλών προς άγρια θηλυκά.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν ακριβώς ίδια με την παραπάνω. Με μοναδική διαφορά τα άγρια θηλυκά που χρησιμοποιήθηκαν από τις φυλές Μπενάκειο και γενιάς F5 Θεσσαλονίκης έμειναν περισσότερες ημέρες στα ατομικά κλουβιά έως ότου πραγματοποιηθεί το πείραμα (ενήλικα 12-14 ημερών). Διότι τα άγρια χρειάζονται περισσότερες μέρες να ωριμάσουν σεξουαλικά σε σχέση με τα θηλυκά εργαστηριακών φυλών .

2.4 Στατιστική ανάλυση

Οι συγκρίσεις που αφορούσαν τα ποσοστά σύζευξης των αρσενικών με τα θηλυκά πραγματοποιήθηκαν με το  $\chi^2$  κριτήριο. Για τις ανά δύο συγκρίσεις εφαρμόστηκε διόρθωση κατά Bonferroni  $\alpha/n$  όπου  $\alpha$  η πιθανότητα σημαντικότητας και  $n$  ο αριθμός των προς σύγκριση μεταχειρίσεων. Οι συγκρίσεις που αφορούσαν το χρόνο μέχρι την έναρξη της σύζευξης καθώς επίσης και τη διάρκεια της σύζευξης μεταξύ των αρσενικών που είχαν εκτεθεί στα αιθέρια έλαια του πορτοκαλιού και του μάρτυρα (μη εκτεθειμένα αρσενικά) πραγματοποιήθηκαν με το  $t$ -κριτήριο. Οι αναλύσεις έγιναν με το στατιστικό πακέτο SPSS 25 (IBM Corp., Armonk, NY). Σε όλες τις αναλύσεις, η πιθανότητα σημαντικών διαφορών και επιδράσεων ορίστηκε στο  $\alpha = 0,05$ .

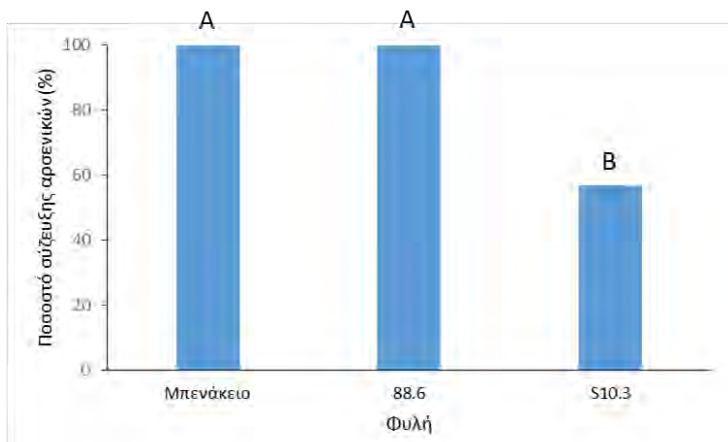
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Επίδραση των αιθέριων ελαίων του πορτοκαλιού στην ανταγωνιστικότητα σύζευξης των αρσενικών των εργαστηριακών φυλών για θηλυκά της αντίστοιχης φυλής.

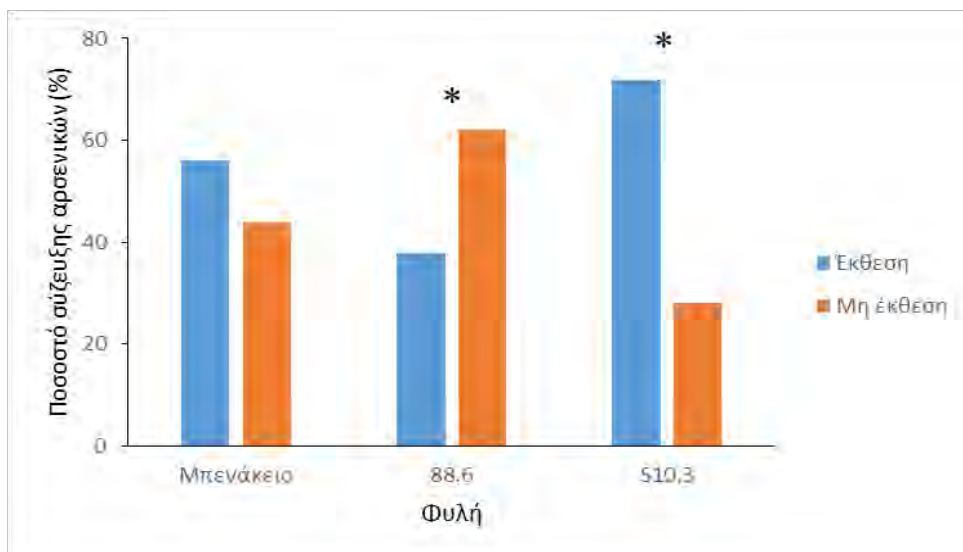
Τα ποσοστά σύζευξης των αρσενικών με τα αντίστοιχα θηλυκά της φυλής τους κυμάνθηκαν από 57% για τη φυλή S10.3 έως 100% για τις φυλές Μπενάκειο και 88.6 αντίστοιχα και διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους ( $\chi^2=100,389$ ,  $df=2$ ,  $P<0,001$ ). Ειδικότερα τα αρσενικά της φυλής S10.3 πέτυχαν σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό συζεύξεων με τα αντίστοιχα θηλυκά τους σε σχέση με τα αρσενικά της φυλής Μπενάκειο και 88.6 ( $\chi^2=54,777$ ,  $df=1$ ,  $P<0,001$ ) (Διάγραμμα 1).

Η έκθεση στο αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού δεν επηρέασε σημαντικά την ανταγωνιστικότητα σύζευξης των αρσενικών της φυλής του Μπενακειού ( $\chi^2=2,880$   $df=1$ ,  $P=0,089$ ). Αντιθέτως είχε αποκλίνουσες επιπτώσεις στους άλλους δύο πληθυσμούς. Ειδικότερα, μείωσε σημαντικά την ανταγωνιστικότητα σύζευξης των αρσενικών της φυλής 88.6 σε σχέση με τα μη εκτεθειμένα άτομα ( $\chi^2=11,520$ ,  $df=1$ ,  $P<0,001$ ) και αύξησε σημαντικά εκείνη των αρσενικών της φυλής S10.3 ( $\chi^2=21,930$ ,  $df=1$ ,  $P<0,001$ ) (Διάγραμμα 2).

Τέλος, η έκθεση στο αιθέριο έλαιο του πορτοκαλιού δεν επηρέασε σημαντικά το χρόνο έως την έναρξη της σύζευξης των αρσενικών με τα θηλυκά σε καμιά από τις τρεις φυλές που μελετήθηκαν ( $t=0,777$ ,  $df=98$ ,  $P=0,439$ ,  $t=1,053$ ,  $df=98$ ,  $P=0,295$  και  $t=-1,852$ ,  $df=55$ ,  $P=0,069$  για τη φυλή του Μπενακειού, την 88.6 και την S10.3 αντίστοιχα) (Διάγραμμα 3) ούτε επίσης τη διάρκεια της σύζευξης μεταξύ εκτεθειμένων και μη αρσενικών ( $t=-0,654$ ,  $df=98$ ,  $P=0,515$ ,  $t=-0,725$ ,  $df=98$ ,  $P=0,470$  και  $t=0,594$   $df=55$ ,  $P=0,555$  για τη φυλή του Μπενακειού, την 88.6 και την S10.3 αντίστοιχα) (Διάγραμμα 4).

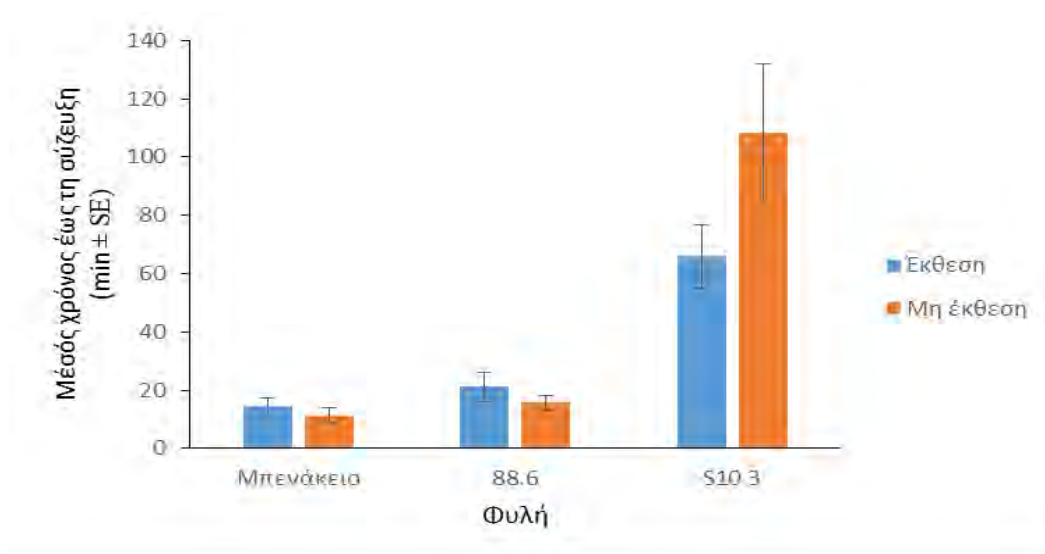


**Διάγραμμα 1.** Ποσοστά σύζευξης αρσενικών της μύγας της Μεσογείου που προέρχονταν από τις τρεις εργαστηριακές φυλές με θηλυκά της αντίστοιχης φυλής τους, ανεξάρτητα από την έκθεση ή μη των αρσενικών σε αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού. Ποσοστά που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν σημαντικά ( $P=0,017$  μετά από εφαρμογή της διόρθωσης κατά Bonferroni 0.05/n όπου n ο αριθμός των μεταχειρίσεων μεταξύ των οποίων γίνονται οι συγκρίσεις,  $\chi^2$  κριτήριο).

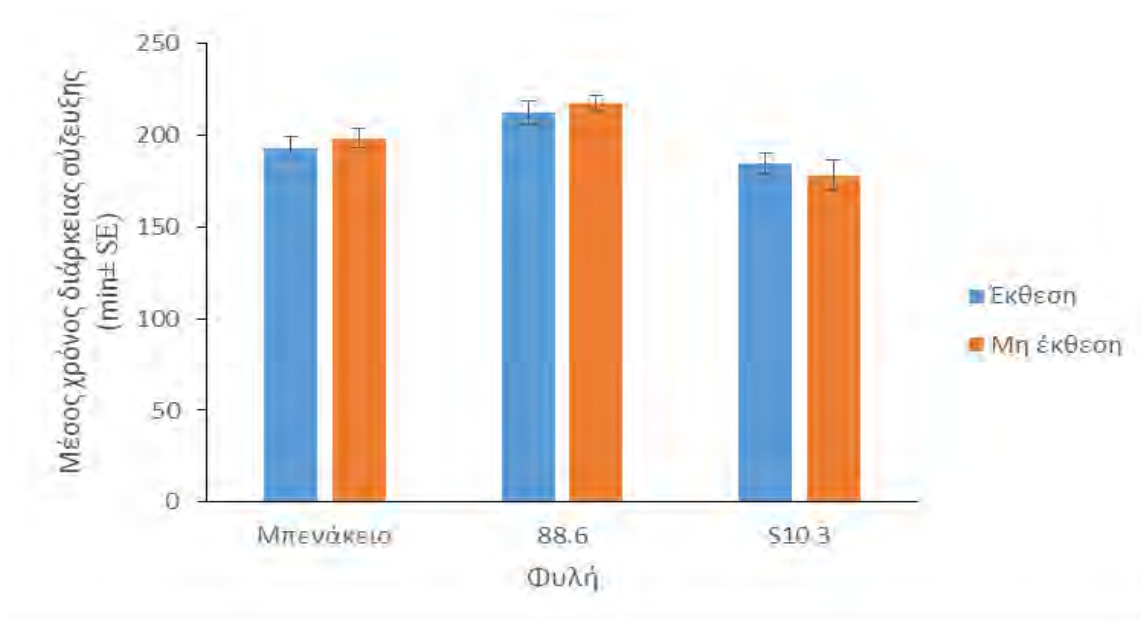


**Διάγραμμα 2.** Επίδραση της έκθεσης στο αιθέριο έλαιο του πορτοκαλιού στην ανταγωνιστικότητα σύζευξης των αρσενικών των τριών εργαστηριακών φυλών της μύγας της Μεσογείου για θηλυκά της ίδια φυλής (\* $P=0,017$  μετά από εφαρμογή της διόρθωσης κατά Bonferroni 0.05/n όπου n ο αριθμός των μεταχειρίσεων μεταξύ των οποίων γίνονται οι συγκρίσεις,  $\chi^2$  κριτήριο).





**Διάγραμμα 3.** Επίδραση της έκθεσης των αρσενικών στο αιθέριο έλαιο του πορτοκαλιού στο χρόνο που μεσολάβησε έως την έναρξη της σύζευξης με θηλυκά της ίδιας φυλής στους τρεις εργαστηριακούς πληθυσμούς της μύγας της Μεσογείου .



**Διάγραμμα 4.** Επίδραση της έκθεσης των αρσενικών στο αιθέριο έλαιο του πορτοκαλιού στη διάρκεια σύζευξής τους με θηλυκά της ίδιας φυλής στους τρεις εργαστηριακούς πληθυσμούς της μύγας της Μεσογείου.

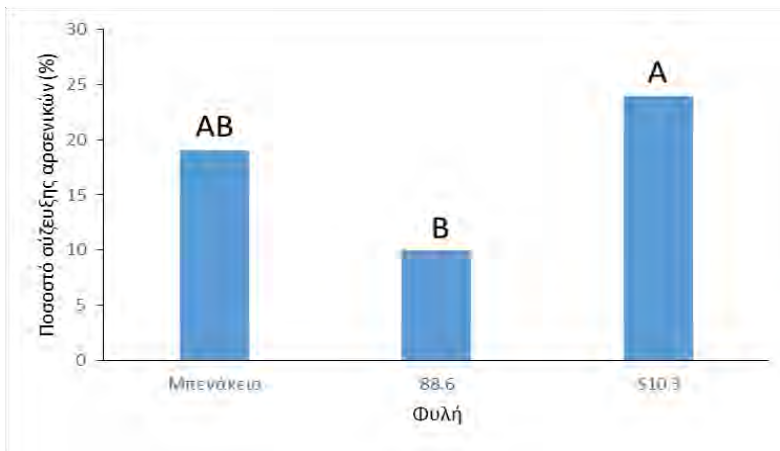


3.2 Επίδραση των αιθέριων ελαίων του πορτοκαλιού στην ανταγωνιστικότητα σύζευξης των αρσενικών των εργαστηριακών φυλών με θηλυκά ενός φυσικού πληθυσμού που εγκαταστάθηκαν πρόσφατα στο εργαστήριο.

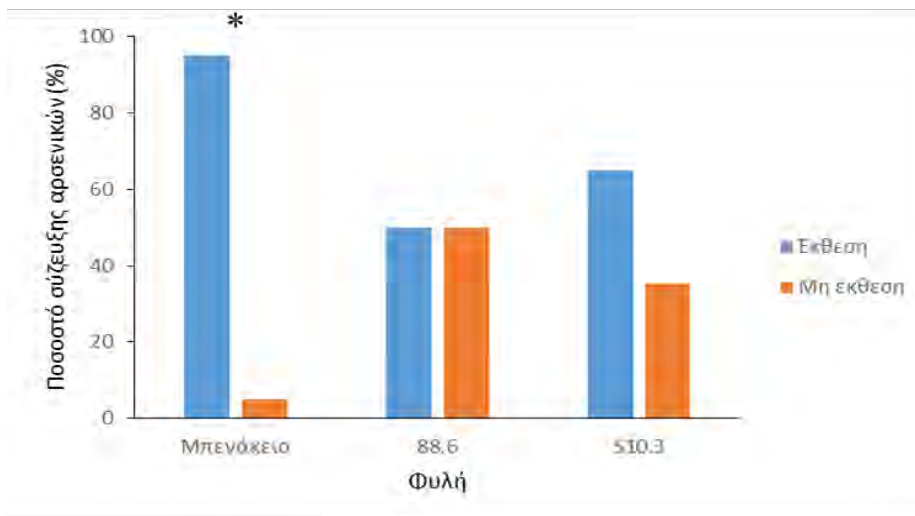
Τα ποσοστά σύζευξης μεταξύ των αρσενικών ατόμων των εργαστηριακών φυλών της μύγας της Μεσογείου με θηλυκά άτομα του φυσικού πληθυσμού διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους ( $\chi^2= 6,190$ ,  $df=2$ ,  $P=0,045$ ). Το ποσοστό σύζευξης των αρσενικών της φυλής S10.3 ήταν σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με εκείνο της φυλής 88.6 ( $\chi^2= 6,071$ ,  $df=1$ ,  $P=0,014$ ). Αντιθέτως, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ της φυλής S10.3 και εκείνης του Μπενακείου ( $\chi^2= 0,611$ ,  $df=1$ ,  $P=0,435$ ) καθώς επίσης και της φυλής 88.6 και του Μπενακείου ( $\chi^2= 3,267$ ,  $df=1$ ,  $P=0,071$ ) (Διάγραμμα 5).

Η έκθεση στο αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού αύξησε σημαντικά την ανταγωνιστικότητα σύζευξης των αρσενικών της φυλής του Μπενακείου ως προς τα θηλυκά του φυσικού πληθυσμού ( $\chi^2=32,400$   $df=1$ ,  $P<0,001$ ). Αντιθέτως δε είχε σημαντική επίδραση στην ανταγωνιστικότητα των αρσενικών τόσο της φυλής 88.6 ( $\chi^2=0,000$   $df=1$ ,  $P=1,000$ ) όσο και της S10.3 ( $\chi^2=2,941$   $df=1$ ,  $P=0,086$ ) (Διάγραμμα 6).

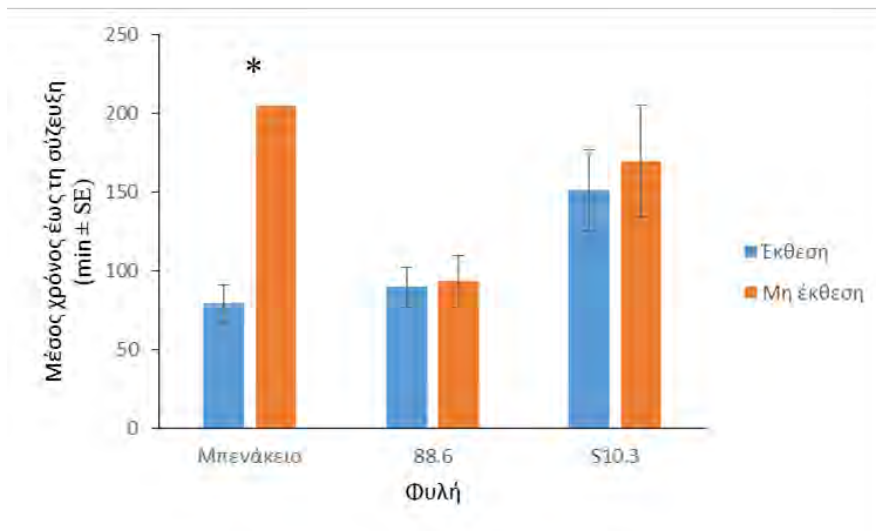
Τέλος, η έκθεση στο αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού μείωσε σημαντικά το χρόνο έως τη σύζευξη των αρσενικών της φυλής του Μπενακείου ( $t= 2.389$ ,  $df=18$ ,  $P= 0,028$ ) και παράλληλα αύξησε σημαντικά τη διάρκεια της σύζευξής τους με τα θηλυκά του φυσικού πληθυσμού ( $t= -2,947$ ,  $df=17$ ,  $P= 0,009$ ) (Διάγραμμα 7 & 8). Αντιθέτως, η έκθεση στο αιθέριο έλαιο του πορτοκαλιού δεν είχε σημαντική επίδραση στο χρόνο έως τη σύζευξη των αρσενικών της φυλή 88.6 και S10.3 ( $t=-0,192$ ,  $df=8$ ,  $P= 0,853$  και  $t= -0,433$ ,  $df=15$ ,  $P= 0,671$  αντίστοιχα) καθώς επίσης και στη διάρκεια της σύζευξής τους ( $t=0,580$ ,  $df=8$ ,  $P= 0,578$  και  $t= -0,428$ ,  $df=11$ ,  $P= 0,677$  αντίστοιχα) (Διάγραμμα 7 & 8).



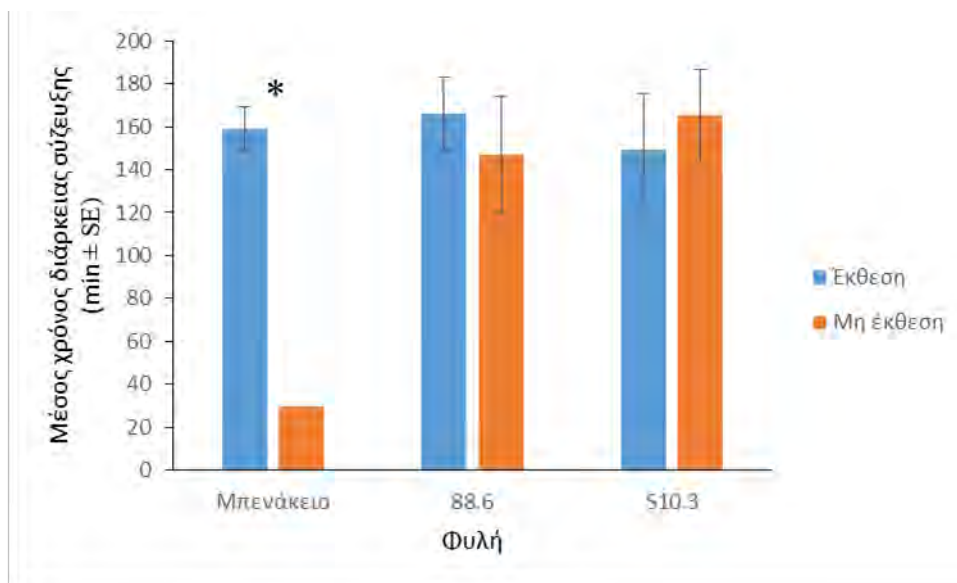
**Διάγραμμα 5.** Ποσοστά συζεύσεων αρσενικών της μύγας της Μεσογείου που προέρχονταν από τις τρεις εργαστηριακές φυλές με θηλυκά ενός φυσικού πληθυσμού που εγκαταστάθηκε πρόσφατα στο εργαστήριο, ανεξάρτητα από την έκθεση ή μη των αρσενικών σε αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού. Ποσοστά που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν σημαντικά ( $P=0,017$  μετά από εφαρμογή της διόρθωσης κατά Bonferroni 0.05/n όπου n ο αριθμός των μεταχειρίσεων μεταξύ των οποίων γίνονται οι συγκρίσεις,  $\chi^2$  κριτήριο).



**Διάγραμμα 6.** Επίδραση της έκθεσης στο αιθέριο έλαιο του πορτοκαλιού στην ανταγωνιστικότητα σύζευξης των αρσενικών των τριών εργαστηριακών φυλών της μύγας της Μεσογείου για θηλυκά ενός φυσικού πληθυσμού που εγκαταστάθηκε πρόσφατα στο εργαστήριο (\* $P=0,017$  μετά από εφαρμογή της διόρθωσης κατά Bonferroni 0.05/n όπου n ο αριθμός των μεταχειρίσεων μεταξύ των οποίων γίνονται οι συγκρίσεις,  $\chi^2$  κριτήριο).



**Διάγραμμα 7.** Επίδραση της έκθεσης των αρσενικών στο αιθέριο έλαιο του πορτοκαλιού στο χρόνο που μεσολάβησε έως την έναρξη της σύζευξης με θηλυκά ενός φυσικού πληθυσμού που εγκαταστάθηκε πρόσφατα στο εργαστήριο στους τρεις εργαστηριακούς πληθυσμούς της μύγας της Μεσογείου. (\* $P < 0.05$ ,  $t$  κριτήριο)



**Διάγραμμα 8.** Επίδραση της έκθεσης των αρσενικών στο αιθέριο έλαιο του πορτοκαλιού στη διάρκεια σύζευξής τους με θηλυκά ενός φυσικού πληθυσμού που εγκαταστάθηκε πρόσφατα στο εργαστήριο στους τρεις εργαστηριακούς πληθυσμούς της μύγας της Μεσογείου. (\* $P < 0.05$ ,  $t$  κριτήριο).

#### 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προέκυψε ότι:

α) ο αριθμός συζεύξεων όταν τα αρσενικά και τα θηλυκά προέρχονταν από την ίδια εργαστηριακή φυλή, ήταν μεγαλύτερος από τον αριθμό των συζεύξεων που πραγματοποιήθηκαν, όταν τα θηλυκά προέρχονταν από φυσικό πληθυσμό.

β) στη φυλή S10.3 τα ποσοστά συζεύξεων ήταν μικρότερα σε σχέση με τις φυλές Μπενάκειο και 88.6 όταν τα θηλυκά ανήκαν στις αντίστοιχες φυλές. Αντίθετα παρουσιάστηκαν υψηλότερα ποσοστά συζεύξεων για τη φυλή S10.3 σε σχέση με τη φυλή 88.6, όταν τα θηλυκά προέρχονταν από τον άγριο πληθυσμό. Αποδεικνύοντας έτσι ότι τα θηλυκά φυσικού πληθυσμού είναι περισσότερο δεκτικά στα αρσενικά της S10.3 φυλής σε σχέση με τα αρσενικά της 88.6. Όσον αφορά τη φυλή Μπενάκειο δεν σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές τόσο με την S10.3 όσο και με την 88.6 φυλή.

γ) όταν χρησιμοποιήθηκαν θηλυκά από την αντίστοιχη φυλή, τα αιθέρια έλαια πορτοκαλιού αύξησαν την σεξουαλική ανταγωνιστικότητα των αρσενικών της S10.3, ενώ τη μείωσαν για τα αρσενικά της 88.6. Για τη φυλή Μπενάκειο οι διαφορές στα ποσοστά συζεύξεων δεν ήταν μεγάλες με βάση την έκθεση των αρσενικών στα αιθέρια έλαια πορτοκαλιού.

δ) όταν χρησιμοποιήθηκαν θηλυκά από φυσικό πληθυσμό, τα αιθέρια έλαια πορτοκαλιού αύξησαν κατά πολύ την σεξουαλική ανταγωνιστικότητα των αρσενικών της φυλής Μπενάκειο. Αντιθέτως δεν επηρεάστηκαν οι φυλές 88.6 και της S10.3.

ε) η έκθεση στα αιθέρια έλαια πορτοκαλιού δεν επηρέασε τον χρόνο υστέρησης, δηλαδή τον μέσο χρόνο που χρειάστηκαν για την έναρξη της σύζευξης, στη φυλή Μπενάκειο, 88.6 και S10.3 όταν χρησιμοποιήθηκαν θηλυκά της αντίστοιχης φυλής.

ζ) η έκθεση στα αιθέρια έλαια δεν επηρέασε τον χρόνο υστέρησης της σύζευξης των φυλών 88.6 και S10.3 όταν χρησιμοποιήθηκαν θηλυκά φυσικού πληθυσμού. Για την φυλή Μπενάκειο όταν τα αρσενικά εκτέθηκαν σε αιθέρια έλαια πορτοκαλιού ο χρόνος υστέρησης για σύζευξη μειώθηκε σημαντικά.

η) τα αιθέρια έλαια πορτοκαλιού και η μολυσματική κατάσταση των εντόμων δεν επηρέασε τη διάρκεια σύζευξης για τις φυλές S10.3, 88.6 και Μπενάκειο όταν χρησιμοποιήθηκαν θηλυκά των αντίστοιχων φυλών.

θ) η έκθεση στο αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού επηρέασε σημαντικά τη διάρκεια σύζευξης της φυλής Μπενάκειο όταν τα θηλυκά προέρχονταν από φυσικό πληθυσμό. Αντίθετα στις φυλές S10.3 και 88.6 δεν επηρεάστηκε ο μέσος χρόνος σύζευξης από το αιθέριο έλαιο και την μολυσματική κατάσταση των αρσενικών που συζεύχθηκαν με άγρια θηλυκά.

Από τα ανωτέρω αποτελέσματα παρατηρήθηκε ιδιαίτερη σχέση στον χρόνο υστέρησης των συζεύξεων της φυλής Μπενάκειο μεταξύ των εκτεθειμένων και των μη εκτεθειμένων αρσενικών όταν χρησιμοποιήθηκαν θηλυκά από φυσικό πληθυσμό. Συγκεκριμένα ο μέσος χρόνος που χρειάστηκε για την έναρξη της σύζευξης μειώθηκε σημαντικά με την παρουσία αιθέριων ελαίων πορτοκαλιού ( $P < 0,001$ ), αποδεικνύοντας ότι τα θηλυκά έχουν την τάση να ξεκινούν νωρίτερα τη σύζευξη τους με τα εκτεθειμένα αρσενικά εξαιτίας της παρουσίας των αιθέριων ελαίων πορτοκαλιού. Η προτίμηση των εκτεθειμένων αρσενικών από τα θηλυκά του φυσικού πληθυσμού φαίνεται και από τη διάρκεια σύζευξης που σημειώθηκε αφού αυξήθηκε σε μεγάλο βαθμό ( $P = 0,009$ ).

Επιπρόσθετα, σημαντική είναι η σχέση που παρουσίασαν τα αρσενικά της φυλής S10.3 με τα θηλυκά του φυσικού πληθυσμού. Ο αριθμός συζεύξεων της φυλής S10.3 διέφερε σημαντικά από εκείνο της φυλής 88.6 ( $P = 0,014$ ), συμπεραίνοντας ότι τα θηλυκά του φυσικού πληθυσμού τείνουν να συζευγνύονται περισσότερο με τα αρσενικά της S10.3 σε σχέση με την επίσης μολυσματική φυλή 88.6. Παρο' όλα αυτά η σεξουαλική ανταγωνιστικότητα των αρσενικών της φυλής S10.3 δεν φάνηκε να επηρεάζεται από την

έκθεση τους στα αιθέρια έλαια ( $P=0,086$ ). Αντίθετα στα αρσενικά της φυλής Μπενάκειο αυξήθηκε η ανταγωνιστικότητα τους με την έκθεση σε αιθέρια έλαια πορτοκαλιού προς τα θηλυκά του φυσικού πληθυσμού ( $P<0,001$ ).

Ανεξάρτητα από την έκθεση τους σε αιθέρια έλαια πορτοκαλιού, οι μολυσμένες με το βακτήριο *Wolbachia* φυλές του *Ceratitis capitata* παρουσιάζουν μειωμένα ποσοστά σύζευξης με τα θηλυκά των φυσικών πληθυσμών. Όμως όπως προαναφέρθηκε η φυλή S10.3 πραγματοποίησε περισσότερες συζεύξεις σε σχέση με την φυλή 88.6. Ως πιθανή αιτία μπορεί να προταθεί η διαφορετική επίδραση των βακτηριακών στελεχών *Wolbachia* με το οποίο είναι μολυσμένες (η S10.3 με το *wCer4* και η 88.6 με το *wCer2*). Παρόμοια συμπεράσματα προέκυψαν από πειράματα που διεξήχθησαν στον ίδιο εργαστηριακό χώρο, με μοναδική διαφορά ότι τα αρσενικά όλων των φυλών τρέφονταν με ζάχαρη και πρωτεΐνη (Γεωργάκη 2018). Τα διαφορετικά βακτηριακά στελέχη, φαίνεται να επηρεάζουν σε διαφορετικό βαθμό την ανταγωνιστικότητα των αρσενικών παρουσία άγριων θηλυκών χωρίς ωστόσο να έχει βρεθεί η ακριβής αιτία αυτής της συμπεριφοράς (Κυρίτσης 2016).

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, συμπεραίνεται ότι τόσο η έκθεση σε αιθέρια έλαια όσο και η μολυσματική κατάσταση ή όχι των διαφορετικών εργαστηριακών φυλών επηρέασε την σεξουαλική ανταγωνιστικότητα των αρσενικών έναντι των θηλυκών του φυσικού πληθυσμού. Έντονο ενδιαφέρον παρουσιάζει το προβάδισμα της φυλής S10.3 έναντι της φυλής 88.6 στα ποσοστά συζεύξεων που προέκυψαν με τα θηλυκά του φυσικού πληθυσμού. Η σημασία των αιθέριων ελαίων είναι εμφανής στην επιτυχία σύζευξης των άγριων αρσενικών (Paradopoulos et al. 2001). Στο παρόν πείραμα η έκθεση στα αιθέρια έλαια πορτοκαλιού ενίσχυσε τη σεξουαλική ανταγωνιστικότητα των αρσενικών της φυλής Μπενάκειο, ενώ τα ποσοστά συζεύξεων που πραγματοποίησαν τα εκτεθειμένα αρσενικά της φυλής S10.3 δεν είχαν σημαντικά μεγαλύτερη στατιστική διαφορά έναντι των μη εκτεθειμένων. Ως πιθανή αιτία μπορεί να προταθεί η έλλειψη πλούσιας διατροφής, δηλαδή πρωτεΐνης και ζάχαρης, καθώς τα ενεργειακά αποθέματα των αρσενικών πρέπει να είναι αυξημένα για διαδικασίες χρονοβόρες και ενεργοβόρες όπως είναι η έκλυση της σεξουαλικής φερομόνης όσο και η μετέπειτα ερωτοτροπία τους

(Prokopy & Hendrichs 1979). Σε έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί, βρέθηκε ότι όταν προστέθηκε αιθέριο ελαίο πιπερόριζας στη διατροφή στείρων εντόμων τα αποτελέσματα στην σεξουαλική ανταγωνιστικότητα των αρσενικών ήταν θετικά (Juan Blasco et al. 2013). Όποτε για την βελτίωση της τεχνικής του ασύμβατου εντόμου, προτείνεται η χρήση της εργαστηριακής φυλής S10.3 σε έρευνες που θα ακολουθήσουν, σε συνδιασμό με πλούσια διατροφή, που θα περιλαμβάνει διαφορετικές δόσεις αιθέριων ελαίων πορτοκαλιού, για την εύρεση της αποτελεσματικότερης χρήσης. Επίσης, η διαίτα των προνυμφών είναι γνωστό ότι επηρεάζει την σεξουαλική επιτυχία των αρσενικών (Kaspi et al. 2002, Daniele Merli et al. 2018), όποτε προτείνεται επιπλέον η χρήση των αιθέριων ελαίων στη διατροφή των προνυμφών. Σε μία πιο πρόσφατη έρευνα βρέθηκε ότι πτητικές ουσίες που βρίσκονται σε διαφορετικά διατροφικά περιβάλλοντα στα οποία αναπτύχθηκαν οι προνύμφες εμφανίζονται και μετέπειτα στα συστατικά της φερομόνης των αρσενικών επηρεάζοντας τη χημική σύσταση της (Daniele Merli et al, 2018). Επομένως η χρήση του αιθέριου ελαίου πορτοκαλιού ή συστατικών αυτού, τόσο στη διατροφή των προνυμφών όσο και των ενηλίκων μπορεί να έχει ως αποτελέσματα την άυξηση της ανταγωνιστικότητας της φυλής S10.3 ενώ ταυτόχρονα μπορούν να πραγματοποιηθούν εκτενέστερες μελέτες πάνω στους μηχανισμούς δράσης των χημικών συστατικών στην αύξηση του σεξουαλικού καλέσματος των αρσενικών.

## Βιβλιογραφία

### Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

- Arita L.H., Kaneshir K.Y. (1989) Sexual Selection and Lek Behavior in the Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Pacific science. University of Hawaii Publisher, 43:135-143.
- Augustinos A., Rajamohan A., Kyritsis G. A., Zacharopoulou A., Haq I., Targovska A., Caceres C., Bourtzis K., M.Abd-Alla A. M. (2016) Cryopreservation of Embryos of the Mediterranean Fruit Fly *Ceratitis capitata*, Vienna 8 Genetic Sexing Strain.
- Bertina S., Scolaria F., Guglielminob C. R., Bonizzonia M., Bonomia A., Marchinic D., Gomulskia L. M., Gasperia G., Malacridaa A. R., Matessid C. (2010) Sperm storage and use in polyandrous females of the globally invasive fruitfly, *Ceratitis capitata*. Journal of Insect Physiology. Elsevier publisher, 56: 1542-1551.
- Blasco M. J., San Andres V., Martínez-Utrillas M. A., Argiles R., Pla I., Urbaneja A., Sabater-Mun B(2013) Alternatives to ginger root oil aromatherapy for improved mating performance of sterile *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) males. Journal of applied Entomology. Wiley Blackwell Publisher, Valencia Spain, 137:244-251.
- Caceres C. (2002) Mass rearing of temperature sensitive genetic sexing strains in the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*). Genetica Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 116: 107-16.
- Carey J. R. (1984) Host specific demographic studies of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. Ecological Entomology. University of California, 9: 261-270.
- Castillo M. A., Moya P., Hernández E., Primo-Yúfera E. (2000) Susceptibility of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) to Entomopathogenic Fungi and Their Extracts. Biological Control. Elsevier Publishers, New York, 19: 274-282.



- Charlat S., Davies N., Roderick G. K, Hurst G. (2007) Disrupting the timing of Wolbachia induced male killing: Evolutionary Biology. *Biology Letters* Publisher, 3: 154-156
- De Meyer MD. (2000) Systematic revision of the subgenus *Ceratitidis* MacLeay S.S. (Diptera, Tephritidae). *Zoological Journal*. The Linnean Society of London Publisher, 128: 439-467.
- Dyck VA, Hendrichs J & Robinson AS. (2005) *Sterile Insect Technique Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. Springer Publisher, The Netherlands
- Harbi A., Luis P., Ferrara F. A., Tormos J., Chermiti B., Beitia F., Sabater-Munoz B. (2019) *Diachasmimorpha longicaudata*, Parasitism Response to Medfly Host Fruit and Fruit Infestation Age.
- Karagoz M, Gulcu B., Hazir C., Kaya H.K., Hazir S. (2009) Biological control potential of Turkish entomopathogenic nematodes against the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata*. *Phytoparasitica*. Springer Nature Switzerland Publisher, 37: 153–159.
- Katsoyannos B. I., Kouloussis N. A., Papadopoulos N. T. (1997) Response of *Ceratitidis capitata* to citrus chemicals under semi-natural conditions. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. Kluwer Academic Publishers, Belgium, 82: 181–188
- Kouloussis N. A., Gerofotis C. D., Ioannou C. S., Iliadis I. V., Papadopoulos N. T., Koveos D. S. (2017) Towards improving sterile insect technique: Exposure to orange oil compounds increases sexual signalling and longevity in *Ceratitidis capitata* males of the Vienna 8 GSS.
- Kouloussis N. A., Katsoyannos B. I., Papadopoulos N. T., Ioannou C. S., Iliadis I. V. (2013) Enhanced mating competitiveness of *Ceratitidis capitata* males following exposure to citrus compounds. *Journal of applied Entomology*. Wiley Blackwell Publisher, 137. 30-38.
- Merli D, Mannucci B., Bassetti F., Corana F., Falchetto M., Malacrida A. R., Gasperi G., Scolari F. (2018) Larval Diet Affects Male Pheromone Blend in a Laboratory Strain of the Medfly, *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Chemical Ecology*. Springer Nature Switzerland Publisher, 44: 339-353

- Nishida R., Shelly T. E., Whittier T. S., Kaneshiro K. Y. (2000) a-copaene, a potential rendezvous cue for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*?. Journal of Chemical Ecology. Springer Nature Switzerland Publisher, 26: 87-100
- Papachristos D.P., Kimbaris A.C., Papadopoulos N.T., Polissiou M.G. (2009) Toxicity of citrus essential oils against *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) larvae. Annals of Applied Biology. John Wiley & Sons Publisher, 155: 381-389.
- Papadopoulos N. T. (2014) Historical, Biological, Economic Aspects and Management. Trapping Tephritid Fruit Flies. Springer Science Publisher, Florida, pp: 219-252.
- Papadopoulos NT. (2008) Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Encyclopedia of entomology. Springer Science, pp: 2318-2322.
- Papadopoulos N. T, Katsoyannos Byron I. (2003) Field parasitism of *Ceratitis capitata* larvae by *Aganaspis daci* in Chios, Greece. BioControl. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 48: 191-195.
- Papadopoulos N.T., Katsoyannos B.I., Carey J. R., Kouloussis N. A. (2001) Seasonal and Annual Occurrence of the Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) in Northern Greece. Annals of the Entomological Society of America. Oxford University Press Publisher, 94: 41-50
- Papadopoulos Nikos T., Katsoyannos B. I., Kouloussis N. A., Hendrichs J. (2001) Effect of orange peel substances on mating competitiveness of male *Ceratitis capitata*. Entomologia Experimentalis et Applicata. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 99: 253–261
- Papadopoulos N. T., Papachristos D. P., Ioannou C. (2015) Citrus Fruits and the Mediterranean Fruit Fly, pp: 1009-1018.
- Papadopoulos N. T, Shelly T. E., Niyazi N., Jang E. (2006) Olfactory and Behavioral Mechanisms Underlying Enhanced Mating Competitiveness Following Exposure to Ginger Root Oil and Orange Oil in Males of the Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Journal of Insect Behavior. Springer Nature Switzerland Publisher, pp: 403-418

- Pereira R., Yuval B., Liedo P., Tal P. E. A., Shelly T. E., McInnis D. O., Hendrichs J. (2011) Improving sterile male performance in support of programmes integrating the sterile insect technique against fruit flies. *Journal of applied Entomology*, 137: 178-190
- Prokopy R. J., Hendrichs J. (1979) Mating Behavior of *Ceratitidis capitata* on a Field-Caged Host Tree. *Entomological Society of America, Mexico City*, 72: 642-648.
- Qazzaz F. O., Al-Masri M. I., Barakat R. M. 2015. Effectiveness of *Beauveria bassiana* Native Isolates in the Biological Control of the Mediterranean Fruit Fly (*Ceratitidis capitata*). *Advances in Entomology*. Scientific Research Publisher, Hebron University, Palestine, 3: 44-55.
- Ros V. I. D., Fleming V. M., Feil E. J., Breeuwer J. A. J. (2009) How Diverse Is the Genus *Wolbachia*? Multiple-Gene Sequencing Reveals a Putatively New *Wolbachia* Supergroup Recovered from Spider Mites (Acari: Tetranychidae). *Applied and Environmental Microbiology*, The Netherlands
- Ruang-Areerate T., Kittyapong P., Baimai V., O'Neill S. L. (2003) Molecular Phylogeny of *Wolbachia* Endosymbionts in Southeast Asian Mosquitoes (Diptera: Culicidae) Based on *wsp* Gene Sequences. *Journal of Medical Entomology*. Entomological Society of America Publisher, 40: 1036-1043.
- Ruiu L., Falchilgnazio G., Giovanna M. F. M., Mura M. E., Satta A. (2015) Pathogenicity and characterization of a novel *Bacillus cereus sensu lato* isolate toxic to the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata*. *Journal of Invertebrate Pathology*. Elsevier publisher, pp: 71-77
- Shelly T E., Mcinnis D. O. (2001) Exposure to Ginger Root Oil Enhances Mating Success of Irradiated, Mass-Reared Males of Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae). *Journal of economic entomology*. The Entomological Society of America, pp: 1413–1418.
- Stouthamer R., Kazmer D. J. (1994) Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. *The Genetical Society of Great Britain. Heredity*. California, pp: 317-327

- Suárez L. M., Biancheri J. B., Murúa F., Rull J., Ovruski S., Claudia de los Ríos, Escobar J., Schliserman P. (2018). An egg-laying device to estimate the induction of sterility in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of applied Entomology*. Wiley Blackwell Publisher, German, 143: 144-154.
- Tram U., Sullivan W. (2002) Role of Delayed Nuclear Envelope Breakdown and Mitosis in *Wolbachia*-Induced Cytoplasmic Incompatibility. *Science*. American Association for the Advancement of Science Publisher, 296: 1124-1126
- Vargas R. I., Miller N. W., Prokopy R. J. (2003) Attraction and feeding responses of Mediterranean fruit fly and a natural enemy to protein baits laced with two novel toxins, phloxine B and spinosad. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. The Netherlands Entomological Society, 102: 273-282
- Werren J. H. (1997) Biology of *Wolbachia*. *Annual Reviews of Entomology*. New York, pp: 587–609
- Zabalou S., Apostolaki A., Livadaras I., Franz G., Robinson A.S., Savakis C., Bourtzis K.. (2009) Incompatible insect technique : incompatible males from a *Ceratitis capitata* genetic sexing strain. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. The Netherlands Entomological Society Publishers, Netherlands, 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.

### Ελληνική Βιβλιογραφία

- Ιωάννου Χ. (2014) Μελέτη φυτικών ερεθισμάτων που επηρεάζουν την ωοτοκία και άλλες βιολογικές παραμέτρους της μύγας της *Ceratitis Capitata* (Diptera: Tephritidae). Διδακτορική διατριβή, Θεσσαλονίκη.
- Κυρίτσης Α. Γ. (2016) Επίδραση ενδοσυμβιωτικών μικροοργανισμών στη συμπεριφορά και βιολογία της μύγας της Μεσογείου (Diptera: Tephritidae). Διδακτορική διατριβή, Βόλος.

- Παπαδόπουλος Ν.Θ, Σταυρίδης Δ.Γ, Ζάρπας Κ.Δ και Διαμαντίδης Α.Δ (2012) Η μύγα της Μεσογείου στην Ελλάδα: υφιστάμενη κατάσταση και σχεδιασμός της αντιμετώπισής της. Γεωργία - Κτηνοτροφία, τεύχος 7/201238. Σελ. 38-46
- Παπαναστασίου Σ. Α (2014) Επίδραση της ηλικίας και άλλων παραγόντων στη συμπεριφορά της μύγας της Μεσογείου, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Διδακτορική Διατριβή, Βόλος.
- Τζανακάκης ΜΕ, Κατσόγιαννος ΒΙ (2003) Έντομα Καρποφόρων Δέντρων και Αμπέλου Εκδόσεις ΑγροΤύπος, Αθήνα.