

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού
Περιβάλλοντος

Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας

Επίδραση της μόλυνσης με *Wolbachia* στην αντοχή
στο ψύχος ενηλίκων της μύγας της Μεσογείου

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΙΡΗΝΑΙΟΣ ΧΑΤΖΗΦΙΛΙΠΠΟΥ



ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

Νικόλαος Παπαδόπουλος, καθηγητής

Νέα Ιωνία, Βόλος, 2016



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ & ΚΕΝΤΡΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 16345/1
Ημερ. Εισ.: 12/06/2017
Δωρεά: Συγγραφέα
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ-ΦΠΑΠ
2016
ΧΑΤ

Επίδραση της μόλυνσης με *Wolbachia* στην αντοχή
στο ψύχος ενηλίκων της μύγας της Μεσογείου

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Παπαδόπουλος Νικόλαος (Επιβλέπων) Καθηγητής

Αθανασίου Χρήστος (Μέλος)

Αναπληρωτής Καθηγητής

Βέλλιος Ευάγγελος (Μέλος)

Επίκουρος Καθηγητής

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή κ. Νικόλαο Παπαδόπουλο για την ανάθεση του θέματος, τη βοήθειά και καθοδήγηση που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Δρ. Κωνσταντίνο Ζάρπα για την πολύτιμη βοήθειά του στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων και για τις επισημάνσεις κατά την ολοκλήρωση της πτυχιακής. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Γιώργο Κυρίτση για τη βοήθεια του στη διεκπεραίωση της στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων, την Νίκη Διονυσοπούλου, υποψήφια διδάκτορα για τη βοήθεια και καθοδήγηση κατά τη διάρκεια εκτέλεσης της πειραματικής διαδικασίας. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου που ήταν δίπλα μου κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη	
Abstract	
Εισαγωγή.....	1
1.1 Γενικά για τη μύγα της Μεσογείου	1
1.1.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά της μύγας της Μεσογείου	1
1.1.2 Ενήλικο	1
1.1.2 Αυγό.....	2
1.1.3 Προνύμφη	3
1.1.4 Νύμφη	4
1.1.5 Βιολογία – ζημιές του εντόμου	4
1.1.6 Γεωγραφική εξάπλωση	5
1.1.7 Ξενιστές	8
1.1.8 Οικονομική σημασία.....	9
1.1.9 Καταπολέμηση.....	11
1.2 Το ενδοκυτταρικό βακτήριο <i>Wolbachia ripientis</i> και επίδραση του στα έντομα	13
1.2.1 Ταξινόμηση	14
1.3 Μόλυνση της μύγας της Μεσογείου με <i>Wolbachia</i>	15
1.4 Εφαρμογή του <i>Wolbachia</i> στην αντιμετώπιση εντόμων	16
1.5 Σκοπός της εργασίας.....	18
Υλικά και Μέθοδοι.....	19
2.1 Συνθήκες εργαστηρίου	19
2.2 Εκτροφή της μύγας της Μεσογείου.....	19
2.3 Φυλές που χρησιμοποιήθηκαν	21
2.4 Κρυόλουτρο.....	21

2.5 Πειραματική διαδικασία	21
2.6 Στατιστική ανάλυση	24
Αποτελέσματα	25
3.1 Αντοχή εντόμων στους -2 °C	25
3.2 Αντοχή εντόμων στους -5 °C	31
3.3 Αντοχή εντόμων στους -10 °C	37
Συζήτηση	43
Συμπεράσματα	44
Βιβλιογραφία	45

Κατάλογος Πινάκων

- Πίνακας 1 . Ορισμένοι κύριοι και δευτερεύοντες ξενιστές της μύγας της Μεσογείου
- Πίνακας 2 . Ταξινόμηση *Wolbachia pipientis*, Integrated Taxonomic Information System, (www.its.gov)
- Πίνακας 3 . Αποτελέσματα διασταύρωσης αρσενικών και θηλυκών εντόμων, μολυσμένων ή μη μολυσμένων με *Wolbachia* όσον αφορά την εμφάνιση CI
- Πίνακας 4 . Περιπτώσεις στις οποίες έχει αναφερθεί η επαγόμενη από *Wolbachia* CI στις κύριες τάξεις και οικογένειες εντόμων (από Bourtzis, K., Thomas, AM 2006, Insect Symbiosis, Volume 2, CRC Press, United States of America, pp. 231)
- Πίνακας 5 . Πρότυπο λογιστικής παλινδρόμησης που αφορά στη θνησιμότητα ενηλίκων της μύγας της Μεσογείου στους -2° C.
- Πίνακας 6 . Πρότυπο λογιστικής παλινδρόμησης που αφορά στη θνησιμότητα ενηλίκων της μύγας της Μεσογείου στους -2° C.
- Πίνακας 7 . Πρότυπο λογιστικής παλινδρόμησης που αφορά στη θνησιμότητα ενηλίκων της μύγας της Μεσογείου στους -2° C.
- Πίνακας 8 . Πρότυπο λογιστικής παλινδρόμησης που αφορά στη θνησιμότητα ενηλίκων της μύγας της Μεσογείου στους -5° C.
- Πίνακας 9 . Πρότυπο λογιστικής παλινδρόμησης που αφορά στη θνησιμότητα ενηλίκων της μύγας της Μεσογείου στους -5° C.
- Πίνακας 10 . Πρότυπο λογιστικής παλινδρόμησης που αφορά στη θνησιμότητα ενηλίκων της μύγας της Μεσογείου στους -5° C.
- Πίνακας 11 . Πρότυπο λογιστικής παλινδρόμησης που αφορά στη θνησιμότητα ενηλίκων της μύγας της Μεσογείου στους -10° C.
- Πίνακας 12 . Πρότυπο λογιστικής παλινδρόμησης που αφορά στη θνησιμότητα ενηλίκων της μύγας της Μεσογείου στους -10° C.
- Πίνακας 13 . Πρότυπο λογιστικής παλινδρόμησης που αφορά στη θνησιμότητα ενηλίκων της μύγας της Μεσογείου στους -10° C.

Κατάλογος διαγραμμάτων

- Διάγραμμα 1 . Πιθανές οικονομικές απώλειες των ΗΠΑ σε περίπτωση εφαρμογής εμπάρκου από χώρες στις οποίες εξάγονται αγροτικά προϊόντα.
(από: <http://ucce.ucdavis.edu/files/repository/calag/fig4904p11.jpg>)
- Διάγραμμα 2 . Επίδραση της μόλυνσης με *Wolbachia* στη θνησιμότητα αρσενικών και θηλυκών της μύγας της Μεσογείου στους -2°C .
- Διάγραμμα 3 . Επίδραση της μόλυνσης με *Wolbachia* στη θνησιμότητα αρσενικών της μύγας της Μεσογείου στους -2°C .
- Διάγραμμα 4 . Επίδραση της μόλυνσης με *Wolbachia* στη θνησιμότητα θηλυκών εντόμων στους -2°C .
- Διάγραμμα 5 . Επίδραση της μόλυνσης με *Wolbachia* στη θνησιμότητα αρσενικών και θηλυκών της μύγας της Μεσογείου στους -5°C .
- Διάγραμμα 6 . Επίδραση της μόλυνσης με *Wolbachia* στη θνησιμότητα αρσενικών της μύγας της Μεσογείου στους -5°C .
- Διάγραμμα 7 . Επίδραση της μόλυνσης με *Wolbachia* στη θνησιμότητα θηλυκών της μύγας της Μεσογείου στους -5°C .
- Διάγραμμα 8 . Επίδραση της μόλυνσης με *Wolbachia* στη θνησιμότητα αρσενικών και θηλυκών της μύγας της Μεσογείου στους -10°C .
- Διάγραμμα 9 . Επίδραση της μόλυνσης με *Wolbachia* στη θνησιμότητα αρσενικών της μύγας της Μεσογείου στους -10°C .
- Διάγραμμα 10 . Επίδραση της μόλυνσης με *Wolbachia* στη θνησιμότητα θηλυκών της μύγας της Μεσογείου -10°C .

Κατάλογος Εικόνων

- Εικόνα 1 . Ενήλικο της μύγας της Μεσογείου σε καρπό πορτοκαλιού.
- Εικόνα 2 . Αυγά της μύγας της Μεσογείου.
(entnemdept.ufl.edu/creatures/fruit/mediterranean_fruit_fly.htm.)
- Εικόνα 3 . Προνύμφη της μύγας της Μεσογείου
(http://entnemdept.ufl.edu/creatures/fruit/mediterranean_fruit_fly04.jpg)
- Εικόνα 4 . Νύμφες διαφορετικού μεγέθους και χρωματισμού.
- Εικόνα 5 . Παγκοσμία γεωγραφική κατανομή της μύγας της Μεσογείου,
(European and Mediterranean plant protection (EPPO) 2015)
- Εικόνα 6 . Προνύμφες σε πορτοκάλι.
- Εικόνα 7 . Ενήλικο σε καρπό ροδακινιάς
(www.agric.wa.gov.au/fruit/fruit-trees-and-vine-protection)
- Εικόνα 8 . Παγίδα τύπου McPhail,
(www.ufosupplies.nl/upload/Product/Large/3126McPhailval008.jpg)
- Εικόνα 9 . Παγίδα τύπου Jackson,
(www.agric.wa.gov.au/sites/gateway/files/Jackson-trap-at-DM.jpg)
- Εικόνα 10 . Κοίλο πλαστικό ημισφαίριο (dome) με πλαστικό τρυβλίο (βάση) και δοχείο τοποθέτησης χυμού με σκοπό τη διέγερση της ωοτοκίας.
- Εικόνα 11 . Αυγά πάνω σε βαμβάκι.
- Εικόνα 12 . Ξύλινο κλουβί για την εκτροφή και διατήρηση των ενηλίκων.
- Εικόνα 13 . Τρυβλίο petri με τροφή ενηλίκων.
- Εικόνα 14 . Κρυόλουτρο.
- Εικόνα 15 . Δοκιμαστικοί σωλήνες μέσα στο κρυόλουτρο.
- Εικόνα 16 . Αναρροφητήρας.
- Εικόνα 17 . Δοκιμαστικός σωλήνας.
- Εικόνα 18 . Πλαστικό δοχείο.
- Εικόνα 19 . Συσκευή παροχής CO₂ - αναισθητοποίησης εντόμων.
- Εικόνα 20 . Πιστολάκι παροχής CO₂.
- Εικόνα 21 . Σωλήνας με βαμβάκι.
- Εικόνα 22 . Χωνί για μεταφορά εντόμων στο πλαστικό δοχείο.
- Εικόνα 23 . Σωλήνες εντός του κρυόλουτρου.

Περίληψη

Το ενδοκυτταρικό βακτήριο *Wolbachia pipientis* είναι ένα πολύ διαδεδομένο παράσιτο που επάγει πλήθος βιολογικών επιδράσεων στα έντομα ξενιστές του. Οι φυσικοί πληθυσμοί της μύγας της Μεσογείου δεν φέρουν προσβολή από τη *Wolbachia*, όμως τα τελευταία έτη έχουν δημιουργηθεί τεχνητά μολυσμένοι εργαστηριακοί πληθυσμοί με σκοπό τη χρήση τους σε προγράμματα καταπολέμησης που βασίζονται στη μέθοδο της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας. Υπάρχουν αρκετές μελέτες σχετικά με την επίδραση του *Wolbachia* στα βιολογικά χαρακτηριστικά των τεχνητά μολυσμένων στελεχών της μύγας της Μεσογείου, όμως δεν υπάρχουν στοιχεία για πιθανή επίδραση στην αντοχή στο ψύχος. Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν να μελετήσει την επίδραση της *Wolbachia* στην αντοχή στο ψύχος ενηλίκων της μύγας της Μεσογείου. Χρησιμοποιήθηκαν έντομα της φυλής «Μπενάκειο», τα οποία είτε έφεραν μόλυνση με τη φυλή wCer2 του βακτηρίου είτε παρέμειναν χωρίς μόλυνση. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες εργαστηρίου (25 ± 1 °C, $65 \pm 5\%$ Σ.Υ, 14:10 Φως; Σκοτάδι) στο Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Π.Θ. την περίοδο 2015-2016. Στην ηλικία των 5 ημερών ένας αριθμός αρσενικών και θηλυκών εντόμων αφού αναισθητοποιούνταν εκτίθονταν στους -2, -5 και -10 °C για διάφορα χρονικά διαστήματα. Η θνησιμότητα στους -2 °C ήταν περιορισμένη ακόμα και μετά από έκθεση 180 λεπτών ανεξάρτητα του στελέχους της μύγας της Μεσογείου, έκθεση για διάστημα μεγαλύτερο από 60 λεπτά στους -5° C επέφερε υψηλή θνησιμότητα, με το στέλεχος της μύγας της Μεσογείου να είναι σημαντικός εκτιμητής της θνησιμότητας. Χρόνοι έκθεσης μεγαλύτεροι των 20 λεπτών στους -10° C επέφεραν υψηλή θνησιμότητα σε όλα τα στελέχη της μύγας της Μεσογείου. Τόσο ο χρόνος έκθεσης όσο και τα φύλο και το στέλεχος ήταν σημαντικοί εκτιμητές της θνησιμότητας στους -10 °C. Τα παραπάνω αποτελέσματα δεν δίνουν σαφείς ενδείξεις για την επίδραση του *Wolbachia* στην αντοχή στο ψύχος της μύγας της Μεσογείου. Μελλοντικές μελέτες πρέπει να επικεντρωθούν σε υψηλότερη θερμοκρασία.

Abstract

The intracellular bacterium *Wolbachia pipientis* is a very widespread parasite that induces numerous biological effects on its host insects. Natural populations of medfly do not carry the *Wolbachia* but in recent years artificially infected laboratory populations have been created in order to be used in control programs based on the method of cytoplasmic incompatibility. There are several studies on the effect of *Wolbachia* in the biological characteristics of the artificially contaminated strains of Mediterranean fruit fly, but no data exist for the potential effects on resistance to cold. The purpose of this study was to examine the effect of *Wolbachia* in the resistance to cold of the medfly adults. The insects that were used came from «Benakeio» strain, which either carried the wCer2 race of the bacterium or remained without contamination. The experiments were conducted in laboratory conditions (25 ± 1 °C, $65 \pm 5\%$ RH, 14:10 Light: Dark) in the Laboratory of Entomology of Agricultural Zoology in the Department of Agriculture Crop Production and Rural Environment, University of Thessaly in the period 2015-2016. At the age of 5 days a number of male and female insects were exposed to -2, -5 and -10 °C for various time intervals after anesthetization. Mortality at -2 °C was limited even after 180 minutes of exposure regardless of the medfly strain, exposure for more than 60 minutes at -5 °C resulted in high mortality and the strain of the medfly was an important estimator of mortality. Exposure times longer than 20 minutes at -10 °C resulted in high mortality in all strains of the medfly. Exposure time, sex and strain were significant estimators of mortality at temperature -10 °C. The above results do not give clear indications on the effect of *Wolbachia* in the resistance to cold of the medfly. Future studies should focus on higher temperature.

Εισαγωγή

1.1 Γενικά για τη μύγα της Μεσογείου

Η μύγα της Μεσογείου γνωστή ως Mediterranean fruit fly (medfly), *Ceratitis capitata* (Wiedemann 1824) (Diptera: Tephritidae) κατατάσσεται στη φυλή (tribe) Ceratidini της υποοικογένειας Dacinae. Θεωρείται ένα από τα πιο επιζήμια έντομα για τα νωπά φρούτα και λαχανικά παγκοσμίως (White και Elson-Harris 1992, Papadopoulos 1999, Papadopoulos et al. 2001a) με τεράστια οικονομική σημασία.

Όσον αφορά την καταγωγή της μύγας της Μεσογείου με βάση πρόσφατες έρευνες στο τομέα της γενετικής η θεωρία που έχει επικρατήσει αναφέρει ότι αποτελεί έντομο ιθαγενές της Αφρικής και συγκεκριμένα της Κένυας αφού σε εκείνη την περιοχή οι πληθυσμοί εμφανίζουν τη μεγαλύτερη γενετική παραλλακτικότητα (Bonizzoni et al. 2000).

Υπάρχουν δυο θεωρίες όσο αφορά την εισβολή στις περιοχές της Μεσογείου. Η πρώτη υποστηρίζει ότι το έντομο εξαπλώθηκε μετακινούμενο από τη κοιλάδα του Νείλου και ακολούθως από την ακτογραμμή της Μέσης Ανατολής έφτασε στις δυτικότερες Μεσογειακές χώρες. Μια άλλη θεωρία αναφέρεται στην εξάπλωση από τη βόρεια – δυτική ακτή της Αφρικής και το Γιβραλτάρ στην Ισπανία όπου και εντοπίστηκε πρώτη φορά το 1843. Η πρώτη αναφορά της παρουσίας του εντόμου στην Ελλάδα έγινε το 1915 (Papadopoulos 2008, Παπαδόπουλος και συνεργάτες 2012).

1.1.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά της μύγας της Μεσογείου

1.1.2 Ενήλικο

Τα ενήλικα της μύγας της Μεσογείου έχουν μήκος 4-6 mm και πλάτος 1.2 - 2 mm (Εικόνα 1). Σύμφωνα με τους Τζανακάκη και Κατσόγιαννο (2003), το σώμα του εντόμου χαρακτηρίζεται από έντονο χρωματισμό με κηλίδες χρώματος κίτρινου, καστανού και μαύρου στο θώρακα και στις πτέρυγες. Η

κεφαλή είναι κίτρινη, σκοτεινότερη ανάμεσα στις βάσεις των κεραιών, ενώ ανάμεσα στους σύνθετους οφθαλμούς υπάρχουν μαύρες τρίχες. Οι πτέρυγες έχουν μήκος από τη βάση έως κορυφή περίπου 4,5 mm είναι διάφανες με μαύρες εγκάρσιες, κίτρινες και καστανές ζώνες και κηλίδες. Το ενήλικο όταν βρίσκεται σε στάση ηρεμίας ή όταν βαδίζει κρατά μισάνοιχτες τις πτέρυγες του, ενώ η οπίσθια παρυφή εμφανίζει κλίση ως προς το υπόστρωμα. Η κοιλιά εμφανίζει πορτοκαλοκίτρινο χρώμα με καστανέρυθρες εγκάρσιες ζώνες και πολυάριθμα λεπτά στίγματα. Η κοιλιά του θηλυκού παρουσιάζει λίγο μεγαλύτερο μήκος σε σχέση με το πλάτος, ενώ ο ωothέτης έχει μήκος 0,9-1,3 mm με κιτρινέρυθρο χρώμα και προς την άκρη καστανό. Στα αρσενικά ενήλικα υπάρχουν δυο έμμισχα ροπαλοειδή εξαρτήματα στην κεφαλή.



Εικόνα 1 . Ενήλικο της μύγας της Μεσογείου σε καρπό πορτοκαλιού

1.1.2 Αυγό

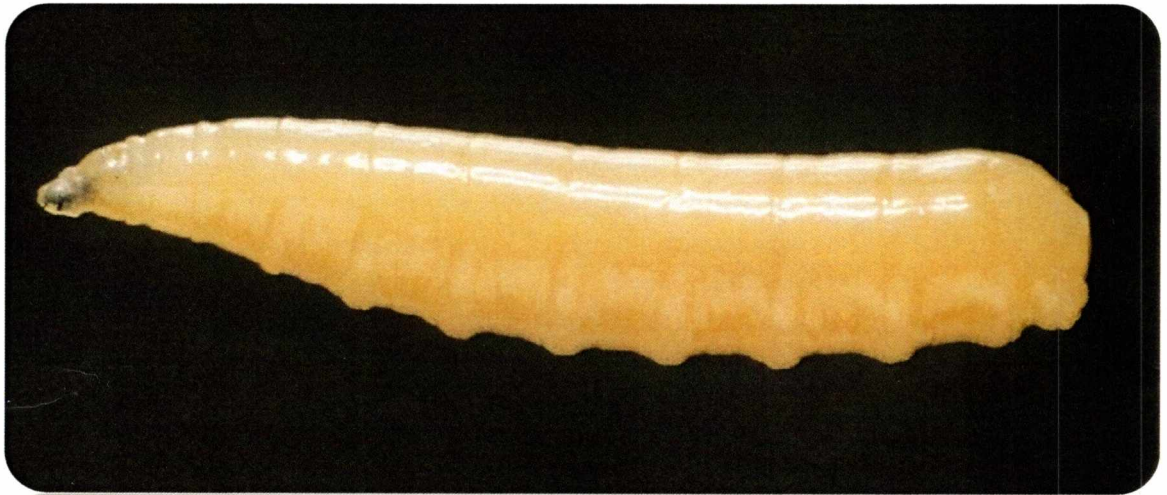
Τα αυγά είναι λευκά στενόμακρα, λεία σε σχήμα μπανάνας με διαστάσεις 0,9-1,1 x 0,2 mm (Εικόνα 2). Τα αυγά τοποθετούνται μέσω του ωothέτη των θηλυκών σε ώριμους ή ημιώριμους καρπούς. Η περίοδος εκκόλαψης διαφοροποιείται ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν. Σε συνθήκες εργαστηρίου τα αυγά εκκολάπτονται εντός δύο ημερών. Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες αγρού η περίοδος για την εκκόλαψη αυξάνεται στις 16-18 ημέρες.



Εικόνα 2. Αυγά της μύγας της Μεσογείου
(http://entnemdept.ufl.edu/creatures/fruit/mediterranean_fruit_fly.htm)

1.1.3 Προνύμφη

Οι προνύμφες είναι λευκοκίτρινου χρώματος, ακέφαλες, άποδες και στενότερες στο πρόσθιο μέρος. Οι διαστάσεις σε πλήρη ανάπτυξη στην τελευταία προνυμφική ηλικία είναι 7-9 x 1,5-2 mm (Εικόνα 3). Στην άκρη της κοιλιάς υπάρχουν δύο αναπνευστικά στίγματα που αποτελούνται από 3 στενόμακρα σε σχήμα σχισμής ανοίγματα το καθένα.



Εικόνα 3. Προνύμφη της μύγας της Μεσογείου
(http://entnemdept.ufl.edu/creatures/fruit/mediterranean_fruit_fly04.jpg)

1.1.4 Νύμφη

Οι νύμφες είναι ελλειψοειδείς με διαστάσεις 4-4,5 x 2,5 mm. Το χρώμα ποικίλει από ανοιχτοκαστανό έως σκοτεινοκαστανό ανάλογα με την τροφή που έχει καταναλώσει η προνύμφη (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Νύμφες διαφορετικού μεγέθους και χρωματισμού

1.1.5 Βιολογία – ζημιές του εντόμου

Η μύγα της Μεσογείου είναι πολυκυκλικό έντομο, έχει δηλαδή την ικανότητα να συμπληρώνει πολλές γενεές ανά έτος εφόσον αναπτύσσεται σε θερμό κλίμα και υπάρχουν ταυτόχρονα διαθέσιμοι καρποί. Λαμβάνοντας υπόψη το ευρύ φάσμα ξενιστών, μπορεί να εμφανιστεί από την περίοδο Ιουνίου σε ροδάκινα και βερίκοκα και να προσβάλει έως το χειμώνα τα εσπεριδοειδή ολοκληρώνοντας έτσι 6-7 γενεές με χαρακτηριστικό παράδειγμα την Ιταλία (Ευσταθίου 2007).

Σύμφωνα με τους Τζανακάκη και Κατσόγιαννο (2003) στην Ελλάδα θεωρείται ότι έχει 3-7 γενεές ανάλογα με την περιοχή, ενώ η διαχείμαση γίνεται κυρίως ως προνύμφη σε προσβεβλημένους καρπούς πάνω σε δέντρα, καρπούς στο έδαφος ή ακόμα και ως νύμφη στο έδαφος. Σε περιοχές με ήπιους χειμώνες όπως η Κρήτη ένα μικρό ποσοστό του πληθυσμού διαχειμάζει ως ενήλικο.

Η δραστηριοποίηση των εντόμων ξεκινάει την άνοιξη. Τα ενήλικα τρέφονται με σακχαρούχες και αζωτούχες ουσίες όπως νέκταρ, απεκκρίματα κοκκοειδών ή ουσίες που μπορούν να ρευστοποιήσουν με το σάλιο τους χρησιμοποιώντας τη μυζητική τους σπογγώδη προβοσκίδα (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003). Αφού τραφούν για λίγες ημέρες και ωριμάσουν αναπαραγωγικά (7-10 ημέρες), στη συνέχεια τα αρσενικά έντομα εκλύουν μια συζευκτική ορμόνη με την οποία ελκύουν τα θηλυκά με τα οποία στη συνέχεια συζευγνύονται (Papadopoulos 2008). Το θηλυκό μετά τη γονιμοποίηση ανοίγει σπή στο καρπό με τον ωθότη του και τοποθετεί στο επικάρπιο ή μεσοκάρπιο 1-6 αυγά. Συνήθως ωτοκεί σε σχισμές, τραύματα του φλοιού ή σε προηγούμενες σπές άλλων θηλυκών (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος). Κάθε θηλυκό δύναται να εναποθέσει από 250 έως και 1000 αυγά καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του (Papadopoulos 2008).

Το νύγμα ωτοκίας έχει διάμετρο 1 mm και περιβάλλεται από χλωρωτική κηλίδα 10 – 20 mm χρώματος πορτοκαλί ή κίτρινου η οποία δεν είναι ευδιάκριτη σε ώριμους καρπούς. Με τη διατροφή των προνυμφών το εσωτερικό του καρπού διαβρώνεται και καταστρέφεται. Στη σάρκα του καρπού μετά την προσβολή αναπτύσσονται δευτερογενείς μύκητες και βακτήρια που συντελούν στη σήψη του καρπού (Papadopoulos 2008). Οι προνύμφες μετά την ολοκλήρωση της ανάπτυξης τους πέφτουν στο έδαφος και νυμφώνονται σε βάθος περίπου 5 cm.

1.1.6 Γεωγραφική εξάπλωση

Η παγκόσμια αύξηση της θερμοκρασίας του πλανήτη μέσω του φαινομένου του θερμοκηπίου και η εξέλιξη στον τομέα του διεθνούς εμπορίου αγροτικών προϊόντων, αποτελούν τους κύριους παράγοντες εξάπλωσης και εισβολής εντόμων σε νέες περιοχές που δεν προϋπήρχαν (Vermeij 1996). Η κλιματική αλλαγή κάνει περιοχές που στο παρελθόν ήταν ακατάλληλες για την επιβίωση του εντόμου 'ευαίσθητες' ως προς την επιτυχή εγκατάσταση του εντόμου (Estay et al. 2009).

Με βάση τη EUROPHYT που αποτελεί το ευρωπαϊκό σύστημα παρακολούθησης της 'υγείας' των φυτών, το ένα τρίτο του συνολικού αριθμού επιβλαβών οργανισμών σε φυτικά προϊόντα που εισήχθησαν στην Ευρωπαϊκή

Ένωση το 2011 (534 από 1.600) ανήκαν στην οικογένεια Tephritidae (Papadopoulos et al. 2013). Η εισβολή αυτών των ειδών σε νέες περιοχές μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τη βιοποικιλότητα, τη λειτουργία του οικοσυστήματος, τη βιώσιμη αγροτική παραγωγή, ενώ απειλεί και τη δημόσια υγεία (Shelly et al. 2014).

Με βάση τη σημαντικότητα των παραπάνω προβλημάτων έχουν δημιουργηθεί βιοκλιματικά και άλλα μοντέλα που έχουν ως κύριο σκοπό α) να προβλέψουν τις κατάλληλες περιοχές εξάπλωσης, και τη μελλοντική κατανομή των οργανισμών–εισβολέων στις περιοχές που εισέβαλαν (Vera et al. 2002a, De Meyer et al. 2008, Li et al. 2009, De Meyer et al. 2010) και β) να εκτιμήσουν τις πιθανές επιπτώσεις της κλιματικής αλλαγής στην επέκταση της γεωγραφικής κατανομής των εντόμων εισβολέων (Gutierrez et al. 2009, Ponti et al. 2009).

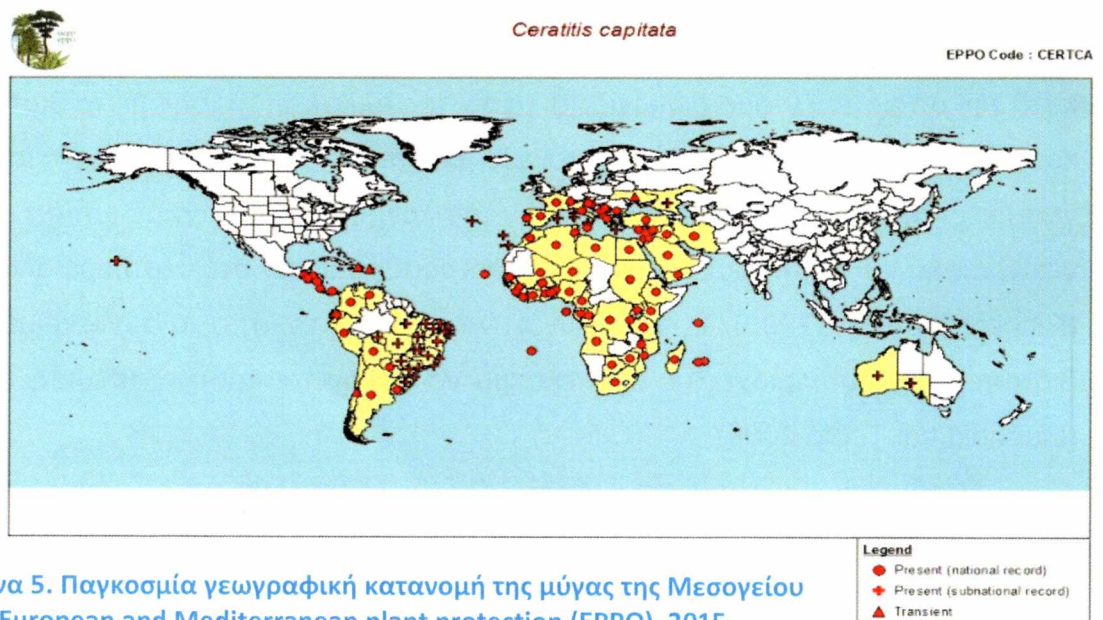
Η εγκατάσταση ενός είδους σε μια νέα περιοχή ακολουθεί τέσσερα διαδοχικά στάδια α) άφιξη β) εγκατάσταση, γ) ‘προσαρμογή’ (naturalization) και δ) ευρεία διασπορά στην περιοχή (Liebhold και Tobin 2008, Carey 2010). Το πρώτο στάδιο της άφιξης αφορά τη διασπορά στη νέα περιοχή και σχετίζεται α) με τις ιδιαιτερότητες του εντόμου για τοπική διασπορά και β) τις εμπορικές δραστηριότητες που αφορούν τη μετακίνηση φρούτων σε μεγαλύτερες αποστάσεις. Η εγκατάσταση προκύπτει από την ικανότητα του εντόμου να διατηρηθεί στο νέο περιβάλλον καθώς δημιουργεί πληθυσμούς που μπορούν να αναπτύσσονται από μόνοι τους. Η δυνατότητα αυτή επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, κυρίως από το αρχικό μέγεθος του πληθυσμού, τις αλληλεπιδράσεις με το βιοτικό περιβάλλον και άλλους παράγοντες. Το επόμενο στάδιο της προσαρμογής αφορά μια μακρά (χρονικά) διαδικασία κατά την οποία το έντομο διαιωνίζεται μέσω της αλληλεπίδρασης με το βιοτικό και αβιοτικό περιβάλλον. Μέσα στο νέο οικοσύστημα το έντομο υφίσταται γενετικές αλλαγές λόγω της πίεσης επιλογής. Αφού αντιμετωπίσει τα γεωγραφικά και αναπαραγωγικά εμπόδια προσαρμόζεται στο νέο περιβάλλον (Richardson et al. 2000). Τέλος, ξεκινάει να επεκτείνεται από το συγκεκριμένο βίοτοπο σε νέες περιοχές με αποτέλεσμα να επέρχεται και η εξάπλωσή του (Liebhold και Tobin 2008).

Μετά την εγκατάσταση ακολουθεί η διασπορά της μύγας της Μεσογείου σε κοντινές αποστάσεις (δίπλανους οπωρώνες) με την πτήση των

ενηλίκων. Η μεταφορά σε μεγάλες αποστάσεις (διαφορετική χώρα ή ήπειρο) συμβαίνει μέσω προσβεβλημένων καρπών που μεταφέρονται από το διεθνές εμπόριο και τους τουρίστες. Τα όρια εξάπλωσης του εντόμου καθορίζονται γεωγραφικά μεταξύ 45° βόρειο και 45° νότιο γεωγραφικό πλάτος. Συγκεκριμένα στο βόρειο ημισφαίριο έχει καταγραφεί το έντομο έως και 41° γεωγραφικό πλάτος.

Η παρουσία του εντόμου έχει καταγραφεί σε ολόκληρη τη Μεσόγειο και σε πολλές περιοχές ανά τον κόσμο (Αφρική, Μέση Ανατολή, Δυτική Αυστραλία, Κεντρική και μέρος της Νότιας Αμερικής, νησιά του Ατλαντικού, του Ειρηνικού και του Ινδικού Ωκεανού). Συγκεκριμένα, εντοπίστηκε στην Δυτική Αυστραλία το 1895, στην Αργεντινή αρχές του 1900, στη Χαβάη το 1910 και στην Καλιφόρνια των ΗΠΑ το 1975 (Carey 1991, Vera et al. 2002a, Bonizzoni et al. 2004) (Εικόνα 5).

Η εξάπλωση του εντόμου συνεχίζει σε περιοχές της Ευρώπης όπως η Βόρεια Ιταλία και η Σλοβενία (Bjelis 2008), ενώ αποτελεί έντομο καραντίνας σε πολλές περιοχές του πλανήτη όπως οι ΗΠΑ και η Ιαπωνία (Paradopoulos 2008), αν και θεωρείται ότι έχει εγκατασταθεί στην Καλιφόρνια των ΗΠΑ (Paradopoulos et al. 2013). Τοπικά και διεθνή προγράμματα έχουν δημιουργηθεί με κύριο σκοπό την αποτροπή εξάπλωσης του εντόμου σε νέες περιοχές αλλά και την εξάλειψη του σε περιοχές που έχει ήδη εμφανισθεί. Όσον αφορά την Ελλάδα έχει καταγραφεί κυρίως στις νότιες παραλιακές και ηπειρωτικές περιοχές, ενώ πλέον εμφανίζεται και σε περιοχές της κεντρικής και βόρειας Ελλάδας (Παπαδόπουλος και συνεργάτες 2012).



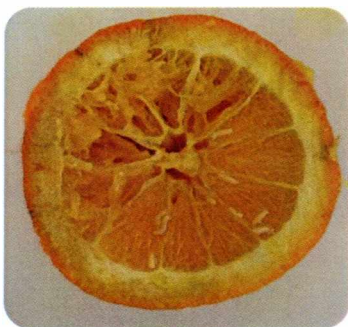
1.1.7 Ξενιστές

Η μύγα της Μεσογείου είναι το πιο πολυφάγο είδος της οικογένειας Tephritidae με τον αριθμό των ξενιστών να είναι αρκετά μεγάλος. Το έντομο προσβάλλει περίπου 350 είδη που ανήκουν σε 67 οικογένειες φυτών, εκ των οποίων κυριότερες είναι οι Myrtaceae (6%), Rosaceae (10%), Rutaceae (9%), Sapotaceae (9%) και Solanaceae (6%) (Liquido et al. 1990, 1991). Προσβάλλει ημιώριμους, σχεδόν ώριμους ή ώριμους καρπούς δέντρων, θάμνων ή ποωδών φυτών (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003).

Στην Ελλάδα οι κυριότεροι ξενιστές του είναι τα γιγαρτόκαρπα, πυρηνόκαρπα, εσπεριδοειδή ακόμα και τα σταφύλια με βάση πρόσφατα στοιχεία (Παπαδόπουλος και συνεργάτες 2012) (Εικόνες 6, 7, Πίνακας 1). Σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές προσβάλλει φυτά μεγάλης οικονομικής σημασίας όπως ο καφές (*Coffea arabica*), το μάνγκο (*Mangifera indica*) και το αβοκάντο (*Persea americana*) (Papadopoulos 2008).

Η εύρεση του φυτού ξενιστή από το έντομο επηρεάζεται από οπτικά και χημικά ερεθίσματα (Katsoyannos 1989a,b). Όσο αφορά τα χημικά ερεθίσματα αυτά προέρχονται από ουσίες που παράγουν τα δέντρα. Σύμφωνα με τους Prokopy και Roitberg (1989), δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί μέχρι ποιά απόσταση τα έντομα μπορούν να εντοπίσουν και να προσβάλουν τους ξενιστές μέσω όσφρησης ή της οπτικής επαφής.

Τα θηλυκά της μύγας της Μεσογείου γενικά προτιμούν για ωοτοκία φρούτα με υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία, κατάλληλη υφή, ενώ ρόλο παίζει και το γενικότερο οπτικό ερέθισμα του καρπού. Η οσμή των φρούτων παίζει δευτερεύοντα ρόλο (Levinson et al. 2003).



Εικόνα 6. Προνύμφες σε πορτοκάλι



Εικόνα 7. Ενήλικο σε καρπό ροδακινιάς
(www.agric.wa.gov.au/fruit/fruit-trees-and-vine-protection)

Πίνακας 1. Ορισμένοι κύριοι και δευτερεύοντες ξενιστές της μύγας της Μεσογείου

Κύριοι Ξενιστές	Δευτερεύοντες Ξενιστές
Μανταρινιά (<i>Citrus reticulata</i>)	Ακτινίδια (<i>Actinidia chinensis</i>)
Πορτοκαλιά (<i>Citrus sinensis</i>)	Μηλιά (<i>Malus domestica</i>)
Μάνγκο (<i>Mangifera indica</i>)	Αβοκάντο (<i>Persea americana</i>)
Ροδακινιά (<i>Prunus persica</i>)	Βερικοκιά (<i>Prunus armeniaca</i>)
Συκιά (<i>Ficus carica</i>)	Δαμασκηλιά (<i>Prunus domestica</i>)

1.1.8 Οικονομική σημασία

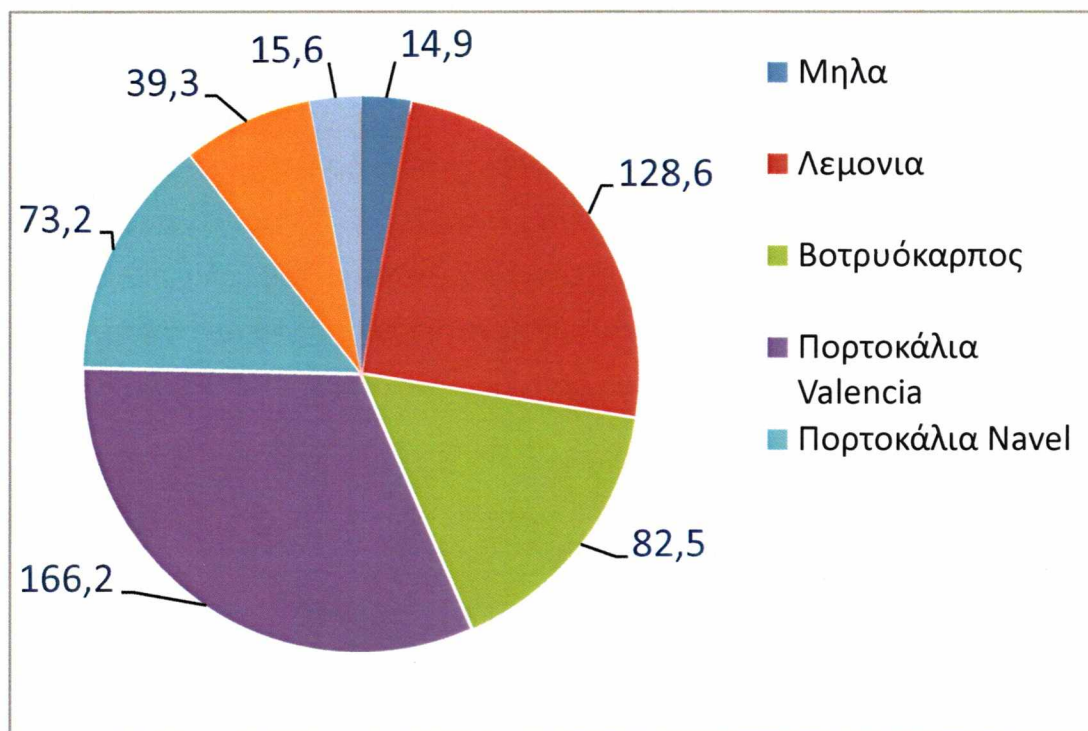
Η οικονομική σημασία του εντόμου είναι αρκετά μεγάλη σε παγκόσμιο αλλά και τοπικό επίπεδο. Σε περιοχές που προσβάλλει καρποφόρα δέντρα μπορεί να επιφέρει ζημιές έως και 100% (Papadopoulos 2008), αυξάνοντας ταυτόχρονα το κόστος παραγωγής λόγω της ανάγκης καταπολέμησης. Η μύγα της Μεσογείου και γενικά τα έντομα Tephritidae όταν εγκατασταθούν σε μια νέα περιοχή μπορούν να οδηγήσουν σε εγκατάλειψη μιας καλλιέργειας. Στην περίπτωση που ο ξενιστής εμφανίζει ιδιαίτερη ευαισθησία, απαιτεί έντονες και συνεχείς προσπάθειες (χημικούς ψεκασμούς) για διατήρηση της παραγωγής φρούτων και λαχανικών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το Ιράν αφού μετά την εγκατάσταση του εντόμου έχει γίνει ο κύριος εχθρός της εγχώριας παραγωγής (Mirsardoo et al. 2010).

Το έντομο δύναται επίσης να δημιουργήσει σημαντικά προβλήματα και να επηρεάσει αρνητικά το εμπόριο φρούτων ακόμη και σε μη ευαίσθητους καρπούς όπως τα ακτινίδια μειώνοντας τις δυνητικές εξαγωγές φρούτων της Ελλάδας σε συγκεκριμένες αγορές λόγω εμπάρκου για αποφυγή εισβολής σε απαλλαγμένες από τη μύγα της Μεσογείου περιοχές (Papadopoulos 2008, Παπαδόπουλος και συνεργάτες 2012) .

Οι Jerome και Todd (1995) αναφέρουν πιθανές απώλειες που κυμαίνονται από 493 έως 875 εκατομμύρια \$ για τη καταπολέμηση της μύγας της Μεσογείου σε περίπτωση εγκατάστασης της στη Καλιφόρνια των ΗΠΑ. Η

ταυτόχρονη επιβολή εμπάργκο σε χώρες στις οποίες εξάγονται προϊόντα όπως η Ιαπωνία, Κορέα, Ταϊβάν και το Χονγκ Κονγκ θα επέφερε απώλειες 564 εκατομμυρίων δολαρίων \$ (Διάγραμμα 1) και η πολιτεία της Καλιφόρνια θα μπορούσε να υποστεί ζημιές \$1.2 δισεκατομμύρια και απώλεια 14,000 θέσεων εργασίας. Πιο πρόσφατα στοιχεία ανεβάζουν το ποσό των απωλειών στα 1,8 δις (<http://www.cdfa.ca.gov>) εφόσον το έντομο εγκατασταθεί και εξαπλωθεί σε γεωργικές περιοχές της Καλιφόρνια. Η παραγωγή φρούτων στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής έχει ακαθάριστη αξία περίπου \$ 12 δις (Ανώνυμος 2012). Ως αποτέλεσμα του αυξημένου κινδύνου εισβολής και εγκατάστασης του εντόμου η Καλιφόρνια έχει εφαρμόσει 17 σχέδια έκτακτης ανάγκης τα τελευταία 10 έτη (Carey 2010).

Επιπλέον, έρευνες που αφορούν τη Μέση Ανατολή υπολογίζουν τις ετήσιες απώλειες, λόγω της δραστηριότητας της μύγας της Μεσογείου σε 192 εκατομμύρια \$ (Enkerlin και Mumford 1997).



Διάγραμμα 1. Πιθανές οικονομικές απώλειες των ΗΠΑ σε περίπτωση εφαρμογής εμπάρκου από χώρες στις οποίες εξάγονται αγροτικά προϊόντα.

1.1.9 Καταπολέμηση

Χημική καταπολέμηση

Η κλασική μέθοδος καταπολέμησης αφορά τη χρήση χημικών μέσων με την εφαρμογή ψεκασμών κάλυψης ή δολωματικών ψεκασμών. Τα εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται είναι συνήθως τα οργανοφωσφορούχα ή τα πυρεθροειδή. Όσον αφορά την εκτέλεση δολωματικών ψεκασμών αυτοί εφαρμόζονται σε ένα μέρος της κόμης κάθε δέντρου ή, κάθε 2^{ου} ή 3^{ου} δέντρου με την προσθήκη εντομοκτόνου και ελκυστικού υγρού. Το ελκυστικό υγρό είναι υδρόλυμα πρωτεϊνών, φυσικό ή συνθετικό προϊόν αποσύνθεσης πρωτεϊνούχων ουσιών (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003) με τη δράση του να οφείλεται στην έκλυση αμμωνίας.

Για το προσδιορισμό του χρόνου και της αναγκαιότητας των ψεκασμών χρησιμοποιούνται παγίδες τύπου McPhail (Εικόνα 8) ή παγίδες τύπου Jackson (Εικόνα 9) που εγκαθίστανται στον οπωρώνα λίγες εβδομάδες πριν οι καρποί αρχίσουν να γίνονται κατάλληλοι για ωτοκία. Για τις παγίδες τύπου Jackson γίνεται χρήση ελκυστικού για τα αρσενικά ενώ στις McPhail προστίθεται διάλυμα πρωτεΐνης με βόρακα που δρα ως συντηρητικό. Σε περίπτωση που δεν χρησιμοποιούνται παγίδες για παρακολούθηση του πληθυσμού, θα πρέπει να προστατεύονται οι καρποί καθ' όλη την περίοδο που είναι ευπρόσβλητοι. Ο αριθμός των ψεκασμών που γίνεται εξαρτάται από την εποχή, περιοχή και το είδος του δέντρου.



Εικόνα 8. Παγίδα τύπου McPhail
(www.ufosupplies.nl/upload/Product/Large/3126Mc_Phailval_008.jpg)



Εικόνα 9. Παγίδα τύπου Jackson
(www.agric.wa.gov.au/sites/gateway/files/Jackson-trap-at-DM.jpg)

Μέθοδος στειρών εντόμων

Ένας άλλος τρόπος μαζικής καταπολέμησης που εφαρμόζεται σε μεγάλες εκτάσεις (Area-Wide Integrated Pest Management, AW-IPM) είναι η μαζική εξαπόλυση στειρών εντόμων - sterile insect technique (SIT). Η μύγα της Μεσογείου αποτελεί μοντέλο όσο αφορά τη μέθοδο SIT (Augustinos et al. 2015). Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει την εκτροφή σε μεγάλο αριθμό ενός είδους - στόχου, που ακολούθως εκτίθεται σε ραδιενεργές ακτίνες με σκοπό την επαγωγή στειρότητας των αρσενικών. Μετά την πρόκληση της στειρότητας απελευθερώνονται με σκοπό τη σύζευξη με άγρια θηλυκά έτσι ώστε να αποτραπεί η επιτυχής αναπαραγωγή που έχει ως αποτέλεσμα τη σταδιακή μείωση του πληθυσμού στις επόμενες γενεές.

Η εξαπόλυση μόνο στειρών αρσενικών κάνει την μέθοδο SIT περισσότερο αποδοτική και αποτελεσματική σε σχέση με ταυτόχρονη χρήση αρσενικών και θηλυκών ενώ παράλληλα μειώνει το κόστος της (Franz 2005). Για τη μαζική εκτροφή αρσενικών της μύγας της Μεσογείου για χρήση σε προγράμματα SIT έχουν αναπτυχθεί στελέχη εντόμων (Genetic Sexing Strains -GSSs) τα οποία υπό προϋποθέσεις παράγουν μόνο αρσενικά όπως τα Vienna 7 και Vienna 8 GSSs που χρησιμοποιούνται σήμερα μαζικά σε μεγάλη κλίμακα, σχεδόν σε κάθε ήπειρο (Franz 2005).

Καλλιεργητικά μέτρα

Οι μέθοδοι καταπολέμησης στις οποίες δεν χρησιμοποιούμε χημικές ή συνθετικές ουσίες ορίζονται ως καλλιεργητικά μέτρα. Κύριο μέτρο καταπολέμησης αυτής της κατηγορίας είναι η συλλογή των προσβεβλημένων καρπών που βρίσκονται στο έδαφος και στη συνέχεια η καταστροφή τους. Αποτέλεσμα αυτή της μεθόδου είναι η μείωση του πληθυσμού και η ταυτόχρονη μείωση των εστιών διαχείμασης.

Βιολογική καταπολέμηση

Όσον αφορά τη βιολογική καταπολέμηση έχουν γίνει προσπάθειες με μαζικές εξαπολύσεις εντόμων φυσικών εχθρών της μύγας της Μεσογείου χωρίς ιδιαίτερα αποτελέσματα. Πρόσφατα βρέθηκε στην Ελλάδα η παρουσία του παρασιτοειδούς *Aganaspis daci* σε νύμφες της μύγας Μεσογείου που προέρχονται από προσβεβλημένα σύκα από τη Χίο (Papadopoulos και Katsoyannos 2003). Μια νέα μέθοδος που θα μπορούσε να προκύψει είναι η χρήση του ενδοκυτταρικού βακτηρίου *Wolbachia pipientis* εφόσον πραγματοποιηθούν έρευνες για την αποτελεσματικότητά του.

1.2 Το ενδοκυτταρικό βακτήριο *Wolbachia pipientis* και επίδραση του στα έντομα

Ως συμβίωση ορίζεται η στενή σχέση μεταξύ δυο διαφορετικών οργανισμών κατά την οποία τουλάχιστο ο ένας οργανισμός ωφελείται από αυτή τη σχέση. Ένας ειδικός τύπος συμβίωσης είναι η αμοιβαιότητα (mutualism) όπου προκύπτει όφελος και για τους δυο οργανισμούς. (John LC 2008). Το *Wolbachia pipientis* είναι ένα ευρέως διαδεδομένο βακτήριο το οποίο παρουσιάζεται στο 20 % του πληθυσμού των εντόμων (Werren et al. 1995, Werren and Windsor 2000). Η Dyer (2003) αναφέρει το *W. pipientis* ως ένα ενδοκυτταρικό (υποχρεωτικό) συμβιωτικό βακτήριο πολλών ασπόνδυλων. Το βακτήριο δεν φαίνεται να προκαλεί σοβαρό πρόβλημα στους ξενιστές, ωστόσο προκαλεί κάποια 'επιβάρυνση' στη φυσική κατάσταση του ξενιστή (fitness cost). Σε ορισμένες περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί όφελος στη φυσική κατάσταση του ξενιστή μέσω της συμβίωσης με το βακτήριο (Bourtzis et al. 2006a).

Στις περισσότερες περιπτώσεις που εξετάστηκαν το *Wolbachia* θεωρείται ότι ενεργεί ως παράσιτο χειραγωγώντας το ξενιστή του για τη μετάδοσή του. Η συμβίωση αυτή δεν εμφανίζει οποιουδήποτε εμφανές σύμπτωμα πράγμα που αποκλείει την μακροσκοπική αναγνώριση της παρουσίας του στο έντομο. Ωστόσο σε κάποιες περιπτώσεις στελέχη του βακτηρίου μπορεί να προκαλέσουν «παθολογική» κατάσταση στους ξενιστές

αφού επηρεάζουν άμεσα ή έμμεσα την αναλογία αρσενικών – θηλυκών, θανατώνοντας τα αρσενικά κατά το στάδιο της εμβρυογένεσης.

Πέραν της θανάτωσης των αρσενικών, το *Wolbachia* μπορεί να επιδράσει σε άλλες βιολογικές λειτουργίες του εντόμου που οδηγούν σε αναπαραγωγικές ανωμαλίες, όπως η κυτταρολασματική ασυμβατότητα (cytoplasmic incompatibility - CI), η παρθενογένεση και η θηλυκοποίηση (Ντουντούμης 2014). Συγκεκριμένα στη κυτταροπλασματική ασυμβατότητα τα μη μολυσμένα θηλυκά έντομα είναι αναπαραγωγικά ασυμβίβαστα με μολυσμένα αρσενικά (Bourtzis et al. 2006).

Ο τρόπος μετάδοσης από γενεά σε γενεά είναι μέσω των αυγών (όχι το σπέρμα). Η παρουσία περισσότερων θηλυκών βοηθάει στην ευχερέστερη εξάπλωση, πληθυσμιακή ανάπτυξη και επιβίωση του βακτηρίου, γεγονός που επιδρά θετικά και στο έντομο λόγω της αύξησης του πληθυσμού. Η ανομοιομορφή αναλογία αρσενικών - θηλυκών στους πληθυσμούς δεν οφείλεται πάντα στην ύπαρξη του βακτηρίου. Έντομα όπως οι μέλισσες και οι σφήκες εμφανίζουν εκ φύσεως αυτή την ανομοιομορφία.

Εκτός από έντομα το γένος *Wolbachia* εμφανίζεται και σε νηματώδεις με ευεργετική συμβιωτική δράση τόσο στη γονιμότητα του ξενιστή όσο και στη βιωσιμότητα των προνυμφών (Bandi et al. 2001).

1.2.1 Ταξινόμηση

Η γενική κατηγοριοποίηση του γένους *Wolbachia* γίνεται σε 5 “supergroups” A έως F (Lo et al. 2002, και αναφορές). Τα A και B που αποτελούν και τα πλείστα παράσιτα, βρίσκονται στα έντομα (Werren et al., 1995) ενώ τα C και D ευρίσκονται σε φιλάριους νηματώδεις (Bandi et al., 1998) τα μέλη της ομάδας E περιλαμβάνουν έντομα της τάξης Collembola (Vandekerckhove et al. 1999, Czarnetzki και Tebbe 2004). Τα μέλη του supergroup F μολύνουν τερμίτες και το παράσιτο *Mansonella ozzardi* (Casiraghi et al 2001, Lo et al. 2002), ενώ πιο πρόσφατα, ένα νέο supergroup G, έχει προταθεί για τη *Wolbachia* spp. σε αράχνες στην Αυστραλία (Rowley et al., 2004).

Πίνακας 2. Ταξινόμηση *Wolbachia pipientis*

(από: www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=958403)

Βασίλειο	Bacteria
Υπο-βασίλειο	Negibacteria
Φύλο	Proteobacteria
Κλάση	Alphaproteobacteria
Τάξη	Rickettsiales
Οικογένεια	Anaplasmataceae
Γένος	<i>Wolbachia</i>
Είδος	<i>pipientis</i>

1.3 Μόλυνση της μύγας της Μεσογείου με *Wolbachia*

Το *Wolbachia pipientis* αν και ευρέως διαδεδομένο σε πολλά αρθρόποδα και νηματώδεις δεν παρουσιάζει φυσικούς πληθυσμούς σε έντομα της μύγας της Μεσογείου (βλέπε όμως Rocha 2005). Πρόσφατα οι Zabalou et al. (2004) κατάφεραν να μεταφέρουν δυο στελέχη (wCer2 και wCer4 strains) *Wolbachia* από το *Rhagoletis cerasi* στη μύγα της Μεσογείου δημιουργώντας ‘μολυσμένες’ φυλές. Επιπλέον οι Zabalou et al. (2009) μετέφεραν το βακτήριο στη φυλή Vienna 8 (genetic sexing line-GSS) που χρησιμοποιείται σε υφιστάμενα προγράμματα SIT με σκοπό τη χρήση του σε πειράματα εργαστηρίου IIT. Σε πείραμα που διεξήχθη τα έντομα της φυλής (Vienna 8) που μολύνθηκαν με το βακτήριο χρησιμοποιήθηκαν σε αναλογία 20:1 μολυσμένα προς μη μολυσμένα αρσενικά επιφέροντας 100% CI (cytoplasmic incompatibility) με αποτέλεσμα τη σχεδόν ολοκληρωτική εξάλειψη του πληθυσμού.

Πέραν όμως του ενδιαφέροντος για τη χρήση της μεθόδου IIT με σκοπό τη καταπολέμηση, έχουν διεξαχθεί πειράματα που μελετούν την επίδραση της μόλυνσης με *Wolbachia* στην ‘υγεία’ (fitness) του εντόμου. Οι Sarakatsanou et al. (2011) εξέτασαν δυο διαφορετικές περιπτώσεις α) επίδραση ενός στελέχους *Wolbachia* σε δυο διαφορετικές φυλές της μύγας της Μεσογείου και β) επίδραση δυο διαφορετικών στελεχών στην ίδια φυλή. Συγκεκριμένα στην πρώτη περίπτωση έγινε μόλυνση με τα στελέχη wCer2 και wCer4 στη φυλή «Μπενάκειο» της μύγας της Μεσογείου ενώ στη δεύτερη περίπτωση το στέλεχος (wCer2) μόλυνε δυο φυλές («Μπενάκειο» και

WoIMed «88.6»). Στα αποτελέσματα παρατηρήθηκε διαφορετική ανταπόκριση των φυλών της μύγας της Μεσογείου στη μόλυνση με ένα συγκεκριμένο στέλεχος. Επιπλέον βρέθηκε ότι τα διαφορετικά στελέχη στην ίδια φυλή είχαν διαφορετική επίδραση.

1.4 Εφαρμογή του *Wolbachia* στην αντιμετώπιση εντόμων

Η χρήση των κλασικών χημικών μεθόδων καταπολέμησης εντόμων αν και εξαιρετικά αποτελεσματική για πολλά χρόνια έχει δημιουργήσει αρκετά προβλήματα. Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας από τα έντομα, η θανάτωση των φυσικών εχθρών και οργανισμών μη στόχων αλλά και η μόλυνση του περιβάλλοντος είναι ένα κομμάτι από το σύνολο των προβλημάτων που έχουν δημιουργηθεί.

Η σύγχρονη αντίληψη για τον 'έλεγχο' των εντόμων (όπως ορίζεται από τον FAO, 2005) με σκοπό τη καταπολέμηση, περιορισμό και εξάλειψη τους αφορά την εφαρμογή νέων αποτελεσματικών και κοινωνικά αποδεκτών μεθόδων. Κύριος γνώμονας είναι η προστασία της υγείας του ανθρώπου, των καλλιεργειών και του περιβάλλοντος. Μια τέτοια μέθοδος είναι αυτή της εξαπόλυσης στείρων εντόμων (SIT) που χρησιμοποιείται στη μύγα της Μεσογείου (βλέπε Κεφάλαιο 1.1.6).

Γίνεται πλέον ευρέως αποδεκτό ότι η χρήση κατάλληλων μεθόδων που στοχεύουν στο σύνολο του πληθυσμού ενός εντόμου, για μία συγκεκριμένη περιοχή (Area-Wide Integrated Pest Management, AW-IPM) οδηγεί σε αποδοτικότερη αντιμετώπιση του εντόμου σε σχέση με την καταπολέμηση στο επίπεδο του παραγωγού (Dyck et al. 2005). Μια νέα προσέγγιση στη μαζική καταπολέμηση είναι η χρήση του βακτηρίου *Wolbachia* με σκοπό τη μείωση της γονιμότητας, εφαρμόζοντας την μέθοδο ασυμβατότητας εντόμων (incompatible insect technique – IIT) (Boller and Bush.1974 Boller et al. 1976). Το συμβιωτικό αυτό βακτήριο έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (CI - cytoplasmic incompatibility) σε πλήθος οργανισμών, ένα είδος αρσενικής στειρότητας, στην οποία δύναται να βασιστεί η καταπολέμηση των εντόμων.

Ο Laven (1967) όπως αναφέρει ο Bourtzis 2006, ήταν ο πρώτος που προσπάθησε επιτυχώς με πιλοτικά πειράματα στο πεδίο να χρησιμοποιήσει το συμβιωτικό αυτό βακτήριο με σκοπό τη καταπολέμηση των κουνουπιών (*Culex pipiens*). Σύμφωνα με το Bourtzi (2006) η CI προκαλεί θνησιμότητα των εμβρύων σε δύο περιπτώσεις. Η πρώτη αφορά διασταυρώσεις μεταξύ εντόμων με διαφορετική κατάσταση (status) μόλυνσης *Wolbachia* που χαρακτηρίζεται ως 'αμφίδρομη διασταύρωση' ενώ η δεύτερη, 'μονόδρομη διασταύρωση' αναφέρεται στη διασταύρωση μεταξύ μολυσμένων αρσενικών και μη μολυσμένων θηλυκών. Η CI δεν εμφανίζεται σε όλες τις περιπτώσεις. (Πινάκας 3).

Πίνακας 3. Αποτελέσματα διασταύρωσης αρσενικών και θηλυκών εντόμων, μολυσμένων ή μη μολυσμένων με *Wolbachia* όσον αφορά την εμφάνιση CI

Αρσενικό	Θηλυκό	Αποτέλεσμα διασταύρωσης
Μολυσμένο	Μολυσμένο	Κανονική γονιμοποίηση
Μολυσμένο	Μη μολυσμένο	Εμφάνιση CI
Μη Μολυσμένο	Μολυσμένο	Κανονική γονιμοποίηση
Μη μολυσμένο	Μη μολυσμένο	Κανονική γονιμοποίηση
Στέλεχος <i>Wolbachia</i> "A"	Στέλεχος <i>Wolbachia</i> "B"	Εμφάνιση CI

Με έκφραση της CI στα περισσότερα έντομα προκαλείται εμβρυική θνησιμότητα με εξαίρεση τα Hymenoptera όπου προκαλείται διαφοροποίηση στα ποσοστά αρσενικών-θηλυκών με τη γέννηση μόνο αρσενικών ατόμων. Τα μολυσμένα θηλυκά μπορούν να ζευγαρώσουν επιτυχώς με μολυσμένα και μη μολυσμένα αρσενικά, ενώ τα μη μολυσμένα θηλυκά μπορούν να ζευγαρώσουν μόνο με μη μολυσμένα αρσενικά (Turelli και Hoffman, 1991).

Πίνακας 4. Περιπτώσεις στις οποίες έχει αναφερθεί η επαγόμενη από *Wolbachia* CI στις κύριες τάξεις και οικογένειες εντόμων

Τάξη	Οικογένεια	Κοινό όνομα
Orthoptera	Gryllidae	Γρύλλοι (τριζόνια)
Hemiptera	Aleyrodidae	Αλευρώδης
	Delphacidae	Ακρίδες
Coleoptera	Curculionidae	Σκαθάρια
	Tenebrionidae	
Hymenoptera	Figitidae	
	Pteromalidae	
Lepidoptera	Pyralidae	
Diptera	Culicidae	Κουνούπια
	Drosophilidae	Μύγες ξυδιού
	Tephritidae	Μύγες των φρούτων

1.5 Σκοπός της εργασίας

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω η επίδραση του *Wolbachia* έχει μελετηθεί σε αρκετές πτυχές της βιολογίας της μύγας της Μεσογείου όχι όμως και στην αντοχή στο ψύχος καθώς δεν είναι γνωστή η επίδραση του ψύχους σε μολυσμένα με *Wolbachia* στελέχη της μύγας της Μεσογείου. Μελετήθηκε στη παρούσα διατριβή η αντοχή στο ψύχος σε μολυσμένα με *Wolbachia* ενήλικα έντομα της μύγας της Μεσογείου στα οποία υπάρχει το συμβιωτικό βακτήριο *Wolbachia pipientis*. Οι μολυσμένες με *Wolbachia* φυλές ήταν οι «88:6» και «88:15» ενώ ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η φυλή «Μπενάκειο» που αποτελείτο από μη μολυσμένα έντομα. Τα έντομα των μολυσμένων και μη μολυσμένων φυλών της μύγας της Μεσογείου εκτέθηκαν για διαφορετικούς χρόνους και διαστήματα στους -2°C , -5°C και -10°C .

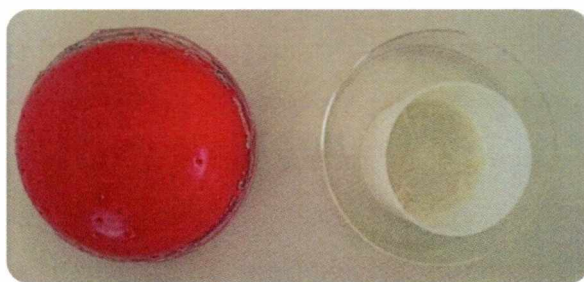
Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Συνθήκες εργαστηρίου

Τα πειράματα διεξήχθησαν στο εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας τη περίοδο 2015 - 2016 σε σταθερές συνθήκες (25 ± 1 °C, σχετική υγρασία 65 ± 5 %, 14:10 Φ:Σ). Ο φωτισμός προερχόταν από λαμπτήρες φθορισμού σε συνδυασμό με φυσικό φως που εισέρχονταν από παράθυρα στην οροφή του εντομοδωματίου.

2.2 Εκτροφή της μύγας της Μεσογείου

Η εκτροφή των εντόμων πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τα θηλυκά ωτοκούσαν σε κοίλα πλαστικά ημισφαίρια «domes», κόκκινου χρώματος και διαμέτρου 5cm στα οποία είχαν δημιουργηθεί 40-50 ομοιόμορφα κατανεμημένες οπές διαμέτρου 1 mm (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Κοίλο πλαστικό ημισφαίριο (dome) με πλαστικό τρυβλίο (βάση) και δοχείο τοποθέτησης χυμού με σκοπό τη διέγερση της ωτοκίας.

Τα αυγά εναποθέτονταν στην εσωτερική επιφάνεια του «dome» που έφερε στη βάση του τρυβλίο με νερό που είχε ως σκοπό τη διατήρηση της υγρασίας για εναπόθεση των αυγών. Στο κέντρο του τρυβλίου petri τοποθετούταν πλαστικό δοχείο με χυμό πορτοκαλιού ως 'διεγερτικό' ωτοκίας. Μετά από περίοδο δύο ημερών γινόταν συλλογή των αυγών με τη χρήση πινέλου και

ακολουθούσε μεταφορά τους σε στρόγγυλα κομμάτια βαμβακιού εμποτισμένα με κατάλληλη τροφή για την ανάπτυξη των προνυμφών. Τα βαμβάκια τοποθετούνταν μέσα σε γυάλινα τρυβλία (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. Αυγά πάνω σε βαμβάκι

Τα ενήλικα μετά την εκκόλαψη διατηρούνταν σε ξύλινα κλουβιά (30 x 30 x 30 cm Εικόνα 12) με παροχή νερού και τροφής που περιείχε ζάχαρη και υδρολυμένη μαγιά σε αναλογία 4:1 (Εικόνα 13)



Εικόνα 12. Ξύλινο κλουβί για την εκτροφή και διατήρηση των ενηλίκων



Εικόνα 13. Τρυβλίο petri με τροφή ενηλίκων

2.3 Φυλές που χρησιμοποιήθηκαν

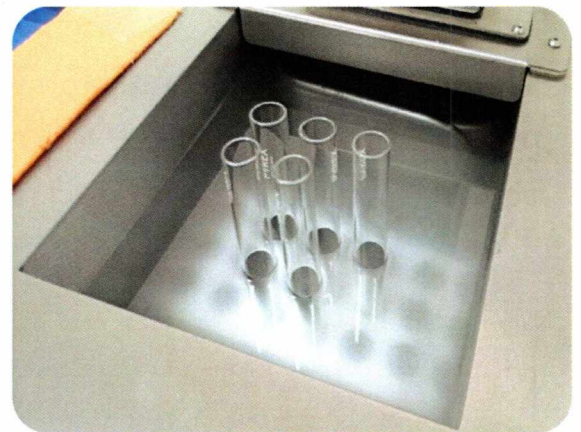
Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές φυλές. Η φυλή «Μπενάκειο» που αποτελείται από μη μολυσμένα έντομα, οι φυλές «88.6» και «88.15» (Zabalou et al. 2004) που έχουν μολυνθεί με το ίδιο στέλεχος *Wolbachia* wCer2 σε δυο διαφορετικές χρονικές περιόδους.

2.4 Κρυόλουτρο

Για τη έκθεση των εντόμων στις χαμηλές θερμοκρασίες χρησιμοποιήθηκε το κρυόλουτρο Cole-Parmer® Polystat (Εικόνες 14, 15).



Εικόνα 14. Κρυόλουτρο

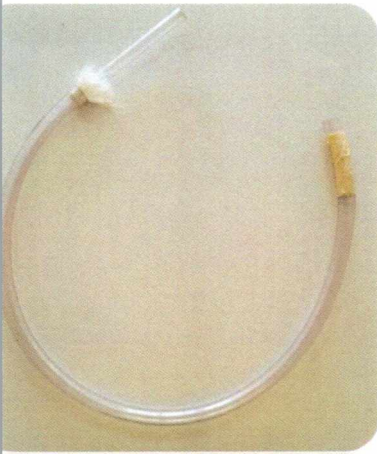


Εικόνα 15. Δοκιμαστικοί σωλήνες μέσα στο κρυόλουτρο

2.5 Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία ξεκινούσε με τη συλλογή των εντόμων από τα κλουβιά και τη μεταφορά τους στους δοκιμαστικούς σωλήνες. Για τη συλλογή τους χρησιμοποιήθηκε αναρροφητήρας (Εικόνα 16). Δέκα ενήλικα τοποθετούνταν σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα (Εικόνα 17) αφού προηγουμένως είχαν αναισθητοποιηθεί με τη χρήση διοξειδίου του άνθρακα που διοχετευόταν στο πλαστικό δοχείο (Εικόνα 18). Η παροχή διοξειδίου του

άνθρακα γίνονται με χρήση της συσκευής «The flow buddy» με πιστολάκι παροχής (Εικόνες 19,20)



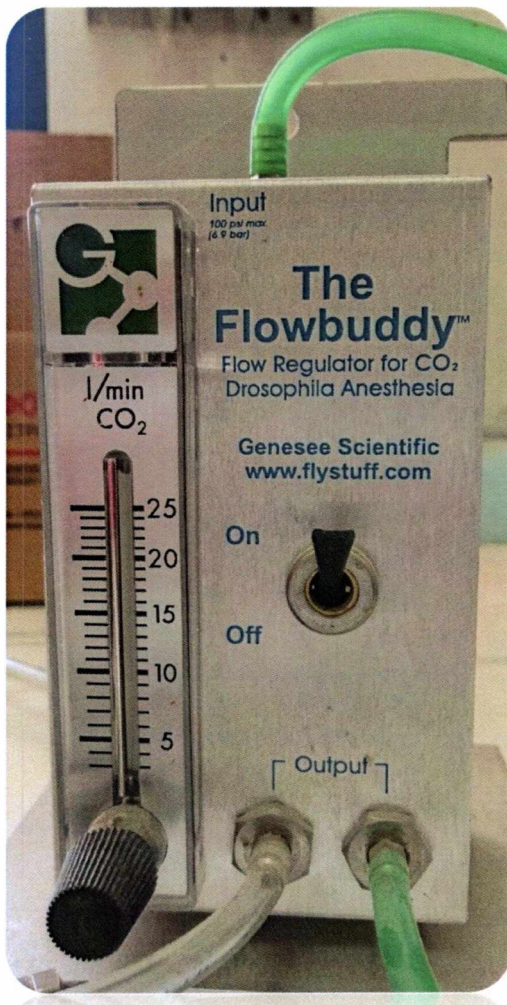
Εικόνα 16. Αναρροφητήρας



Εικόνα 17. Δοκιμαστικός σωλήνας



Εικόνα 18. Πλαστικό δοχείο



Εικόνα 19. Συσκευή παροχής CO₂ - ναισθητοποίησης εντόμων.



Εικόνα 20. Πιστολάκι παροχής CO₂

Το διοξείδιο του άνθρακα διοχετευόταν στο πλαστικό δοχείο για χρονικό διάστημα περίπου 20-30 δευτερολέπτων και οδηγούσε στην πλήρη αναισθητοποίηση των εντόμων. Σε αυτό το διάστημα τα έντομα μεταφέρονταν στους δοκιμαστικούς σωλήνες (Εικόνα 21) με τη χρήση χωνιού (Εικόνα 22).

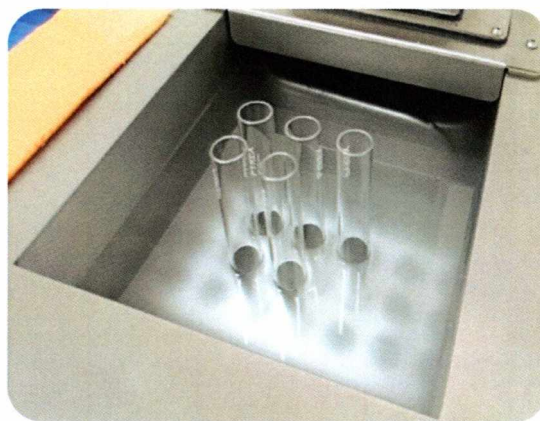


Εικόνα 21. Σωλήνες με βαμβάκι



Εικόνα 22. Χωνί για μεταφορά εντόμων στο πλαστικό

Τα αρσενικά και θηλυκά έντομα μεταφέρονταν σε ξεχωριστούς σωλήνες. Το σύνολο των εντόμων ήταν εκατό (100) με πενήντα (50) αρσενικά και πενήντα (50) θηλυκά σε δέκα (10) δοκιμαστικούς σωλήνες με δέκα (10) έντομα σε κάθε σωλήνα. Οι σωλήνες τοποθετούνταν στο κρυόλουτρο για προκαθορισμένο χρονικό διάστημα (Εικόνα 23)



Εικόνα 23. Σωλήνες εντός του κρυόλουτρου

Μετά το πέρας του χρόνου οι σωλήνες αφαιρούνταν από το κρυόλουτρο και τα έντομα τοποθετούνταν σε δυο ξεχωριστά κλουβιά (αρσενικά – θηλυκά) plexiglass. Ακολούθως λαμβάνονταν μετρήσεις ανά τακτά χρονικά διαστήματα

έως τρεις (3) ημέρες. Συγκριμένα οι μετρήσεις γίνονταν στα 5', 10', 20', 40', 60', 120', 24 h, 48 h και 72 h μετά την έξοδο των εντόμων από το κρυόλουτρο.

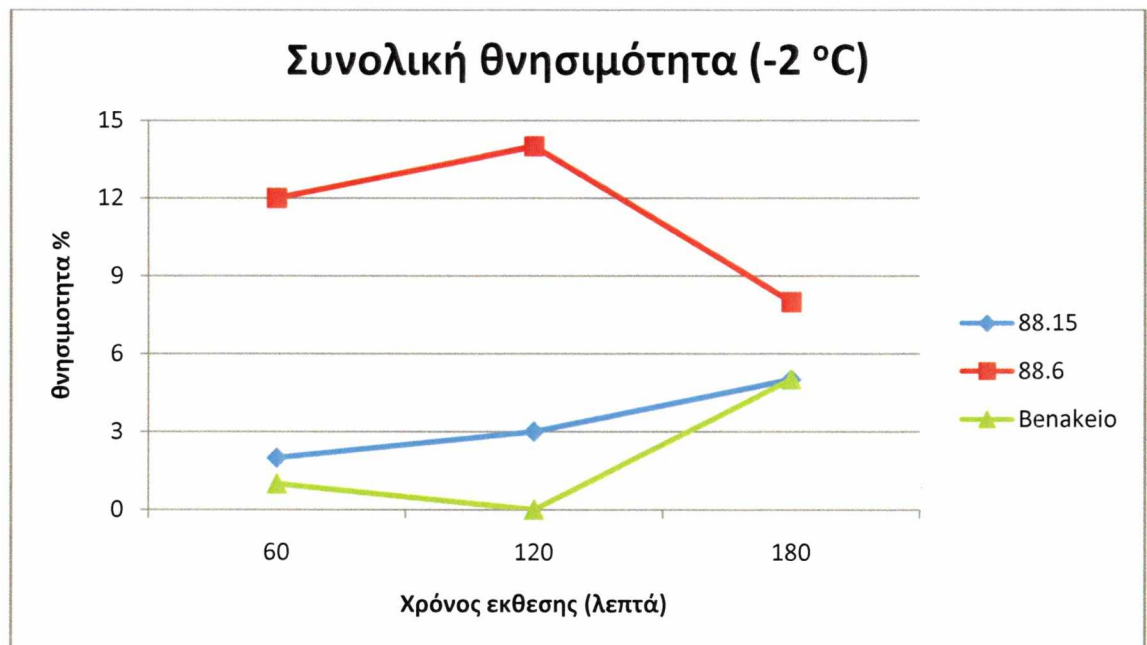
2.6 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη χρήση της λογιστικής παλινδρόμησης (Logistic regression) με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης SPSS. Η δημιουργία των διαγραμμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Office Excel.

Αποτελέσματα

3.1 Αντοχή εντόμων στους -2 °C

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 2, το ποσοστό θνησιμότητας σε όλες τις περιπτώσεις ήταν αρκετά χαμηλό χωρίς να ξεπεράσει σε καμία περίπτωση το 15 %. Η μεγαλύτερη συνολική θνησιμότητα παρουσιάστηκε στα έντομα της φυλής «88.6» σε όλα τα χρονικά διαστήματα. Ο χρόνος έκθεσης των 180 λεπτών οδήγησε στη μεγαλύτερη θνησιμότητα στις φυλές «Μπενάκειο» και «88.15» ενώ η φυλή «88.6» εμφάνισε το μέγιστο ποσοστό θνησιμότητας στα 120 λεπτά το οποίο μειώθηκε στα 180 λεπτά.



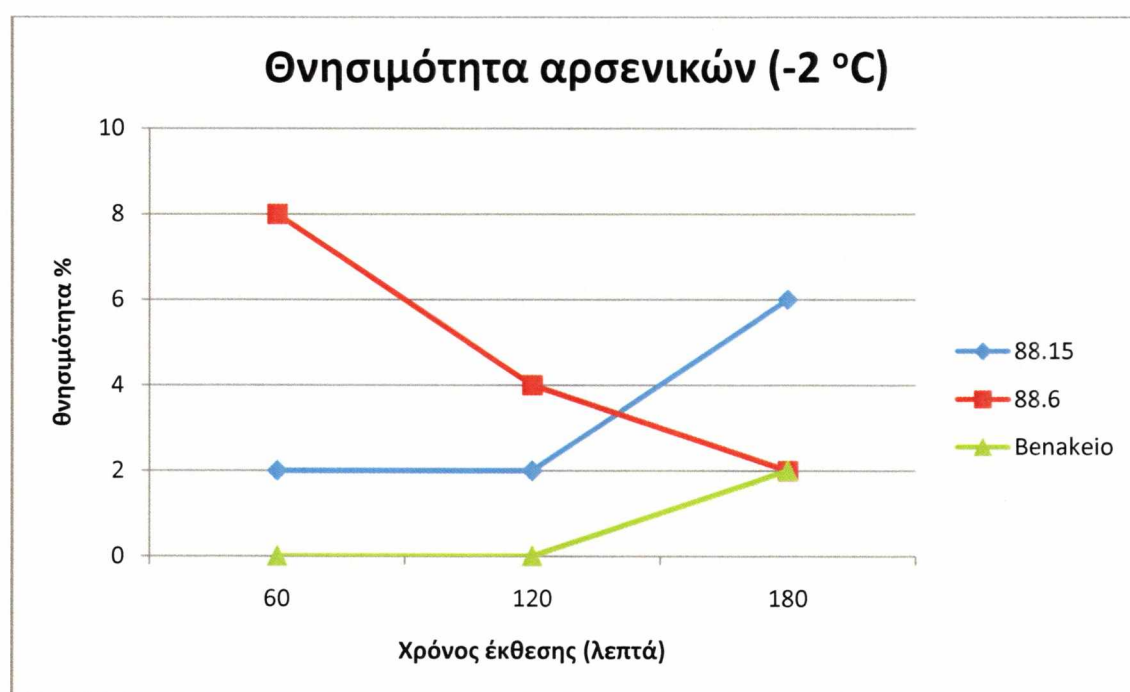
Διάγραμμα 2. Επίδραση της μόλυνσης με *Wolbachia* στη συνολική θνησιμότητα αρσενικών και θηλυκών της μύγας της Μεσογείου μετά από έκθεση τους για διαφορετικά χρονικά διαστήματα στους -2 °C.

Η στατιστική ανάλυση για τη συνολική θνησιμότητα παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα 5. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι α) η φυλή και β) η αλληλεπίδραση φύλο* φυλή δεν αποτελούν σημαντικούς εκτιμητές της θνησιμότητας. Αντίθετα ο παράγοντας φύλο αποτελεί σημαντικό εκτιμητή της θνησιμότητας.

Πίνακας 5. Πρότυπο λογιστικής παλινδρόμησης για την επίδραση της φυλής της μύγας της Μεσογείου (μολυσμένη ή μη μολυσμένη με *Wolbachia*), του φύλου και της διάρκειας έκθεσης στους -2 °C στην θνησιμότητα των αρσενικών και θηλυκών εντόμων.

Πηγή παραλλακτικότητας	Βαθμοί ελευθερίας (df)	Wald-test	P
Φυλή	1	0,642	0,423
Φύλο * Φυλή	1	2,447	0,118
Φύλο	1	6,969	0,008

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 3, το ποσοστό θνησιμότητας των αρσενικών σε όλες τις περιπτώσεις ήταν αρκετά χαμηλό ενώ δεν ξεπέρασε το 8 % σε καμία περίπτωση. Η φυλή «88.6» παρουσίασε τα μεγαλύτερα ποσοστά θνησιμότητας σε χρόνο έκθεσης 60 ενώ σε μεγαλύτερους χρόνους (120, 180 λεπτά) τα ποσοστά μειώθηκαν. Στη φυλή «Μπενάκειο» τα ποσοστά ήταν μηδενικά για χρόνους έκθεσης 60 και 120 λεπτά με ελάχιστη αύξηση 2% στα 180 λεπτά. Η φυλή «88.15» εμφάνισε μέγιστη θνησιμότητα στα 180 λεπτά και μικρότερα ποσοστά (2%) στα 60 και 120 λεπτά.



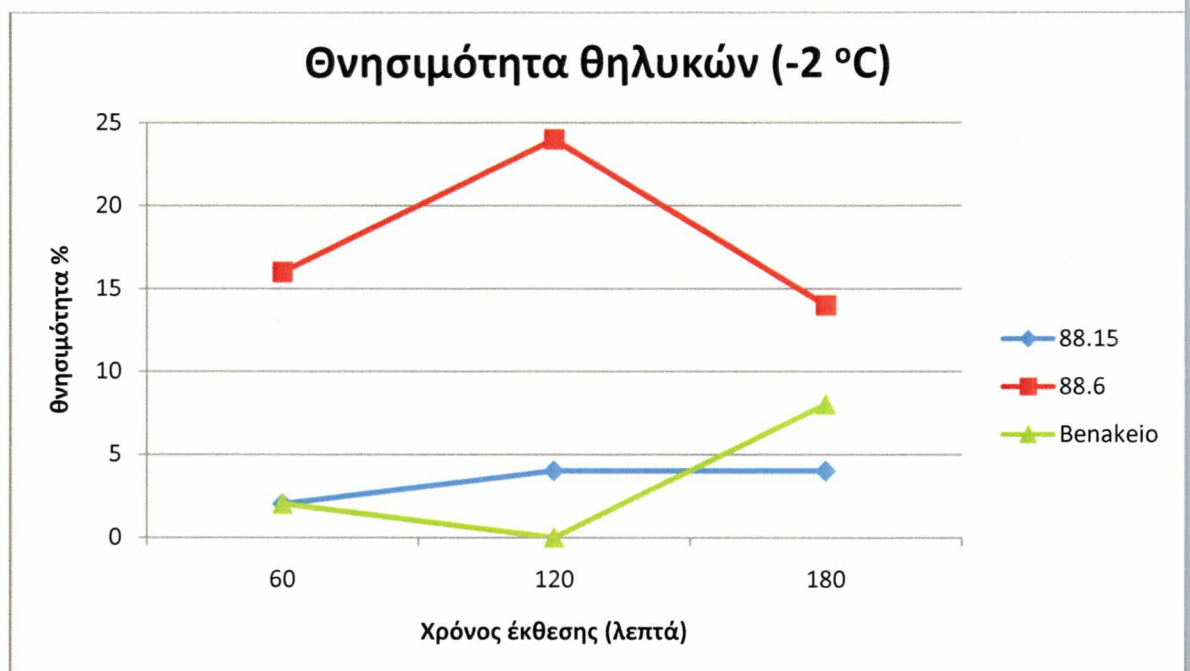
Διάγραμμα 3. Επίδραση της μόλυνσης με *Wolbachia* στη θνησιμότητα αρσενικών της μύγας της Μεσογείου μετά από έκθεση τους για διαφορετικά χρονικά διαστήματα στους -2 °C.

Η στατιστική ανάλυση για τη θνησιμότητα των αρσενικών παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα 6. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι α) η φυλή β) ο χρόνος έκθεσης και γ) ο χρόνος έκθεσης * φυλή δεν αποτελούν σημαντικούς εκτιμητές της θνησιμότητας των αρσενικών. Συμπέρασμα είναι ότι η έκθεση σε θερμοκρασία -2°C δεν παρουσιάζει οπουδήποτε διαφορά μεταξύ των αρσενικών των τριών φυλών σε χρόνους έκθεσης 60, 120 και 180 λεπτών.

Πίνακας 6. Πρότυπο λογιστικής παλινδρόμησης για την επίδραση της φυλής της μύγας της Μεσογείου (μολυσμένη ή μη μολυσμένη με *Wolbachia*), του φύλου και της διάρκειας έκθεσης στους -2°C στην θνησιμότητα των αρσενικών εντόμων.

Πηγή παραλλακτικότητας	Βαθμοί ελευθερίας (df)	Wald-test	P
Φυλή	2	2,991	0,224
Χρόνος έκθεσης	1	1,162	0,281
Χρόνος έκθεσης * Φυλή	2	2,925	0,232

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 4, το ποσοστό θνησιμότητας των θηλυκών σε όλες τις περιπτώσεις ήταν αρκετά χαμηλό για τις φυλές «Μπενάκειο» και «88.15» (<10%) ενώ η φυλή «88.6» εμφάνισε ποσοστά θνησιμότητας πάνω από 20 % σε χρόνο έκθεσης 120 λεπτά. Η φυλή «88.6» εμφάνισε τα μεγαλύτερα ποσοστά θνησιμότητας σε όλες τις περιπτώσεις. Τα θηλυκά της φυλής «88.15» εμφάνισαν σταθερά χαμηλή θνησιμότητα κάτω από 5 %. Η φυλή «Μπενάκειο» για χρόνους έκθεσης 60 και 120 λεπτά διατήρησε ποσοστό θνησιμότητας κάτω από 5 % με εξαίρεση τα 180 λεπτά όπου ξεπέρασε ελαφρά το ποσοστό αυτό.



Διάγραμμα 4. Επίδραση της μόλυνσης με *Wolbachia* στη θνησιμότητα θηλυκών της μύγας της Μεσογείου μετά από έκθεση τους για διαφορετικά χρονικά διαστήματα στους - 2° C.

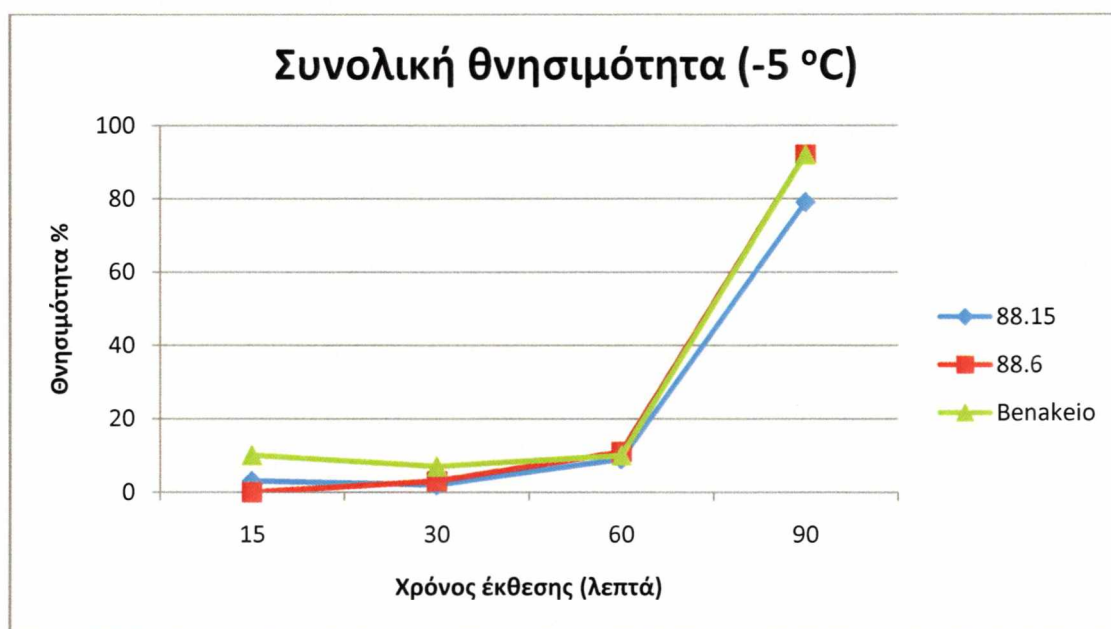
Η στατιστική ανάλυση για τη θνησιμότητα των θηλυκών παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα 7. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι α) ο χρόνος έκθεσης και β) ο χρόνος έκθεσης * φυλή δεν αποτελούν σημαντικούς εκτιμητές. Ο παράγοντας φυλή αποτελεί σημαντικό εκτιμητή στη θνησιμότητα ανάμεσα στις 3 φυλές. Τα θηλυκά της φυλής «88.6» εμφανίζουν συνολικά μεγαλύτερα ποσοστά θνησιμότητας από τις φυλές «Μπενάκειο» και «88.15».

Πίνακας 7. Πρότυπο λογιστικής παλινδρόμησης για την επίδραση της φυλής της μύγας της Μεσογείου (μολυσμένη ή μη μολυσμένη με *Wolbachia*), του φύλου και της διάρκειας έκθεσης στους -2 °C στην θνησιμότητα των θηλυκών εντόμων.

Πηγή παραλλακτικότητας	Βαθμοί ελευθερίας (df)	Wald-test	P
Φυλή	2	2,991	0,037
Χρόνος έκθεσης	1	1,162	0,580
Χρόνος έκθεσης * Φυλή	2	2,925	0,455

3.2 Αντοχή εντόμων στους -5 °C

Όπως φαίνεται στο παρακάτω Διάγραμμα 5 και οι τρεις φυλές εμφανίζουν σχετικά χαμηλά ποσοστά θνησιμότητας σε χρόνους έκθεσης 15, 30 και 60 λεπτά που βρίσκονται περίπου στο 15 %. Η φυλή «Μπενάκειο» παρουσιάζει ελαφρά μεγαλύτερη θνησιμότητα στους χρόνους έκθεσης 15 και 30 λεπτά σε σχέση με τις «88.15» και «88.6». Σε χρόνο έκθεσης 90 λεπτών τα ποσοστά αυξάνονται σε μεγάλο ποσοστό και για τις τρεις φυλές. Συγκεκριμένα οι φυλές «Μπενάκειο» και «88.6» έχουν ποσοστά θνησιμότητας περίπου 90% ενώ η «88.15» βρίσκεται χαμηλότερα σε ποσοστό περίπου 80%.



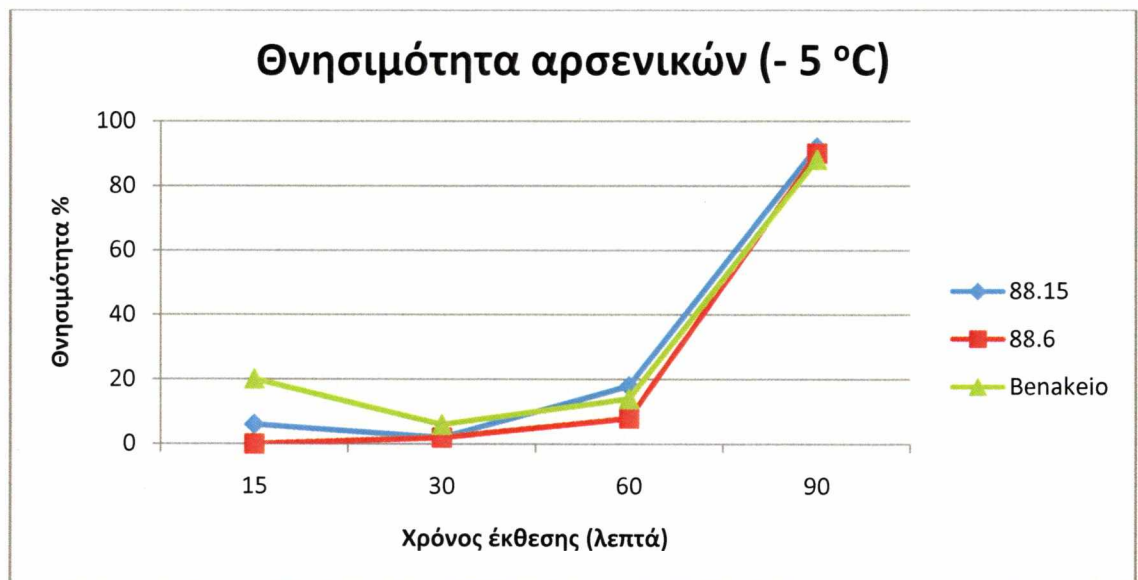
Διάγραμμα 5. Επίδραση της μόλυνσης με *Wolbachia* στη συνολική θνησιμότητα αρσενικών και θηλυκών της μύγας της Μεσογείου μετά από έκθεση τους για διαφορετικά χρονικά διαστήματα στους -5 °C.

Η στατιστική ανάλυση για τη συνολική θνησιμότητα αρσενικών και θηλυκών παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα 8. Οι τρεις παράγοντες α) φυλή β) φύλο*φυλή και γ) χρόνος έκθεσης * φυλή αποτελούν σημαντικούς εκτιμητές. Ο παράγοντας φύλο δεν αποτελεί σημαντικό εκτιμητή.

Πίνακας 8. Πρότυπο λογιστικής παλινδρόμησης για την επίδραση της φυλής της μύγας της Μεσογείου (μολυσμένη ή μη μολυσμένη με *Wolbachia*), του φύλου και της διάρκειας έκθεσης στους -5 °C στην θνησιμότητα των αρσενικών και θηλυκών εντόμων

Πηγή παραλλακτικότητας	Βαθμοί ελευθερίας (df)	Wald-test	P
Φυλή	2	12,574	0,002
Φύλο	1	1,370	0,242
Φύλο * Φυλή	2	13,952	0,001
Χρόνος έκθεσης * Φυλή	1	292,397	0,000

Όπως φαίνεται στο παρακάτω Διάγραμμα 6 τα αρσενικά των τριών φυλών εμφανίζουν ποσοστά θνησιμότητας χαμηλότερα από 20 % σε χρόνους έκθεσης 15, 30 και 60 λεπτά. Συγκεκριμένα η φυλή «Μπενάκειο» εμφανίζει τα υψηλότερα ποσοστά σε χρόνο έκθεσης 15 λεπτά με αρκετά αυξημένα ποσοστά σε σχέση με τις υπόλοιπες φυλές που παρουσιάζουν εμφανώς χαμηλότερα ποσοστά. Το ποσοστό αυτό μειώνεται στα 30 λεπτά και αυξάνει ελαφρώς στα 60 λεπτά για τη φυλή «Μπενάκειο». Σε χρονικό διάστημα έκθεσης 90 λεπτών η θνησιμότητα αυξάνεται σε ποσοστά που φθάνουν το 90 % σε όλες τις φυλές.



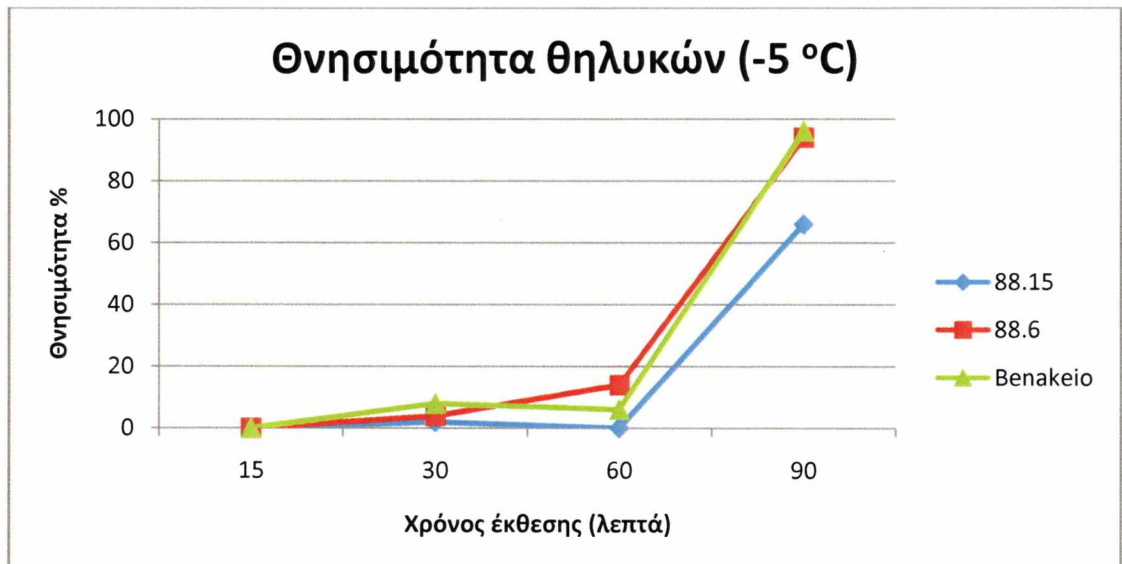
Διάγραμμα 6. Επίδραση της μόλυνσης με *Wolbachia* στη θνησιμότητα αρσενικών της μύγας της Μεσογείου μετά από έκθεση τους για διαφορετικά χρονικά διαστήματα στους -5°C .

Η στατιστική ανάλυση για τη συνολική θνησιμότητα αρσενικών παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα 9. Ο χρόνος έκθεσης, η φυλή και η φυλή σε συνδυασμό με το χρόνο έκθεσης αποτελούν σημαντικούς εκτιμητές της θνησιμότητας.

Πίνακας 9. Πρότυπο λογιστικής παλινδρόμησης για την επίδραση της φυλής της μύγας της Μεσογείου (μολυσμένη ή μη μολυσμένη με *Wolbachia*), του φύλου και της διάρκειας έκθεσης στους -5 °C στην θνησιμότητα των αρσενικών εντόμων.

Πηγή παραλλακτικότητας	Βαθμοί ελευθερίας (df)	Wald-test	P
Χρόνος έκθεσης	1	52,470	0,000
Φυλή	2	20,187	0,000
Χρόνος έκθεσης * Φυλή	1	4,444	0,035

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 7 η θνησιμότητα των θηλυκών σε χρόνους έκθεσης 15 και 30 λεπτών βρίσκεται σε χαμηλά ποσοστά (<10%). Σε χρόνο έκθεσης 60 λεπτών η θνησιμότητα των θηλυκών της φυλής «88.6» εμφανίζει ελαφρά διαφορά σε σχέση με τις υπόλοιπες φυλές καθώς η «88.15» έχει μηδενικά ποσοστά θνησιμότητας. Σε χρόνο έκθεσης 90 λεπτών η θνησιμότητα αυξάνεται απότομα σε ποσοστό >90 % στις φυλές «Μπενάκειο» και «88.6» ενώ στη φυλή «88.15» το ποσοστό είναι αρκετά μικρότερο, περίπου στο 65%.



Διάγραμμα 7. Επίδραση της μόλυνσης με *Wolbachia* στη θνησιμότητα θηλυκών της μύγας της Μεσογείου μετά από έκθεση τους για διαφορετικά χρονικά διαστήματα στους - 5° C.

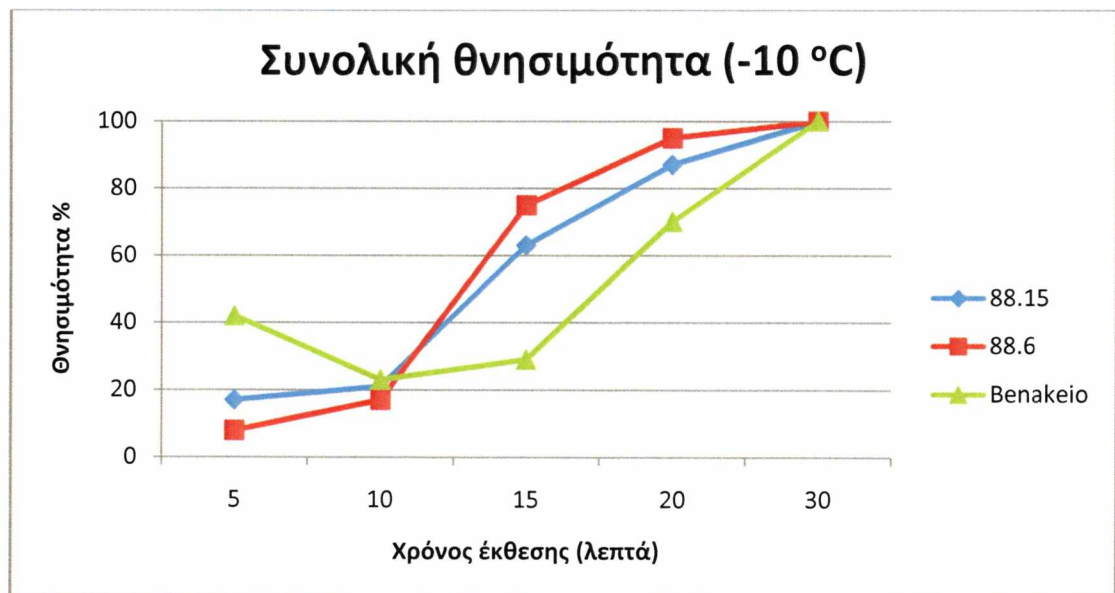
Η στατιστική ανάλυση για τη συνολική θνησιμότητα θηλυκών παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα 10. Ο χρόνος έκθεσης, η φυλή και αλληλεπίδραση του χρόνου έκθεσης με τη φυλή αποτελεί σημαντικούς εκτιμητές της θνησιμότητας.

Πίνακας 10. Πρότυπο λογιστικής παλινδρόμησης για την επίδραση της φυλής της μύγας της Μεσογείου (μολυσμένη ή μη μολυσμένη με *Wolbachia*), του φύλου και της διάρκειας έκθεσης στους -5 °C στην θνησιμότητα θηλυκών εντόμων.

Πηγή παραλλακτικότητας	Βαθμοί ελευθερίας (df)	Wald-test	P
Χρόνος έκθεσης	1	45,843	0,000
Φυλή	2	10,609	0,005
Χρόνος έκθεσης * Φυλή	1	14,661	0,001

3.3 Αντοχή εντόμων στους -10 °C

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 8 η θνησιμότητα των εντόμων ποικίλει σε σχέση με το χρόνο έκθεσης. Σε χρόνο έκθεσης 5 λεπτών η φυλή «Μπενάκειο» εμφανίζει το μεγαλύτερο ποσοστό θνησιμότητας (40%) το οποίο είναι αρκετά υψηλότερο σε σύγκριση με τα ποσοστά των φυλών «88.6» και «88.15» (<20%). Σε χρονικό διάστημα έκθεσης 10 λεπτών η θνησιμότητα των εντόμων φθάνει στα ίδια επίπεδα και για τις τρεις φυλές. Με την αύξηση του χρόνου έκθεσης τα ποσοστά θνησιμότητας αυξάνονται σε όλες τις φυλές φθάνοντας το ποσοστό 100% σε χρόνο έκθεσης 30 λεπτών. Οι τρεις φυλές παρουσιάζουν εμφανείς ποσοστιαίες διαφορές στη θνησιμότητα στους χρόνους έκθεσης 5, 15 και 20 λεπτών. Ενώ αρχικά η φυλή «Μπενάκειο» έχει μεγαλύτερα ποσοστά θνησιμότητας σε χρόνους 15 και 20 λεπτών παρουσιάζει σαφώς μικρότερη θνησιμότητα σε σχέση με τις άλλες δυο φυλές.



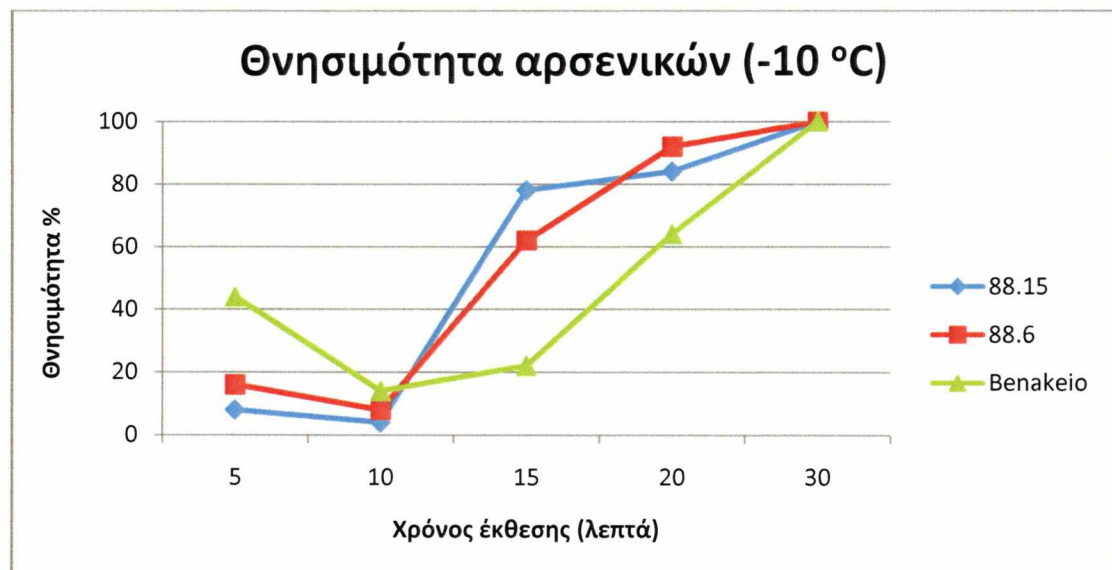
Διάγραμμα 8. Επίδραση της μόλυνσης με *Wolbachia* στη συνολική θνησιμότητα αρσενικών και θηλυκών της μύγας της Μεσογείου μετά από έκθεση τους για διαφορετικά χρονικά διαστήματα στους -10 °C.

Η στατιστική ανάλυση για τη συνολική θνησιμότητα αρσενικών και θηλυκών παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα 11. Οι τρεις παράγοντες που εξετάστηκαν αξιολογούνται ως σημαντικοί εκτιμητές της θνησιμότητας. Τα ποσοστά θνησιμότητας επηρεάζονται από τις διαφορετικές φυλές, το φύλο του εντόμου και τους διαφορετικούς χρόνους έκθεσης.

Πίνακας 11. Πρότυπο λογιστικής παλινδρόμησης για την επίδραση της φυλής της μύγας της Μεσογείου (μολυσμένη ή μη μολυσμένη με *Wolbachia*), του φύλου και της διάρκειας έκθεσης στους -10°C στην θνησιμότητα των αρσενικών και θηλυκών εντόμων.

Πηγή παραλλακτικότητας	Βαθμοί ελευθερίας (df)	Wald-test	P
Φυλή	2	15,418	0,000
Φύλο	1	6,781	0,009
Χρόνος έκθεσης	1	344,695	0,000

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 9 η θνησιμότητα των αρσενικών εντόμων ποικίλει σαφώς για το σύνολο των χρόνων έκθεσης. Η φυλή «Μπενάκειο» εμφανίζει αυξημένο ποσοστό θνησιμότητας σε χρόνο έκθεσης 5 λεπτών σε σχέση με τις φυλές «88.6» και «88.15». Καθώς αυξάνει ο χρόνος έκθεσης στα 10 λεπτά τα ποσοστά θνησιμότητας βρίσκονται σχεδόν στα ίδια επίπεδα. Καθώς αυξάνει περαιτέρω ο χρόνος τα θηλυκά της φυλής «Μπενάκειο» παρουσιάζουν μικρότερα ποσοστά θνησιμότητας σε αντίθεση με τα 5 λεπτά που εμφανίζουν αυξημένα ποσοστά. Σε χρόνο 30 λεπτών έκθεσης η θνησιμότητα είναι στο 100% για όλες τις φυλές. Οι φυλές «88.15» και «88.6» παρουσιάζουν σταθερά παρόμοιες τιμές με την φυλή «88.15» να έχει μικρότερα ποσοστά θνησιμότητας με εξαίρεση τα 15 λεπτά που έχει μεγαλύτερα ποσοστά θνησιμότητας ενώ η φυλή «Μπενάκειο» έχει εμφανή διάφορα στη θνησιμότητα όπου στα 5 λεπτά έκθεσης είναι υψηλότερη και στα 15 και 20 λεπτά χαμηλότερη.



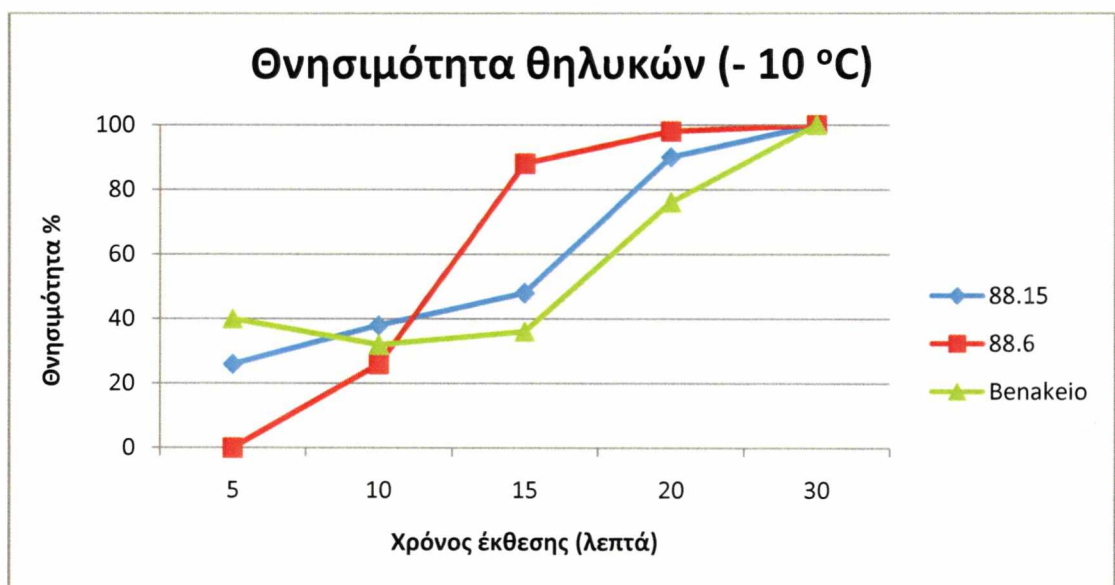
Διάγραμμα 9. Επίδραση της μόλυνσης με *Wolbachia* στη θνησιμότητα αρσενικών της μύγας της Μεσογείου μετά από έκθεση τους για διαφορετικά χρονικά διαστήματα στους -10°C .

Η στατιστική ανάλυση για τη θνησιμότητα αρσενικών των τριών φυλών παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα 12. Οι τρεις παράγοντες που εξετάστηκαν αξιολογήθηκαν ως σημαντικοί αξιολογητές.

Πίνακας 12. Πρότυπο λογιστικής παλινδρόμησης για την επίδραση της φυλής της μύγας της Μεσογείου (μολυσμένη ή μη μολυσμένη με *Wolbachia*), των διαφόρων φυλών, του φύλου και της διάρκειας έκθεσης στους -10° C στην θνησιμότητα αρσενικών εντόμων.

Πηγή παραλλακτικότητας	Βαθμοί ελευθερίας (df)	Wald-test	P
Φυλή	2	11,386	0,003
Χρόνος έκθεσης	1	53,989	0,000
Χρόνος έκθεσης * Φυλή	2	16,707	0,000

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 10 η θνησιμότητα των θηλυκών ποικίλει σαφώς μεταξύ των διαφόρων χρόνων έκθεσης αλλά και μεταξύ των φυλών. Η φυλή «88.6» αρχικά εμφανίζει μηδενικά ποσοστά θνησιμότητας τα οποία αυξάνονται απότομα και είναι μεγαλύτερα μεταξύ των φυλών στα χρονικά διαστήματα έκθεσης 15 και 20 λεπτά. Μεταξύ των φυλών «88.15» και «Μπενάκειο» υπάρχει σχετική ταύτιση των τιμών. Η φυλή «88.15» εμφανίζει μεγαλύτερα ποσοστά σε όλα τα χρονικά διαστήματα εκτός των πέντε λεπτών που εμφανίζει μικρότερα ποσοστά θνησιμότητας.



Διάγραμμα 10. Επίδραση της μόλυνσης με *Wolbachia* στη θνησιμότητα θηλυκών της μύγας της Μεσογείου μετά από έκθεση τους για διαφορετικά χρονικά διαστήματα στους -10°C .

Η στατιστική ανάλυση για τη θνησιμότητα των θηλυκών των τριών φυλών παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα 13. Ο παράγοντας της φυλής δεν αξιολογήθηκε ως σημαντικός εκτιμητής, αντίθετα ο χρόνος έκθεσης επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη θνησιμότητα των θηλυκών στους διαφορετικούς χρόνους έκθεσης.

Πίνακας 13. Πρότυπο λογιστικής παλινδρόμησης για την επίδραση της φυλής της μύγας της Μεσογείου (μολυσμένη ή μη μολυσμένη με *Wolbachia*), των διαφόρων φυλών, του φύλου και της διάρκειας έκθεσης στους -10°C στην θνησιμότητα θηλυκών εντόμων.

Πηγή παραλλακτικότητας	Βαθμοί ελευθερίας (df)	Wald-test	P
Φυλή	2	3,941	0,139
Χρόνος έκθεσης	1	170,635	0,000

Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη όπως φαίνεται από τις μετρήσεις σε διαφορετικούς χρόνους και θερμοκρασίες η θνησιμότητα αυξάνεται 1) με την αύξηση του χρόνου έκθεσης και 2) μείωση της θερμοκρασίας, ωστόσο υπήρξαν εξαιρέσεις σε μερικές περιπτώσεις. Όσον αφορά την επίδραση της *Wolbachia* στη θνησιμότητα των μολυσμένων φυλών («88.6», «88.15») δεν παρουσίασε ξεκάθαρη διαφορά σε σχέση με το μάρτυρα. Ενώ σε αρκετές περιπτώσεις εμφανίστηκαν σημαντικές διαφορές στα ποσοστά θνησιμότητας μεταξύ των τριών φυλών, αυτό δεν παρατηρήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις για μία συγκεκριμένη φυλή. Σε θηλυκά της φυλής 88.6 αν και παρατηρήθηκε υψηλή θνησιμότητα στους -2°C σε σχέση με τις υπόλοιπες φυλές αυτή η θνησιμότητα δεν παρατηρήθηκε στις υπόλοιπες επαναλήψεις για τις διάφορες θερμοκρασίες και χρόνους έκθεσης. Γενικά η υψηλότερη θνησιμότητα που παρατηρήθηκε σε διάφορους χρόνους έκθεσης και θερμοκρασίες δεν προερχόταν από κάποια συγκεκριμένη φυλή ή φύλο.

Συμπεράσματα

Σε γενικές γραμμές τα στοιχεία για την επίδραση της *Wolbachia* στην αντοχή στο ψύχος της μύγας της Μεσογείου είναι περιορισμένα. Με την παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μια πρώιμη καταγραφή των επιπέδων θνησιμότητας που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως οδηγός για περαιτέρω διερεύνηση. Με το παρόν πείραμα δεν προκύπτει κάποιο συμπέρασμα που να υποστηρίζει οποιαδήποτε σημαντική διαφορά μεταξύ μολυσμένων και μη μολυσμένων με *Wolbachia* εντόμων όσον αφορά το ψύχος. Αν και υπήρξαν διαφορές μεταξύ των φύλων και των φυλών αυτές περιορίζονταν σε ένα χρονικό διάστημα έκθεσης και δεν εμφανίζονταν σε όλους τους χρόνους έκθεσης. Οι σημαντικές διαφορές αφορούσαν και τις τρεις φυλές αλλά και τα δυο διαφορετικά φύλα. Κρίνεται αναγκαίο να πραγματοποιηθούν περαιτέρω έρευνες σε διάφορες θερμοκρασίες και χρόνους έκθεσης για να επιβεβαιωθούν τα ευρήματα της παρούσας εργασίας, καθώς αυτή αποτελεί μόνο μία πρόδρομη προσπάθεια διερεύνησης των επιπέδων αντοχής στο ψύχος μολυσμένων από *Wolbachia* ατόμων του *C. Capitata*.

Βιβλιογραφία

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

Augustinos, AA, Kyritsis GA, Papadopoulos, NT, Adly M, Abd-Alla M, Cáceres, C & Bourtzis, K 2015, Exploitation of the Medfly Gut Microbiota for the Enhancement of Sterile Insect Technique: Use of *Enterobacter* sp. in Larval Diet-Based Probiotic Applications, *PloS one*, 10(9), p.e0136459

Bandi, C, Anderson, TJ, Genchi, C & Blaxter, ML 1998, *Phylogeny of Wolbachia in filarial nematodes*, *Proc Biol Sci*, vol. 265, pp. 2407–2413.

Bandi, C, Sironi, M, Nalepa, CA, Corona, S & Sacchi, L 1997, Phylogenetically distant intracellular symbionts in termites, *Parassitologia* 39, 71–75.

Dyer BD, 2003, *A Field Guide to Bacteria*, Cornell University Press, United States of America.

Bjelis, M 2008, Fruit flies from the family *Rhagoletis* (Tephritidae) in Croatia, *Glasiolo Biljne Zastite* vol.8, pp. 25–28.

Bjelis, M 2008, *Landscape ecology of species from subfamily Tephritinae (Tephritidae, Diptera) along a north-east Adriatic lowlands*, first meeting of Tephritid workers of Europe, Africa and the Middle East, Palma de Mallorca.

Boller, E.F & Bush, G.L. 1974, Evidence for genetic variation in populations of the European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae) based on physiological parameters and hybridization experiments, *Entomol. Exp. Appl.* Vol.17, pp. 279–293.

Boller, EF, Russ, K, Vallo, V, & Bush, GL 1976, Incompatible races of European cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae): their origin and potential use in biological control, *Entomol. Exp. Appl.* Vol.20, pp. 237–247.

Bonizzoni, M, Malacrida, AR, Guglielmino, CR, Gomulski L.M, Gasperi, G & Zheng, L 2000, Microsatellite polymorphism in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, *Insect Mol Bio*, vol.9, pp. 251–261.

Bourtzis K, & Thomas A.M 2006, *Insect Symbiosis: Volume 2*, CRC Press, United States of America.

Carey, JR 1991, Establishment of the Mediterranean fruit fly in California, *Science*, vol. 253, pp. 1369–1373.

Carey, JR 2010, The Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*), *An. Entomol.* vol. 253, pp. 116–121.

Casiraghi, M, Favia, G, Cancrini, G, Bartoloni, A & Bandi, C 2001, Molecular identification of *Wolbachia* from the filarial nematode *Mansonella ozzardi*, *Parasitol Res*, vol. 87, pp. 417–420.

De Meyer M, Robertson MP, Mansell MW, Ekesi S, Tsuruta K, Mwaiko W, Vayssières JF, & Peterson AT 2010, Ecological niche and potential geographic distribution of the invasive fruit fly *Bactrocera invadens* (Diptera, Tephritidae), *Bull Entomol Res*, vol. 100, pp. 35–48.

De Meyer M, Robertson MP, Peterson AT & Mansell MW 2008, Ecological niches and potential geographical distributions of Mediterranean fruit fly (*Ceratitidis capitata*) and Natal fruit fly (*Ceratitidis rosa*), *J Biogeogr* vol. 35, pp. 270–281.

Dyck, V.A, Hendrichs, J & Robinson, AS 2005, *Sterile Insect Technique. Principles and Practice. In Area-Wide Integrated Pest Management*, Springer, Dordrecht, The Netherlands.

Enkerlin, W & Mumford, J 1997, Economic evaluation of three alternative methods for control of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in Israel, Palestinian territories, and Jordan, *J Econ Entomol* vol. 90, pp. 1066–1072.

Estay, SA, Lima, M & Labra, FA 2009, Predicting insect pest status under climate change scenarios: combining experimental data and population dynamics modeling, *J Appl. Entomol.*, vol. 133, pp. 491– 1094

Food and Agriculture Organization of the United Nations 2005, Glossary of Phytosanitary Terms, Publication Number 5, *International Plant Protection Convention (IPPC)*, FAO, Rome, Italy.

Franz, G 2005, *Genetic sexing strains in Mediterranean fruit fly, an example for other species amenable to large-scale rearing for the sterile insect technique In: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*, Springer, Dordrecht, The Netherlands.

Gutierrez, A, Ponti, L & Cossu, Q 2009, Effects of climate warming on olive and olive fly (*Bactrocera oleae* (Gmelin)) in California and Italy, *Climatic Change* vol.95, pp. 195–217.

Jerome, BS & Cooper, T 1995, If medfly infestation triggered a trade ban: Embargo on California produce would cause revenue, job loss, *California Agriculture* vol. 49, pp. 7-12.

John, L.C 2008, *Encyclopedia of entomology*, Vol. 3 (P-Z), pp. 2168

Katsoyannos, BI 1989a, *Response to shape, size and color, In Fruit Flies: Their Biology And Control, vol. 3A, World Crop Pests*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 307-324.

Katsoyannos, BI 1989b, *Field responses of Mediterranean fruit flies to spheres of different color patterns and to yellow crossed panels, In: Fruit flies of economic importance*, Balkema, Rome, Italy, pp. 393-400

Laven, H 1967, Eradication of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmic incompatibility, *Nature*, vol. 216, pp. 383–384.

Levinson, HA, Levinson AR & Osterried, E 2003, Orange-derived stimuli regulating oviposition in the Mediterranean fruit fly, *Journal of Applied Entomology*, vol.127, pp.269-275.

- Li, BN, Ma J, Hu XN, Liu HJ & Zhang RJ 2009, Potential geographical distributions of the fruit flies *Ceratitis capitata*, *Ceratitis cosyra*, and *Ceratitis rosa* in China. *J Econ Entomol*, vol.102, pp. 1781– 1179
- Liebholt, AM & Tobin PC 2008, Population ecology of insect invasions and their management. *Ann Rev Entomol*, vol. 53, pp. 387–408
- Liquido, NJ, Shinoda LA, & Cunningham, R.T 1991, Host plants of the Mediterranean fruit fly (Diptera, Tephritidae) an annotated world review, Miscellaneous Publications, No.77, *Entomological Society of America*, Lanham, MD.
- Lo, N, Casiraghi, M, Salati, E, Bazzocchi, C & Bandi, C 2002, How many *Wolbachia* supergroups exist? *MolBiolEvol* vol. 19, pp. 341–346.
- Mirsardoo S, Mafi-Pashakolaei SA, Barari, H 2010, Preliminary investigation on the geographical distribution of Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Dip., Tephritidae), in Mazandaran province, Iran, *J Entomol Res* vol. 2, pp.143–154
- Papadopoulos, NT 1999, 'Study on the biology and ecology of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in northern Greece' PhD thesis (in Greek with English summary), Aristotle University of Thessaloniki
- Papadopoulos NT, Katsoyannos BI, Carey JR & Kouloussis NA, 2001a Seasonal and annual occurrence of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in northern Greece, *Ann EntomolSoc Am* vol. 94 pp. 41–50
- Papadopoulos, NT, Plant, RE & Carey JR 2013, From trickle to flood: the large-scale, cryptic invasion of California by tropical fruit flies, *Proc R Soc B Biol Sci*.
- Papadopoulos NT, 2008, Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), In *Encyclopedia of Entomology Vol. 3*, Springer, Heidelberg
- Papadopoulos, NT, Stavrides DG, Zarpas KD & Diamantidies, AD, 2012, *Georgia Ktinotrofia*, vol.7, pp. 2318-2322
- Ponti, L, Cossu, QA & Gutierrez, AP, 2009, Climate warming effects on the *Olea europaea*-*Bactrocera oleae* system in Mediterranean islands: Sardinia as an example, *Glob Change Biol*, vol.15, pp.2874–2884
- Prokopy, RJ, & Roitberg, BD, 1989, *Fruit fly foraging behavior*, In *World Crop Pests Vol. 3A*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 293-306
- Richardson, DM, Pysček, P, Rejmaňek, M, Barbour MG, Panetta FD & West CJ, 2000, Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions, *Divers Distrib*vol.6 pp.93–107
- Robinson, AS, Cayol, JP & Hendrichs, J 2002, Recent findings on medfly sexual behavior: implications for SIT, *Florida Entomologist* vol. 85, pp. 171–181.
- Rocha, LS, Mascarenhas, RO, Perondini ALP & Selivon D, 2005, Occurrence of *Wolbachia* in Brazilian samples of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), *Neotrop. Entomol*, vol. 34, pp. 1013–1015.
- Rowley, SM, Raven, RJ & McGraw, EA, 2004, *Wolbachia pipientis* in Australian spiders. *CurrMicrobiol*, vol. 49, pp. 208–214.

White IM, Elson-Harris MM, 1992, *Fruit flies of economic significance their identification and bionomics*, CAB International, Wallingford

Shelly, TE, Epsky, N, Jang, EB, Reyes-Flores, J & Vargas, RI, 2014, *Trapping and the Detection, Control, and Regulation of Tephritid Fruit Flies*, Springer, Dordrecht

Turelli, M & Hoffmann, AA, 1991, Rapid spread of an inherited incompatibility factor in California *Drosophila*, *Nature*, vol. 353 pp. 440–442.

Dyck VA, Hendrichs J & Robinson AS, 2005, *Sterile Insect Technique Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*, Springer

Vandekerckhove, TMT, Watteyne, S, Willems, S, Swings, Mertens, JG & Gillis, M 1999, Phylogenetic analysis of the 16S rDNA of the cytoplasmic bacterium *Wolbachia* from the novel host *Folsomia candida* (Hexapoda, Collembola) and its implications for the *Wolbachia* taxonomy, *FEMS MicrobiolLett*, vol.180 pp. 279–286.

Vera MT, Rodriguez, R, Segura DF, Cladera JL & Sutherst RW 2002a, Potential geographical distribution of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae), with emphasis on Argentina and Australia. *Environ Entomol* vol31, pp. 1009–1022

Vermeij GJ 1996, An agenda for invasion biology, *Biol. Conserv*, vol. 78, pp. 3–9

Werren, JH & Windsor, DM, 2000, *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium, *Proc. R. Soc. London (B)* vol. 267, pp. 1277–1285.

Werren, JH, Windsor, D, & Guo, LR 1995, Distribution of *Wolbachia* among Neotropical Arthropods. *Proc. R. Soc. London (B)* 262: 197–204.

Zabalou, S, Apostolaki, A, Livadaras, I, Franz, G, Robinson, AS, Savakis, C, & Bourtzis, K, 2009, Incompatible insect technique: incompatible males from a *Ceratitidis capitata* genetic sexing strain, *Entomol Exp. Appl.* vol.132, pp. 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. *Proc. Natl. Acad. Sci*, vol. 101 pp. 15042–15045.

Ελληνόγλωσση Βιβλιογραφία

Ευσταθίου Γ 2007, Κλωνοποίηση του γονιδιακού τύπου των α-εστερασών στη Μεσογειακή μύγα, *Ceratitidis capitata* (Wiedemann), Λάρισα

Τζανακάκης ΜΕ, και Κατσογιαννος ΒΙ, 2003, Έντομα καρποφόρων δέντρων και αμπέλου, εκδόσεις ΑγροΤύπος, Ελλάδα

Ντουντούμης, Ε 2014, Χαρακτηρισμός των συμβιωτικών σχέσεων του βακτηρίου *Wolbachia* με έντομα αγροτικής, δασικής και ιατρικής σημασίας. Διδακτορική Διατριβή Πανεπιστήμιο Πατρών, Αγρίνιο

Παπαδόπουλος Ν, Σταυρίδης Δ, Ζάρπας Κ, και Διαμαντιδής Α, 2012 Γεωργία - Κτηνοτροφία, τεύχος 7/2012 σελ. 38 -4



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



004000134358