ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΣΗΜΕΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΤΟΥ DROSOPHILA SUZUKII ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗΣ ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗΣ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

ΜΠΕΛΕΝΙΩΤΗ ΜΑΡΙΑ

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΧΑΝΙΩΤΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2020

UNIVERSITY OF CRETE

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

LABORATORY ANALYTICAL CHEMISTRY

DOCTORAL THESIS

DETERMINATION OF SEMIOCHEMICAL COMPOUNDS OF DROSOPHILA SUZUKII FOR THE DEVELOPMENT INTEGRATED PEST MANAGEMENT STRATEGIES IN GREECE

BELENIOTI MARIA

THESIS SUPERVISOR: CHANIOTAKIS NIKOLAOS

HERAKLION 2020

Στους γονείς μου..

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΧΑΝΙΩΤΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ (Επιβλέπων Καθηγητής)

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

ΚΑΤΕΡΙΝΟΠΟΥΛΟΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ (Α' Συνεπιβλέπων Καθηγητής)

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

ΒΟΝΤΑΣ ΙΩΑΝΝΗΣ (Β' Συνεπιβλέπων Καθηγητής)

Καθηγητής Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΒΑΣΙΛΙΚΟΓΙΑΝΝΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

ΓΑΝΩΤΑΚΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

ΡΟΔΙΤΑΚΗΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ

Καθηγητής Τμήματος Γεωπονίας Ελληνικού Μεσογειακού Πανεπιστημίου

ΣΠΥΡΟΣ ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής, τώρα που όλα φαντάζουν πιο εύκολα, οφείλω το πρώτο και μεγαλύτερο ευχαριστώ στον καθηγητή μου, κ. **Χανιωτάκη Νικόλαο**. Ένας εξαιρετικός επιστήμονας, ο οποίος μου στάθηκε δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια με το ευρύ επιστημονικό του υπόβαθρο και με τις πολύτιμες συμβουλές του. Τον ευχαριστώ γιατί μου έμαθε να βάζω στόχους στη ζωή μου και να στηρίζομαι στις δυνάμεις μου. Είναι ένας άνθρωπος πραγματικός δάσκαλος για μένα, τον οποίο θαυμάζω και μου δίνει κίνητρο στο να συνεχίχω να προσπαθώ για τα όνειρα μου.

Επίσης ευχαριστώ θερμά τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής: κ. **Κατερινόπουλο Χαράλαμπο**, καθηγητή Παν/μίου Κρήτης, κ. **Βόντα Ιωάννη**, καθηγητή Γεωπονικού Παν/μίου Αθηνών, κ. **Ροδιτάκη Εμμανουήλ**, καθηγητή ΕΛ.ΜΕ.ΠΑ, κ. **Βασιλικογιαννάκη Γεώργιο**, καθηγητή Παν/μίου Κρήτης, κ. **Γανωτάκη Δημήτριο**, καθηγητή Παν/μίου Κρήτης και κ. **Σπύρο Απότολο**, καθηγητή Παν/μίου Κρήτης για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους που συνέλαβαν σημαντικά στο τελικό αποτέλεσμα. Ιδιαιτέρως θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ροδιτάκη Εμμανουήλ και το ΕΘΙΑΓΕ, για τις σημαντικές υποδείξεις του στον τομέα της εντομολογίας. Η βοήθεια του ήταν καθοριστική για την ολοκλήρωση της διατριβής μου.

Παράλληλα κατά τη διάρκεια όλων αυτών των χρόνων, υπήρχαν άνθρωποι, οι οποίοι με βοήθησαν να προπελάσω δυσκολίες και στάθηκαν δίπλα μου σε όλες τις απογοητεύσεις. Ειδικότερα, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην **Φουσκάκη Μαίρη**, η οποία με τις συμβουλές της, τις γνώσεις της, την εμπειρία της και τις ιδέες της με βοήθησε στη θεμελίωση της παρούσας διατριβής. Ήταν καθημερινά δίπλα μου για να με στηρίζει τόσο επιστημονικά όσο και ψυχολογικά.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την **Δρ. Αποστολάκη Μαρία**. Ένας εξαιρετικός άνθρωπος, ο οποίος μου προσέφερε με πραγματική ανιδιοτέλεια τις γνώσεις της. Την ευχαριστώ θερμά για όλες τις ώρες και τις μέρες που μου αφιέρωσε όλα αυτά τα χρόνια. Επίσης την ευχαριστώ για τις συμβουλές της και νιώθω πολύ τυχερή που συνάντησα έναν τέτοιον καταπληκτικό άνθρωπο.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο Διδάκτωρ **Σοφιαδή Μάνο**, από το Εργαστήριο Οργανικής, Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Κρήτης με υπεύθυνο καθ. τον κ. Βασιλικογιαννάκη Γεώργιο. Ο Μάνος διαδραμάτισε καθοριστικό ρόλο στη παρούσα διατριβή, καθώς χωρίς τη βοήθεια του και συγκεκριμένα τη σύνθεση συγκεκριμένων ουσιών, δεν θα είχα καταφέρει να περάσω στο επόμενο βήμα.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήρω τα μέλη του εργαστηρίου μου και συγκεκριμένα τον **Αλιφραγκή Γιάννη**, τη **Γιαννακάκη Εύη** και την **Αλιπράντη Φλωρεντία** για τη στήριξή τους και τα όμορφα χρόνια που περάσαμε στο εργαστήριο.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους φίλους μου, **Ρούσσο Γιώργο** και **Πέτρου Αθανασία**, οι οποίοι όλα αυτά τα χρόνια με στήριξαν και με βοήθησαν τόσο με τις γνώσεις τους όσο και με τις πολύτιμες συμβουλές τους. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω το φιλο μου δρ. **Κουβαράκη Γιώργο**, ο οποίος πάντα με προθυμία με βοηθησούσε σε οτιδήποτε χρειαζόμουν. Επίσης ευχαριστώ τις παιδικές μου φίλες, **Γιάννα, Ελένη** και **Μαριέλα**, οι οποίες όλα αυτά τα χρόνια ήταν εκεί οποιαδήποτε στιγμή τις χρειάστηκα για να με ενθαρύνουν και να με στηρίζουν. Επίσης οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στο σύντροφό μου, **Κώστα,** για την αμέριστη κατανόηση και υπομονή που έδειξε όλα αυτά τα χρόνια της προσπάθειά μου.

Αφήνω το τελευταίο και το πιο βαθύ από ψυχής ευχαριστώ στην οικογένεια μου και ιδιαίτερα στους γονείς μου, **Ελένη** και **Γιώργο** και την αδερφή μου **Εύη.** Τους ευχαριστώ γιατί χωρίς αυτούς δεν θα είχα καταφέρει τίποτα. Τους ευχαριστώ γιατι όλα αυτά τα χρόνια επέλεξαν να στερηθούν εκείνοι για να μπορώ εγώ να πετυχαίνω τους στόχους μου. Είναι πάντα δίπλα μου, στα εύκολα και στα δύσκολα και είναι αυτοί που ευθύνονται για το τι είμαι σήμερα.

Τελειώνοντας αυτό το κεφάλαιο στη ζώη μου θα ήθελα να μοιραστώ μία φράση του Καζαντζάκη:

Έχεις τα πινέλα, έχεις και τα χρώματα, ζωγράφισε τον παράδεισο και μπες μέσα.

Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (MIS-5000432), που υλοποιεί το **Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).**

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Προσωπικές Πληροφορίες

Όνομα:	Μαρία
Επώνυμο:	Μπελενιώτη
Ιδιότητα:	Γεωπόνος
Ημερομηνία γεννήσεως:	13 Ιανουαρίου 1989
Οικογενειακή κατάσταση:	Άγαμη
Τηλέφωνο επικοινωνίας:	+30 6959880755
Διεύθυνση:	Αρσινόης 22, Ηράκλειο Κρήτης
Διεύθυνση ηλεκτρονικού ταχυδρομείου:	maria_belenioti@hotmail.com

Σπουδές

- **Ιούνιος 2016 – Απρίλιος 2020**

Διδακτορικό δίπλωμα στο τμήμα Χημείας, Πανεπιστημίου Κρήτης.
Ο τίτλος της διδακτορικής διατριβής είναι *'Προσδιορισμός και Χαρακτηρισμός Σημειοχημικών Ουσιών του Drosophila suzukii για την Ανάπτυξη Ολοκληρωμένης Στρατηγικής Διαχείρισής του στην Ελλάδα.'*

- **Ιούλιος 2013 - Μάρτιος 2016**

Μεταπτυχιακές σπουδές στο πρόγραμμα *«Απομόνωση και Σύνθεση Φυσικών Προϊόντων με Βιολογική Δραστικότητα»* του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης.
Ο τίτλος της διπλωματικής εργασίας είναι *'Ελκυστική Δράση Πτητικών Ουσιών Ώριμων Φρούτων επί του Drosophila suzukii (Diptera:Drosophilidae).'*

- **Οκτώβριος 2006 - Ιανουάριος 2012**

Προπτυχιακές σπουδές στο Τμήμα '*Αγροτικής Οικονομίας και Διοίκηση Αγροτικών Επιχειρήσεων'* στο Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης με κατεύθυνση Τεχνολογία και Ανάλυση Τροφίμων, και βαθμό 7,01 *«Λίαν Καλώς».*
Ο τίτλος της διπλωματικής εργασίας είναι: *'Μελέτη της σύστασης αιθέριων ελαίων των φυτών Mentha spicata και Mentha longifolia όπως και της αντιμικροβιακής τους δράσης ενάντια στο βακτήριο Staphylococcus aureus. Έλεγχος της σχέσης δομής αντιμικροβιακής δράσης των κύριων συστατικών τους'*

Υποτροφίες

- **Δεκέμβριος 2016- 2019**

Υπότροφος του **Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών (Ι.Κ.Υ.)**. Η Πράξη με τίτλο «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής διατριβής» με κωδικό MIS 5000432, η οποία συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση».

Δημοσιεύσεις

Belenioti M., Chaniotakis N. (2019) Aggressive Behaviour of *Drosophila suzukii* in Relation to Environmental and Social Factors' Scientific Reports, Nature (accepted)

Συμμετοχή σε Διεθνή Συνέδρια

- **Belenioti M.,** Redoumis I. Chaniotakis N (2019*)* Studying Aggression in *Drosophila suzukii* 21ο Conference Master Student, Department of Chemistry, Panepistimioupoli Vouton, Heraklion Crete, 15-17 May 2019.
- **Belenioti M.,** Chaniotakis N. (2018) The Elucidation of the Pheromone Profile of *Drosophila suzukii* with GC-MS' **'**ECE 2018 - XI EUROPEAN CONGRESS OF ENTOMOLOGY**',** Napole.
- **Belenioti M.,** Chaniotakis N. (2017) Time Dependent Pheromone Profile of *Drosophila Suzukii* e-poster "Plant Biotechnology & Agriculture, AGRI-WORLD" Belenioti Maria et al., Adv Crop Sci Tech 2018, Volume 6 DOI: 10.4172/2329-8863-C1-006
- **Μπελενιώτη Μ.**, Χανιωτάκης Ν.(2016) Ελκυστική Δράση Πτητικών Ουσιών Ώριμων Φρούτων επί του *Drosophila suzukii*. 18^{ο} Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας, Πανεπιστημίου Κρήτης
- **Μπελενιώτη Μ.**, Παντελέρη Ρ, Δουρής Β, Βόντας Ι. Χανιωτάκης Ν. (2015) Απόκριση *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophiladeae) σε χημικές ουσίες και ανθεκτικότητά της στα εντομοκτόνα. 16ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο, 20-23 Οκτωβρίου, Ηράκλειο Κρήτης, Μάιος 2015.
- Συμμετοχή στο διεθνές συνέδριο του Οργανισμού **IOBC** στη 7^{η} Συνάντηση του IOBCWPRS Working Group με θέμα "**Integrated Plant Protection of Olive Crops**", Καλαμάτα, Ελλάδα.

Συμμετοχή σε Προγράμματα (Κρατικά & Ευρωπαϊκά)

- **2017-2018**

Διαχείριση προγράμματος μικρού μεγέθους (Τύπου ΙΙ) του Ειδικού Λογαριασμού Κονδυλίων Έρευνας (ΕΛΚΕ). Τίτλος έργου '*Προσδιορισμός και Χαρακτηρισμός Σημειοχημικών Ουσιών του Drosophila suzukii για την Ανάπτυξη Ολοκληρωμένης Στρατηγικής Διαχείρισής του στην Ελλάδα.'*.

- **2014 - 2015**

Συντονίστρια του διακρατικού προγράμματος που χρηματοδοτήθηκε από το Ευρωπαϊκό Πρόγραμμα **'**Youth in Action', με κωδικό GR-12–E135-2013-R3 & 1.2/R3/2013/34, υπό την αιγίδα του Ιδρύματος Νεολαίας και Δια Βίου Μάθηση. Το πρόγραμμα υλοποιήθηκε ταυτόχρονα σε Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδας και Μπράγκα, Πορτογαλίας και είχε ως θέμα την '*Ενσωμάτωση των Ατόμων με Μειωμένη Κινητικότητα στην Κοινωνία*'

- **Μάρτιος 2015 και Απρίλιος 2016**

Συμμετοχή στην οργάνωση του 2^{ο} και 3^{ο} Συνέδριου του Ευρωπαϊκού Προγράμματος 'Chain Reaction'που διοργανώθηκε στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης σχετικά με τη «Διερευνητική μάθηση και την εφαρμογή της στη διδασκαλία των φυσικών επιστημών στη Δευτεροβάθμια εκπαίδευση».

Διδακτική Εμπειρία

- **Σεπτέμβριος 2017-Δεκέμβριος 2018**

Βοηθός Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας σε προπτυχιακούς φοιτητές του Τμήματος Χημείας στο Πανεπιστήμιο Κρήτης

- **Σεπτέμβριος 2015 - Δεκέμβριος 2016 και Σεπτέμβριος 2016 - Δεκέμβριος 2017**

Βοηθός Εργαστηρίου στο Μάθημα Πληροφορικής σε προπτυχιακούς φοιτητές του Τμήματος Χημείας στο Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τεχνικές- Μέθοδοι

- Αέρια χρωματογραφία - Φασματομετρία μαζών (Gas Chromatography – Mass Spectometry, GC/MS)
- Υγρή Χρωματογραφία-Υψηλής Απόδοσης (High Pressure-Liquid Chromatography, HPLC)
- Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης (Atomic Absorption Spectrometry, AAS)
- Μέθοδος Υδροαπόσταξης (HydroDistilation, HD) με χρήση της συσκευής Clevenger
- Μέθοδος Kirby Bauer - μέθοδο διάχυσης από χάρτινους δίσκους σε στερεό υπόστρωμα
- Μέθοδος Minimum Inhibitory Concentration (MIC) - μέθοδος αραίωσης σε υγρό καλλιεργητικό υπόστρωμα
- Τεχνικές καλλιέργειας μικροβίων
- Τεχνικές καλλιέργειας εντόμων
- Γνώσεις χρήσης στερεοσκοπίου και μικροσκοπίου

Εργασιακή Εμπειρία

- **Μάρτιος 2013 - Ιανουάριος 2016**

Υπάλληλος στην ιδιωτική επιχείρηση

Τομείς Εργασίας:

1. Πρωτόκολλα πειραμάτων πεδίου για τα προϊόντα της επιχείρησης (φυτοπροστατευτικά προϊόντα) σύμφωνα με την 'Ολοκληρωμένη Διαχείριση Επιβλαβών Οργανισμών'
2. Έλεγχος Ποιότητας Παραγόμενου Προϊόντος
3. Τοποθέτηση παγίδων και καταμέτρηση του πληθυσμού διαφόρων επιβλαβών οργανισμών (*Bactrocera oleae, Ceratitis capitata, Drosophila suzukii*)
4. Επιμορφωτικά σεμινάρια σε επαγγελματίες και ερασιτέχνες αγρότες με θέματα όπως (Ωφέλιμα Έντομα, Διατήρηση Βιοποικιλότητας, Ολοκληρωμένη Φυτοπροστασία, Καλλιεργητικές Τεχνικές)
5. Ανάπτυξη του Τμήματος Πωλήσεων

- **Ιούνιος 2010 - Σεπτέμβριος 2010**
- **Μάιος 2011 - Σεπτέμβριος 2011**

Υπάλληλος στο χημείο της «**Ένωσης Αγροτικών Συνεταιρισμών Ηρακλείου**» Στα πλαίσια πρακτικής άσκησης στον τομέα της ανάλυσης κρασιών

Αρμοδιότητες:

- μετρήσεις οξύτητας

- πυκνότητας οίνου
- αγωγιμότητας
- pH

Επιμόρφωση-Σεμινάρια

- **Μάρτιο 2017**

Παρακολούθηση του προγράμματος '*Οινολογίας*' στο Τμήμα Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης.

- **Νοέμβριος 2014**

Συμμετοχή στο τριήμερο εκδηλώσεων του Γεωτεχνικού Επιμελητηρίου Κρήτης σχετικά με *«Μετάβαση σε ένα ισχυρό αειφόρο αγροδιατροφικό σύστημα»*.

- **Ιούνιος 2010**

Συμμετοχή στην 2ημερη ημερίδα με θέμα *«Εισαγωγή στα αυτοφυή φυτά με αρωματική και καλλωπιστική χρήση»* στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

- **Ιανουάριος 2009**

Συμμετοχή στο σεμινάριο *«Μέθοδοι θρέψης και φυτοπροστασίας με φυσικές και χημικές μεθόδους»* στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

- **Οκτώβριος 2008**

Συμμετοχή σε 4μηνο εκπαιδευτικό σεμινάριο *«Μηχανογραφημένης λογιστικής και κοστολόγησης»,* στο Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Ορεστιάδας.

- **Νοέμβριος 2008**

Συμμετοχή σε ημερίδα με θέμα **«***Οι κοινωνικές και περιβαλλοντικές διαστάσεις του μάρκετινγκ στο πλαίσιο της εταιρικής κοινωνικής ευθύνης»*, στο πλαίσιο του Money Show, στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Γνώσεις Ξένων Γλωσσών

- **Αγγλικά:** Πολύ Καλά, Κάτοχος αγγλικού τίτλου 'IELTS, British Council', 2012
- **Γερμανικά:** Πολύ Καλά, Κάτοχος γερμανικού τίτλου 'Zertificat', 2003
- **Πορτογαλικά:** Βασική Γνώση

Γνώσεις Ηλεκτρονικού Υπολογιστή-Λογισμικά

- **Προγράμματα:** SPSS Statistics**,** Origin Analysis Program
- **Κάτοχος ECDL:** Microsoft Word, Excel, Powerpoint, Outlook, Access

CURICULUM VITAE

Personal Details

Full name:	Belenioti Maria
Date of birth:	January 13th 1989
Professional property:	Agriculturist
Marital status:	Single
Address:	Arsinois 22 Heraklion, Greece
Phone:	+ 30 6959 880 755
e-mail:	maria_belenioti@hotmail.com

Education

- **June 2016 - April 2020**

Doctoral thesis entitled ‘ *Determination of Semiochemical Compounds of Drosophila suzukii for development Integrated Pest Management Strategies in Greece’*. The doctoral thesis was completed in the Laboratoty of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Greece.

- **July 2013 - March 2016**

Master studies in the ‘Isolation and Synthesis of Natural Products with Biological Activity’, Department of Chemistry, University of Crete. Thesis title: ‘*Response of the invasive pests Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilideae) to chemical compounds from fermented fruits*’. The master thesis was completed in the Laboratoty of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Greece.

- **October 2006 - January 2012**

Bachelor Degree, Department of Agricultural Economics and Agricultural Business Management, Democritus University of Thrace. Thesis title: ‘*Research on composition of essential oil’s Mentha spicata and Mentha longifolia and the anti microbial action on Staphylococcus aureus. Control of relationship between structure and antimicrobial action on main compounds of essential oils’*.

Scholarship

- **December 2016- 2019**

This research is co-financed by Greece and the European Union (European Social Fund- ESF) through the Operational Programme «Human Resources Development, Education and Lifelong Learning» in the context of the project “Strengthening Human Resources Research Potential via Doctorate Research” (MIS-5000432), implemented by the **State Scholarships Foundation** (**IKY**)»

Publication in International Scientific Journals with Reviewers

Belenioti M., Chaniotakis N. (2019) Aggressive Behaviour of *Drosophila suzukii* in Relation to Environmental and Social Factors’ Scientific Reports, Nature (accepted)

Presentation of International Conferences

- **Belenioti M.,** Redoumis I. Chaniotakis N (2019*)* Studying Aggression in *Drosophila suzukii* 21o Conference Master Student, Department of Chemistry, Panepistimioupoli Vouton, Heraklion Crete, 15-17 May 2019.
- **Belenioti M.,** Chaniotakis N. (2018) The Elucidation of the Pheromone Profile of *Drosophila suzukii* with GC-MS' **'**ECE 2018 - XI EUROPEAN CONGRESS OF ENTOMOLOGY**',** Napole.
- **Belenioti M.,** Chaniotakis N. (2017) Time Dependent Pheromone Profile of Drosophila Suzukii e-poster "Plant Biotechnology & Agriculture, AGRI-WORLD"Belenioti Maria et al., Adv Crop Sci Tech 2018, Volume 6 DOI: 10.4172/2329-8863-C1-006.
- **Belenioti M.,** Chaniotakis N. 2016)' Attractiveness of Ripe Fruit Volatile Compounds to *Drosophila suzukii'*. 18° Conference Master Student Department of Chemistry, Panepistimioupoli Vouton, Heraklion Crete.
- **•Belenioti M.,** Chaniotakis N, Panteleri R, Douris B., Vontas J. (2015) Response of the invasive pests Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilideae) to chemical compounds from fermented fruits. 16o Panhellenic Entomology Conference, 20-23 Octomber, Heraklion Crete, May 2015.
- Participation on global conference of IOBC with subject 7th Meeting of the IOBC-WPRS Working Group "Integrated Plant Protection of Olive Crops", Kalamata, Messinia, Greece.

Participation of International Programs

- **2017-2018**

Management of small program (Type II) of ELKE Research Committee. Title of program '*Determination of Semiochemical Compounds of Drosophila suzukii for development Integrated Pest Management Strategies in Greece'*

- **2014-2015**

Participation in the implementation of the transnational program financed by the European Program "Youth in Action", with code GR-12–E135-2013-R3 & 1.2/R3/2013/34, under the auspices of the Foundation for Youth and Lifelong Learning. The program was simultaneously implemented in Heraklion (Crete, Greece) and Braga (Portugal) and aimed mainly at integrating into society of people with reduced mobility.

- **March 2015 and April 2016**

Participation of management of 2nd and 3 nd European 'Chain Reaction', in Department of Chemistry, University of Crete. Title of European Program was 'Chain Reaction: A Substainable Approach to Inquiry Based Science Education'.

Teaching Experience

- **September 2017-December 2018**

Supervisor Assistant in Analytical Chemistry Laboratories, Department of Chemistry, University of Crete. Supervisor Professor: Dr. Saridakis.

September 2015 - December 2016 and September 2016 - December 2017

Supervisor Assistant in Informatics Laboratories, Department of Chemistry, University of Crete. Supervisor Professor: Dr. Triantafillakis.

Laboratory Techniques

- Gas Chromatography – Mass Spectometry (GC/MS)
- High Pressure-Liquid Chromatography (HPLC)
- Atomic Absorption Spectrometry (AAS)
- Method of HydroDistilation (HD) (Method of Clevenger)
- Method Kirby Bauer
- Method Minimum Inhibitory Concentration (MIC) –
- Tecniques caltivation of microbs
- Tecniques caltivation insects
- Knowldege of use stereoskope and microscope

Work experience

- **March 2013 - Junuary 2016**

Working as Agricultural Researcher at private company.

Subject Areas:

1. Creation of field experiments protocols for the company products according to the 'Integrated Pest Management'.

2. Training courses for farmers on the subject "Management of Pesticides".

3. Quality of Products management.

4. Development of the Sales Department.

- **June 2011 - September 2011 and June 2010 - September 2010**

Working as chemist's assistants of the Chemical Laboratory of the 'Union of Agricultural Cooperatives of Heraklion'. Subject Area of Wine Analysis: a) Measurement of acidity, b)density, c) conductivity and d) pH.

Seminars

- **March 2017**

Training Seminar of Program '*Oenology'*, Department of Chemisry, University of Crete.

- **November 2014**

Participation in the three-day event on "Transition to a strong agri-food system", issued by Geotechnical Chamber Crete Branch.

- **June 2010**

Participation in a 2-day workshop on 'Introduction to native plants, aromatic and ornamental use', issued by Geotechnical Chamber Crete Branch.

- **January 2009**

'Methods nutrition and plant protection with physical and chemical control', Demokritous University of Orestiada.

- **April 2009**

'Gardening for amateurs - presentation to create your own organic garden' seminar, Agricultural University of Athens.

- **October 2008 – January 2009**

Training course on **'**Computerized accounting and costing', from Aristotle University of Thessaloniki**.**

Languages

- Greek: mother language
- English: fluent - IELTS British Council', 2012
- German: fair - 'Zertificat issued by Goethe Institute' 2003
- Portuguese: Basic knowledge

Knowledge of TCI

- Microsoft Windows, Microsoft Word, Excel, PowerPoint
- Bioinformatics programs: SPSS Statistics, Origin Analysis Program, ChemDraw

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οικονομία πολλών χωρών και ιδιαίτερα της Μεσογείου βασίζεται στον πρωτογενή τομέα παραγωγής. Η προσβολή των καλλιεργειών από επιζήμιους οργανισμούς αποτελεί αναμφισβήτητα ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που καλείται να αντιμετωπίσει ο καλλιεργητής. Το δίπτερο έντομο *Drosophila suzukii (D. suzukii*) είναι ένας εξαιρετικά επιβλαβής οργανισμός για τις καρποφόρες καλλιέργειες. Στις μέρες μας ο κυριότερος τρόπος αντιμετώπισής του είναι οι εντομοκτόνες ουσίες, όπως η σπινοσίνη, τα οργανοφωσφορικά και τα πυρεθροειδή. Βασικό μειονέκτημα των ενώσεων αυτών είναι ότι για να θεωρηθούν αποτελεσματικές θα πρέπει να εφαρμόζονται τακτικά με αποτέλεσμα την ταυτόχρονη θανάτωση πολλών ωφέλιμων εντόμων. Η μη ορθολογική τους χρήση οδηγεί σε πιθανή εμφάνιση ανθεκτικότητας, ενώ η εφαρμογή τους κατά το στάδιο ωρίμανσης των φρούτων μπορεί να αυξήσει τα υπολείμματα στον καρπό.

Η αναζήτηση εναλλακτικών στρατηγικών διαχείρισης και αντιμετώπισης του *D. suzukii* έχει γίνει πλέον επιτακτική ανάγκη με πρωταρχικό στόχο την προστασία του περιβάλλοντος και του καταναλωτή. Η επικοινωνία και η συμπεριφορά των εντόμων είναι ενστικτώδης και καθορίζεται από χημικά ερεθίσματα που τους προκαλούν συγκεκριμένες αντιδράσεις. Τέτοιου είδους χημικά ερεθίσματα είναι οι φερομόνες, οι οποίες είναι ικανές να κατευθύνουν τα έντομα προς τον ξενιστή ή την τροφή τους. Συγχρόνως αυτές επιτρέπουν στα έντομα να αναγνωρίσουν επιφάνειες κατάλληλες για ωοτοκία ή άτομα του ίδιου είδους ή ακόμα και να αποφύγουν επικίνδυνες γι' αυτά θέσεις. Οι χημικές μελέτες για την ταυτοποίηση φερομονών σε συνδυασμό με μελέτες της συμπεριφοράς των εντόμων είναι μεγάλης σημασίας για δύο λόγους, την αποκρυπτογράφηση της χημικής οικολογίας του *D. suzukii* και τη χρήση των φερομονών στην Ολοκληρωμένη Φυτοπροστασία.

Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε η βελτιστοποίηση της μεθόδου για την ανάλυση των επιδερμικών υδρογονανθράκων (cuticular hydrocarbon, CHC) του *D. suzukii*. Στην συνέχεια, *μ*ελετώντας την επίδραση διαφορετικών χρόνων εκχύλισης στην εκχυλιζόμενη ποσότητα των επιδερμικών υδρογονανθράκων του *D. suzukii*, ταυτοποίηθηκαν επτά νέες ουσίες, εκ των οποίων το δωδεκάνιο (dodecane, C12) παρουσίασε απωθητική δράση. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι η μέγιστη εκχυλιζόμενη ποσότητα του 9-πεντακοσένιο (9-pentacosene, 9-C25) προκάλεσε

αυξημένη σεξουαλική συμπεριφορά στο αρσενικό φύλο σε σύγκριση με την εκχυλιζόμενη ποσότητα της 1 ώρας.

Έπειτα, εξετάσθηκε η επίδραση του φύλου και της ηλικίας στο CHC προφίλ του εντόμου. Ο παράγοντας του φύλου επηρέασε μόνο ποσοτικά την παραγωγή των CHCs. Αντίθετα η ηλικία επηρέασε την παραγωγή των CHC τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά. Στην ηλικία της 1 ημέρας τα έντομα παράγουν σε μεγαλύτερη αφθονία ενώσεις με μακριές ανθρακικές αλυσίδες, ενώ στην ηλικία των 4 και 25 ημερών τα έντομα παράγουν ενώσεις με λιγότερο μακριές ανθρακικές αλυσίδες. Το αλκένιο 9-εικοσιενένιο (9-heneicosene, 9-C21) χαρακτηρίστηκε ως φερομόνη συνάθροισης, αλλά σε μικρές συγκεντρώσεις.

Μελετώντας την επιθετική συμπεριφορά του *D. suzukii* διαπιστώθηκε ότι τα μη κοινωνικοποιημένα αρσενικά είναι περισσότερο επιθετικά από τα κοινωνικοποιημένα. Στην ηλικία των 4 ημερών και στην $3^{η}$ ώρα μετά την έναρξη της φωτοπεριόδου, αρσενικά και θηλυκά, εκδήλωσαν έντονη επιθετικότητα. Σχεδιάστηκε το ηθόγραμμα για τα επιθετικά και αμυντικά μοτίβα συμπεριφοράς του εντόμου. Τέλος, εξετάσθηκε πώς επηρεάζει ο παράγοντας της κοινωνικοποίησης το CHC προφίλ του εντόμου και παρατηρήθηκε ότι η μη κοινωνικοποίηση και των δύο φύλων του *D. suzukii* οδηγήσε σε αυξημένα ποσοστά της ουσίας 7-τρικοσένιο (7-tricosene, 7-C23). Μελετώντας τη βιολογική της δράση, διαπιστώθηκε αύξηση της επιθετικής συμπεριφοράς και των δύο φύλων του *D. suzukii*.

Ο πλήρης ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του CHC προφίλ του *D. suzukii* καθώς και η μελέτη της βιολογικής δράσης των προαναφερθέντων ουσιών μπορεί να οδηγήσουν σε περαιτέρω γνώση για την οικολογία του εντόμου, η οποία με τη σειρά της θα συνεισφέρει στην ανάπτυξη νέων μεθόδων για την Ολοκληρωμένη Αντιμετώπιση του *D. suzukii*.

Λέξεις κλειδιά: *D. suzukii*, GC-MS, χρόνοι εκχύλισης, φερομόνες, ελκυστικότητα, απωθητικότητα, συνάθροιση, επιθετικότητα, 9-pentacosene, dodecane, 9-heneicosene, 7-tricosene, ολοκληρωμένη φυτοπροστασία

ABSTRACT

The economy of many countries and specifically countries of Mediterranean is based in agricultural production. Insect pests are a big hazard, since they are responsible for the damage of many crops. *Drosophila suzukii* Matsumura (Diptera: Drosophilidae) is a relatively new pest for Europe, affecting a wide variety of small and stone fruits. Infection by *D. suzukii* causes fruit to be unsuitable for distribution and consumption resulting in significant economic damage. In order to control this pest and limit the economic damage on fruit crops, farmers usually resort to the use of organophosphate, spinosyn and/or pyrethroid insecticides. Unfortunately, the insecticide efficacy on *D. suzukii* is limited and the impact on biodiversity, ecosystem, food and water ecosystems is devastating. Nowadays, biological control methods play a crucial role for the Integrated Pest Management (IPM) with the ability to suppress pest population below economic thresholds rather than only providing a temporary control based on broad range agrochemicals. For this reason, the search for alternative insect management strategies of *D. suzukii* in food crops is of vital importance.

The cuticle of insects is covered with a layer of wax that consists of lipids, a class of compounds that includes alcohols, fatty acids, acylglycerols and hydrocarbons. Cuticular hydrocarbons (CHCs) are found at all life stages of insects and their production can be affected by several factors such as reproductive status, sex, age, maturation, food, temperature, social experience and photoperiod. One of the main roles of these compounds is to serve as means of communication and signaling, providing both inter-and intraspecific information including aggregation, mating, alarm, aggression and recognition.

In this thesis a method coupling gas chromatography with electron ionization mass spectrometry was developed for a better structural identification of CHCs of *D. suzukii*. In addition to the known CHCs reported in previous studies, three new compounds, nonadecane, 2-methyleicosane and 2-methylheneicosane, was observed.

We evaluate the effect of solvent extraction time on the amount of *D. suzukii* CHCs. Extraction time can affect the detection as well as the relative amount of substances in both male and female flies. Specifically, it was shown that the increase of the extraction time had a profound effect on the amount and type of CHCs determined in both sexes of *D. suzukii*. Increasing the extraction

time, we were also able to detect new compounds in the fly, which subsequently were used to evaluate their role on insect's behavior. Based on the quantitative results obtained, we further evaluated the biological role of two compounds, dodecane and 9-pentacosene. It was found that the *D. suzukii* adults are repulsed when exposed to dodecane (C12) acting as alarm pheromone. On the other hand, 9-pentacosene (9-C25) seems to enhance mating behavior of *D. suzukii* males acting as sex pheromone

Furthermore, the study of the effect of age and sex in CHCs production showed that there are prominent changes in CHC profiles in function of age-related maturation and less prominent changes in function of sex. Specifically, we concluded that *D. suzukii* has a sexually monomorphic CHC. Both sexes at age of 1 day produced compounds in high abundance which they have long carbon chains (C25-C33), while at the age of 2 and 25 days insects produced CHCs with short carbon chains (C19-C25). The results of bioassays demonstrate that 9-heneicosene (9-C21) positively regulated the aggregation.

We investigate the aggressive behaviour of *D. suzukii*. Inter-male and inter-female aggression was determined ethologically consisting of several behaviour patterns. Two hours starvation period increase locomotor activity of flies, promoting increased aggressive behaviour. Number of male encounters was higher in flies held in isolation than in those that had been reared with siblings whereas in case of females, only those that were isolated exhibited increased aggression. Females and males *D. suzukii* that were 4-day-old were more aggressive. In addition it is found that on the 3rd hour after the beginning of photoperiod, regardless of age, both genders rise to high intensity aggression patterns. Also the effect of socialization in CHC profile of insect was study. It is observed that non-socialization resulted increased amounts of 7-tricosene (7-C23). Evaluation of biological role of 7-C23 showed that it is a compound that increases the aggressive behaviour of male *D. suzukii*.

Our findings offer potential new routes for IPM strategies. Many potential IPM strategies such as attract-and-kill, mass trapping and mating disruption rely on chemical communication used by insects. We propose that 9-C21, C12, 9-C25 and 7-C23 CHCs could be part of an IPM for *D. suzukii.*

Key words: *D. suzukii*, GC-MS, extraction time, pheromones, attraction, repulsion, aggregation, aggression, 9-pentacosene, dodecane, 9-heneicosene, 7-tricosene, integrated pest management

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1 .....

Εισαγωγή 1

1. *Drosophila suzukii* 1

1.1 Μορφολογία 2

1.2 Βιολογικός Κύκλος (Life Cycle) 3

1.3 Ξενιστές 5

1.4 Διασπορά 6

1.5 Ζημίες-Οικονομικές Επιπτώσεις 9

2. Χημική Επικοινωνία Εντόμων 11

2.1 Interspecific- επικοινωνία μεταξύ διαφορετικών ειδών 11

2.2 Intraspecific - επικοινωνία μεταξύ του ίδιου είδους 12

2.3 Αισθητήρια των Φερομονών 14

2.4 Χημεία των Φερομονών 17

2.5 Βιο-Σύνθεση των Φερομονών 19

3. Φασματομετρία Μάζας 23

3.1 Εισαγωγή 23

3.2 Οργανολογία 24

3 Η Φασματομετρία Μαζών στη Χημική Ανάλυση 27

4. Αέρια Χρωματογραφία 31

4.1 Εισαγωγή 31

4.2 Οργανολογία 31

4.3 Αέρια Χρωματογραφία- Φασματομετρία Μάζας 34

5. Μελετώντας τη Βιολογική Δραστικότητα των CHC 36

5.1 Βιοδοκιμές Συμπεριφοράς 37

5.2 Παράγοντες που Επηρεάζουν την Απόκριση των Εντόμων 41
6. Μέθοδοι Ελέγχου-Καταπολέμησης 44
6.1 Χημικός Έλεγχος 44
6.2 Ολοκληρωμένη Διαχείριση Επιβλαβών Οργανισμών 46
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ 51
Κεφάλαιο 2 53
Βελτιστοποίηση Μεθόδου Ανάλυσης Ανάλυσης Επιδερμικών Υδρογονανθράκων του *D. suzukii* 54
2.1 Εισαγωγή 54
2.2 Πειραματικό Μέρος 55
2.2.1 Υλικά 55
2.2.2 Προετοιμασία Δείγματος 55
2.2.3 Οργανολογία 56
2.2.4 Βαθμονόμηση Οργάνου για το Φασματόμετρο Μάζας 56
2.2.5 Εκπλύσεις Μικροσύριγγας Δειγμάτων 57
2.2.6 Εισαγωγή Δείγματος 57
2.2.7 Θερμοκρασιακό Πρόγραμμα Στήλης 57
2.2.8 Παρακολούθηση Ιόντων Full Scan και SIM 59
2.2.9 Ποιοτικός και Ποσοτικός Προσδιορισμός 60
2.2.10 Πιστότητα Μεθόδου 62
2.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση 64
Κεφάλαιο 3 71
Μελέτη Επίδρασης του Χρόνου Εκχύλισης στους Επιδερμικούς Υδρογονανθράκές του *D. suzukii* 72
3.1 Εισαγωγή 72
3.2 Πειραματικό Μέρος 74

3.2.1 Εκχύλιση CHCs 74
3.2.2 Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζας 74
3.2.3 Βιοδοκιμές 74
3.2.4 Στατιστική Ανάλυση 78
3.3 Αποτελέσματα - Συζήτηση 79
3.3.1 Ποιοτικός και Ποσοτικός Προσδιορισμός των CHCs του *D. suzukii* 79
3.3.2 Επίδραση του Χρόνου Εκχύλισης στο Προφίλ των CHCs του *D. suzukii* 85
3.3.3 Βιολογική Δράση της Ουσίας 9-C25 88
4.3.4 Βιολογική Δράση της Ουσίας C12 91
Κεφάλαιο 4 95
Μελέτη της Επίδρασης του Φύλου και της Ηλικίας στους Επιδερμικούς Υδρογονάνθρακες του *D. suzukii* 96
4.1 Εισαγωγή 96
4.2 Πειραματικό Μέρος 98
4.2.1 Εκχύλιση CHCs 98
4.2.2 Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζας 98
4.2.3 Βιοδοκιμές 98
4.2.4 Στατιστική Ανάλυση 100
4.3 Αποτελέσματα - Συζήτηση 101
4.3.1 Επίδραση Φύλου και Ηλικίας στο CHC Προφίλ του *D. suzukii* 101
4.3.2 Βιολογική Δράση της Ουσίας 9-C21 108
Κεφάλαιο 5 112
Η Επιθετική Συμπεριφορά του *D. suzukii* και η Επίδραση των Περιβαλλοντικών και Κοινωνικών Παραγόντων σε αυτήν 113
5.1 Εισαγωγή 113
5.2 Πειραματικό Μέρος 116

5.2.1 Καλλιέργεια Εντόμων 116
5.2.2 Βιοδοκιμές Επιθετικότητας 116
5.2.3 Επίδραση Έλλειψη Τροφής 117
5.2.4 Επίδραση Περιβαλλοντικών και Κοινωνικών Παραγόντων 118
5.2.5 Βιοδοκιμές Κινητικότητας 119
5.2.6 Στατιστική Ανάλυση 120
5.3. Αποτελέσματα - Συζήτηση 121
5.3.1 Επίδραση Έλλειψης Τροφής 121
5.3.2 Ηθόγραμμα της Επιθετικής Συμπεριφοράς του *D. suzukii* 124
5.3.3 Επίδραση των Περιβαλλοντικών και Κοινωνικών Παραγόντων 128
5.3.4 Κινητικότητα του *D. suzukii* 133
Κεφάλαιο 6 135
Μελέτη Επίδρασης του Παράγοντα Κοινωνικοποίησης στο CHC Προφίλ του *D. suzukii* και Μελέτη της Βιολογικής Δράσης του 7-C23 και 7-C25 στη Συμπεριφορά του εντόμου 136
6.1 Εισαγωγή 136
6.2 Πειραματικό Μέρος 138
6.2.1 Πειραματική Διαδικασία 138
6.2.2 Εκχύλιση CHCs 139
6.2.3 Βιοδοκιμές 139
6.2.4 Στατιστική Ανάλυση 140
6.3 Αποτελέσματα - Συζήτηση 141
6.3.1 Επίδραση Κοινωνικοποίησης στους CHCs του *D. suzukii* 141
6.3.2 Βιολογική Δράση της Ουσίας 7-C23 145
6.3.3 Βιολογική Δράση της Ουσίας 7-C25 147
Κεφάλαιο 7 150

Συμπεράσματα –Μελλοντικοί Στόχοι 151
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ 154
Παράρτημα Ι 154
Καλλιέργεια Εντόμων 154
Παράρτημα ΙΙ 155
Φάσματα Μάζας – Μηχανισμοί Θραυσματοποίησης 155
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 161

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

CHC: Cuticular Hydrocarbon
cVA: cis-vacenyl-acetate
DART: Direct Analysis in Real Time
ECD: Electron Capture Detector
eV: electron energy
FID: Flame Ionization Detector
GC: Gas Chromatography
GC-EAD Gas Chromatography-Electroantennography
IPM: Integrated Pest Management
m/z: λόγος μάζα- προς-φορτίο
MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MS: Mass Spectrometry
NIST MS: National Institute of Standards and Technology Mass Spectral Library
NMR: Nuclear Magnetic Resonance
ORN: Olfactory Receptor Neurons
PER: Proboscis Extension Reflex
RRF: Relative Response Factor
SIM: Single Ion Monitoring
SIT: Sterile Insect Technique
SWD: Spotted Wing Drosophila
TCD: Thermal Conductivity Detector
TOF: time of flight mass spectrometer
ΑΕΠ: ακαθάριστου εγχώριου προϊόντος

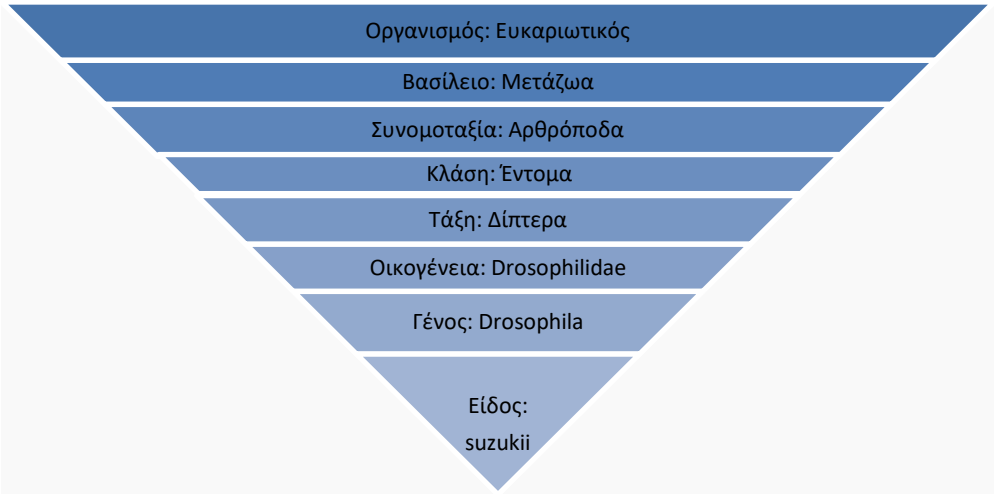
Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

Ο πρωτογενής τομέας παραγωγής είναι αυτός με τον οποίον αρχικά και σχεδόν αποκλειστικά ασχολήθηκε ο άνθρωπος μέχρι τη Βιομηχανική επανάσταση. Σήμερα ο τομέας αυτός, αν και έχει μικρότερη ποσοστιαία συμμετοχή στην απασχόληση και στη δημιουργία του ακαθάριστου εγχώριου προϊόντος (ΑΕΠ), εξακολουθεί να είναι πολύ μεγάλης σημασίας, καθώς παρέχει την πρώτη ύλη για την παραγωγή νέων προϊόντων και αγαθών. Η οικονομία πολλών χωρών της Αμερικής, της Ασίας και κυρίως της Μεσογείου εξαρτάται άμεσα από τον πρωτογενή τομέα, σημαντικό κομμάτι του οποίου αποτελούν οι καλλιέργειες φρούτων. Η προσβολή των καλλιεργειών από επιζήμιους οργανισμούς αποτελεί αναμφισβήτητα ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που καλείται να αντιμετωπίσει ο καλλιεργητής. Παγκόσμιες έρευνες και εκτιμήσεις καταδεικνύουν ότι η απώλεια της παραγωγής λόγω των διαφόρων προσβολών από εχθρούς κυμαίνεται από 30-40% ετησίως. Σε αρκετές περιπτώσεις η προσβολή μιας καλλιέργειας από έναν επιζήμιο οργανισμό μπορεί να προκαλέσει την ολοκληρωτική καταστροφή της σοδειάς, με αποτέλεσμα την οικονομική καταστροφή του καλλιεργητή και συνάμα τη μεγάλη οικονομική ζημία για μια χώρα. Για το λόγο αυτό κρίνεται επιτακτική η προστασία των καλλιεργειών από τέτοιου είδους οργανισμούς.

1. *Drosophila suzukii*

Ένας εξαιρετικά επιζήμιος οργανισμός για την καλλιέργεια των φρούτων είναι το δίπτερο έντομο *Drosophila suzukii* (*D. suzukii*), με το οποίο θα ασχοληθούμε στην παρούσα διδακτορική διατριβή. Τον Ιούνιο του 1916, το έντομο αναγνωρίζεται για πρώτη φορά από τον Dr. Shounen Matsumura και ονομάζεται *Drosophila suzukii* Matsumura (Kanzawa, 1935). Το *D. suzukii* ανήκει στην τάξη των δίπτερων και στην οικογένεια Drosophilidae, η οποία αριθμεί περισσότερα από 3750 διαφορετικά είδη τα οποία απαντώνται σε ποικίλα κλίματα ανά τον κόσμο (Wheeler, 1981). Η υποομάδα του *D. suzukii* θεωρείται πολυφυλετική, δηλαδή έχει περισσότερες από μία προγονικές καταγωγές (Yang et al. 2012). Πρόσφατες έρευνες υποστηρίζουν ότι η ταξινομική του θέση συνδέεται στενά με εκείνη του *takahashii* και του *melanogaster* (Ometto et al. 2013). Περισσότερες λεπτομέρειες για την ταξινομική κατανομή του παρουσιάζονται στην Εικ.1.1.



Εικόνα. 1.1: Ταξινομικό δέντρο του *Drosophila suzukii*

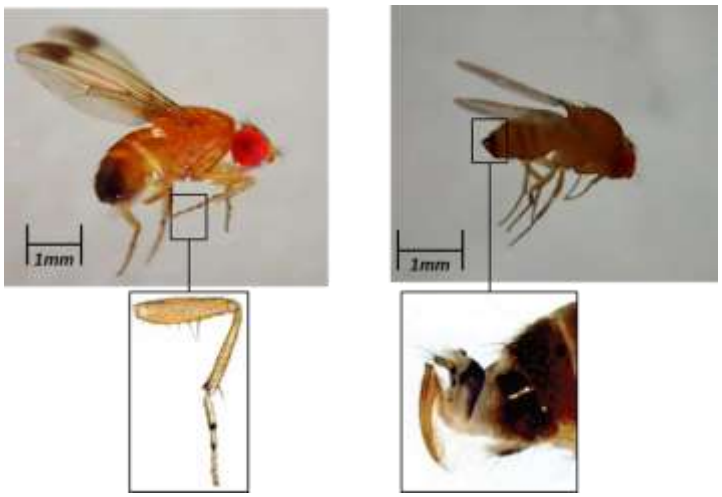
Το *D. suzukii* είναι μια νέα μύγα φρούτων, η οποία απασχολεί την επιστημονική κοινότητα τα τελευταία χρόνια, στην προσπάθεια να δημιουργηθούν νέα επιστημονικά δεδομένα για την αντιμετώπισή του. Είναι ιθαγενές έντομο της Νοτιοανατολικής Ασίας και η ειδοποιός διαφορά του σε σύγκριση με άλλες μύγες φρούτων, είναι ότι το θηλυκό ακμαίο εναποθέτει τα αυγά του σε ώριμους καρπούς (Karageorgi et al. 2017) σε αντίθεση για παράδειγμα με το *D. melanogaster*, το οποίο εναποθέτει τα αυγά του σε υπερώριμους καρπούς (Allemand & Boulétreau-Merle, 1989).

1.1 Μορφολογία

Βασικό εργαλείο για τον έλεγχο και την αποτελεσματική αντιμετώπιση ενός εντόμου είναι η μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών και του βιολογικού κύκλου.

Το ενήλικο ακμαίο του *D. suzukii* έχει κίτρινο-καφέ χρώμα με μαύρες ζώνες στην κοιλιακή χώρα και οφθαλμούς ζωηρού κόκκινου χρώματος (Calabria et al. 2012) (Εικ.1.2). Τα αρσενικά ακμαία (2.0 έως 3.5 mm) είναι συνήθως μικρότερα σε μέγεθος από τα θηλυκά (2.2 έως 4.0 mm). Το άνοιγμα των φτερών του ενήλικου θηλυκού μπορεί να φτάσει μέχρι και τα 8.0 mm (Kanzawa, 1939, Calabria et al. 2012). Το αρσενικό ακμαίο διαθέτει δύο μαύρες κηλίδες στην άκρη των πρόσθιων πτερύγων του, εξ' ου και το χαρακτηριστικό του όνομα Spotted Wing Drosophila (SWD) (Kanzawa, 1939) (Εικ.1.2). Οι κηλίδες αυτές εμφανίζονται περίπου 10 με 20 ώρες μετά την εκκόλαψή του (Walsh et al. 2011, Anfora et al. 2012). Επιπλέον, διαθέτει δύο

σειρές από σκουρόχρωμα χτένια σε κάθε πρόσθιο ταρσό. Το θηλυκό ακμαίο διαθέτει έναν μεγάλο οδοντωτό ωοθέτη (60 έως 72 δόντια), που τον χρησιμοποιεί για να διαπεράσει το φλοιό των φρούτων και να εναποθέσει τα αυγά του (Kanzawa 1939, Dreves et al. 2009, Hauser et al. 2009, Hauser, 2011) (Εικ.1.2).



Εικόνα 1.2: Ακμαίο αρσενικό (πάνω αριστερά), σκουρόχρωμα χτένια στον πρόσθιο ταρσό του αρσενικού (κάτω αριστερά), ακμαίο θηλυκό (πάνω δεξιά) και οδοντωτός ωοθέτης (κάτω δεξιά)

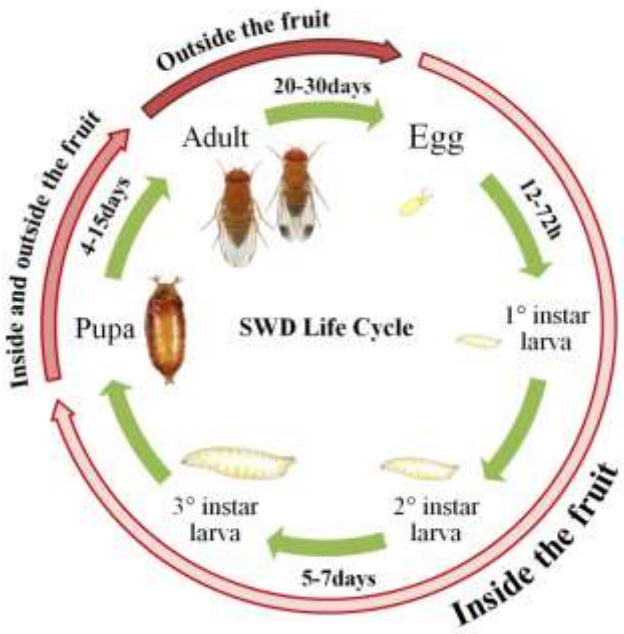
Το *D. suzukii* διαφοροποιείται ως προς τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του σε σχέση με τα άλλα είδη του γένους του. Μελέτες έχουν αποδείξει ότι οι εποχιακές διακυμάνσεις επηρεάζουν αυτές τις μορφολογικές διαφοροποιήσεις του εντόμου (Stephens et al. 2015). Η φαινοτυπική πλαστικότητα είναι ένα φαινόμενο κατά το οποίο ο γονότυπος μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικούς φαινότυπους ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Moczek, 2010). Για παράδειγμα, ορισμένα έντομα μπορεί να αναπτύσσονται βραδύτερα σε χαμηλές θερμοκρασίες, αλλά είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος από ότι αυτά που μεγάλωσαν σε υψηλές θερμοκρασίες (Angilletta & Dunham, 2003).

1.2 Βιολογικός Κύκλος[1] (Life Cycle)

Τα ενήλικα του *D. suzukii* είναι σεξουαλικά ώριμα τρεις με τέσσερις ημέρες μετά την εκκόλαψή τους (Revadi et al. 2015). Η διάρκεια του βιολογικού τους κύκλου κυμαίνεται κατά

[1] Βιολογικός Κύκλος (Life Cycle) του εντόμου είναι το σύνολο των σταδίων ανάπτυξης του, από την ωοτοκία μέχρι την αναπαραγωγική του ωρίμανση.

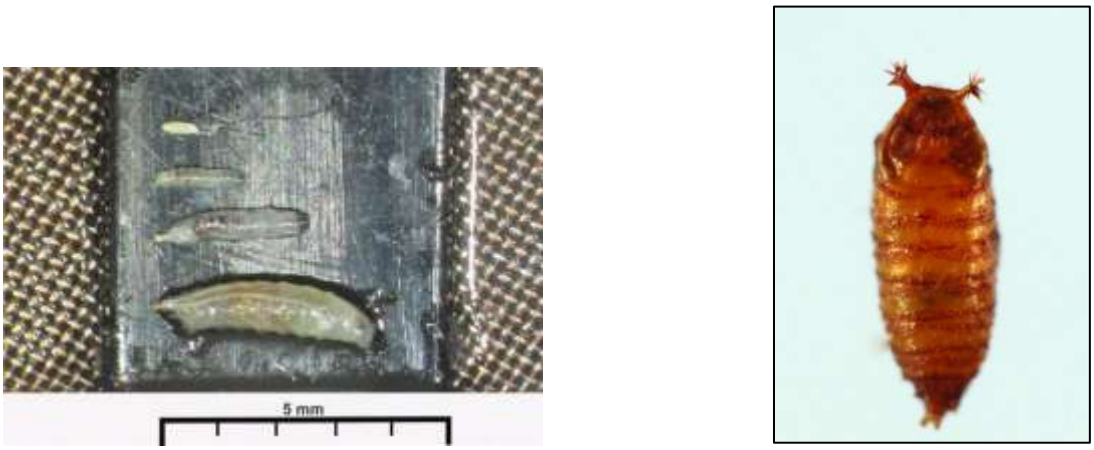
μέσο όρο από 10 μέχρι 66 ημέρες. Το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την ολοκλήρωση του βιολογικού τους κύκλου είναι ένας από τους κύριους λόγους που το καθιστούν εξαιρετικά επικίνδυνο, μιας και επιτρέπει στο *D. suzukii* να ολοκληρώσει αρκετές γενεές σε μια εποχή, με δυνατότητα να φτάσει μέχρι και τις 13 (Kanzawa, 1939, Vogt et al. 2012, Tochen et al. 2014). Στην παρακάτω εικόνα (Εικ.1.3) απεικονίζεται σχηματικά ο βιολογικός κύκλος του *D. suzukii*.



Εικόνα 1.3: *Γραφική απεικόνιση του Βιολογικού Κύκλου του Drosophila suzukii*
https://catalog.extension.oregonstate.edu/em9262/html

Ο αριθμός των εναποθετημένων αυγών επηρεάζεται άμεσα από τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Kubli, 2003). Ο μεγαλύτερος αριθμός εναποθετημένων αυγών έχει καταγραφεί στους 25°C ενώ κάτω από 10°C και πάνω από 30°C η ωοτοκία δεν επιτυγχάνεται (Kinjo et al. 2014, Tochen et al. 2014). Το θηλυκό κατά μέσο όρο εναποθέτει περίπου 25 αυγά ανά ημέρα (Kinjo et al. 2014) με μέγεθος που φτάνει περίπου στα 0.6 mm και με χρώμα υπόλευκο (Walsh et al, 2011), το οποίο γίνεται πιο διαυγές κατά τη μετάβασή τους στο στάδιο της προνύμφης (Εικ.1.4). Η προνύμφη διακρίνεται σε τρία προνυμφικά στάδια, στα οποία το μέγεθος της είναι κατά μέσο όρο 0.67 x 0.17 mm, 2.13 x 0.44 mm και 3.94 x 0.88 mm αντίστοιχα (Kanzawa, 1939, Timmeren et al. 2017) (Εικ.1.4). Έπειτα ακολουθεί η μετάβασή της στο στάδιο της νύμφης, η οποία έχει σκούρο καφέ χρώμα και μέγεθος 3.21 x 1.14 mm (Kanzawa, 1939). Η διαδικασία της αναπνοής πραγματοποιείται από δύο διακριτές κωνοειδείς προεξοχές του κεφαλιού με μήκος

0.32 mm (Εικ.1.4), οι οποίες χωρίζονται σε οκτώ περαιτέρω τμήματα στα άκρα (Kanzawa, 1935). Οι νύμφες απαντώνται είτε στο εσωτερικό των φρούτων είτε στην επιφάνειά τους (Bauerfeld et al. 2010).



Εικόνα 1.4: Αυγό και τρία προνυμφικά στάδια (αριστερά) και νύμφη (δεξιά) του D. suzukii. (Timerren et al. 2017)

1.3 Ξενιστές[2]

Το *D. suzukii* είναι ένα εξαιρετικά πολυφάγο έντομο με ένα ευρύ φάσμα ξενιστών το οποίο περιλαμβάνει καλλιεργούμενες και άγριες ποικιλίες φρούτων (Πίνακας 1). Οι προτιμώμενοι ξενιστές είναι τα καρποφόρα φρούτα όπως για παράδειγμα κεράσια, ροδάκινα, φράουλες και σταφύλια. Παρ' όλα αυτά, σε περίπτωση απουσίας τους έχει την ικανότητα να αναζητήσει διαφορετικές πηγές τροφής όπως καρπούς βελανιδιάς (Kanzawa, 1935).

Πίνακας 1. Ξενιστές του *Drosophila suzukii*

Κοινό Όνομα	Είδος	Οικογένεια	Αναφορά
Raspberry	*Rubus idaeus*	Rosaceae	Abraham et al. 2015
Cherry	*Prumus cerasus*	Rosaceae	Revadi et al. 2015
Strawberry	*Fragaria x ananassa*	Rosaceae	Revadi et al. 2015
Blackberry	*Rubus allegheniensis*	Rosaceae	Elsensohn & Loeb, 2018
Black raspberry	*Rubus occidentalis*	Rosaceae	Elsensohn & Loeb, 2018
Milk flower cotoneaster	*Cotoneaster lacteus*	Rosaceae	Lee et al. 2015
Peach	*Prunus spp.*	Rosaceae	Lee et al. 2015
Wild cherry	*Prunus avium*	Rosaceae	Lee et al. 2015
Cherry laurel	*Prunus laurocerasus*	Rosaceae	Lee et al. 2015
Portuguese laurel	*Prunus lusitanica*	Rosaceae	Lee et al. 2015
Himalaya blackberry	*Rubus armeniacus*	Rosaceae	Lee et al. 2015

[2] Ξενιστής (φυτό) είναι ευπαθής στον παθογόνο παράγοντα (έντομο)

Salmonberry	*Rubus spectabilis*	Rosaceae	Lee et al. 2015
Dewberry	*Rubus aboriginum*	Rosaceae	Lee et al. 2015
Blunchberry	*Cormus canadensi*	Cornaceae	Ballman & Drummond 2017
Dogwood	*Cormus spp.*	Cornaceae	Lee et al. 2015
Silky dogwood	*Cormus amomum*	Cornaceae	Elsensohn & Loeb 2018
Kiwi	*Actinidia spp.*	Actinidiaceae	Yu et al. 2013
Blue honeysuckle	*Lonicera caerulea*	Caprifoliaceae	Lee et al. 2015
Mullberry	*Morus spp.*	Moraceae	Lee et al. 2015
Mulberry	*Ficus carica*	Moraceae	Yu et al. 2013
Snowberry	*Symphoricarpos albus*	Caprifoliaceae	Lee et al. 2015
Oregon grape	*Mahonia aquifolium*	Berberidaceae	Lee et al. 2015
Autumn olive	*Elaeagmus umbellate*	Elaeagnaceae	Lee et al. 2015
Spicebush	*Lindera benzoin*	Lauraceae	Lee et al. 2015
Sweet box	*Sarcococca confusa*	Buxaceae	Lee et al. 2015

Η μεγάλη ποικιλία των ήδη τεκμηριωμένων ξενιστών καθώς επίσης η παρουσία του εντόμου και στα καλλωπιστικά αυτοφυή φυτά (άγριο τριαντάφυλλο, κρανιά, καμέλια κ.α.) σε όλες τις παράκτιες περιοχές του Ειρηνικού, του Ατλαντικού Ωκεανού και της Μεσογείου υποδηλώνει την ύπαρξη μεγάλου αριθμού εναλλακτικών πηγών τροφής. Επιπρόσθετα, οι ξενιστές του, εναλλακτικοί και μη, ωριμάζουν καθόλη τη διάρκεια του χρόνου, γεγονός που επιδεινώνει την ανησυχία για την εξάπλωση του εντόμου (Mitsui et al. 2006 και 2010).

Συνήθως, τα θηλυκά εναποθέτουν τα αυγά τους σε ώριμους και όχι σε υπερώριμους καρπούς (Karageorgi et al. 2017). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι καθοριστικό ρόλο στην επιλογή αυτή διαδραματίζει το CO_2, καθώς αυτό εκλύεται από τα ώριμα φρούτα σε μεγαλύτερη αφθονία από ότι στα υπερώριμα (Krause Pham & Ray, 2015). Επίσης, η επίδραση του pH και του βαθμού °Brix[3] των φρούτων στην εναπόθεση αυγών φαίνεται ότι δεν είναι ξεκάθαρη (Lee et al. 2016). Σε κάποιες μελέτες (Lee et al. 2011a, b, Lee et al. 2015, Lee et al. 2016), παρουσιάζεται να έχουν άμεση σχέση, και συγκεκριμένα τα θηλυκά *D. suzukii* εναπόθετουν μεγαλύτερο αριθμό αυγών σε φρούτα με περισσότερα σάκχαρα και με μικρότερη οξύτητα, ενώ σε πρόσφατη μελέτη εμφανίζεται ακριβώς το αντίθετο (Little et al. 2017), προτείνοντας ότι η προσέλκυση των θηλυκών βασίζεται σε έναν συνδυασμό από ποικίλα ερεθίσματα.

1.4 Διασπορά

Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό του *D. suzukii* που το καθιστά εξαιρετικά επικίνδυνο είναι η ραγδαία διασπορά του τα τελευταία χρόνια, από την Ασία στην Αμερική και μετέπειτα στην

[3] Βαθμός °Brix: εκφράζει την περιεκτικότητα των σακχάρων

Ευρώπη. Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν έρευνες, οι οποίες αναφέρουν ότι η κλιματική αλλαγή επηρεάζει σημαντικά τη διασπορά των χωροταξικών εντόμων, ιδιαίτερα των ειδών με μικρό βιολογικό κύκλο (Masters & Norgrove, 2010).

Τα έντομα προσαρμόζονται κατάλληλα στις κλιματολογικές συνθήκες με σκοπό να αντιμετωπίσουν τις αλλαγές του περιβάλλοντός τους. Έντομα, τα οποία ζουν σε περιοχές με γρήγορα μεταβαλλόμενες εποχικές συνθήκες περιβάλλοντος, αντιμετωπίζουν επανειλημμένα το πρόβλημα της αναζήτησης περιοχών με κατάλληλες συνθήκες για αναπαραγωγή. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος, τα έντομα της οικογένειας Drosophilidae έχουν αναπτύξει ειδικές αντιδράσεις συμπεριφοράς και φυσιολογίας, όπως είναι η διασπορά, ο φωτοπεριοδισμός[4] και η διάπαυση[5] (Kimura, 1990). Για παράδειγμα, με την αύξηση της θερμοκρασίας, οι ανυψωμένες περιοχές που για τα χωροταξικά είδη θεωρούνται φυσικά φράγματα, γίνονται εύκολα προσπελάσιμες και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εύκολη μετακίνηση των εντόμων σε γειτονικές περιοχές (Masters & Norgrove, 2010).

Αναλυτικότερα, το *D. suzukii* θεωρείται ιθαγενές έντομο της Ασίας (Kanzawa, 1935, Dreves et al. 2009, Hauser et al. 2009, Ometto, 2013) και η πρώτη καταγραφή γίνεται στην Ιαπωνία το 1916 ενώ στη συνέχεια το έντομο εξαπλώνεται σε Κίνα και Κορέα (Kanzawa 1935, Lee 1964, Hauser et al. 2009). Στην Ινδία και στο Πακιστάν έχει περιορισμένη κατανομή και ειδικότερα συναντάται στα μεγάλα υψόμετρα των βόρειων περιοχών (Singh & Bhatt, 1988, Singh & Negi, 1989, Amin Ud Din et al. 2005, Hauser et al. 2009). Παράλληλα, έχει καταγραφεί στη Μιανμάρ (Toda, 1991), στην Ταϊλάνδη (Okada, 1976) και στην Άπω Ανατολή της Ρωσίας (Sidorenko, 1992) (Εικ.1.5).

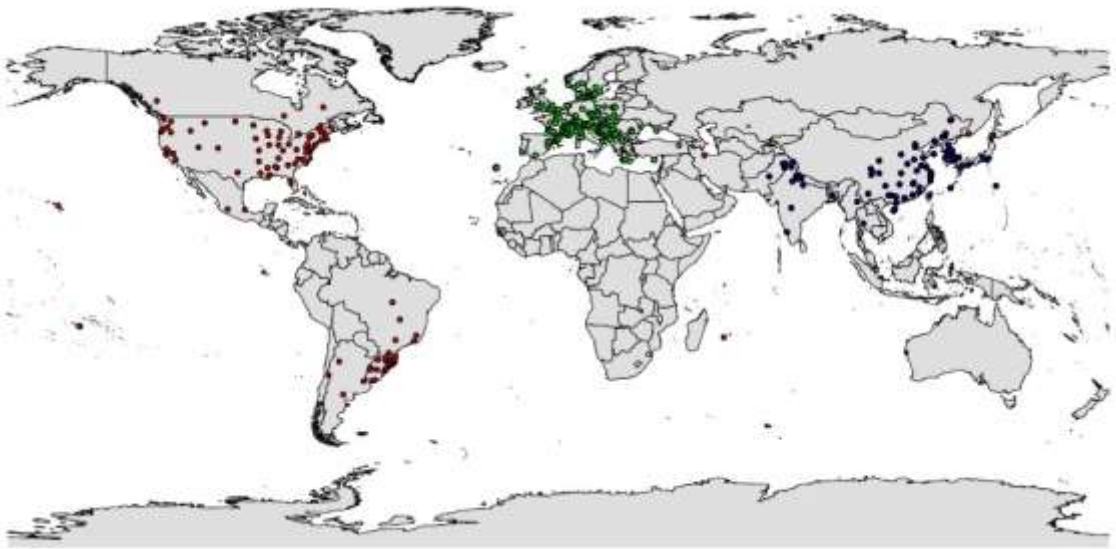
Στη Βόρεια Αμερική έχει καταγραφεί από τις Η.Π.Α. μέχρι και τον Καναδά. Η πρώτη αναφορά γίνεται στη Χαβάη το 1980 (Kaneshiro, 1983). Το 2008 καταγράφεται στην Καλιφόρνια (Lee et al. 2011b) και έκτοτε έχει εξαπλωθεί στη Φλόριντα, στο Όρεγκον, στην Ουάσιγκτον και στην Κολομβία (WSUE 2009, Hueppelshueser, 2009). Θα πρέπει να αναφερθεί

[4] Φωτοπεριοδισμός είναι η φυσιολογική αντίδραση των οργανισμών σε σχετική διάρκεια των περιόδων φωτός και σκότους.

[5] Διάπαυση είναι μια περίοδος ανάσχεσης της δραστηριότητας και των μορφολογικών μεταβολών που γενικά παρατηρείται σε ψυχρές ή ξερές περιόδους.

ότι στις Η.Π.Α. δεν υφίστανται περιορισμοί καραντίνας[6] (NAPPO 2010b) και αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη γρήγορη εξάπλωση του πληθυσμού του εντόμου στις ανατολικές πολιτείες μέχρι το 2009 (Hauser et al. 2009). Αργότερα το *D. suzukii* επιβεβαιώνεται στο Μεξικό, στη Βόρεια και Νότια Καρολίνα, στη Λουιζιάνα, στη Γιούτα και στο Μίσιγκαν. (Burrack, 2010, Isaacs et al. 2010, NAPPO 2011). Παράλληλα, το έντομο καταγράφεται στη Κεντρική και Νότια Αμερική, στη Κόστα Ρίκα και στο Εκουαδόρ (Ashbumer et al. 2005, Hauser, 2011, Calabria et al. 2012) (Εικ.1.5).

Το 2009 καταγράφεται για πρώτη φορά στην Ευρώπη και συγκεκριμένα στο Τρεντ της Ιταλίας (EPPO 2010a). Έκτοτε καταγράφεται σε διάφορες περιοχές της Ιταλίας (EPPO 2010c, Pansa et al. 2011, Süss & Costanzi, 2011, Griffo et al. 2012), της Γαλλίας (EPPO 2010b, Mandrin et al. 2010, Weydert & Bourgouin, 2011) και πολύ πρόσφατα και της Ελλάδας (Garantonakis et al. 2016). Επιπλέον έχει καταγραφεί και στις πιο βόρειες Ευρωπαϊκές χώρες όπως στην Ελβετία (Baroffio & Fisher, 2011), στη Σλοβενία (Seljiak, 2011), στην Κροατία, στην Αυστρία (EPPO 2012b), στη Γερμανία (Vogt et al. 2012) και στο Βέλγιο (EPPO 2012a). (Εικ.1.5).



Εικόνα 1.5: Η διασπορά του *D. suzukii* μέχρι και το 2018. Τα χρώματα υποδηλώνουν τη γεωγραφική διασπορά του, το πράσινο αναφέρεται στην Ευρώπη, το κόκκινο στην Αμερική και το μπλε στην Ασία (Orsted & Orsted 2018)

[6] Οργανισμός καραντίνας είναι ο οργανισμός με πιθανή οικονομική σημασία για μία συγκεκριμένη περιοχή, η οποία κινδυνεύει από αυτόν και στην οποία δεν είναι ακόμη παρών, ή είναι παρών αλλά δεν έχει εξαπλωθεί ευρέως και βρίσκεται υπό επίσημο έλεγχο.

1.5 Ζημίες-Οικονομικές Επιπτώσεις

Το *D. suzukii* εναποθέτει τα αυγά του σε μη τραυματισμένα, ώριμα και υγιή φρούτα, (Sasaki & Sato, 1995) σε αντίθεση με τα περισσότερα είδη της οικογένειας Drosophilidae οποία τα εναποθέτουν σε μη υγιή και υπερώριμα φρούτα (Mitsui et al. 2006).

Οι περισσότερες ζημίες προκαλούνται από τις προνύμφες οι οποίες τρέφονται από τη σάρκα των φρούτων δημιουργώντας καφέ, μαλακές και βυθισμένες περιοχές στον φλοιό του φρούτου. (Kanzawa, 1939, Lee et al. 2001b, Mitsui et al. 2006). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να τίθεται σε κίνδυνο η εμπορευσιμότητα των φρούτων, καθώς δημιουργείται κατάλληλο περιβάλλον για προσέλκυση άλλων εντόμων, όπως για παράδειγμα του *D. melanogaster* (Bolda et al. 2010). Ωστόσο η εισαγωγή του οδοντωτού ωοθέτη στο φλοιό του καρπού μπορεί να προκαλέσει και περαιτέρω φυσική βλάβη. Παθογόνα, όπως νηματοειδείς μύκητες και βακτήρια έχουν πλέον πρόσβαση στη σάρκα του φρούτου, γεγονός που προκαλεί δευτερογενείς λοιμώξεις και ταχύτερη φθορά (Εικ. 1.6) (Hauser & Damus, 2009).

Εικόνα 1.6: Αρχική βλάβη από τις προνύμφες γύρω από το σημείο εναπόθεσης των αυγών (αριστερά), δευτερογενής προσβολή από παθογόνα (μέση και δεξιά). Φωτογραφία από τον Dr. Martin Hauser, California Dept. of Food & Agriculture, Sacramento, USA

Ο υπολογισμός του κόστους, ο οποίος συνδέεται με τις ζημίες που προκαλεί το *D. suzukii,* θα πρέπει να πραγματοποιείται με τον συνυπολογισμό τόσο των παραγόντων του άμεσου κόστους όσο και του έμμεσου (Goodhue et al. 2011, Walsh et al. 2011). Η οικονομική ζημία που προκαλεί το έντομο στις καλλιέργειες φρούτων θεωρείται άμεσο κόστος, ενώ οι αρνητικές επιπτώσεις που εντοπίζονται στη βιοποικιλότητα, στην υγεία και στην ευζωία των ζώων εξαιτίας της αλόγιστης χρήσης φυτοφαρμάκων θεωρείται έμμεσο κόστος (Bolda et al. 2010, Goodhue et al. 2011). Επιπλέον, η οικονομική ζημία ποικίλει σε σχέση με το είδος της καλλιέργειας, την περιοχή και την ένταση της προσβολής (Goodhue et al. 2011).

Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι το 2008 στις πολιτείες της Καλιφόρνιας, του Όρεγκον και της Ουάσιγκτον η συνολική οικονομική ζημία από το *D. suzukii* για μία καταστροφή περίπου στο 20% της συνολικής παραγωγής υπολογίστηκε στα 511.000.000$ (Goodhue et al. 2011). Όσον αφορά την Ευρώπη, το 2010 στην επαρχία Τρέντο της βόρειας Ιταλίας σε καλλιέργεια φρούτων 400 εκταρίων η οικονομική ζημία υπολογίστηκε στα 500.000€, ενώ το 2011 έφτασε στα 3.000.000€ (Ioriatti et al. 2011).

2. Χημική Επικοινωνία Εντόμων

Η πρώτη επιστημονική καταγραφή για την ύπαρξη ουσιών που προκαλούν συγκεκριμένες αντιδράσεις γίνεται από τον Δαρβίνο, ο οποίος αναφέρει μία εμπειρία που είχε κατά την διάρκεια συλλογής διαφόρων ειδών σκαθαριών. Ενώ και τα δύο χέρια του ήταν γεμάτα με σκαθάρια στην προσπάθεια του να ελευθερώσει το ένα, έβαλε ένα σκαθάρι (carabid beetle) στο στόμα του. Η άσχημη μυρωδιά και η απαίσια γεύση του έκαναν μεγάλη εντύπωση και αυτό τον οδήγησε αργότερα στο να γράψει για τις αμυντικές ικανότητες του σκαθαριού.

Τα έντομα έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν το έμβιο και μη, περιβάλλον τους με βάση οπτικά, ηχητικά, μηχανικά και χημικά ερεθίσματα και να αντιδρούν σε αυτό ανάλογα με το εκάστοτε ερέθισμα. Ο όρος **σημειοχημικά** (semiochemicals) προέρχεται από την ελληνική λέξη *σημείο* που *σημαίνει σημάδι* και αναφέρεται σε ουσίες που παράγονται από έμβιους οργανισμούς και μετέχουν σε χημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των οργανισμών. Οι σημειοχημικές ουσίες υποδιαιρούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με το αν οι αλληλεπιδράσεις (πληροφορίες που μεταβιβάζονται) αφορούν έντομα του ίδιου είδους ή διαφορετικού. Όταν το άτομο-πομπός (αποστολέας) μιας σημειοχημικής ουσίας ανήκει στο ίδιο είδος με το άτομο-δέκτη της χημικής πληροφορίας, η ουσία ονομάζεται φερομόνη. Ενώ, όταν το άτομο-πομπός ανήκει σε άλλο είδος από το άτομο-δέκτη, η ουσία λέγεται αλληλοχημική. Για τις παραπάνω κατηγορίες χρησιμοποιούνται οι αγγλικοί όροι ‘intraspecific’ και ‘interspecific’ αντίστοιχα.

2.1 Interspecific- επικοινωνία μεταξύ διαφορετικών ειδών

Η επικοινωνία μεταξύ δύο διαφορετικών ειδών επιτυγχάνεται με αλληλοχημικές ουσίες, οι οποίες υποδιαιρούνται σε τρεις περαιτέρω κατηγορίες:

- **αλλομόνες (allomones),** όταν ωφελείται από τη δράση τους μόνο το είδος πομπός
- **καιρομόνες (kairomones),** όταν ωφελείται από τη δράση τους μόνο το είδος δέκτης
- **συνομόνες (synomones),** όταν ωφελούνται από τη δράση τους τα άτομα και των δύο ειδών

Οι καιρομόνες με τη σειρά τους υποδιαιρούνται σε επιπλέον κατηγορίες (Metcalf & Metcalf, 1992):

- **εντομοαπωθητικά (repellents),** τα οποία παρέχουν προστασία
- **κατασταλτικά (suppressants)**, τα οποία αναστέλλουν τους ανταγωνιστές
- **δηλητήρια (venoms),** τα οποία δηλητηριάζουν οργανισμούς θηράματα
- **χημικά θέλγητρα (chemical lures),** τα οποία προσελκύουν το θήραμα στο αρπακτικό

2.2 Intraspecific - επικοινωνία μεταξύ του ίδιου είδους

Ο όρος **φερομόνη** προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Karlson και τον Luscher το 1959 ως ουσίες που παράγονται από έντομα ή άλλα ζώα, ελευθερώνονται στην επιφάνεια του σώματός τους και προκαλούν χαρακτηριστικές αντιδράσεις συμπεριφοράς σε άλλα άτομα του ίδιου είδους. Ο όρος φερομόνη προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις *φέρω* και *ορμόνη*, δηλαδή μεταφορά διέγερσης. Ο Adolf Butenandt, Γερμανός βιοχημικός, συνθέτει την πρώτη φερομόνη και του απονέμεται το Βραβείο Νόμπελ Χημείας το 1939 (Karlson & Luscher, 1959).

Η συμπεριφορά των εντόμων είναι ενστικτώδης και καθορίζεται από ερεθίσματα τα οποία διεγείρουν τα αισθητήρια όργανά τους και προκαλούν συγκεκριμένες για κάθε περίπτωση αντιδράσεις. Μεταξύ των ποικίλων ερεθισμάτων, οι φερομόνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση και στην προσέλκυση του άλλου φύλου, των τέκνων, στη διατήρηση του σμήνους, στην εκδήλωση συναγερμού, στη κοινωνική συμπεριφορά, στη σήμανση της ιδιόκτητης περιοχής, στην εκδήλωση ερωτικής συμπεριφοράς, στην επιθετική διάθεση, στον καλλωπισμό, στην κυριαρχία, στην υποταγή και στην αναγνώριση της φυσιολογικής καταστάσεως.

Τα έντομα αντιδρούν στο χημικό τους περιβάλλον είτε άμεσα είτε με καθυστέρηση. Στις άμεσες αντιδράσεις, οι οποίες και αφορούν κυρίως τη συμπεριφορά του εντόμου, περιλαμβάνονται εκδηλώσεις λόγω διεγέρσεως των εξωτερικών αισθητήριων οργάνων. Εμφανείς εκδηλώσεις λόγω τέτοιας διεγέρσεως είναι για παράδειγμα η σύζευξη, η ωοτοκία, η μετακίνηση, η επιθετική και η αμυντική διάθεση. Στις καθυστερημένες αντιδράσεις, οι οποίες και αφορούν κυρίως αλλαγές των φυσιολογικών λειτουργιών του εντόμου, περιλαμβάνονται συμπτώματα τοξικότητας, φυλετική ή αναπαραγωγική διαφοροποίηση.

Η κατάταξη των φερομονών γίνεται με βάση τη χαρακτηριστική αντίδραση συμπεριφοράς που προκαλούν στο έντομο δέκτη:

Φερομόνες συνάθροισης

Οι φερομόνες συνάθροισης προσελκύουν και τα δύο φύλα του ίδιου είδους. Πολλά είδη, όπως για παράδειγμα σκαθάρια, μυρμήγκια, κατσαρίδες, μύγες, μέλισσες, σφήκες, θρυσανόπτερα και ακρίδες χρησιμοποιούν τις φερομόνες συνάθροισης (Wertheim et al. 2005). Οι ουσίες αυτές συνήθως εκκρίνονται ως μείγμα ουσιών και συνδυάζονται με χημικά ερεθίσματα εκλυόμενα από τροφικά υποστρώματα. Η συνάθροιση σε τροφικό υπόστρωμα παρέχει οφέλη, προωθώντας την κοινή θρέψη των εντόμων (Hausmann & Miller, 1989, Peng & Weiss, 1992, Prado et al. 1992, Durisko et al. 2014), βοηθώντας στην ανεύρεση συντρόφου (Verhoef & Nagelkerke, 1977) και ταυτόχρονα προσφέροντας προστασία από ακραίες καιρικές συνθήκες και από θηρευτές (Hoe, 1962, Lockwood & Story, 1986, Gamberale & Tullberg, 1998, Riipi et al. 2001).

Φερομόνες σεξουαλικής συμπεριφοράς

Οι φερομόνες σεξουαλικής συμπεριφοράς παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αναπαραγωγική συμπεριφορά των εντόμων (Yew & Chung, 2015). Είναι η μόνη κατηγορία φερομονών που η λειτουργία τους είναι κοινή για όλα τα είδη των εντόμων (Teal P.E.A, 2008). Εκκρίνονται από έναν αδένα του θηλυκού, ο οποίος βρίσκεται στην κοιλιακή του χώρα, γνωστοποιώντας τη θέση του και τη διαθεσιμότητά του για αναπαραγωγή. Τα αρσενικά μπορούν να προσελκυστούν από φερομόνες σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις της τάξεως των 200μορίων/cm^3 (Boeckh et al. 1965). Η πρώτη φερομόνη η οποία προσδιορίστηκε ως σεξουαλική στο δίπτερο έντομο *Musca domestica* είναι το 9-εικοσιτριένιο (9-tricosene) (Carlson et al. 1971).

Φερομόνες ωοτοκίας

Οι φερομόνες ωοτοκίας είναι ουσίες, οι οποίες είναι υπεύθυνες είτε για την προσέλκυση άλλων θηλυκών σε θέση κατάλληλη για ωοτοκία, είτε για την παρότρυνση άλλων θηλυκών να ωοτοκήσουν (McCall & Cameron, 1995). Η πρώτη αναφορά για φερομόνη ωοτοκίας γίνεται για τα κουνούπια του γένους *Culex* spp. (McCall & Cameron, 1995).

Φερομόνες συναγερμού

Οι φερομόνες συναγερμού μπορούν να προκαλέσουν διασπορά και στα δύο φύλα του ίδιου είδους αλλά και απώθηση ενός επικείμενου θηρευτή. Γενικά, οι φερομόνες συναγερμού αυξάνουν την πρόληψη και την επιθετικότητα προς στους ανταγωνιστές (Wilson & Regnier, 1971). Επίσης, οι φερομόνες αυτές είναι λιγότερο εξειδικευμένες σε σύγκριση με άλλα είδη φερομονών και είναι ουσίες που εξυπηρετούν γενικά στην επικοινωνία και γίνονται αντιληπτές και από άλλα είδη εντόμων (Bowers et al. 1972).

2.3 Αισθητήρια των Φερομονών

Στα έντομα οι φερομόνες παράγονται από ειδικούς αδένες ή από μεμονωμένα εκκριτικά κύτταρα. Συνήθως είναι αδενικώς αλλοιωμένα υποδερμικά κύτταρα του εξωσκελετού και σπανιότερα άλλων ιστών. Για παράδειγμα, στα Λεπιδόπτερα ο αδένας που παράγει και εκλύει τη σεξουαλική ελκυστική φερομόνη βρίσκεται στην επιφάνεια της κοιλίας. Αντίθετα στα ωοτόκα θηλυκά της αφίδας *Megura viciae*, η σεξουαλική φερομόνη παράγεται από πολυάριθμές οσμηρές πλάκες οι οποίες βρίσκονται στις οπίσθιες κνήμες. Οι φερομόνες παράγονται από τους αδένες υπό υγρή μορφή και εκλύονται υπό μορφή ρύσεων, σταγονιδίων, λεπτών μεμβρανών, αερολυμάτων ή αερίων. Επιπλέον, θα πρέπει να σημειωθεί ότι είναι δυνατόν η φερομόνη να παράγεται και να αποθηκεύεται στο έντομο υπό διαφορετική μορφή από εκείνη από την οποία εκλύεται. Έχει διαπιστωθεί ότι σε ορισμένα θηλυκά Υμενόπτερα, η ελκυστική φερομόνη αποθηκεύεται στο έντομο ως αλκοόλη και εστεροποιείται στο τελευταίο στάδιο πριν από την έκλυσή της. Πολλά είδη εντόμων διαθέτουν κατάλληλα ρυθμιζόμενα οργανίδια που εκλύουν τις φερομόνες σε ελεγχόμενες ποσότητες.

Σε ορισμένα είδη εντόμων, όπως στα Λεπιδόπτερα, μια και μόνο ουσία είναι αναγκαία για την εκδήλωση της συγκεκριμένης χαρακτηριστικής αντίδρασης του εντόμου-δέκτη. Σε άλλα είδη, όπως σε ορισμένα είδη των τάξεων κολεόπτερα και δίπτερα απαιτείται μείγμα ουσιών. Η εξειδίκευση, λοιπόν, της φερομονικής επικοινωνίας των εντόμων επιτυγχάνεται είτε με μία χημική δομή είτε με ένα χαρακτηριστικό μείγμα δύο ή περισσότερων ουσιών. Επιπλέον, η αναλογία τους στο μείγμα, που προσδιορίζεται ποιοτικά και ποσοτικά με βάση την ανάλυση του εντόμου που το παράγει, δεν είναι κατ’ ανάγκην και η μόνη ελκυστική, ούτε η βέλτιστη για την προσέλκυση του εντόμου (Tzanakakis, 1977).

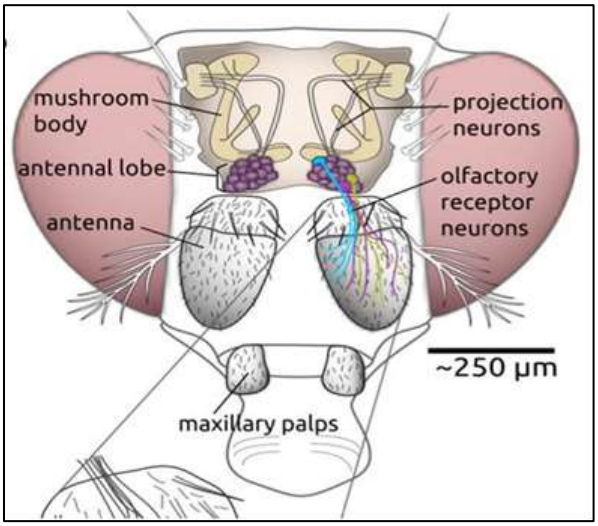
Τα έντομα αντιλαμβάνονται τις φερομόνες με τα αισθητήρια όργανα της όσφρησης ή της γεύσης (Tzanakakis, 1995). Τα αισθητήρια φερομονών είναι όργανα που βρίσκονται κάτω από το δερμάτιο, το οποίο στα σημεία εκείνα είναι συνήθως λεπτό και έχει πόρους, μέσω των οποίων το χημικό ερέθισμα φτάνει στις άκρες των νευρικών δενδριτικών ινιδίων του νευρικού κυττάρου.

Στην περίπτωση του Drosophila, αυτό που συμμετέχει στο μηχανισμό της όσφρησης είναι το τρίτο τμήμα της κεραίας του, το λεγόμενο μαστίγιο (flagellum) (Vosshall & Stocker, 2007). Στον οσφρητικό προσανατολισμό του εντόμου εκτός από το μαστίγιο συμμετέχουν και οι γναθικές προσακτρίδες (maxillary palp). Και τα δύο αυτά όργανα αποτελούνται από τριχίδια, αισθητήρια όργανα που ονομάζονται sensilla. Τα sensilla είναι κύτταρα ή ομάδες εξειδικευμένων κυττάρων που δέχονται ποικίλα εξωτερικά ερεθίσματα, όπως οπτικά, ήχου, χημικά, θερμοκρασίας, υγρασίας και μηχανικά (Tzanakakis 1995, De Bruyne et al. 2001, Hallem & Carlson, 2004) και αποτελούν τις βασικές λειτουργικές μονάδες του οσφρητικού συστήματος.

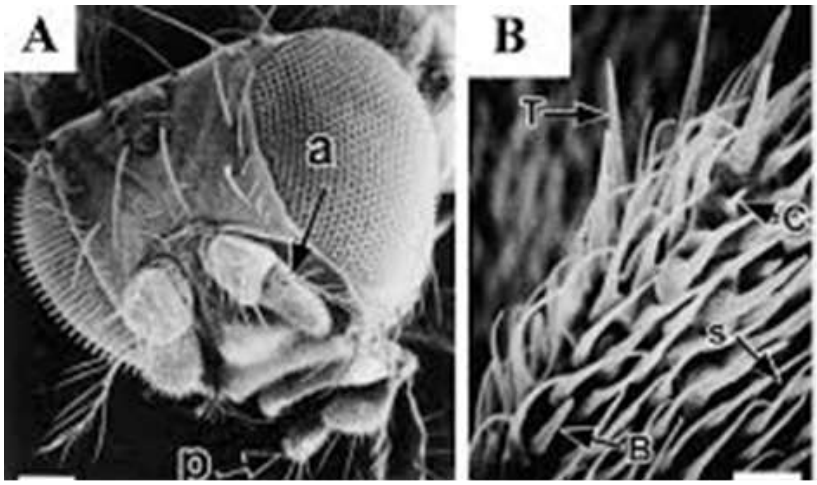
Τα αισθητήρια όργανα έχουν υδρόφοβη μεμβράνη επιτρέποντας στα λιπόφιλα μόρια των οσμών να περάσουν μέσα από μικρούς πόρους και να εισαχθούν στο υδατικό διάλυμα φτάνοντας στους νευρώνες του οσφρητικού υποδοχέα (ORN, Olfactory Receptor Neurons). Κάθε sensilla αποτελείται από έναν έως τέσσερεις ORNs και αυτοί αποτελούνται από τους δενδρίτες (De Bruyne et al., 2001,1999). Τα sensilla ανταποκρίνονται σε διαφορετικά ερεθίσματα, παράγουν ηλεκτρικό σήμα και το αποστέλλουν στο “mushroom body” (μανιταροειδές σώμα) και στις πλευρικές περιοχές του εγκεφάλου (Εικ.2.1). Το “mushroom body” είναι υπεύθυνο για την οσφρητική αντίληψη και τη μνήμη, ενώ τα πλευρικά τμήματα του εγκεφάλου είναι υπεύθυνα για την αντίδραση του εντόμου στο εκάστοτε ερέθισμα (Masse et al. 2009).

Στην κεραία του Drosophila υπάρχουν 3 διαφορετικοί τύποι αισθητηρίων οργάνων, τα οποία διαφέρουν ως προς το σχήμα, το μέγεθος και τη λειτουργία τους. Διαχωρίζονται σε βασικονικά (basiconic), τριχοειδή (tricoid) και κοιλοκωνικά (coeloconic) sensilla (Εικ.2.2) (Stocker, 1944). Τα βασικονικά είναι εκείνα που είναι υπεύθυνα για την ανίχνευση των πτητικών ουσιών και τον εντοπισμό της τροφής (Hallem et al. 2004, Yao et al. 2005, De Bruyne et al. 2011). Για την ανίχνευση των φερομονών είναι υπεύθυνα τα τριχοειδή. Τέλος, τα κοιλοκωνικά ανιχνεύουν

οξέα, αμμωνία και υγρασία (Yao et al. 2005, Benton et al. 2009, Galizia & Rössler 2010). Οι γναθικές προσακτρίδες είναι δευτερεύοντα οσφρητικά όργανα του Drosophila και συνυπάρχουν κοντά στην προβοσκίδα (De Bruyne et al. 1999). Σε σύγκριση με την κεραία έχουν μικρότερο αριθμό αισθητήριων οργάνων και αποτελούνται από μία μόνο κατηγορία, τα βασικονικά (Singh & Nayak, 1985). Υπάρχουν μόνο 60 βασικονικά αισθητήρια τα οποία παρουσιάζουν ιδιαίτερη ευαισθησία στις πτητικές ουσίες (De Bruyne et al. 1999).



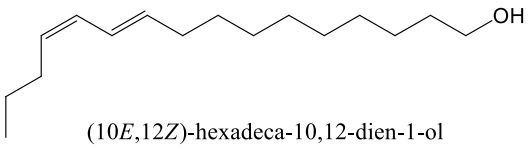
Εικόνα 2.1: Ανατομική περιγραφή κεφαλής του *D. suzukii* (Strauch et al. 2015)



Εικόνα 2.2: Αισθητήρια όργανα όσφρησης (Olfactory Sensilla) (A) Το τρίτο τμήμα της κεραίας, μαστίγιο (flagellum) (a), προσακτρίδες maxillary palp (p), μπάρα κλίμακας, 100 mm (B) Τρεις τύποι αισθητήριων οργάνων στο μαστίγιο όπου "T" (tricoid), "C" (coleoconic),"B" (basiconic) και "s" τριχίδια που ονομάζονται spinules ("s") μπάρα κλίμακας 5 mm (Riesgo-Escovar et al. 1995)

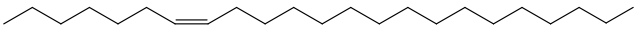
2.4 Χημεία των Φερομονών

Μέχρι σήμερα οι φερομόνες οι οποίες έχουν προσδιοριστεί, περιλαμβάνουν οργανικές ενώσεις όπως για παράδειγμα αλκοόλες, κετόνες, ισοπρενοειδή, εστέρες λιπαρών οξέων, τριγλυκερίδια και υδρογονάνθρακες (Εικ.2.3) (Francke & Shulz, 1999, Seybold et al. 2003, Blomquist et al. 2012). Οι υδρογονάνθρακες εκκρίνονται από αδένες, οι οποίοι βρίσκονται στο δερμάτιο των εντόμων και γι αυτό το λόγο ονομάζονται επιδερμικοί υδρογονάνθρακες (cuticular hydrocarbons, CHC) (Kaib et al. 1991). Πρόκειται για μακριές ανθρακικές αλυσίδες, κορεσμένες ή ακόρεστες, αποτελούμενες συνήθως από 5 έως 35 άτομα άνθρακα ενώ η πτητικότητά τους διαφοροποιείται ανάλογα με το μήκος της ανθρακικής τους αλυσίδας (Lockey, 1988). Τα έντομα ανιχνεύουν τις περισσότερο πτητικές ουσίες με την αίσθηση της όσφρησης, ενώ τις λιγότερο πτητικές με την αίσθηση της αφής.



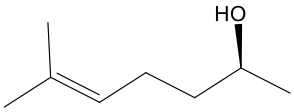
(10*E*,12*Z*)-hexadeca-10,12-dien-1-ol
(bombykol)

Bombyx mandarina



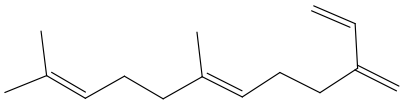
(Z)-7-tricosene

Drosophila melanogaster



(*S*)-6-methylhept-5-en-2-ol
((S)-sulcatol)

Gnathotrichus materiarius



(*E*)-7,11-dimethyl-3-methylenedodeca-1,6,10-triene
((E)-farnesene)

Arabidopsis thaliana

Εικόνα 2.3: Παραδείγματα γνωστών φερομονών από διαφορετικά είδη εντόμων

Στους κορεσμένους υδρογονάνθρακες (αλκάνια), η ένωση μεταξύ των ατόμων άνθρακα γίνεται με απλό δεσμό, ενώ στους ακόρεστους η ένωση γίνεται είτε με ένα διπλό δεσμό (αλκένιο), είτε με δύο ή τρεις διπλούς (αλκαδιένιο ή αλκατριένιο, αντίστοιχα). Ανάλογα με την ισομέρεια του διπλού δεσμού, τα αλκένια κατηγοριοποιούνται σε δύο *cis-trans* στερεοϊσομερή. Μία επιπλέον ομάδα των κορεσμένων υδρογονανθράκων είναι οι διακλαδισμένοι, στους οποίους η ανθρακική αλυσίδα περιλαμβάνει μία ή περισσότερες μεθυλομάδες (CH_3). Το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας σε συνδυασμό με την παρουσία της μεθυλομάδας ή/και του διπλού δεσμού

καθώς και η ισομέρειά του επηρεάζουν τη δομή και τις φυσικές ιδιότητες μιας ουσίας, χαρακτηριστικά τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιολογική δράση της (Carlson et al. 1989). Για παράδειγμα το πεντακοσάνιο (pentacosane, C25) έχει σημείο τήξεως 54°C. Η προσθήκη ενός διπλού δεσμού στο μόριο καθώς και η θέση του στην ανθρακική αλυσίδα μειώνει το σημείο τήξεως κάτω από τους 54°C (Gibbs & Pomonis, 1995). Το ίδιο συμβαίνει και με την προσθήκη μιας μεθυλομάδας, η οποία μειώνει το σημείο τήξεως στους 30°C (Morgan, 2004).

Η θέση του διπλού δεσμού στην ανθρακική αλυσίδα είναι κρίσιμη α) για τη διαφοροποίηση ενός είδους εντόμου και β) για τη βιολογική δράση της φερομόνης. Για παράδειγμα, το λεπιδόπτερο έντομο *Planotortix excessana* χρησιμοποιεί το (*Z*)-5 και (*Z*)-7 οξικός τετραδεκενυλεστέρας ((*Z*)-5 και (*Z*)-7-tetradecenyl acetate) ως χαρακτηριστικό του είδους του, ενώ το *Planotortix octo* χρησιμοποιεί το (*Z*)-8 και (*Z*)-10 οξικός τετραδεκενυλεστέρας (*Z*)-8 και (*Z*)-10-tetradecenyl acetate (Galbreath et al. 1985, Foster et al. 1990). Ο μη Αφρικανικός πληθυσμός του *D. melanogaster* παράγει ως σεξουαλική φερομόνη το (Z,-Z) -7,11 εικοσιεπταδιένιο ((*Z, Z*)-7,11-heptacosadiene), ενώ ο Αφρικανικός πληθυσμός του παράγει το (*Z, Z*)-5,9 εικοσιεπταδιένιο ((*Z, Z*)-5,9-heptacosadiene) (Ferveur et al. 1996).

Επιπλέον, η εναντιομέρεια μιας ουσίας παίζει σημαντικό ρόλο στη δραστικότητά της (Mori, 2007). Για παράδειγμα, στα μυρμήγκια το (*S*)-ισομερές της φερομόνης συναγερμού, 4-μέθυλο-3-επτανόνη (4-methyl-3-heptanone), παρουσίασε 400 φορές περισσότερη δραστικότητα από το (*R*)-ισομερές της (Riley et al. 1974). Για τα λεπιδόπτερα, όπως ο σκόρος, το (7R, 8S)-εναντιομερές της σεξουαλικής του φερομόνης απεδείχθη 10^6 φορές πιο δραστικό απ' ότι το κατοπτρικό του είδωλο (Iwaki & Marumo, 1974). Υπάρχουν περιπτώσεις κατά τις οποίες μη-φυσικά στερεοϊσομερή είναι περισσότερο δραστικά από τα στερεοϊσομερή που παράγει το έντομο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η σεξουαλική φερομόνη του *D. melanogaster*, 3-acetoxy-11,19 octacosadien-1-ol (CH503), που το στερεοϊσομερές το οποίο παράγεται από το ίδιο το έντομο είναι λιγότερο δραστικό απ' ότι εκείνο που συντίθεται εργαστηριακά (Shikichi et al. 2012, Ng et al. 2014).

Οι υδρογονάνθρακες εκτός του ότι λειτουργούν ως φερομόνες για τη χημική επικοινωνία των εντόμων, συμβάλλουν και στην προστασία τους από την αφυδάτωση. Αυτό επιτυγχάνεται με τον περιορισμό της απώλειας υγρών από το σώμα τους, ρυθμίζοντας τη δια-επιδερμική ροή τους.

Επιπλέον, εξαιτίας του υδρόφοβου χαρακτήρα των υδρογονανθράκων, οι σταγόνες του νερού δεν μπορούν να προσκολληθούν στο δερμάτιο του εντόμου, γεγονός που προστατεύει τα έντομα από τη διαβροχή. Όσο αυξάνεται το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας, η ουσία γίνεται λιγότερο πτητική άρα αυξάνεται το σημείο ζέσεώς της και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ειδικού φιλμ με μικρή διαπερατότητα στο νερό. Για παράδειγμα, ένα αλκάνιο με 33 άτομα άνθρακα (C33-alkane) μειώνει περισσότερο τη δια-επιδερμική ροή σε αντίθεση με ένα αλκάνιο με 23 άτομα άνθρακα (C23-alkane), λόγω σταθεροποίησης των ασθενών διαμοριακών δυνάμεων (van der Waals δυνάμεις), οι οποίες αυξάνονται με την αύξηση του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας (Gibbs, 1998).

Τα περισσότερα έντομα για να διατηρήσουν το σημείο τήξεως των επιδερμικών υδρογονανθράκων τους περίπου στους 30°C παράγουν κορεσμένους υδρογονάνθρακες με περισσότερα από 20 άτομα άνθρακα στην ανθρακική τους αλυσίδα (Gibbs, 1998). Με αυτό τον τρόπο το εύρος της θερμοκρασίας τήξεως των επιδερμικών υδρογονανθράκων του εντόμου διατηρείται σε χαμηλό επίπεδο και επιτρέπει στο κηρώδες υπόστρωμα του δερμάτιου να παραμείνει ελαστικό σε ένα ευρύ θερμοκρασιακό περιβάλλον (Morgan, 2004). Έντομα τα οποία ζουν σε θερμότερα περιβάλλοντα παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες κορεσμένων υδρογονανθράκων, σε αντίθεση με εκείνα τα οποία ζουν σε ψυχρότερα κλίματα και παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες ακόρεστων υδρογονανθράκων (Wagner et al. 1998).

2.5 Βιο-Σύνθεση των Φερομονών

Εκτεταμένες έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί για το βιοσυνθετικό μονοπάτι των υδρογονανθράκων του *Musca domestica* (Blomquist, 2003), του *Periplaneta americana* (Schal et al. 1994), του *Blattella germanica* (Nelson & Blomquist, 1995) και του *Drosophila melanogaster* (Jallon & Wicker-Thomas, 2003). Από τις παραπάνω βιβλιογραφικές αναφορές προκύπτει ότι οι επιδερμικοί υδρογονάνθρακες συντίθενται μέσω του τροποποιημένου βιοσυνθετικού μονοπατιού των λιπαρών οξέων. Οι μακριές αλυσίδες των λιπαρών οξέων σχηματίζονται χρησιμοποιώντας το ακέτυλο-συνένζυμο Α (acetyl-CoA) ως πρόδρομο μόριο, το οποίο μετατρέπεται σε μηλόνυλο-συνένζυμο Α (malonyl-CoA) χρησιμοποιώντας την ακέτυλο-συνένζυμο Α καρβοξυλάση (acetyl-CoA carboxylase). Η συνθάση λιπαρού οξέος ενσωματώνει περαιτέρω τις μονάδες του malonyl-CoA στο acyl-CoA, προσθέτοντας κάθε φορά 2 άτομα άνθρακα στην ανθρακική αλυσίδα (Pennanec’h et al. 1991, Dembeck et al. 2015). Στο

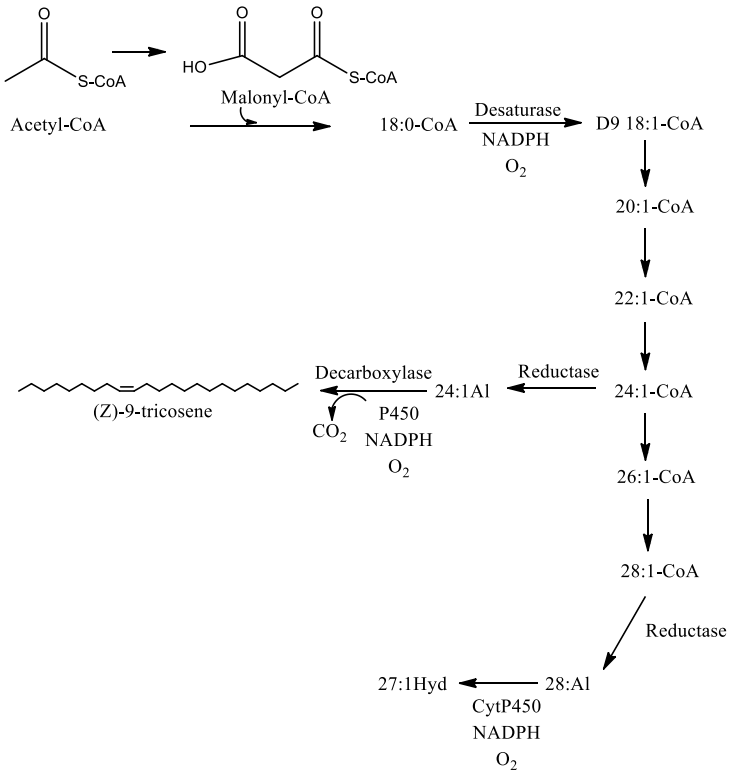
Drosophila, αυτή η διαδικασία οδηγεί στη σύνθεση μακριών αλυσίδων λιπαρών οξέων, οι οποίες αποτελούνται από 14, 16 και 18 άτομα άνθρακα. Στο σημείο αυτό τα γραμμικά αλκάνια μπορεί να τροποποιηθούν περαιτέρω είτε μέσω μιας αντίδρασης αποκορεσμού είτε μέσω προσθήκης μεθυλομάδας (Blomquist & Bagnères, 2010, Dembeck et al. 2015). Στη συνέχεια, ειδικά ένζυμα ενσωματώνουν επιπλέον μονάδες malonyl-CoA για να σχηματιστούν τα λιπαρά οξέα πολύ μακριάς αλυσίδας. Το τελικό στάδιο για τη βιοσύνθεση των υδρογονανθράκων είναι η οξειδωτική κατάλυση της αλδεΰδικής καρβονυλομάδας μέσω του κυτοχρώματος-P450. Ακολουθεί η απομάκρυνση του διοξειδίου του άνθρακα (Tillman et al. 1999, Morgan, 2004), η οποία οδηγεί στη μείωση του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας κατά ένα άτομο άνθρακα (Dembeck et al. 2015).

Οι διακλαδισμένοι υδρογονάνθρακες σχηματίζονται με την υποκατάσταση του μεθυλομηλονυλο-συνένζυμου A (methylmalonyl CoA), προερχόμενο είτε από κάποιο αμινοξύ είτε από κάποιο σουκινικό οξύ, στη θέση του μηλόνυλο-συνένζυμου A (Nelson & Blomquist, 1995, Morgan, 2004). Το βασικό βήμα για τη βιοσύνθεση των αλκενίων είναι ο αποκορεσμός ενός στεατικού (stearic acid) ή ενός παλμιτικού οξέος (palmitic acid) σε ελαϊκό (oleic acid) ή παλμιτελαϊκό οξυ (palmitoleic acid) αντίστοιχα, μέσω της Δ^9 δεσατουράσης (Δ^9-desaturase). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός διπλού δεσμού στη θέση Δ^9. Στη συνέχεια το ελαϊκό ή το παλμιτεαλαϊκό οξυ επιμηκύνεται και συντίθεται το τελικό αλκένιο (Marcillac et al. 2005, Ueyama et al. 2005).

Για τα έντομα της οικογένειας Drosophilidae έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες μελέτες με σκοπό την αποσαφήνιση της λειτουργίας των δεσατουρασών *desat*1, *desat*2 και *desat*F. Στο *D. melanogaster*, οι σεξουαλικές φερομόνες με την περισσότερη αφθονία είναι το 7- εικοσιτριένιο (7-tricosene, 7-C23), το 7- εικοσιπεντένιο (7-pentacosene, 7-C25), το 7,11-εικοσιεπταδιένιο (7,11-heptacosadiene 7,11-HP) και το 7,11-εικοσιενιαδιένιο (7,11-nonacosadiene (7,11-ND) (Jallon, 1984, Pechine et al. 1985). Όλες αυτές οι ουσίες είναι αλκένια με διπλό δεσμό στον 7° άνθρακα, γεγονός που υποδηλώνει ένα κοινό βιοσυνθετικό μονοπάτι, το οποίο ξεκινάει από το στάδιο του αποκορεσμού. Ο αποκορεσμός αυτός πραγματοποιείται μέσω του γονιδίου της *desat*1, το οποίο εκφράζεται στα οενοκύτταρα (oenocytes) και κωδικοποιεί την Δ^9 acyl-CoA δεσατουράση (Dallerac et al. 2000). Η *desat*1 εισάγει έναν διπλό δεσμό στην θέση 7 της ανθρακικής αλυσίδας (16 άτομα άνθρακα) των λιπαρών οξέων και οδηγεί στη σύνθεση του

μονοενίου. Έπειτα, το μονοένιο είτε επιμηκύνεται περισσότερο για να σχηματιστεί το 7-C23 και το 7-C25 (Bontonou & Wicker-Thomas, 2014) είτε εισάγεται ένας δεύτερος διπλός δεσμός για να σχηματιστεί το 7,11-HP και το 7,11-ND (Gleason et al. 2009).

Επιπλέον, οι μεταλλάξεις της *desat*1 προκαλούν, και στα δύο φύλα του *D. melanogaster*, μείωση στους ακόρεστους υδρογονάνθρακες και μια συνακόλουθη αύξηση στους κορεσμένους (Ueyama et al. 2005). Η διαφορά μεταξύ της *desat*2 και της *desat*1 είναι ότι κάθε μία τους συμβάλλει στην παραγωγή διαφορετικών φερομονικών προφίλ, τα οποία διαφοροποιούν για παράδειγμα τον Αφρικανικό πληθυσμό του Drosophila από το μη Αφρικανικό (Dallerac et al. 2000, Takahashi et al. 2001). Η δεσατουράση *desat*F, γνωστή και ως *Fad*2 είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση διενίων στο *D. melanogaster*, τα οποία εμφανίζονται μόνο στα θηλυκά (Shirangi et al. 2009). Η *desat*F κωδικοποιεί το ένζυμο το οποίο μετατρέπει στη θέση 7 μονοένιο λιπαρό οξύ σε διένιο, εισάγοντας έναν δεύτερο διπλό δεσμό στο 11° άτομο άνθρακα. Στη συνέχεια επιμηκύνεται και αποκαρβοξυλιώνεται και σχηματίζεται η φερομόνη 7,11-HP και το 7,11-ND (Legendre et al. 2008). Στην παρακάτω εικόνα (Εικ. 2.4) απεικονίζεται το βιοσυνθετικό μονοπάτι των επιδερμικών υδρογοναθράκων.



Εικόνα 2.4: Βιοσυνθετικό μονοπάτι των επιδερμικών υδρογονανθρακών, όπου Al-αλδεϋδη (aldehyde) και Hyd-υδρογονάνθρακας (hydrocarbon)

Γενικά η βιοσύνθεση των φερομονών συνδέεται άμεσα με το μεταβολισμό των λιπιδίων, ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη συνολική υγεία του εντόμου (Kuo et al. 2012a, Wicker-Thomas et al. 2015). Αν για κάποιο λόγο ο μεταβολισμός των λιπαρών οξέων παρεμποδιστεί, η παραγωγή των υδρογονανθράκων και κατ' επέκταση των φερομονών μπορεί να μειωθεί δραματικά (Wicker-Thomas et al. 2015). Οι επιδερμικοί υδρογονάνθρακες ενός εντόμου διαφοροποιούνται ανάλογα με τη διατροφή, τη θερμοκρασία και τη σχετική υγρασία (Rouault et al. 2004, Etges et al. 2006).

3. Φασματομετρία Μάζας

Τα δύο βασικά εργαλεία για τη μελέτη των φερομονών είναι αρχικά η εφαρμογή αναλυτικών τεχνικών και στη συνέχεια η εφαρμογή βιοδοκιμών. Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, οι φερομόνες μπορεί να ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες οργανικών ενώσεων και συνήθως απαντώνται είτε στο δερμάτιο είτε σε αδένες του εντόμου (Kaib et al. 1991, Howard & Blomquist, 2005). Για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό του φερομονικού προφίλ ενός εντόμου, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η εκχύλιση των επιδερμικών υδρογονανθράκων ή συγκεκριμένων αδένων και στη συνέχεια η ανάλυσή τους με διάφορες αναλυτικές τεχνικές. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS) καθώς είναι η κύρια αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και την αποσαφήνιση των δομικών χαρακτηριστικών των επιδερμικών υδρογονανθράκων.

3.1 Εισαγωγή

Η φασματομετρία μάζας είναι μία ευρέως διαδεδομένη τεχνική για την ταυτοποίηση στοιχείων σε δείγματα καθώς και για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεών τους. Είναι ένα αναλυτικό εργαλείο απαραίτητο για τη διερεύνηση της δομής οργανικών ενώσεων. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ποιοτική ανάλυση αερίων, υγρών και υπό ειδικές συνθήκες στερεών. Τα πλεονεκτήματα της είναι αρκετά, όπως:

- Όρια ανίχνευσης πολύ χαμηλότερα από εκείνα των οπτικών μεθόδων
- Φάσματα απλά, χαρακτηριστικά και εύκολα στην ερμηνεία τους

Η φασματομετρία μάζας είναι μία τεχνική για τη μελέτη των μαζών ατόμων, μορίων ή θραυσμάτων μορίων. Για να ληφθεί ένα φάσμα μάζας, ουσίες στην αέρια φάση ιοντίζονται, τα ιόντα επιταχύνονται από ένα ηλεκτρικό πεδίο και κατόπιν διαχωρίζονται βάση του λόγου μάζα-προς-φορτίο, m/z. Το φασματόμετρο μάζας μπορεί να προσδιορίσει μοριακά βάρη ουσιών έως και 4000 amu. Στις μέρες μας χρησιμοποιούνται διάφοροι τύποι φασματόμετρων μάζας, όπως για παράδειγμα το φασματόμετρο μάζας διπλής εστίασης (double focusing mass spectrometer), το φασματόμετρο μάζας χρόνου πτήσης (time of flight mass spectrometer, TOF) και το φασματόμετρο μάζας τετραπόλου (quadrupole mass spectrometer) (Skoog et al. 2002, Harris, 2010).

3.2 Οργανολογία

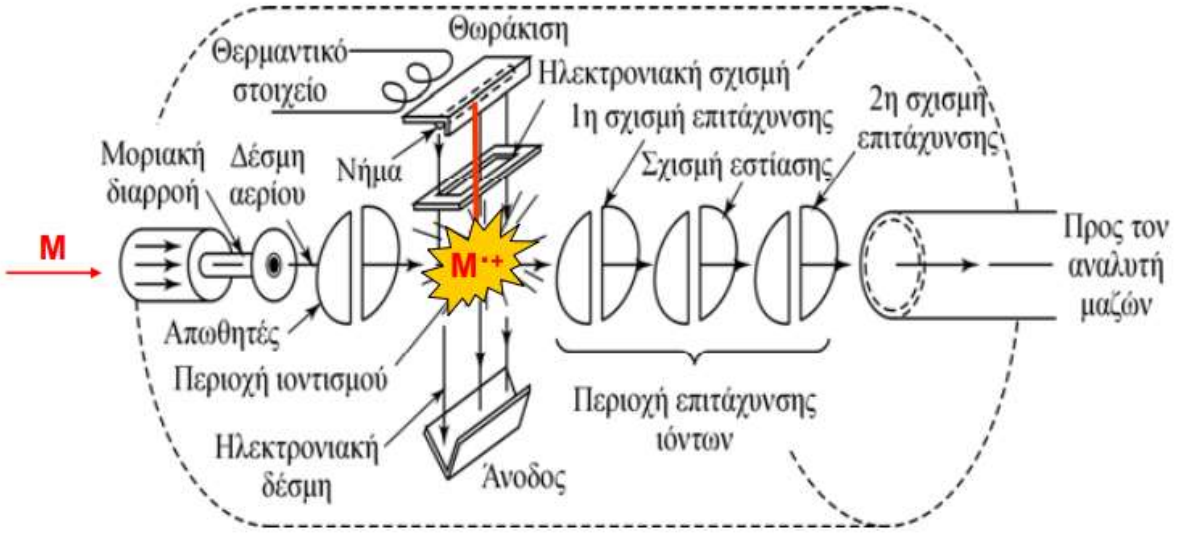
Όλοι οι τύποι των φασματόμετρων μαζών αποτελούνται από τα εξής τμήματα:

1) Το σύστημα εισαγωγής του δείγματος. Ο σκοπός του συστήματος εισαγωγής δείγματος είναι η προετοιμασία του δείγματος για την εισαγωγή του στο χώρο ιοντισμού, υπό σταθερή ροή και σε αέρια πάντοτε κατάσταση. Η εξαέρωση δειγμάτων που περιέχουν ενώσεις με περιορισμένη πτητικότητα ή στερεών δειγμάτων, διευκολύνεται με θέρμανση σε συνθήκες υψηλού κενού. Στο δοχείο δείγματος η πίεση που επικρατεί είναι της τάξης των 10^{-2} Torr. Με κατάλληλο στόμιο εισαγωγής το αέριο δείγμα εισάγεται σε ενδιάμεσο χώρο με ακόμη μικρότερη πίεση (10^{-5} Torr) και έπειτα στο χώρο ιοντισμού (Skoog et al. 2002).

2) Την πηγή ιόντων. Στο τμήμα αυτό οι ενώσεις μετατρέπονται σε ιόντα έπειτα από βομβαρδισμό με ηλεκτρόνια, ιόντα, μόρια ή φωτόνια και με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου ή υψηλής θερμοκρασίας. Συχνά το σύστημα εισαγωγής συνενώνεται με την πηγή ιόντων. Το προϊόν του ενιαίου αυτού τμήματος είναι ένα ρεύμα ιόντων, (συνήθως θετικά φορτισμένων), τα οποία επιταχύνονται και εισέρχονται στον αναλυτή μαζών. Η επιλογή της τεχνικής ιοντισμού που θα εφαρμοσθεί είναι μεγάλης σημασίας. Στην παρούσα έρευνα χρησιμοπιήθηκε ο ηλεκτρονιακός ιοντισμός κατά τον οποίο, τα μόρια εισέρχονται στην πηγή ιόντων μετατρέπονται σε ιόντα μέσω ηλεκτρονιακού ιοντισμού (πρόσκρουσης με ηλεκτρόνια) (Εικ.3.2). Τα ηλεκτρόνια που εκπέμπονται από ένα θερμό νήμα, επιταχύνονται μέσω μιας διαφοράς δυναμικού της τάξης των 70 eV πριν αλληλεπιδράσουν με τα εισερχόμενα μόρια. Ορισμένα μόρια (0,01%) απορροφούν έως και 12-15 eV (1eV=96,5KJ/mol), ενέργεια που επαρκεί για ιοντισμό (σχέση 3.1):

$$M + e^- \rightarrow M^{+\cdot} + e^- + e^- \qquad \textbf{(Σχ. 3.1)}$$

Σχεδόν όλα τα σταθερά μόρια έχουν άρτιο αριθμό ηλεκτρονίων. Όταν χάσουν ένα ηλεκτρόνιο, το παραγόμενο κατιόν με το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο γράφεται $M^{+\bullet}$ και αποτελεί το μοριακό ιόν. Μετά τον ιοντισμό, το $M^{+\bullet}$ έχει συνήθως αρκετή εσωτερική ενέργεια (1eV) ώστε να διασπαστεί σε θραύσματα (Harris, 2010).



Εικόνα 3.2: Σχηματική διάταξη ιοντισμού με πρόσκρουση ηλεκτρονίων
https://eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/CHEM165/08-SAT_03_Mass_Spectrometry_pt2.pdf

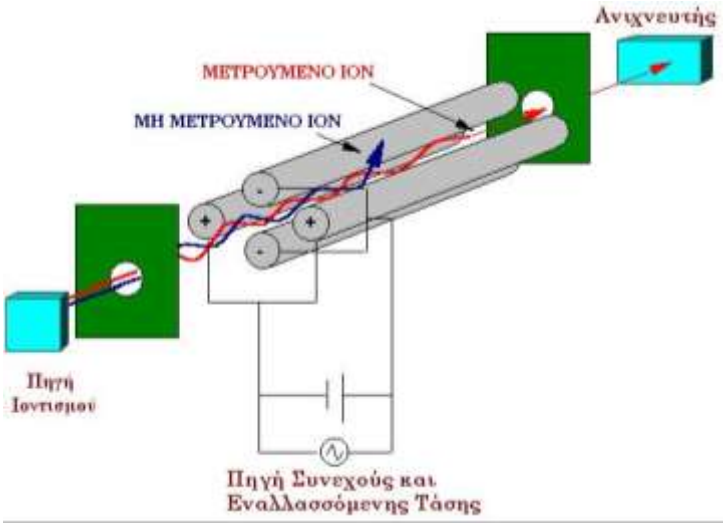
3) Τον αναλυτή μαζών. Εδώ πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των ιόντων και η διασπορά τους βασίζεται στον λόγο *m/z*. Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες αναλυτών μαζών, των οποίων η λειτουργία βασίζεται σε διαφορετικές αρχές. Ο ιδανικός αναλυτής μαζών πρέπει να επιτρέπει τη διέλευση αρκετών ιόντων, ώστε να παραχθεί ένα άμεσα μετρήσιμο ρεύμα ιόντων και να διαχωρίζει μάζες που διαφέρουν ελάχιστα μεταξύ τους. Από τον τύπο του αναλυτή μαζών εξαρτάται η *διαχωριστική ικανότητα* (resolution) του οργάνου, που είναι το σπουδαιότερο χαρακτηριστικό ποιότητας ενός φασματόμετρου μάζας. Η διαχωριστική ή διακριτική ικανότητα (R) ορίζεται από την παρακάτω σχέση 3.2. Για παράδειγμα, ένα φασματόμετρο με διακριτική ικανότητα 4000 μπορεί να διακρίνει κορυφές με λόγους *m/z* 400,0 και 400,1 (Harris, 2010).

$$R = \frac{M}{\Delta M} \qquad \textbf{(Σχ. 3.2)}$$

Όπου: M = η μάζα της πρώτης κορυφής
ΔM = η διαφορά μαζών δύο διαδοχικών κορυφών

Η κύρια διαφορά μεταξύ των διαφόρων φασματόμετρων μαζών έγκειται στους αναλυτές που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό των ιόντων. Στην παρουσά μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο τετραπολικός αναλυτής (Εικ.3.3). ο οποίος είναι ο πιο συνηθισμένος διαχωριστής μάζας λόγω του χαμηλού κόστους.

Αποτελείται από τέσσερεις παράλληλες μεταλλικές ράβδους (πόλοι), στις οποίες εφαρμόζεται ένα σταθερό δυναμικό και ένα εναλλασσόμενο δυναμικό ραδιοσυχνοτήτων. Το ηλεκτρικό πεδίο εκτρέπει τα ιόντα σε διάφορες τροχιές, καθώς αυτά κινούνται από τον θάλαμο ιοντισμού προς τον ανιχνευτή, αφήνοντας ιόντα με συγκεκριμένο λόγο m/z, να φθάσουν στον ανιχνευτή. Τα άλλα ιόντα, που δεν συντονίζονται, συγκρούονται με τις ράβδους και χάνονται πριν φθάσουν στον ανιχνευτή. Κατά τη σάρωση τα δυναμικά των δύο ρευμάτων (συνεχούς και εναλλασσόμενου) αυξάνονται από τιμή 0 έως μία μέγιστη. Με τον τρόπο αυτό το δυναμικό μεταβάλλεται από 0 έως ±250V για το συνεχές και από 0 έως ±1500V για το εναλλασσόμενο. Τα ιόντα κινούνται διαγράφοντας ελικοειδείς πορείες και η κίνησή τους επηρεάζεται από τη σάρωση. Τα τετραπολικά όργανα έχουν την ικανότητα να καταγράφουν 2 έως 8 φάσματα ανά δευτερόλεπτο, καλύπτοντας ένα εύρος έως και 4000 μονάδες *m/z*. Επιπλέον, μπορούν να διαχωρίσουν κορυφές που διαφέρουν κατά 0.3 m/z (Hoffmann & Stroobant, 2007).

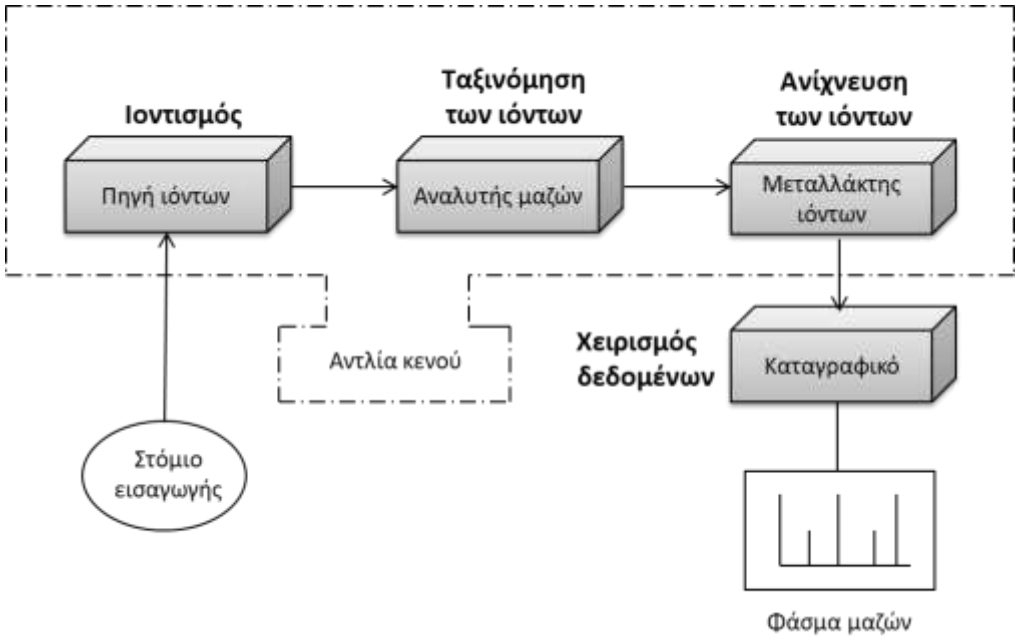


Εικόνα 3.3: Σχηματική απεικόνιση γραμμικού τετραπολικού αναλύτη (Μιχόπουλος, 2008)

4) Τον ανιχνευτή. Συλλαμβάνει τα διαχωριζόμενα ιόντα και μετατρέπει την ιοντική δέσμη σε ηλεκτρικό σήμα. Στην έξοδο του ανιχνευτή παράγεται ηλεκτρικό σήμα ανάλογο του αριθμού των ιόντων και του φορτίου τους που εισέρχονται στην είσοδό του. Μια σειρά από δυνόδους πολλαπλασιάζει τον αριθμό των ηλεκτρονίων κατά 10^{-5} πριν αυτά φθάσουν στην άνοδο, όπου μετριούνται. Υπάρχουν διάφοροι τύποι ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται στη φασματομετρία μάζας. Ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής (*electron multiplier)* είναι ο πιο συνηθισμένος ανιχνευτής που χρησιμοποιείται στη φασματομετρία μάζας (Skoog, 2002).

5) Το καταγραφικό. Καταγράφει το ηλεκτρικό σήμα και στη συνέχεια γίνεται επεξεργασία αυτού με ειδικό λογισμικό σε ηλεκτρονικό υπολογιστή.

6) Το σύστημα κενού. Ολόκληρο το φασματόμετρο (πέραν του συστήματος επεξεργασίας δεδομένων) βρίσκεται υπό υψηλό κενό (10^{-5} έως 10^{-8} torr) με σκοπό να αποφευχθεί η εκφόρτισή των παραγόμενων σωματιδίων από τα αέρια της ατμόσφαιρας και να διατηρηθεί η πίεση σε χαμηλά επίπεδα στα περισσότερα τμήματά του. Στην Εικ.3.4 δίνεται ένα διάγραμμα των τμημάτων ενός τυπικού φασματόμετρου μαζών (Skoog, 2002)



Εικόνα 3.4: Σχηματικό διάγραμμα των τμημάτων ενός φασματόμετρου μαζών

3 Η Φασματομετρία Μαζών στη Χημική Ανάλυση

3.3.1 Φάσμα Μάζας

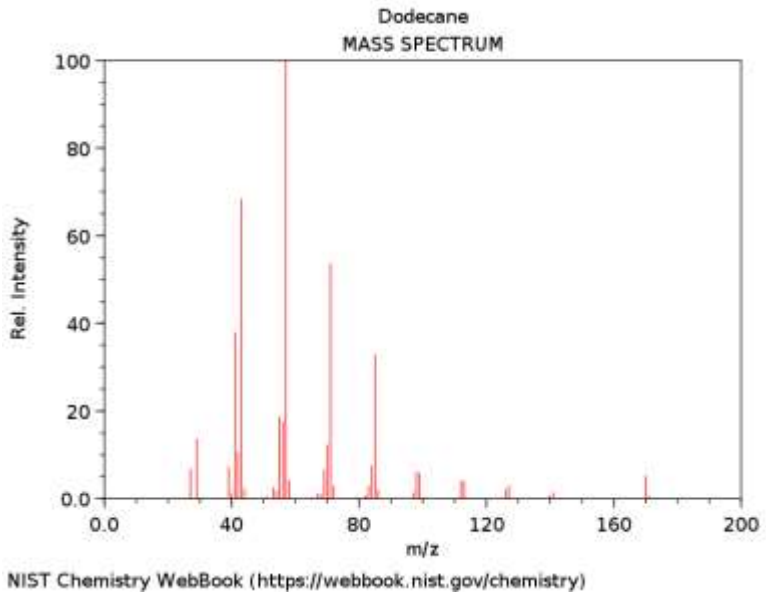
Το φάσμα μάζας είναι η γραφική απεικόνιση των ιόντων που προέρχονται από μία ένωση και περιγράφει το σχετικό ποσοστό του κάθε ιόντος (τεταγμένη) σε συνάρτηση με το λόγο της μάζας προς το φορτίο του m/z (τετμημένη). Το μοριακό βάρος εκφράζεται στις συνήθεις μονάδες ατομικής μάζας amu (atomic mass unit) ή Da (Dalton), με βάση το ισότοπο ^{12}C που κατά συνθήκη αντιστοιχεί ακριβώς σε 12.000000 amu. Επειδή τα ιόντα που παράγονται φέρουν κατά κανόνα ένα φορτίο, ο λόγος m/z αντιστοιχεί αριθμητικά στη μοριακή μάζα του ιόντος. Η

μεγαλύτερη κορυφή στη φασματομετρία μάζας ονομάζεται κύρια ή βασική κορυφή. Οι εντάσεις των υπόλοιπων κορυφών εκφράζονται ως ποσοτό της κύριας κορυφής (Harris, 2010). Πέρα από αυτές τις κορυφές, άλλοι τύποι κορυφών που συχνά διακρίνονται είναι οι θυγατρικές κορυφές, οι κορυφές ισοτόπων και οι κορυφές του υποβάθρου-θορύβου. Οι θυγατρικές κορυφές αντιστοιχούν σε θυγατρικά ιόντα, προέρχονται από τη θραυσματοποίηση των μοριακών ιόντων και μπορεί να είναι και οι κύριες κορυφές. Κορυφές ισοτόπων μπορεί να ληφθούν από τα ισότοπα στοιχείων, όπως για παράδειγμα τα ισότοπα του χλωρίου ^{35}Cl και ^{37}Cl. Οι κορυφές υποβάθρου συχνά προέρχονται είτε από διαρροές αερίων και είναι συνήθως στα *m/z* 18, 24, 32, 40, 44, είτε από εκχύλιση πλαστικών τμημάτων (septum) κ.α (Skoog, 2002).

3.3.2 Προσδιορισμός Μοριακών Μαζών

Ποιοτικός Προσδιορισμός: Το φάσμα μάζας αποτελεί το δακτυλικό αποτύπωμα μιας ένωσης διότι δύο διαφορετικά μόρια δεν είναι δυνατόν να διασπασθούν και να ιονισθούν από μία δέσμη ηλεκτρονίων με τον ίδιο ακριβώς τρόπο. Το φάσμα μάζας μιας ένωσης παρέχει πληροφορίες χρήσιμες για την ταυτοποίησή της. Ταυτοποιώντας τη μοριακή κορυφή μιας ένωσης, μπορεί να προσδιοριστεί η μοριακή μάζα της με ακρίβεια, η οποία εξαρτάται από τη διακριτική ικανότητα του οργάνου. Επιπλέον, ανάλογα με το είδος της οργανικής ένωσης, η ένταση σήματος στον ανιχνευτή διαφοροποιείται. Η ερμηνεία της σχηματομορφής των θραυσμάτων παρέχει πληροφορίες για την παρουσία ή απουσία λειτουργικών ομάδων. Για παράδειγμα, κορεσμένοι αλειφατικοί υδρογονάνθρακες, ακόρεστοι αλειφατικοί υδρογονάνθρακες, αρωματικοί υδρογονάνθρακες, εστέρες, κετόνες, αλκοόλες κ.α. δίνουν χαρακτηριστικά διαγράμματα θραύσης, λόγω των συγκεκριμένων μηχανισμών διάσπασης των δεσμών τους.

Αν σε ένα φάσμα μάζας υπάρχουν συστάδες κορυφών των οποίων οι μάζες τους διαφέρουν κατά 14 (m/z = 14, 28, 42) αυτό είναι χαρακτηριστικό για τις αλκυλομάδες, που προέρχονται από τη διάσπαση κορεσμένων αλειφατικών υδρογονανθράκων (Εικ.3.5). Άλλα ιόντα που απαντώνται συχνά και επιβεβαιώνουν το μοριακό ιόν είναι, M-2 (απώλεια H_2), M-15 (απώλεια CH_3), M-18 (απώλεια H_2O), M+17 (προσθήκη NH_4), M+22 (προσθήκη Na), M+38 (προσθήκη K) και M+39 (προσθήκη Ca).



Εικόνα 3.5: Φάσμα μάζας dodecane ($C_{12}H_{26}$) M_r=170.3348

Μία ένωση μπορεί να ταυτοποιηθεί συγκρίνοντας το φάσμα μάζας της με φάσματα πρότυπων ενώσεων. Συνήθως, μετά τον προσδιορισμό της μοριακής μάζας μιας ουσίας, τη μελέτη της ισοτοπικής κατανομής της και της σχηματομορφής των θραυσμάτων, ένας αναλυτής μπορεί να περιορίσει σε μικρό αριθμό τις πιθανές δομές. Εάν διατίθενται πρότυπες ουσίες, η οριστική ταυτοποίηση βασίζεται στη σύγκριση του φάσματος μάζας του προτύπου με της άγνωστης ουσίας.

Επιπλέον, έχουν δημιουργηθεί βάσεις δεδομένων με φάσματα χιλιάδων ενώσεων από πιστοποιημένα εργαστήρια. Διατίθενται σε μορφή αρχείου, το οποίο είναι συνδεδεμένο με το λογισμικό του οργάνου και έχει τη δυνατότητα σύγκρισης του αγνώστου φάσματος με τα αντίστοιχα των βιβλιοθηκών, μέσω δεικτών ομοιότητας (similarity index).

Ποσοτικός Προσδιορισμός: Η φασματομετρία μαζών εφαρμόζεται τόσο για τον ποιοτικό όσο και για τον ποσοτικό προσδιορισμό ενός αγνώστου δείγματος. Η παρακολούθηση των ιόντων μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τρόπους, όπως για παράδειγμα την πλήρη σάρωση (Full Scan) και την παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος (Single Ion Monitoring-SIM). Κατά τη SIM μέθοδο, παρακολουθείται μία τιμή *m/z,* αλλά πολλές φορές μπορεί και παρακολουθούνται τα ρεύματα τριών ή τεσσάρων τιμών m/z. Η SIM μέθοδος είναι αποτελεσματική στην ανίχνευση μικρών ποσοτήτων μιας γνωστής ουσίας σε πολύπλοκα δείγματα όταν το φάσμα μάζας της

ουσίας είναι γνωστό. Επίσης, επειδή παρακολουθούνται συγκεκριμένα ιόντα μπορούν να επιτευχθούν χαμηλότερα όρια ανίχνευσης και μεγαλύτερες ταχύτητες σάρωσης από τη μέθοδο Full Scan. Όμως ενδέχεται να μειωθεί η εκλεκτικότητα, διότι οποιαδήποτε ουσία δίνει το συγκεκριμένο ιόν θα εμφανιστεί ως η ουσία στόχος. Η Full Scan παρέχει ένα φάσμα πλήρους σάρωσης για κάθε ουσία και βοηθάει στον προσδιορισμό της ταυτότητας της άγνωστης ουσίας. Αυξάνοντας το χρόνο σάρωσης, αυξάνεται η ευαισθησία της μέτρησης, καθώς αυξάνεται ο συνολικός αριθμός των ιόντων τα οποία φθάνουν στον ανιχνευτή. Την ίδια στιγμή όμως υστερεί σε ευαισθησία και δεν ευνοεί την ποσοτικοποίηση, σε αντίθεση με την SIM μέθοδο, που τα εμβαδά των κορυφών είναι ανάλογα με τις συγκεντρώσεις των συστατικών.

Αν και η φασματομετρία μάζας είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την ταυτοποίηση των επιδερμικών υδρογονανθράκων, η χρησιμότητά της στην ανάλυση πολύπλοκων μειγμάτων περιορίζεται λόγω του μεγάλου πλήθους παραγόμενων θραυσμάτων διαφορετικών τιμών m/z. Για τον λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι στις οποίες οι φασματογράφοι μάζας συζεύγνυνται με συστήματα διαχωρισμού. Η πιο διαδεδομένη συζευγμένη τεχνική (hyphenated technique) με διευρυμένες αναλυτικές δυνατότητες για την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό των επιδερμικών υδρογονανθράκων είναι η Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC)(Skoog, 2002).

4. Αέρια Χρωματογραφία

4.1 Εισαγωγή

Η χρωματογραφία είναι μια τεχνική διαχωρισμού, η οποία βρίσκει εφαρμογές σε όλους τους κλάδους των επιστημών. Σε όλους του χρωματογραφικούς διαχωρισμούς το δείγμα κινείται σε μία κινητή φάση (mobile phase), η οποία μπορεί να είναι ένα αέριο, υγρό ή ένα υπερκρίσιμο ρευστό. Στη συνέχεια, η κινητή φάση διέρχεται μέσω μίας στατικής φάσης (stationary phase), η οποία είτε είναι μία στήλη είτε είναι μία στερεή επιφάνεια. Η επιλογή των φάσεων πραγματοποιείται με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε τα συστατικά του δείγματος να κατανεμηθούν μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης σε διαφορετικό βαθμό. Τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση κινούνται αργά, ενώ τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ασθενέστερα κινούνται ταχύτερα κατά τη ροή της κινητής φάσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα συστατικά του δείγματος να διαχωρίζονται. Ανάλογα με το είδος της κινούμενης και της στατικής φάσης η χρωματογραφία χαρακτηρίζεται ως αέρια ή υγρή.

Η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ταυτότητας (ποιοτική ανάλυση) και της ποσότητας (ποσοτική ανάλυση) των ενώσεων. Ωστόσο η εν λόγω μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως μέθοδος απομόνωσης ενός συστατικού από ένα μείγμα στην καθαρή του μορφή (preparative chromatography) (Skoog, 2002).

4.2 Οργανολογία

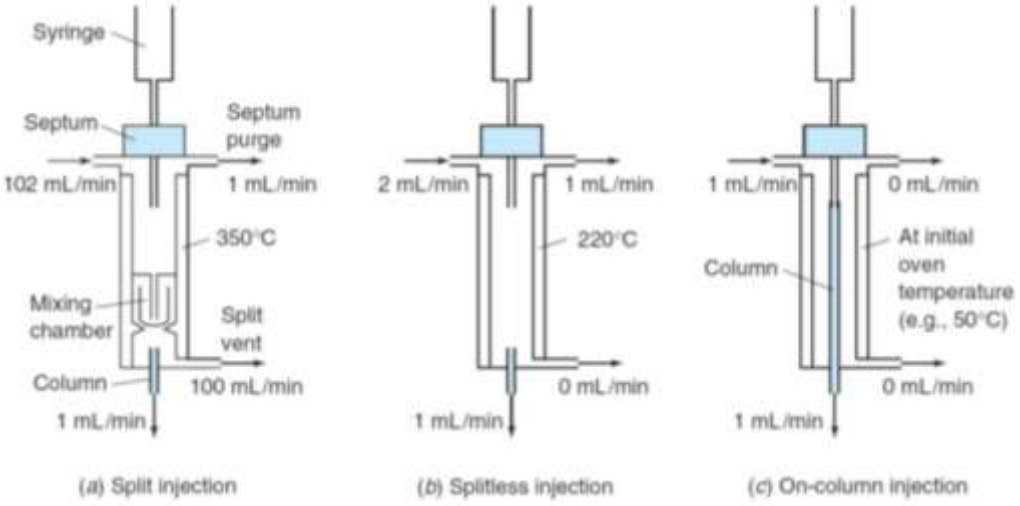
Ο αέριος χρωματογράφος αποτελείται από τα παρακάτω τμήματα:

1) Τροφοδοσία φέροντος αερίου. Τα φέροντα αέρια θα πρέπει να είναι χημικώς αδρανή και τέτοια είναι το ήλιο, το άζωτο και το υδρογόνο. Η επιλογή του φέροντος αερίου καθορίζεται από τον τύπο του ανιχνευτή. Οι ταχύτητες ροής ρυθμίζονται με ρυθμιστές πίεσης δύο σταδίων, οι οποίοι προσαρμόζονται στη φιάλη του αερίου και στο χρωματογράφο.

2) Σύστημα έγχυσης δείγματος. Για αποτελεσματικό διαχωρισμό πρέπει κατάλληλη ποσότητα δείγματος να εισαχθεί σαν «βύσμα» ατμού. Η συνηθέστερη τεχνική έγχυσης είναι η ένεση του υγρού ή αέριου δείγματος με μικροσύριγγα, μέσω ενός ελαστικού διαφράγματος σιλικόνης, γνωστό ως septum. Το δείγμα εισέρχεται από το στόμιο εισόδου στο χώρο ταχείας εξάτμισης, ο

οποίος βρίσκεται στην κεφαλή της στήλης. Για τις κοινές αναλυτικές στήλες η ποσότητα δείγματος κυμαίνεται από λίγα δέκατα του μικρόλιτρου έως και 20μl. Ανάλογα με τον τρόπο έγχυσης του δείγματος υπάρχουν τρείς κατηγορίες:

- **Έγχυση με διαμοιρασμό (split injection).** Στην περίπτωση αυτή, οι αναλύτες θα πρέπει να είναι >0.1% του δείγματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη ακρίβεια με τη μικρότερη ποσότητα δείγματος που μπορεί να ανιχνευθεί (Εικ.4.1a).
- **Έγχυση χωρίς διαμοιρασμό (splitless injection).** Στην περίπτωση αυτή οι αναλύτες θα πρέπει να είναι λιγότερο από το 0,01% του δείγματος. Αυτός ο τρόπος έγχυσης είναι βέλτιστος για ιχνοποσότητες ουσιών με υψηλό σημείο ζέσεως σε διαλύτες με χαμηλό σημείο ζέσεως (Εικ.4.1b)
- **Έγχυση στη στήλη (on column injection)**. Η έγχυση στη στήλη χρησιμοποιείται για δείγματα που διασπώνται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από το σημείο βρασμού τους και είναι η καταλληλότερη για ποσοτική ανάλυση (Εικ.4.1c).



Εικόνα 4.1: Συστήματα έγχυσης δείγματος με διαμοιρασμό (split), χωρίς διαμοιρασμό (splitless) και έγχυση στη στήλη (on column) https://slideplayer.com/slide/6537763/

3) Φούρνος στήλης. Στον θερμοκρασιακό προγραμματισμό, η θερμοκρασία μιας στήλης αυξάνεται κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού προκειμένου να αυξηθεί η πίεση των ατμών της ουσίας και να μειωθούν οι χρόνοι κατακράτησης των ουσιών που εκλύονται στο τέλος. Χρησιμοποιούνται δύο τύποι στηλών:

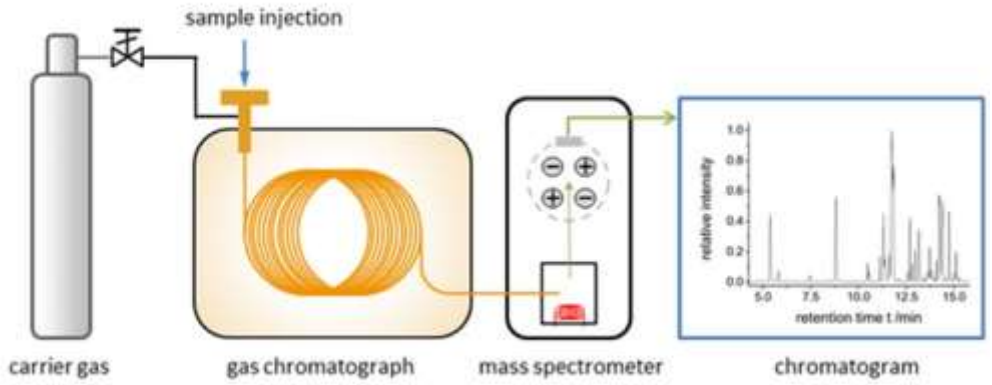
- **πληρωμένες** (packed) περιέχουν λεπτά σωματίδια στερεού υλικού στήριξης καλυμμένα με μη πτητική υγρή στατική φάση. Παρά τη μικρή διαχωριστική ικανότητα, οι πληρωμένες στήλες χρησιμοποιούνται για παρασκευαστικούς διαχωρισμούς, οι οποίοι απαιτούν μεγαλύτερη ποσότητα στατικής φάσης. Συνήθως κατασκευάζονται από ανοξείδωτο χάλυβα ή γυαλί και έχουν διάμετρο 3 έως 6 mm και μήκος 1 έως 5 m. Το στερεό υλικό στήριξης είναι συνήθως πυρίτιο έτσι ώστε να μειωθούν οι δεσμοί υδρογόνου με πολικούς διαλύτες (Harris, 2010).
- **ανοικτές σωληνοειδείς στήλες** είναι από οξείδιο του πυριτίου (SiO_2) και είναι καλυμμένες με πολυϊμίδιο για τη στήριξη και την προστασία τους από την ατμοσφαιρική υγρασία. Έχουν συνήθως εσωτερική διάμετρο 0.1 έως 0.53 mm και μήκος 15 έως 100 m. Ο αριθμός των θεωρητικών πλακών, N, μιας στήλης είναι ανάλογος με το μήκος της. Οι ανοικτές σωληνοειδείς στήλες έχουν υψηλότερη διαχωριστική ικανότητα, μικρότερους χρόνους ανάλυσης και μεγαλύτερη ευαισθησία από τις πληρωμένες, αλλά έχουν μικρή χωρητικότητα δείγματος (Harris, 2010).

4) Ανιχνευτής. Ο σκοπός ενός ανιχνευτή είναι να δίνει μία απόκριση, η οποία να είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση ενός δείγματος και αυτή η απόκριση να έχει τη μορφή ενός σήματος, το οποίο να μπορεί να μετρηθεί. Τα κύρια χαρακτηριστικά της λειτουργίας των ανιχνευτών βασίζονται στην ευαισθησία, στη γραμμικότητα και στην εκλεκτικότητα. Υπάρχουν διάφορα είδη ανιχνευτών όπως ο ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας (Flame Ionization Detector, FID), ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας (Thermal Conductivity Detector, TCD) και ανιχνευτής δέσμευσης ηλεκτρονίων (Electron Capture Detector, ECD).Ο πιο ευρέως διαδεδομένος είναι το φασματόμετρο μάζας (Mass Spectrometer).

5) Καταγραφικό σύστημα. Το σήμα μεταβιβάζεται από τον ανιχνευτή στο καταγραφικό σύστημα που στη συνέχεια παράγεται το χρωματογράφημα, δηλαδή η έγγραφη αναφορά της ανάλυσης.

Συνοπτικά, ένας αέριος χρωματογράφος λειτουργεί ως ακολούθως: το αδρανές φέρον αέριο ρέει αδιάκοπα διαμέσου του σημείου εισαγωγής, της στήλης και του ανιχνευτή. Ο ρυθμός ροής του φέροντος αερίου ελέγχεται προσεκτικά για να επιβεβαιωθούν οι χρόνοι κατακράτησης και να ελαχιστοποιηθεί η μεταβολή σήματος και ο θόρυβος. Το δείγμα εκχύνεται στο θερμαινόμενο

σημείο εισαγωγής όπου εξατμίζεται και μεταφέρεται μέσα στη στήλη. Το δείγμα κατανέμεται μεταξύ της κινητής και στατικής φάσης και διαχωρίζεται σε μεμονωμένα συστατικά (McNair & Miller, 1998). Μετά τη στήλη, το φέρον αέριο και το δείγμα περνά διαμέσου ενός ανιχνευτή. Το όργανο μετρά την ποσότητα του δείγματος, παράγει ένα ηλεκτρικό σήμα, το οποίο μεταβιβάζεται στο καταγραφικό σύστημα. Στην Εικ. 4.4 παρουσιάζεται η σχηματική απεικόνιση των τμημάτων του αέριου χρωματογράφου (McNair & Miller, 1998).



Εικόνα 4.4: Σχηματική απεικόνιση της οργανολογίας του Αέριου Χρωματογράφου https://www.skz.de/en/research/technicalfacilities/pruefverfahren1/spektroskopie1/4870.Gas-Chromatography-coupled-with-Mass-Spectrometry-GCMS.html

4.3 Αέρια Χρωματογραφία- Φασματομετρία Μάζας

Η ανάγκη για ακρίβεια στις μετρήσεις και για προσδιορισμό των χημικών ουσιών σε χαμηλά επίπεδα (ppm, ppb, ppt) ώθησε τους ερευνητές προς αναζήτηση νέων τεχνικών με συνδυασμό δυο ή και περισσότερων επιμέρους οργάνων. Ο σχεδιασμός ενός συστήματος που συνδέει δυο όργανα που λειτουργούν σε ακραίες συνθήκες πίεσης θεωρείται μια καινοτόμα τεχνική. Το MS αποτελεί τον ανιχνευτή στην αέρια χρωματογραφία και ο αέριος χρωματογράφος είναι το σύστημα κατεργασίας-εισαγωγής του δείγματος για το φασματογράφο μαζών. Η σύζευξη της Αέριας Χρωματογραφίας με τη Φασματομετρία Μάζας (Gas Chromatography-Mass Spectromete, GC-MS) αξιοποιεί τα πλεονεκτήματα των δυο μεμονωμένων τεχνικών και αυτό έχει ως αποτέλεσμα ένα πολύ ισχυρό συνδυασμό με μεγάλη αποτελεσματικότητα.

Το πιο σημαντικό μειονέκτημα του MS είναι η καθαρότητα του δείγματος. Ακόμη και ελάχιστες ποσότητες προσμίξεων ή παράγωγα της ένωσης μπορούν να δώσουν πολλές ανεξήγητες φασματικές γραμμές που δυσκολεύουν την ερμηνεία του φάσματος. Περνώντας όμως το δείγμα μέσα από τη στήλη διαχωρισμού ενός αέριου χρωματογράφου, τότε παραλαμβάνεται σε τελείως καθαρή κατάσταση. Οι ποσότητες που εξέρχονται μετά τη χρωματογράφηση είναι στην αέρια φάση και σε ιδανικές συνθήκες για να περάσουν στο θάλαμο ιοντισμού του MS, αφού προηγουμένως απομακρυνθεί το φέρον αέριο (συνήθως He). Η απομάκρυνση του φέροντος αερίου γίνεται με φίλτρα (από συντηγμένο γυαλί) ή με μεμβράνες, ενώ η πιο συνηθισμένη μέθοδος είναι με την επίδραση του κενού (Βαλαβανίδης, 2006). Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου GC-MS απαριθμούνται παρακάτω:

- Εφαρμογή ενός ολικού ανιχνευτή
- Μεγάλη ευαισθησία της συζευγμένης τεχνικής
- Μεγάλη εκλεκτικότητα της μεθόδου
- Δυνατότητα ταυτοποίησης αγνώστων ενώσεων σε άγνωστα δείγματα

Η σύζευξη αυτή θεωρείται η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη συζευγμένη αναλυτική τεχνική για τον ποιοτικό και ποσοτικό χαρακτηρισμό επιδερμικών υδρογονανθράκων (Yee & Chung, 2015).

5. Μελετώντας τη Βιολογική Δραστικότητα των CHC

Η ολοκλήρωση του ποιοτικού και του ποσοτικού προσδιορισμού των επιδερμικών υδρογονανθράκων ενός εντόμου σηματοδοτεί την έναρξη των βιοδοκιμών[7] με σκοπό τη μελέτη της πιθανής βιολογικής δραστικότητας κάποιας ουσίας. Η ικανότητα αντίληψης των χημικών ερεθισμάτων, είτε από κάποια απόσταση (όσφρηση) από το έντομο είτε διά της επαφής (αφή), είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση των εντόμων. Πολλά είδη εντόμων, όπως της οικογένειας Drosophilidae, βασίζονται στις αισθήσεις της όσφρησης και της αφής για την εκδήλωση συμπεριφορών, όπως για παράδειγμα η ωοτοκία, η γονιμοποίηση και η θρέψη.

Η κατανόηση της διαδικασίας μέσω της οποίας τα έντομα αντιλαμβάνονται τα χημικά ερεθίσματα αποτελεί αντικείμενο μελέτης για αρκετούς λόγους. Αρχικά, για έντομα-μοντέλα, όπως το *D. melanogaster*, η ερμηνεία του τρόπου συμπεριφοράς τους, οδηγεί στην κατανόηση της γενετικής και της νευρικής βάσης των αισθήσεων του εντόμου (Kim & Carlson, 2002). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αξιοποίηση, την εφαρμογή και τη συσχέτιση της γνώσης αυτής για άλλους οργανισμούς, ακόμα και για τον ανθρώπινο. Ερευνητές κατάφεραν να συσχετίσουν τη συμπεριφορά του *D. melanogaster* σε κατάσταση ύπνου με εκείνη του ανθρώπου διαπιστώνοντας εντυπωσιακές ομοιότητες (Ho & Sehgal, 2005). Επιπλέον, η μελέτη της συμπεριφοράς του *D. melanogaster* έχει συνεισφέρει σημαντικά στη μελέτη του μεταβολισμού της χοληστερόλης στον άνθρωπο (Niwa & Niwa, 2011).

Για πολλά είδη της οικογένειας Drosophilidae η οικολογική σημασία των οσμών και των γεύσεων υποδεικνύει τον πολυμορφισμό στη συμπεριφορά τους, συσχετίζοντάς την με την εξελικτική τους ικανότητα (Coyne et al. 1994). Η δυνατότητα ποσοτικοποίησης της συμπεριφοράς των εντόμων υπό εργαστηριακές συνθήκες, σε συνδυασμό με τη δυνατότητα ελέγχου του εκάστοτε ερεθίσματος που προκαλεί την αντίδραση, δίνει την απάντηση στο ερώτημα ποιος μηχανισμός του εντόμου είναι υπεύθυνος και γιατί (Carlon, 1994). Οι ερευνητές, λοιπόν, δημιούργησαν πειραματικές διατάξεις με σκοπό τη μελέτη της συμπεριφοράς των εντόμων σε χημικά ερεθίσματα. Παρακάτω αναλύονται διάφορα είδη πειραματικών διατάξεων και οι παράγοντες που επηρεάζουν την εξεταζόμενη συμπεριφορά.

[7] Βιοδοκιμή ονομάζεται η πειραματική διαδικασία κατά την οποία ένας ζωντανός οργανισμός χρησιμοποιείται ως ‘αντικείμενο’ υπό εξέταση

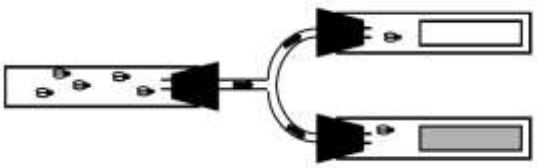
5.1 Βιοδοκιμές Συμπεριφοράς

Ανάλογα με το είδος της συμπεριφοράς του εντόμου, οι βιοδοκιμές χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη περιλαμβάνει πειραματικές διατάξεις, κατά τις οποίες τα έντομα κάνουν μια επιλογή, βιοδοκιμές επιλογής (choice assays) ενώ η δεύτερη περιλαμβάνει πειραματικές διατάξεις, όπου τα έντομα αντιδρούν σε ένα ερέθισμα, βιοδοκιμές απόκρισης (response assays).

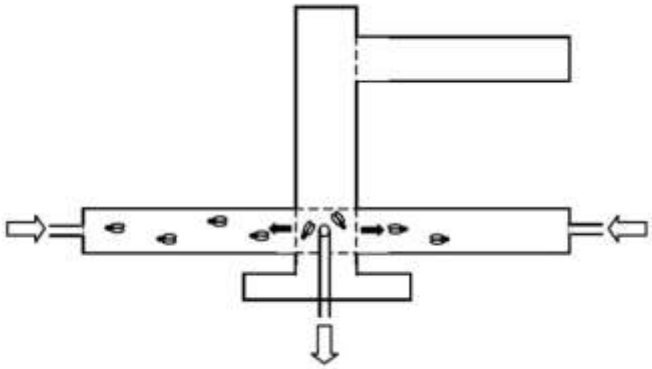
5.1.1 Βιοδοκιμές Επιλογής (Choice Assays)

Η προσέλκυση και η απομάκρυνση του εντόμου είναι συμπεριφορές, οι οποίες ποσοτικοποιούνται μέσα από μία πειραματική διάταξη κατά την οποία το έντομο καλείται να επιλέξει το χημικό ερέθισμα ή το ερέθισμα ελέγχου (control) (Taminura et al. 1982). Με τις *βιοδοκιμές επιλογής* προσδιορίζεται όχι μόνο το είδος της απόκρισης (προσέλκυση ή απομάκρυνση) που προκαλεί το χημικό ερέθισμα στο έντομο, αλλά και το πόσο θετική ή αρνητική είναι αυτή η απόκριση. Όπως έχει αναφερθεί και στην Ενότητα 2, ανάλογα με την πτητικότητα των ουσιών, τα έντομα αντιλαμβάνονται τα χημικά ερεθίσματα με διαφορετικές αισθήσεις. Τα έντομα ανιχνεύουν τις περισσότερο πτητικές ουσίες με την αίσθηση της όσφρησης ενώ τις λιγότερο πτητικές με την αίσθηση της αφής. Ανάλογα λοιπόν, με την αίσθηση που χρησιμοποιούν τα έντομα υπάρχει και η αντίστοιχη πειραματική διάταξη.

Όσφρηση: Οι αποκρίσεις των εντόμων που προκαλούνται από την αίσθηση της όσφρησης αξιολογούνται σε ειδικές διατάξεις σχήματος *Y-maze* και *T-maze*. Στη *Y-maze,* τα έντομα τοποθετούνται στην αρχή της διάταξης και καλούνται να επιλέξουν έναν από τους δύο βραχίονες. Ο ένας περιέχει το οσφρητικό ερέθισμα και ο άλλος το control (Εικ. 5.1). Αντίθετα, στην διάταξη *T-maze,* τα έντομα τοποθετούνται απευθείας στο σημείο επιλογής και καλούνται να επιλέξουν (Εικ. 5.2).



Εικόνα 5.1: Πειραματική διάταξη Y-maze. Τα έντομα τοποθετούνται στον αριστερό βραχίονα και καλούνται να επιλέξουν έναν εκ των δύο άλλων, οι οποίοι περιέχουν διηθητικό χαρτί εμποτισμένο είτε με την εξεταζόμενη ουσία είτε με το control (Martin et al. 2001)



Εικόνα 5.2: Πειραματική διάταξη T-maze. Τα έντομα τοποθετούνται στο κεντρικό του βραχίονα και καλούνται να επιλέξουν έναν από τους δύο βραχίωνες. Τα βέλη υποδεικνύον τη ροή αέρα (Helfand & Carlson, 1989)

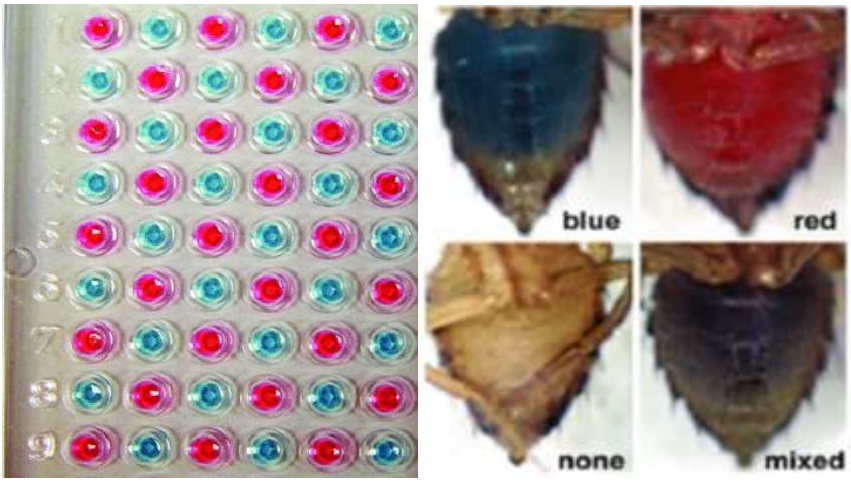
Στις παραπάνω διατάξεις αρκετοί είναι οι ερευνητές οι οποίοι εφαρμόζουν στο σύστημα ρυθμιζόμενη ροή αέρα με σκοπό την ελεγχόμενη διοχέτευση του χημικού ερεθίσματος στα έντομα. Παρόλα αυτά, πειραματικές διατάξεις, στις οποίες γίνεται ένας απλός εμποτισμός διηθητικού χαρτιού με το διάλυμα της ουσίας, έδειξαν εξίσου ικανοποιητική απόκριση (Devaud, 2002).

Όταν τα έντομα εξετάζονται σε ομάδες, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως δείκτης (Index) ο οποίος υπολογίζεται από τη σχέση 5.1 (Alcorta & Rubio, 1989).

$$\Delta\acute{\epsilon}\iota\kappa\tau\eta\varsigma = \frac{\boldsymbol{N}\ \epsilon\nu\tau\acute{o}\mu\omega\nu\ \pi o\upsilon\ \epsilon\pi\acute{\epsilon}\lambda\epsilon\xi\alpha\nu\ \tau o\ \epsilon\rho\acute{\epsilon}\theta\iota\sigma\mu\alpha - \boldsymbol{N}\ \epsilon\nu\tau\acute{o}\mu\omega\nu\ \pi o\upsilon\ \epsilon\pi\acute{\epsilon}\lambda\epsilon\xi\alpha\nu\ \tau o\ control}{\boldsymbol{N}\ \epsilon\nu\tau\acute{o}\mu\omega\nu\ \pi o\upsilon\ \epsilon\pi\acute{\epsilon}\lambda\epsilon\xi\alpha\nu\ \tau o\ \epsilon\rho\acute{\epsilon}\theta\iota\sigma\mu\alpha + \boldsymbol{N}\ \epsilon\nu\tau\acute{o}\mu\omega\nu\ \pi o\upsilon\ \epsilon\pi\acute{\epsilon}\lambda\epsilon\xi\alpha\nu\ \tau o\ control} \qquad \textbf{(Σχ. 5.1)}$$

Αντίθετα, όταν τα έντομα εξετάζονται ατομικά, το αποτέλεσμα υπολογίζεται από την συχνότητα της επιλογής του εντόμου (Alcorta & Rubio, 1989).

<u>Αφή:</u> Οι αποκρίσεις των εντόμων που προκαλούνται από την αίσθηση της αφής αξιολογούνται με ειδικά τεστ τα λεγόμενα feeding test (δοκιμές θρέψης), όπου τα έντομα καλούνται να επιλέξουν το είδος της τροφής τους. Διάλυμα της εξεταζόμενης ουσίας προστίθεται σε χρωματισμένο υπόστρωμα τροφής. Οι δυο πηγές τροφής (ουσία και control) τοποθετούνται σε multiwell plates, τα έντομα τρέφονται και στη συνέχεια χρωματίζεται η κοιλιακή τους χώρα με το αντίστοιχο χρώμα της τροφικής επιλογή τους (Εικ. 5.3) (Tanimura et al. 1982, Goild et al. 2008).

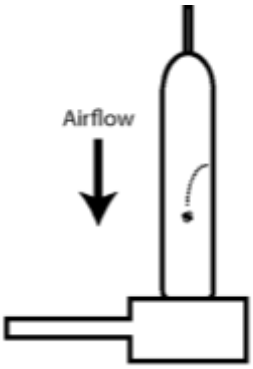


Εικόνα 5.3: Η πειραματική διάταξη της δοκιμής θρέψης. Τα έντομα καλούνται να επιλέξουν είδος τροφής (αριστερά) και ο χρωματισμός της κοιλιακής τους χώρας ανάλογα με την επιλογή τους (Goild et al. 2008)

5.1.2 Βιοδοκιμές Απόκρισης (Response Assays)

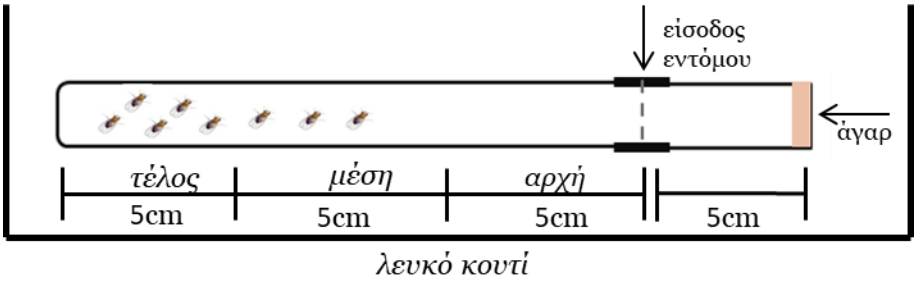
Οι βιοδοκιμές απόκρισης αναφέρονται σε πειραματικές διατάξεις κατά τις οποίες το έντομο αποκρίνεται στιγμιαία στο χημικό ερέθισμα. Αντίστοιχα όπως και στις βιοδοκιμές επιλογής, ανάλογα με την αίσθηση που χρησιμοποιούν τα έντομα υπάρχει και η αντίστοιχη πειραματική διάταξη.

Όσφρηση: Η μελέτη των οσφρητικών ερεθισμάτων στις βιοδοκιμές απόκρισης πραγματοποιείται με πειραματική διάταξη κατά την οποία το έντομο αναπηδάει στο εκάστοτε ερέθισμα (chemosensory jump) (Εικ. 5.4). Το έντομο τοποθετείται σε ανεστραμμένο δοκιμαστικό σωλήνα. Ρυθμιζόμενη ροή αέρα καθώς και η οσμή εισέρχονται από την κορυφή του σωλήνα και στα πρώτα 3 s το έντομο ανταποκρίνεται στιγμιαία με μια αναπήδηση (Christopher & de Belle, 2014). Η συγκεκριμένη πειραματική διάταξη μειονεκτεί ως προς τις υπόλοιπες βιοδοκιμές, εξαιτίας της μη ακριβούς ερμηνείας της συμπεριφοράς του εντόμου.



Εικόνα 5.4: Πειραματική διάταξη chemosensory jump assay (Christopher & de Belle, 2014)

Μια επιπλέον πειραματική διάταξη (οριζόντιος προσανατολισμός) η οποία ποσοτικοποιεί την απόκριση ενός συνόλου εντόμων απεικονίζεται στην Εικ. 5.5. Αρχικά, τα έντομα τοποθετούνται σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα, ο οποίος είναι χωρισμένος ισομερώς σε τρία μέρη (αρχή, μέση, τέλος). Έπειτα, προσαρμόζεται σε αυτόν, φιαλίδιο (vial) το οποίο περιέχει τροφικό υπόστρωμα και την προς εξέταση ουσία και καλύπτεται με πλέγμα για να αποφευχθεί η είσοδος των εντόμων στο φιαλίδιο. Στη συνέχεια ο δοκιμαστικός σωλήνας αναποδογυρίζεται και μελετάται η απόκριση των εντόμων (ελκυστική ή απωθητική) καταμετρώντας τον αριθμό των εντόμων ανά ένα λεπτό, στο κάθε τμήμα του σωλήνα (Vang et al. 2012).



Εικόνα 5.5: Οριζόντια πειραματική διάταξη για την ποσοτικοποίηση της απόκρισης των εντόμων (ελκυστική ή απωθητική)

<u>Αφή</u>: Η βιοδοκιμή απόκρισης της προβοσκίδας του εντόμου (Proboscis Extension Reflex, PER assay) μελετάει ερεθίσματα τα οποία γίνονται αντιληπτά με την αίσθηση της αφής. Το έντομο ακινητοποιείται σε ένα σημείο, στη συνέχεια μόλις τα πόδια του έρθουν σε επαφή με ελκυστικό διάλυμα όπως για παράδειγμα διάλυμα φρουκτόζης, το έντομο αντιδρά αντανακλαστικά επεκτείνοντας την προβοσκίδα του (Εικ. 5.6) (Amrein, 2016).

Εικόνα 5.6: Βιοδοκιμή proboscis extension reflex (Amrein, 2016)

5.2 Παράγοντες που Επηρεάζουν την Απόκριση των Εντόμων

Το μεγαλύτερο πρόβλημα που αντιμετωπίζουν οι ερευνητές κατά τη μελέτη της συμπεριφοράς των εντόμων είναι το πόσο γρήγορα μπορεί να μεταβάλλεται η απόκριση-συμπεριφορά των εντόμων. Ανεξάρτητα από το είδος της βιοδοκιμής, το τελικό αποτέλεσμα μπορεί να επηρεαστεί σε μεγάλο βαθμό από πολλούς παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί διακρίνονται σε ενδογενείς και σε εξωγενείς. Οι ενδογενείς αναφέρονται στα φυσιολογικά χαρακτηριστικά του εντόμου, ενώ οι εξωγενείς στα περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά. Ωστόσο, σε κάθε περίπτωση βιοδοκιμής, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τόσο οι προφανείς περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως είναι το φώς, η θερμοκρασία και η σχετική υγρασία, όσο και οι λιγότερο προφανείς (ενδογενείς παράγοντες), όπως είναι η αλληλεπίδραση του φύλου, η ηλικία, η ατροφία, ο τρόπος αναισθητοποίησης και ο κιρκάδιος ρυθμός.

5.2.1 Αλληλεπίδραση Φύλου

Στις βιοδοκιμές κατά τις οποίες μελετάται ταυτόχρονα η συμπεριφορά των δύο φύλων, παίζει σημαντικό ρόλο η μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Για παράδειγμα, όταν σε μια πειραματική διάταξη τοποθετούνται για μελέτη και τα δύο φύλα, υπάρχουν πολλές πιθανότητες η προσέλκυση των εντόμων να μη γίνεται εξαιτίας της ουσίας που εξετάζεται, αλλά εξαιτίας των σεξουαλικών φερομονών που εκλύουν τα θηλυκά και κατ’ επέκταση προσελκύουν τα αρσενικά. Παρόλα αυτά, όταν πραγματοποιήθηκαν βιοδοκιμές με ένα σύνολο εντόμων του ίδιου φύλου έδωσαν τα ίδια αποτελέσματα με τις βιοδοκιμές που μελέτησαν ταυτόχρονα και τα δύο φύλα (Acebes & Ferrús, 2001, Devaud et al, 2001. 2003b). Εξαιτίας των πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ αρσενικού και θηλυκού, η ερμηνεία των βιοδοκιμών είναι ένα δύσκολο εγχείρημα. Οι περισσότερες βιοδοκιμές πραγματοποιούνται σε ομάδες εντόμων με ξεχωριστό φύλο και οι

ερευνητές προτιμούν να μελετούν κατά κύριο λόγο τα θηλυκά, μιας και τα αρσενικά ανταποκρίνονται λιγότερο (Vaysse & Medioni, 1973).

5.2.2 Ατροφία

Η ατροφία είναι ένα παράγοντας που επηρεάζει το τελικό αποτέλεσμα των βιοδοκιμών και ιδιαίτερα εκείνες που μελετούν χημικά ερεθίσματα τα οποία γίνονται αντιληπτά με την αίσθηση της αφής (Ayyub et al. 1990). Η σημασία της ατροφίας επισημαίνεται για πρώτη φορά από τον Fuyama (1976), ο οποίος παρατήρησε ότι έντομα τα οποία είχαν υποβληθεί σε <20 ώρες ατροφίας δεν έκαναν καμία επιλογή στη Y-maze διάταξη. Η μειωμένη αυτή κινητικότητα οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι τα έντομα δεν νιώθουν το αίσθημα της πείνας συνεπώς δεν υπάρχει κάποιο κίνητρο για αναζήτηση τροφής.

5.2.3 Ηλικία

Η ηλικία είναι ένας επίσης καθοριστικός παράγοντας για την αξιολόγηση των βιοδοκιμών. Η απόκριση του εντόμου στα χημικά ερεθίσματα αρχίζει και λήγει σε ορισμένη ηλικία του ενήλικου εντόμου, χαρακτηριστική για κάθε είδος. Οι περισσότερες βιβλιογραφικές αναφορές για έντομα της οικογένειας Drosophilidae αναφέρουν ότι η ηλικία η οποία κατά κύριο λόγο χρησιμοποιείται στις βιοδοκιμές είναι μικρότερη από 1 εβδομάδας. Ηλεκτροαντενογραφικές μελέτες έδειξαν ότι η απόκριση της κεραίας του εντόμου σε χημικά ερεθίσματα μειώνεται ραγδαία σε σχέση με την ηλικία του (Ayer & Carlson, 1992, Devaud, 2003). Αντίθετα, η περιφερειακή ευαισθησία των νευρώνων του εντόμου βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα σε ηλικία 1 ημέρας (Ayer & Carlson, 1992). Έχει διαπιστωθεί ότι τα έντομα ανταποκρίνονται περισσότερο σε κάποιο χημικό ερέθισμα σε ηλικία 4 ημερών παρά σε 1 ημέρα (Corbet, 1999b). Ωστόσο, σημαντικό ρόλο παίζει και το είδος του χημικού ερεθίσματος για το πώς αποκρίνονται τα έντομα διαφορετικής ηλικίας (Devaud et al. 2003a).

5.2.4 Αναισθητοποίηση

Στις περισσότερες βιβλιογραφικές αναφορές αποφεύγεται η αναισθητοποίηση των εντόμων. Η αναισθητοποίηση είναι μία διαδικασία η οποία εφαρμόζεται για την ευκολότερη διαχείριση των εντόμων. Κατά την εφαρμογή της, επηρεάζεται η νευρική δραστηριότητα του εντόμου και επομένως η απόκρισή του σε ένα επικείμενο χημικό ερέθισμα (Ayer & Carlson, 1992, Devaud,

2003). Η αναισθητοποίηση επιτυγχάνεται είτε με τη χρήση πάγου είτε με τη χρήση CO_2. Η χρήση πάγου είναι πιο ήπια μέθοδος καθώς η ανάρρωση των νευρώνων της κεραίας του εντόμου γίνεται γρηγορότερα σε σύγκριση με τη χρήση CO_2 (Barron et al. 2008). Οι περισσότεροι ερευνητές για τη διαχείριση των εντόμων χρησιμοποιούν μία συσκευή αναρρόφησης και η τοποθέτηση των εντόμων στις πειραματικές διατάξεις γίνεται μέσω μίας μικρής οπής (Fuyama, 1976, Devaud et al. 2001, Martin et al. 2001).

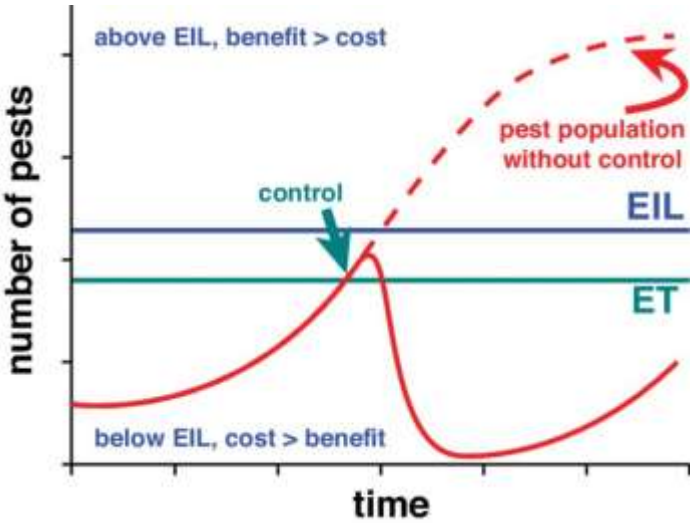
5.2.5 Κιρκάδιος Ρυθμός[8]

Η κινητικότητα πολλών έμβιων οργανισμών, όπως και των εντόμων της οικογένειας Drosophilidae, επηρεάζεται από τον κιρκάδιο ρυθμό. Έχει αποδειχθεί ότι η οσφρητική ευαισθησία των νευρώνων του εντόμου παρουσιάζει μια περιοδική μεταβολή (Krishnan et al. 1999). Οι πειραματικές επαναλήψεις θα πρέπει να πραγματοποιούνται συγκεκριμένη ώρα της ημέρας. Για τα έντομα της οικογένειας Drosophilidae, έχει παρατηρηθεί ότι η ένταση των συμπεριφορών, όπως εκείνων της κινητικότητας, της επιθετικότητας, της γονιμοποίησης και της θρέψης μεταβάλλονται περιοδικά στη διάρκεια του 24ώρου (Tinette et al. 2004, Kurtovic et al. 2007, Wang et al. 2008). Για παράδειγμα, μελέτες στο *D. suzukii* έδειξαν ότι η γονιμοποίηση των ακμαίων του πραγματοποιείται τρεις ώρες μετά την έναρξη της φωτοπεριόδου (Revadi et al. 2015).

[8] Κιρκάδιος Ρυθμός είναι μια οποιαδήποτε βιολογική διαδικασία που παρουσιάζει ενδογενή περιοδική μεταβολή στη διάρκεια ενός 24ώρου.

6. Μέθοδοι Ελέγχου-Καταπολέμησης

Ο άνθρωπος, από τα πρώτα στάδια ανάπτυξης της γεωργίας, ενδιαφέρθηκε για τον έλεγχο των επιβλαβών ειδών, όπως είναι το *D. suzukii*. Με την πάροδο των χρόνων, κατέστη εμφανές ότι είναι αδύνατο αυτά να εξαλειφθούν παντελώς. Ο καλύτερος, λοιπόν, τρόπος αντιμετώπισής τους είναι να ελέγχεται ο πληθυσμός τους. Ο έλεγχος δύναται να ελαττώσει τα επιβλαβή είδη, σε ένα επίπεδο κάτω από το οποίο αυτά δεν θα μπορούν να προκαλέσουν οικονομική ζημιά (Εικ. 6.1). Είναι το σημείο στο οποίο το κόστος του ελέγχου είναι μικρότερο από, ή στην καλύτερη περίπτωση, ίσο με την καθαρή αύξηση σε αξία που προκύπτει από έναν τέτοιο έλεγχο. Παρακάτω αναλύονται οι μέθοδοι ελέγχου καταπολέμησης, τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά τους.



Εικόνα 6.1: Η συσχέτιση του πληθυσμού ενός επιβλαβούς οργανισμού στην πάροδο του χρόνου και ο υπολογισμός του ορίου επιζημιότητας (Economic Threshold-ET) και του πληθυσμού οικονομικής ζημίας (Economic Injury Level-EIL)(Barbercheck & Zaborski, 2015). Το κατώφλι της οικονομικής ζημίας υποδεικνύει το χρόνο λήψης μέτρων ελέγχου. Όταν το μέσο επίπεδο του πληθυσμού ξεπερνάει το κατώφλι, πρέπει να λαμβάνονται ισχυρά προληπτικά μέτρα ώστε ο πληθυσμός να μειωθεί κάτω από το επίπεδο της οικονομικής ζημίας

6.1 Χημικός Έλεγχος

Τα μεγαλύτερα χημικά «όπλα», εμφανίστηκαν μετά το 2^{ο} Παγκόσμιο Πόλεμο, με την ανάπτυξη των οργανικών εντομοκτόνων. Η αρχική ώθηση για την ανάπτυξή τους προήλθε από την επιθυμία της καταπολέμησης των φορέων των λοιμογόνων παραγόντων των ασθενειών του

ανθρώπου, ιδιαίτερα στις τροπικές περιοχές. Η αρχική επιτυχία των εντομοκτόνων αυτών, ενθάρρυνε την ταχύτατη χρήση τους στη γεωργία, για χάριν της οποίας η χημική βιομηχανία προετοίμασε περισσότερα από 500.000 εντομοκτόνα προϊόντα. Σε ποικίλλοντες βαθμούς τοξικότητας και διάρκεια δράσης, τα οργανικά χημικά είναι, είτε συνθετικής, είτε βοτανικής προέλευσης. Ομάδες συνθετικών εντομοκτόνων αποτελούν οι χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες, τα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμιδικά.

Η ευκολία στην εφαρμογή, η αποτελεσματικότητα των μικρών δόσεων και το χαμηλό κόστος τους αποτελούν τα βασικά πλεονεκτήματά τους (Goodhue et al. 2011, De Ros et al. 2013, Mazzi et al. 2017). Αντίθετα, τα μειονεκτήματα που προκύπτουν από την εφαρμογή των χημικών μέσων ποικίλουν, γι' αυτό η χρήση τους θα πρέπει να πραγματοποιείται με σύνεση, ώστε να περιορίζονται στο ελάχιστο δυνατόν (Aktar et al. 2009). Βασικό μειονέκτημα πρωτίστως είναι ο κίνδυνος για την υγεία του ανθρώπου που το εφαρμόζει (Forget, 1993). Επίσης, η υπολειμματική δράση του εντομοκτόνου εγκυμονεί μεγάλους κινδύνους, γιατί συνήθως δεν τηρούνται οι ημέρες μεταξύ τελευταίου ψεκασμού και συγκομιδής (Kole et al. 2001, Andreu & Pico, 2004). Επιπλέον, η λανθασμένη χρήση τους δύναται να βλάψει ωφέλιμα ζώα όπως θηλαστικά, πουλιά, ψάρια, μέλισσες και ωφέλιμα εντομοφάγα αρθρόποδα (Martineau et al. 1987, Barron et al. 1995). Ένα εξίσου σημαντικό μειονέκτημα είναι η ανθεκτικότητα των εντόμων στα εντομοκτόνα (Hawkins et al. 2018). Καταπολεμώντας έναν πληθυσμό εντόμων, χρησιμοποιείται η κατάλληλη γι' αυτόν θανατηφόρο δόση εντομοκτόνου (Tzanakakis, 1995). Η δόση αυτή σκοτώνει το μεγαλύτερο ποσοστό του πληθυσμού αλλά επιζούν ορισμένα ανθεκτικά άτομα. Αφού η ανθεκτικότητα είναι κληρονομήσιμη, το ποσοστό των ανθεκτικών ατόμων στη θυγατρική γενεά θα είναι μεγαλύτερο από ότι στη μητρική (Tzanakakis, 1995). Συνεχίζοντας την καταπολέμηση του πληθυσμού με το ίδιο εντομοκτόνο και την ίδια δόση, συνεχίζεται να αυξάνεται η συχνότητα των ανθεκτικών γονιδίων στον πληθυσμό, ώσπου το πλείστο του πληθυσμού να αποτελείται μόνο από ανθεκτικά στο εντομοκτόνο άτομα (Tzanakakis, 1995).

Τα τελευταία χρόνια, για να αποφευχθούν οι ποικίλες αρνητικές επιπτώσεις της χρήσης των χημικών μέσων έχει αναπτυχθεί μία ολιστική προσέγγιση για τον τρόπο παρακολούθησης και αντιμετώπισης των επιβλαβών οργανισμών περισσότερο φιλική για το περιβάλλον και τον άνθρωπο (Cloonan et al. 2018), η ολοκληρωμένη διαχείριση επιβλαβών οργανισμών. Η μελέτη

και η αποσαφήνιση της χημικής οικολογίας και κατ' επέκταση του φερομονικού προφίλ ενός επιβλαβούς οργανισμού παρέχει άμεσες εφαρμογές στον τομέα της γεωργίας.

6.2 Ολοκληρωμένη Διαχείριση Επιβλαβών Οργανισμών

Η ολοκληρωμένη διαχείριση επιβλαβών οργανισμών (Integrated Pest Management, IPM) περιλαμβάνει ένα συνδυασμό μεθόδων με στόχο τη διατήρηση του πληθυσμού των εντόμων σε χαμηλό επίπεδο, έτσι ώστε να προστατεύεται η γεωργική παραγωγή. Ο αντικειμενικός σκοπός της ολοκληρωμένης διαχείρισης των επιβλαβών ειδών είναι να αντιμετωπίσει το επιβλαβές είδος, όχι όταν ο πληθυσμός του έχει αυξηθεί κατά πολύ, αλλά σε εκείνο το χρονικό σημείο που το μέγεθος του πληθυσμού είναι περισσότερο εύκολο να ελεγχθεί.

Ένας επιτυχημένος ολοκληρωμένος χειρισμός ελέγχου των επιβλαβών ειδών απαιτεί την καλή γνώση της οικολογίας του πληθυσμού κάθε επιβλαβούς είδους, των σχετιζόμενων με αυτό ειδών και των ξενιστών ειδών. Περιλαμβάνει επίσης, δουλειά πεδίου όπου απαιτείται η διαπίστωση της παρουσίας ενός είδους εντόμου και η παρακολούθηση (monitoring) του επιπέδου του πληθυσμού του με σκοπό την καταπολέμησή του με τη μαζική παγίδευση (mass-trapping). Ταυτόχρονα, ο προσδιορισμός των σημειοχημικών ουσιών ενός ζημιογόνου εντόμου, σε συνδυασμό με τη μελέτη της βιολογική τους δράσης θα οδηγήσει στην καλύτερη διαχείρισή του με μέτρα τα οποία δύναται να περιλαμβάνουν ένα ελάχιστο χημικό ψεκασμό σε κατάλληλες χρονικές στιγμές (Witzgall et al. 2008). Στην παρούσα διατριβή επικεντρωνόμαστε στις σημειοχημικές ουσίες. Οι βασικές στρατηγικές που εφαρμόζονται είναι οι παρακάτω:

6.2.1 Παρακολούθηση (Monitoring)

Με τη μέθοδο της παγίδευσης δύναται να διαπιστωθούν νέες μικρές αποικίες εντόμων. Επιπλέον, επιτυγχάνεται η παρακολούθηση (monitoring) της διακύμανσης του ήδη υπάρχοντος πληθυσμού ενός εντόμου και καθορίζεται ο χρόνος επέμβασης με χημικό ή άλλο μέσο καταπολέμησης. Υπάρχουν διάφορα είδη παγίδων τα οποία διαφοροποιούνται ως προς τον τρόπο προσέλκυσης των εντόμων (κολλητικές ή δολωματικές παγίδες) (Εικ. 6.2) και ως προς τα χαρακτηριστικά τους (χρώμα, σχήμα και μέγεθος). Οι πιο γνωστές δολωματικές παγίδες είναι οι παγίδες McPhail, οι οποίες χρησιμοποιούνται ως επί των πλείστον για συλλήψεις ενηλίκων Διπτέρων Tephritidae, όπως του δάκου της ελιάς (*Bactrocera olea*) και της μύγας της

Μεσογείου (*Ceratitis capitata*). Στις μέρες μας πραγματοποιούνται σημαντικές προσπάθειες με σκοπό την βελτίωση των δολωματικών παγίδων παρακολούθησης του πληθυσμού του *D. suzukii* (Cloonan et al. 2018). Οι περισσότερες μελέτες επικεντρώνονται σε δυο βασικά μειονεκτήματα που αντιμετωπίζουν οι δολωματικές παγίδες, τη μικρή αποτελεσματικότητά τους ως προς το έντομο-στόχος και τη χαμηλή συσχέτισή τους με τις προσβολές στα φρούτα.

Εικόνα 6.2: Κίτρινη κολλητική παγίδα (αριστερά), πλαστική δολωματική παγίδα (κέντρο), γυάλινη παγίδα τύπου McPhail (δεξιά) http://ext100.wsu.edu/skagit/agriculture/swd/

Τα περισσότερα εμπορικά διαθέσιμα δολώματα για το *D. suzukii* βασίζονται σε προϊόντα ζύμωσης, τα οποία χαρακτηρίζονται από μικρή εκλεκτικότητα, μιας και προσελκύουν μεγάλους αριθμούς εντόμων διαφορετικών οικογενειών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πιθανή μείωση του πληθυσμού των ωφέλιμων εντόμων. Σε μία πρόσφατη μελέτη πεδίου, όταν εφαρμόστηκαν δολωματικές παγίδες για την παρακολούθηση του πληθυσμού του *D. suzukii* καταγράφηκαν συλλήψεις ωφέλιμων εντόμων με ποσοστό που κυμαινόταν από 28.7 έως 41.3% (Lee et al. 2013).

Ένα επιπλέον μειονέκτημα είναι ότι με τη χρήση των ήδη υπάρχοντων εμπορικά διαθέσιμων δολωμάτων για το *D. suzukii* δεν δύναται να προβλεφθεί με ακρίβεια η επικείμενη ωοτοκία του θηλυκού, συνεπώς και η επικείμενη προσβολή στα φρούτα (Cloonan et al. 2018). Παρόλα αυτά, σε καλλιέργειες μπλε μύρτιλου (blueberry) στη βόρειο Αμερική, όπου οι χαμηλές θερμοκρασίες μπορούν να μειώσουν σημαντικά τον πληθυσμό του εντόμου, χρησιμοποιήθηκε εμπορικό σκεύασμα το οποίο κατάφερε να προσελκύσει και να παγιδεύσει ενήλικα 1 έως και 5 εβδομάδες νωρίτερα από την ωοτοκία (Cha et al. 2018a). Αντίθετα, όταν το ίδιο σκεύασμα εφαρμόστηκε σε

καλλιέργεια raspberry σε νότια Αμερική, δεν έφερε το ίδιο αποτέλεσμα (Cha et al. 2018a). Συμπεραίνεται ότι, η αποτελεσματικότητα ενός δολώματος διαφοροποιείται και από τη γεωγραφική θέση της καλλιέργειας και από το είδος της (Cha et al. 2018a). Η εφαρμογή των φερομονών για την αύξηση της εκλεκτικότητας των δολωματικών παγίδων είναι ένας τρόπος για την αύξηση της αποτελεσματικότητάς τους.

6.2.2 Αντιμετώπιση (Management)

Η αντιμετώπιση ενός επιβλαβούς οργανισμού κατά την Ολοκληρωμένη Διαχείριση Επιβλαβών Οργανισμών μπορεί να επιτευχθεί με τεχνικές όπως η παρεμπόδιση ζευγαρώματος (mating disruption), η μαζική παγίδευση, η παγίδευση τύπου "*attract & kill*" και η παγίδευση "*push & pull*".

Παρεμπόδιση ζευγαρώματος (Mating Disruption): Η παρεμπόδιση ζευγαρώματος (mating disruption) θεωρείται μία από τις πιο καινοτόμες τεχνικές αντιμετώπισης ενός επιβλαβούς οργανισμού. Έχει διαπιστωθεί ότι η συγκέντρωση-ουδός μιας ελκυστικής φερομόνης για την πρόκληση ορισμένης αντίδρασης του εντόμου είναι μεγαλύτερη μετά από έκθεση του εντόμου στη φερομόνη αυτή. Τα αισθητήρια όργανα και τα νευρικά κέντρα προσαρμόζονται, με αποτέλεσμα το έντομο να γίνεται λιγότερο ευαίσθητο στη φερομόνη για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην απελευθέρωση συνθετικών φερομονών, με σκοπό την παρέμβαση και εν συνεχεία τη μείωση της χημικής επικοινωνίας του εντόμου, η οποία είναι απαραίτητη για την εύρεση συντρόφου. Με τη φερομόνη ομοιόμορφα κατανεμημένη στον αέρα στη συγκέντρωση-ουδό, το αρσενικό παύει να ανταποκρίνεται, λόγω προσαρμογής των αισθητήριων οργάνων (Shorey et al. 1967). Μία άλλη ερμηνεία είναι ότι όταν η φερομόνη βρίσκεται σε αφθονία στον αέρα, το φύλο-δέκτης παθαίνει 'σύγχυση' και δεν μπορεί να ανιχνεύσει την πηγή της φυσικής φερομόνης. Η αποτελεσματικότητα της τεχνικής αυτής εξαρτάται από τις μελέτες συμπεριφοράς σε εργαστηριακή κλίμακα και αργότερα από τις μελέτες πεδίου με σκοπό τη βελτιστοποίηση παραμέτρων όπως το ακριβές χρονικό διάστημα και τον ρυθμό της χημικής απελευθέρωσης, τη σύσταση του χημικού μείγματος και τη συγκέντρωσή του.

Μαζική παγίδευση (mass trapping): Η μαζική παγίδευση (mass trapping) θεωρείται εργαλείο αντιμετώπισης ενός επιβλαβούς οργανισμού το οποίο δύναται να χρησιμοποιηθεί και

ως άμεσο μέσο καταπολέμησης. Σε αυτή την περίπτωση όμως, απαιτείται η εφαρμογή μεγαλύτερου αριθμού παγίδων ανά στρέμμα. Οι παγίδες ανάλογα με το είδος του δολώματος (τροφικές ή φερομονικές) προσελκύουν τα έντομα σε μια επιφάνεια που είτε είναι εμποτισμένη με εντομοκτόνο είτε φέρει επίχρισμα κολλητικής ουσίας.

Σε μία πρόσφατη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε μεγάλος αριθμός παγίδων, οι οποίες περιείχαν τροφικό ελκυστικό, σε καλλιέργεια μπλε μύρτιλου με σκοπό να μελετηθεί η βιωσιμότητα της μαζικής παγίδευσης ως εργαλείο αντιμετώπισης του πληθυσμού του *D. suzukii,* (Hampton et al. 2014). Διαπιστώθηκε ότι τα μύρτιλα τα οποία φύονταν γύρω από τις παγίδες είχαν περισσότερες προσβολές από το *D. suzukii* σε σύγκριση με αυτά που φύονταν σε μεγαλύτερη απόσταση από αυτές (Hampton et al. 2014). Η αύξηση των προσβολών προκλήθηκε εξαιτίας της μειωμένης ικανότητας συγκράτησης του πληθυσμού του εντόμου στο εσωτερικό της παγίδας και της μη βέλτιστης αποτελεσματικότητας του τροφικού ελκυστικού. Μόνο ένα μικρό ποσοστό πληθυσμού της τάξεως του 10-30% κατέληξε στο εσωτερικό της και το υπόλοιπο 70% παρέμεινε στα περίχωρα με αποτέλεσμα την ωοτοκία στα μύρτιλα (Hampton et al. 2014). Οι ερευνητές οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι οι διαθέσιμες τεχνολογίες παγίδευσης με χαμηλό επίπεδο προσέλκυσης και κατ' επέκταση συγκράτησης δεν είναι κατάλληλες για τη μείωση των προσβολών από το *D. suzukii* (Cloonan et al. 2018).

Attract & Kill (Προσέλκυση και Θανάτωση): Η μέθοδος '*attract & kill'* είναι παρόμοια με την μαζική παγίδευση χωρίς όμως να βασίζεται στη συγκράτηση των εντόμων στο εσωτερικό της παγίδας (Gregg et al. 2018). Οι παγίδες '*attract & kill'* είναι κατασκευασμένες ως ένας φάκελος, συνήθως από πολυαιθυλένιο, εμποτισμένος με εντομοκτόνο επαφής. Η προσέλκυση των εντόμων επιτυγχάνεται είτε με υδατικό διάλυμα ελκυστικής τροφής τοποθετημένο στο εσωτερικό του φακέλου, είτε με τη χρήση φερομόνης τοποθετημένη σε ειδική αμπούλα στο εξωτερικό του φακέλου. Στη συνέχεια, το έντομο έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια της παγίδας, απορροφά μικρή ποσότητα δραστικής ουσίας και προκαλείται η θανάτωσή του μερικά λεπτά αργότερα (Gregg et al. 2018). Έχει αποδειχθεί ότι η μέθοδος '*attract & kill'* έχει καλύτερα αποτελέσματα στην προστασία μιας καλλιέργειας συγκριτικά με την μέθοδο της μαζικής παγίδευσης (El-Sayed et al. 2009).

Push & Pull (Απώθηση και Προσέλκυση): Μία άλλη πιθανή μέθοδος αντιμετώπισης ενός επιβλαβούς οργανισμού είναι η μέθοδος *'push & pull'*, κατά την οποία ένα απωθητικό

απομακρύνει το έντομο από την καλλιέργεια στόχο (push), ενώ την ίδια στιγμή ένα ελκυστικό προσελκύει το έντομο σε διαφορετική καλλιέργεια (pull) όπου και παγιδεύεται (Cook et al. 2017). Το σύστημα '*push & pull'* έχει εφαρμοσθεί με επιτυχία για την αντιμετώπιση διαφόρων επιζήμιων εντόμων, όπως για παράδειγμα του σκαθαριού, *Phyllotreta cruciferae*, επιζήμιο έντομο για την καλλιέργεια του μπρόκολου (Parket et al. 2016). Πρόσφατες έρευνες πραγματοποιήθηκαν με σκοπό τη μελέτη της αποτελεσματικότητας της μεθόδου '*push & pull'* για την αντιμετώπιση του *D. suzukii* (Wallingfood et al. 2017). Αρχικά, σε πειράματα εργαστηριακής κλίμακας ελέγχθησαν χωριστά η μέθοδος push και χωριστά η μέθοδος pull. Για το στάδιο push, όταν ελέγχθηκε η ουσία 1-οκτεν-3-όλη (1-octen-3-ol) ως απωθητικό είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της ωοτοκίας στα σμέουρα σε ποσοστό 66.2% , ενώ για το στάδιο pull όταν εφαρμόσθηκαν προϊόντα ζύμωσης ως τροφικό ελκυστικό είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της ωοτοκίας σε ποσοστό 69.6%. Όταν οι δύο αυτές τεχνικές εφαρμόστηκαν μαζί η μείωση της ωοτοκίας έφθασε σε ποσοστό 87.6% (Wallingfood et al. 2018).

Συμπεραίνεται λοιπόν, ότι η χρησιμότητα των φερομονών είναι μεγάλη σε βασικές και κατευθυνόμενες έρευνες επιβίωσης, διασποράς, μετανάστευσης και συμπεριφοράς των επιβλαβών εντόμων, συνεισφέροντας στη γνώση του τρόπου ζωής και συνεπώς σε μια ολοκληρωμένη διαχείρισή τους (Witzgall et al. 2010).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Το επιβλαβές έντομο *D. suzukii* αποτελεί μέγιστο οικολογικό, περιβαλλοντικό και οικονομικό κίνδυνο τόσο σε εγχώριο όσο και σε παγκόσμιο επίπεδο. Η αναζήτηση εναλλακτικών στρατηγικών διαχείρισης, οι οποίες θα επικεντρώνονται στη χημική επικοινωνία των εντόμων έχει γίνει πλέον επιτακτική ανάγκη καθώς οι ήδη υπάρχουσες τεχνικές αντιμετώπισής του βασίζονται κατά κύριο λόγο στη χρήση χημικών εντομοκτόνων. Η επικοινωνία των εντόμων εξαρτάται από τις σημειοχημικές ουσίες, οι οποίες είναι ενώσεις, παράγονται από τα έντομα και επηρεάζουν τη συμπεριφορά τους. Η σεξουαλική, η επιθετική και η κοινωνική συμπεριφορά των εντόμων είναι θεμελιώδους σημασίας για τη σύζευξη και την αναπαραγωγική τους διαδικασία, ενώ είναι απαραίτητες οι χημικές αναλύσεις σε συνδυασμό με μελέτες συμπεριφοράς για την αποκρυπτογράφηση της επικοινωνίας του *D. suzukii*. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάλυση και η μελέτη των φερομονών που μελλοντικά δύναται να χρησιμοποιηθούν σε μεθόδους Ολοκληρωμένης Φυτοπροστασίας. Η προσέγγιση του σκοπού αυτού γίνεται μέσω της επίτευξης των παρακάτων επιμέρους στόχων.

- Βελτιστοποίηση της μεθόδου ανάλυσης των επιδερμικών υδρογονανθράκων του *D. suzukii*
- Μελέτη της επίδρασης του χρόνου εκχύλισης στους επιδερμικούς υδρογονάθρακες του *D. suzukii*
- Μελέτη της επίδρασης των παραγόντων του φύλου και της ηλικίας στο φερομονικό προφίλ του εντόμου
- Μελέτη της επιθετικής συμπεριφοράς του *D. suzukii* και μελέτη της επίδρασης περιβαλλοντικών (ηλικία, φύλο και φωτοπερίοδος) και οι κοινωνικών παραγόντων (κοινωνικοποιημένα και μη έντομα) σε αυτήν
- Μελέτη της βιολογικής δράσης ουσιών (που θα επιλεγούν με βάση τα αποτελέσματα των προηγούμενων μελετών), στη σεξουαλικότητα, στη σύζευξη, στην ωοτοκία και στη συνάθροιση του *D. suzukii*.

Η παραγόμενη από τη διδακτορική διατριβή γνώση αναμένεται να συμβάλλει στην κατανόηση της οικολογίας και της χημικής επικοινωνίας του *D. suzukii*. Οι πληροφορίες αυτές αποτελούν σημαντικό στόχο της σύγχρονης έρευνας καθώς το έντομο, είναι ένας σχετικά νέο-

εμφανιζόμενος επιζήμιος οργανισμός και αναμένεται να αποτελέσουν τις βάσεις για την εναλλακτική και φιλική προς το περιβάλλον αντιμετώπισή του.

Κεφάλαιο 2

Βελτιστοποίηση Μεθόδου Ανάλυσης Ανάλυσης Επιδερμικών Υδρογονανθράκων του *D. suzukii*

2.1 Εισαγωγή

Όπως έχει αναφερθεί στην εισαγωγή, οι φερομόνες των εντόμων αποτελούνται από διάφορα είδη οργανικών ενώσεων, όπως για παράδειγμα αλκοόλες, λιπαρά οξέα, κετόνες και υδρογονάνθρακες (Gibbs & Crockett, 1998). Οι φερομόνες βρίσκονται είτε στην επιφάνεια του δερμάτιου του εντόμου είτε σε ειδικούς αδένες (Howard & Blomquist, 2005). Η μελέτη του φερομονικού προφίλ ενός εντόμου προϋποθέτει την εκχύλιση του δερμάτιου ή των αδένων και στη συνέχεια τη μελέτη των εκχυλισμάτων χρησιμοποιώντας κάποια αναλυτική τεχνική. Το μεγάλο μειονέκτημα της εκχύλισης είναι ότι συνήθως οι ουσίες με μικρότερη αφθονία επικαλύπτονται από εκείνες με τη μεγαλύτερη αφθονία. (Chin & Yew, 2013).

Τα τελευταία χρόνια, στις βιβλιογραφικές αναφορές έχουν εφαρμοσθεί πλήθος αναλυτικών τεχνικών για την ανάλυση των CHCs. Πιο συγκεκριμένα έχουν χρησιμοποιηθεί εξειδικευμένες μεθοδολογίες, όπως για παράδειγμα η Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR) (Dossey et al. 2006), κατά την οποία απαιτούνται αρκετές εκατοντάδες μικρογραμμάρια εκχυλίσματος, μια προϋπόθεση που μπορεί να αποτελέσει πρόκληση για ουσίες με μικρή αφθονία οι οποίες εκλύονται από το δερμάτιο των εντόμων (Yew & Chung, 2015). Επιπλέον έχουν αναπτυχθεί τεχνικές όπως η Φασματομετρία Μάζας με Ιονισμό Εκρόφησης με Λέιζερ Υποβοηθούμενο από Υλικό Μήτρας (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI Mass Spectrometry) (Cvacka et al. 2006), η Άμεση Ανάλυση σε Πραγματικό Χρόνο (Direct Analysis in Real Time, DART) (Coby et al. 2005) και η Αέρια Χρωματογραφία-Ηλεκτροαντενογραφία (Gas Chromatography-Electroantennography, GC-EAD). Παρ’ όλα αυτά, η Αέρια Χρωματογραφία συζευγμένη με τη Φασματομετρία Μάζας (Gas Chromatography Mass Spectrometry, GC-MS) είναι η αναλυτική μέθοδος, η οποία εφαρμόζεται συχνότερα (Amirav et al. 2008). Είναι ιδιαίτερα χρήσιμη καθώς η μέθοδος αυτή μπορεί να διαχωρίσει γραμμικούς και διακλαδισμένους υδρογονάνθρακες, επίσης μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη θέση του διπλού δεσμού και τη στερεοχημεία μιας ένωσης.

Στην παρούσα διατριβή για την ανάλυση των επιδερμικών υδρογονανθράκων (CHC) του *D. suzukii* εφαρμόστηκε η παρακάτω μεθοδολογία, η οποία περιλαμβάνει τα εξής στάδια: **α)** την εκχύλιση των CHCs του *D. suzukii* και **β)** τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό τους με τη χρήση της Αέριας Χρωματογραφίας-Φασματομετρία Μάζας (Gas Chromatography Mass Spectrometry, GC-MS). Για την επίτευξη του στόχου αυτού είναι απαραίτητη μια ακολουθία πειραμάτων για τη βελτιστοποίηση τόσο της προετοιμασίας του δείγματος, όσο και της επιλογής των κατάλληλων συνθηκών ανάλυσης με σκοπό τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των CHCs του εντόμου.

2.2 Πειραματικό Μέρος

2.2.1 Υλικά

Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υψηλής καθαρότητας κατάλληλοι για GC-MS. Τα γυαλικά οι λαβίδες, οι σπάτουλες οι σύριγγες και γενικά όλα τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν πλένονταν επιμελώς και πριν τη χρήση τους ξεπλενόταν με οργανικού διαλύτες (εξάνιο).

2.2.2 Προετοιμασία Δείγματος

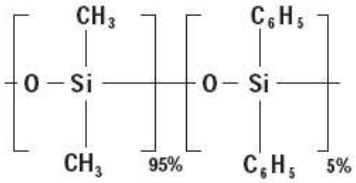
Το πρώτο βήμα για τη μελέτη του CHC προφίλ ενός εντόμου είναι η εκχύλιση των υδρογονανθράκων από το δερμάτιο του. Το *D. suzukii* καλλιεργήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες που αναφέρονται στο Παράρτημα Ι. Ο τρόπος αναισθητοποίησης των εντόμων ποικίλει και δύναται να προκαλέσει στρες στον πληθυσμό τους (Barron, 2000). Επιλέχθηκε η αναισθητοποίηση με πάγο καθώς είναι ο ηπιότερος τρόπος αναισθητοποίησης (Barron, 2000). Για την εκχύλιση των CHCs τοποθετούνται 15 έντομα σε φιαλίδιο και στη συνέχεια προστίθενται 500 μl οργανικού διαλύτη. Η επιλογή του καταλληλότερου διαλύτη γίνεται σύμφωνα με την αρχή: '*οι πολικές ουσίες διαλύονται σε πολικούς διαλύτες και οι μη πολικές σε μη πολικούς διαλύτες'*. Οι υδρογονάνθρακες είναι άπολες ενώσεις συνεπώς επιλέχθηκε το εξάνιο εξαιτίας της πολικότητάς του. Επιπλέον, στις περισσότερες βιβλιογραφικές αναφορές χρησιμοποιείται το εξάνιο ως ο ιδανικότερος άπολος διαλύτης, καθώς άλλοι όπως το χλωροφόρμιο και η μεθανόλη διασπούν το δερμάτιο του εντόμου γρηγορότερα επομένως προτείνεται μικρότερη διάρκεια εκχύλισης, περίπου στα 5 λεπτά και αυτό έχει ως αποτέλεσμα

την μη εκχύλιση όλων των υδρογονανθράκων (Yew & Chin, 2013, Dekker et al. 2015). Στον παρόν κεφάλαιο ο χρόνος εκχύλισης των CHCs του *D. suzukii* ήταν η 1 ώρα (Everaerts et al. 2010). Στη συνέχεια, το εκχύλισμα συλλέγεται, μεταφέρεται σε άλλο φιαλίδιο και προστίθεται δευτεριωμένο δεκαεξάνιο (hexadecane- d_{34}, C16-d_{34}) ως εσωτερικό πρότυπο. Μεταφέρονται 100 μl από το τελικό διάλυμα σε crimp top vial (Thermo Scientific) και αποθηκεύονται στους -20ºC μέχρι την ανάλυσή τους. Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν πειράματα ελέγχου κατά τα οποία προστίθονται εξάνιο σε Eppendorf tubes, με σκοπό να επιβεβαιωθεί η μη ύπαρξη επιμολύνσεων.

2.2.3 Οργανολογία

Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε αέριο χρωματογράφο (Agilent 5973) συζευγμένο με φασματόμετρο μάζας πρόσκρουσης ηλεκτρονίων τετραπολικού φίλτρου, με ενέργεια 70 eV (electron energy, eV) και πεδίο τιμών μάζας 50-550 amu. Πραγματοποιήθηκε έγχυση δείγματος με αυτόματο δειγματολήπτη (Agilent 7683 AutoSampler).

Για όλες τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε ήλιο (He, καθαρότητας 99,999%) ως φέρον αέριο με πίεση 55 kPa και σταθερή ροής της τάξης του 1 mL/min. Πριν τη στήλη χρησιμοποιήθηκε προστατευτική στήλη (προστήλη) με σκοπό τη συσσώρευση των μη πτητικών ουσιών οι οποίες αν δεν απομακρυνθούν μπορούν να επιμολύνουν τη χρωματογραφική στήλη καθώς και να μειώσουν την αποδοτικότητά της. Όταν παρατηρούνταν χρωματογραφήματα με ασυνήθιστες κορυφές κοβόταν ένα μέρος της προστήλης. Ο διαχωρισμός των αναλυτών πραγματοποιήθηκε με τριχοειδή στήλη DB-5MS (Agilent) με τα εξής χαρακτηριστικά:



- Μήκος στήλης (L): 30 m
- Εσωτερική διάμετρος (ID): 0.25 mm
- Πάχος στατικής φάσης (Film Thickness): 0.25 μm
- Στατική φάση: phenyl arylene polymer (5% phenyl-methylpolysiloxane)

2.2.4 Βαθμονόμηση Οργάνου για το Φασματόμετρο Μάζας

Η βαθμονόμηση του MS περιλαμβάνει ρύθμιση του οργάνου σε τρεις διαφορετικές μάζες 69, 219 και 502. Ο έλεγχος λάμβανε χώρα προτού αναλυθούν τα δείγματα, καθώς και μετά από οποιαδήποτε επέμβαση του χρήστη στο όργανο όπως για παράδειγμα αντικατάσταση φιάλης του

αερίου He, αλλαγή νήματος ρηνίου (filament), καθαρισμός πηγής ιονισμού, κόψιμο προστήλης. Το όργανο λειτουργούσε ομαλά όταν οι ισοτοπικές μάζες ήταν κατά 1 amu μεγαλύτερες από τις μάζες των m/z 69, 219, 502 και οι αντίστοιχοι ισοτοπικοί λόγοι είχαν τιμές κοντά στις τιμές 1.08% για την m/z 69, 4.32% για την m/z 219 και 10.09% για την m/z 502. Ο έλεγχος σήματος υποβάθρου και εντοπισμός των *gost peaks* που δίνουν κορυφές στα χρωματογραφήματα πραγματοποιήθηκε με ένεση αέρα.

2.2.5 Εκπλύσεις Μικροσύριγγας Δειγμάτων

Η μικροσύριγγα των δειγμάτων (Hamilton microliter syringe, 10 μl) εκπλυνόταν σε διαλύτη εξάνιο (Unisolv). Το φιαλίδιο του εξανίου ήταν τοποθετημένο σε υποδοχή πάνω στον αυτόματο δειγματολήπτη. Οι εκπλύσεις ρυθμίστηκαν μέσω του λογισμικού του GC-MS. Σε κάθε ανάλυση λάμβαναν χώρα τρεις εκπλύσεις πριν τη μεταφορά του δείγματος στο GC και τρεις φορές μετά για να ξεπλυθεί από τα υπολείμματα του δείγματος και να προετοιμαστεί για την επόμενη εισαγωγή δείγματος. Ο όγκος του εξανίου για κάθε έκπλυση ήταν 5 μl. Η μικροσύριγγα εκπλυνόταν με άντληση 1 μl από το προς ανάλυση δείγμα 3 φορές και γινόταν απόχυση των μικροόγκων μέσα στο ίδιο. Κατά την τρίτη άντληση γινόταν η εισαγωγή στον προθερμασμένο εισαγωγέα του GC κατευθυνόμενο προς τη στήλη. Το ελαστικό διάφραγμα (septum) που βρίσκεται πάνω από τον εισαγωγέα, καθώς διαπερνάται από τη μικροσύριγγα μετά τις εισαγωγές, φθείρεται και αντικαθιστάται μετά από 50 εισαγωγές.

2.2.6 Εισαγωγή Δείγματος

Ο όγκος εισαγωγής του δείγματος ήταν 1 μl και παρέμεινε σταθερός. Ο τρόπος εισαγωγής του δείγματος πραγματοποιείται με έγχυση απευθείας στη στήλη (on column). Επιλέχθηκε αυτός ο τρόπος έγχυσης διότι οι ουσίες φθάνουν στη χαμηλότερη δυνατή θερμοκρασία, οπότε λαμβάνει χώρα ελάχιστη απώλεια ουσιών.

2.2.7 Θερμοκρασιακό Πρόγραμμα Στήλης

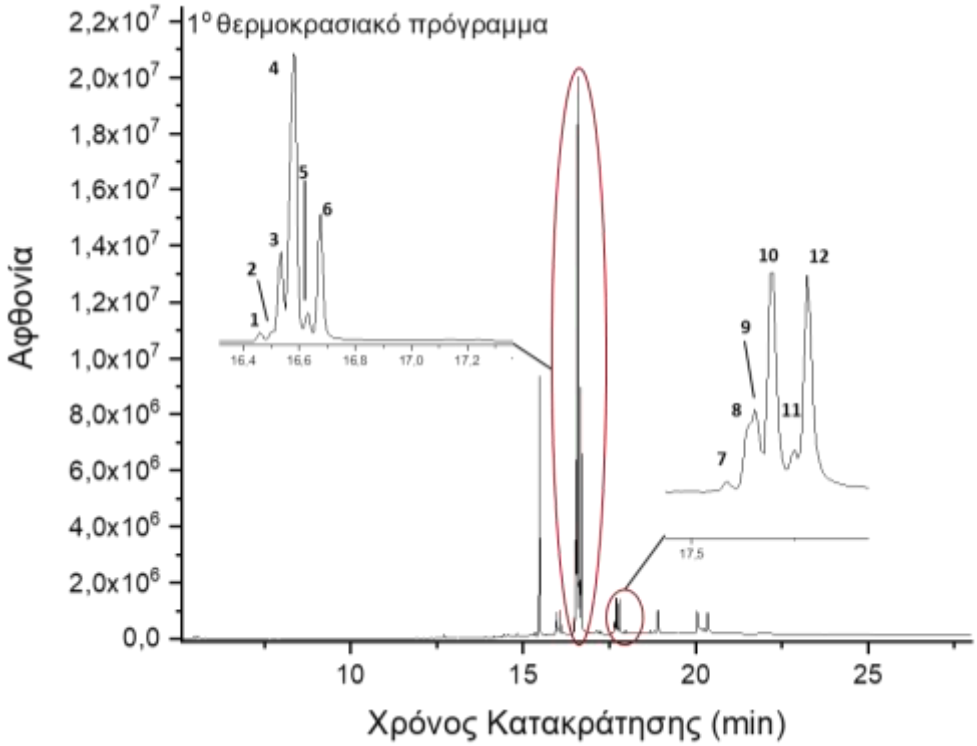
Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά θερμοκρασιακά προγράμματα φούρνου για τη στήλη του GC με σκοπό την επιλογή εκείνου με το οποίο επιτυγχάνεται ο καλύτερος διαχωρισμός των CHCs του εντόμου.

1° Θερμοκρασιακό Πρόγραμμα: Βασιζόμενοι σε βιβλιογραφικές αναφορές (Yew & Chin, 2013, Dekker et al. 2015, Snellings et al. 2018) το πρώτο θερμοκρασιακό πρόγραμμα είχε διάρκεια 28 min και είχε ως εξής:

I. αρχική θερμοκρασία 50°C και παραμονή σε αυτή για 2 min

II. αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό 15°C/min έως τους 290°C και παραμονή σε αυτή για 10 min

Στην Εικ. 2.3 απεικονίζεται το χρωματογράφημα των CHCs του θηλυκού *D. suzukii* με το 1° θερμοκρασιακό πρόγραμμα.



Εικόνα 2.3: Χρωματογράφημα των CHCs του θηλυκού *D. suzukii* με το 1° θερμοκρασιακό πρόγραμμα

Επειδή όπως παρατηρείται για τις κορυφές με Νο 1, 2 και 3, 8 και 9 και 11 και 12 δεν υπήρχε καλός διαχωρισμός, το θερμοκρασιακό πρόγραμμα τροποποιήθηκε όπως φαίνεται παρακάτω.

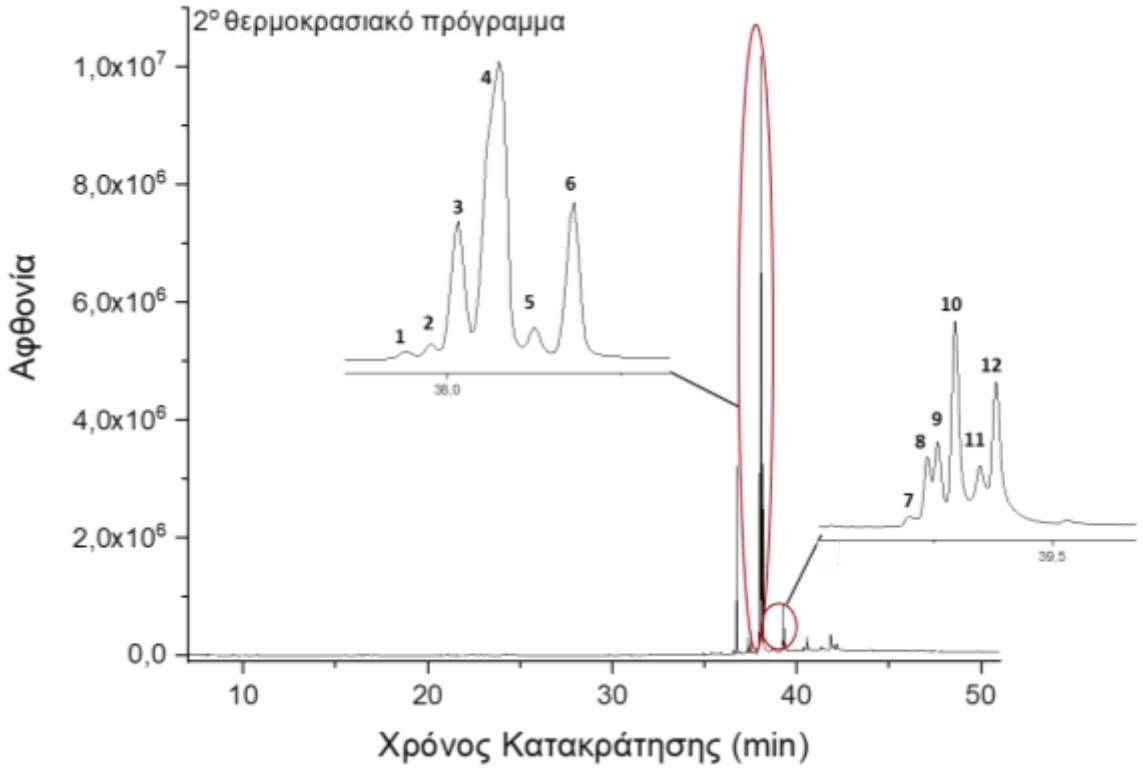
2° Θερμοκρασιακό Πρόγραμμα: Το 2° θερμοκρασιακό πρόγραμμα που δοκιμάστηκε περιγράφεται ακολούθως και είχε συνολική διάρκεια 55.33 min.

I. αρχική θερμοκρασία 50°C

II. αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό 5°C/min έως τους 150°C και παραμονή σε αυτή για 10 min

III. αύξηση μέχρι τους 290°C με ρυθμό 15°C/min και παραμονή σε αυτήν για 16 min

Στην Εικ. 2.4 απεικονίζεται το χρωματογράφημα των CHCs του θηλυκού *D. suzukii* με το 2° θερμοκρασιακό πρόγραμμα.



Εικόνα 2.4: Χρωματογράφημα των CHCs του θηλυκού *D. suzukii* με το 2° θερμοκρασιακό πρόγραμμα

Μελετώντας τα δύο χρωματογραφήματα παρατηρείται ότι οι κορυφές 1, 2 και 3, οι κορυφές 8 και 9 και οι κορυφές 11 και 12 έχουν αυξημένη διαχωριστική ικανότητα στο 2° θερμοκρασιακό πρόγραμμα, γεγονός που επιτρέπει την καλύτερη ποσοτικοποίηση τους και κατά συνέπεια μεγαλύτερη ακρίβεια στον ποσοτικό προσδιορισμό των συγκεκριμένων ουσιών. Για το λόγο αυτό παρά τη μεγαλύτερη διάρκεια του διαχωρισμού επιλέχτηκε το 2ο θερμοκρασικαό πρόγραμμα.

2.2.8 Παρακολούθηση Ιόντων Full Scan και SIM

Η παρακολούθηση των ιόντων πραγματοποιήθηκε είτε την πλήρη σάρωση ιόντων (Full Scan, FS) είτε με την παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος (Single Ion Momitoring-SIM). Η Full Scan τεχνική, χρησιμοποιήθηκε για τον ποιοτικό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των δειγμάτων.

Με τη μέθοδο παρακολούθησης επιλεγμένων ιόντων, επιλέγεται η ανίχνευση ορισμένων ιόντων, τα οποία γνωρίζουμε εκ των προτέρων ότι είναι χαρακτηριστικά των ενώσεων που εξετάζουμε. Η μέθοδος αυτή εξασφαλίζει χαμηλότερα όρια ανίχνευσης καθώς ο χρόνος μέτρησης των ιόντων, που επιλέγονται από το φάσμα μάζας της προ ανάλυσης ένωσης, είναι μεγαλύτερος. Επιπλέον μειώνεται ο χρόνος ανάλυσης αφού παρακολουθούνται λιγότερα ιόντα. Η SIM μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ουσιών μετά τη διαδικασία 'perfuming' (επεξήγηση στα κεφάλαια 4 και 6). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της SIM έχει συνολική διάρκεια 44.67 min και έχει ως εξής:

I. αρχική θερμοκρασία 40°C

II. αύξηση της θερμοκρασίας στους 150°C με ρυθμό 30°C/min

III. αύξηση της θερμοκρασία στους 300°C με ρυθμό 5°C/min και παραμονή για 10 min.

Στον Πίνακα Π.2.1 απεικονίζονται τα ιόντα που επιλέχθηκαν.

Πίνακας 2.1: Χρονικό εύρος παρακολούθησης και μάζες των επιλεγμένων ιόντων που επιλέγονται

Ομάδα	Χρόνος παρακολούθησης	Ιόντα
1	4 έως 8.50 min	71, 156, 170, 184
2	8.50 έως 19.09 min	69, 71, 268, 294
3	19.09 έως 23.0 min	69, 71, 308, 322
4	23.0 έως 25.0 min	69, 71, 336, 338, 350
5	25.0 έως 44.67 min	69,71,366, 406, 434

Τα ιόντα 69 και 71 αντιστοιχούν στη μάζα θραυσμάτων αλκενίων και αλκανίων και τα υπόλοιπα ιόντα αποτελούν τα μοριακά ιόντα των ενώσεων που θέλαμε να αναλύσουμε. Ο χρόνος αναζήτησης και παραμονής για κάθε ιόν (dwell time) προσαρμοζόταν όταν μεταβαλλόταν ο αριθμός των ιόντων με στόχο να παραμένει μικρότερος από 30 msec.

2.2.9 Ποιοτικός και Ποσοτικός Προσδιορισμός

Ο ποιοτικός προσδιορισμός των εκχυλιζόμενων ενώσεων πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση και την ερμηνεία της σχηματομορφής των θραυσμάτων. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε μείγμα πρότυπων ενώσεων (C7 - C40, Sigma Aldrich), το οποίο αναλύθηκε χρησιμοποιώντας το ίδιο θερμοκρασιακό πρόγραμμα με εκείνων των άγνωστων δειγμάτων και οι χρόνοι κατακράτησης συγκρίθηκαν με τα άγνωστα δείγματα. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε η βιβλιοθήκη μοριακών φασμάτων NIST (National Institute of Standards and Technology Library). Τέλος,

χρησιμοποιήθηκε η βιβλιοθήκη φασμάτων υψηλής ομοιότητας (similarity index >90%) συνδεδεμένη με το λογισμικό του οργάνου (MSD ChemStation Data Analysis, Agilent Technologies) και πραγματοποιήθηκε σύγκριση και με ήδη υπάρχουσες βιβλιογραφικές αναφορές (Dekker et al. 2015, Snellings et al. 2018).

Η ποσοτική ανάλυση βασίζεται στο εμβαδόν της χρωματογραφικής κορυφής. Στο εύρος συγκεντρώσεων στο οποίο η απόκριση είναι γραμμική, το εμβαδόν της κορυφής είναι ανάλογο με την ποσότητα του συστατικού. Η ποσοτική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη γνωστής ποσότητας εσωτερικού προτύπου στο άγνωστο δείγμα πριν ακριβώς από την ανάλυση στο σύστημα GC-MS. Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε το C16-d_{34} καθώς η ουσία αυτή δεν ανιχνεύεται στο άγνωστο δείγμα και επειδή ο χρόνος κατακράτησής της είναι διαφορετικός από τις ανιχνευόμενες ουσίες. Η συγκέντρωση της άγνωστης ένωσης x, υπολογίσθηκε από την παρακάτω σχέση (Σχ. 2.1):

$$C_x = \frac{A_x * C_{IS}}{A_{IS} * RRF_x} \qquad \textbf{(Σχ. 2.1)}$$

Όπου: A_X: είναι το εμβαδόν ολοκλήρωσης της κορυφής της ένωσης x
A_{IS}: είναι το εμβαδόν ολοκλήρωσης της κορυφής του εσωτερικού προτύπου στο χρωματογράφημα του αγνώστου δείγματος
C_{IS}: είναι η ποσότητα του εσωτερικού προτύπου
RRF_X: είναι ο παράγοντας σχετικής απόκρισης x (Relative Response Factor)

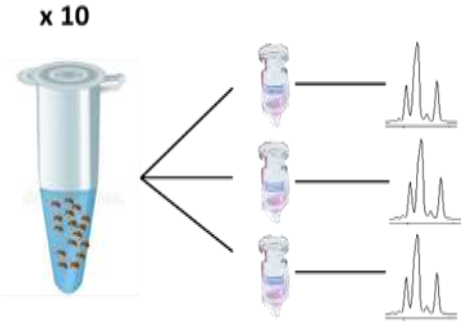
Για τον υπολογισμό του παράγοντα σχετικής απόκρισης παρασκευάσθηκε πρότυπο διάλυμα που περιείχε μείγμα ουσιών από C7 - C40 (Sigma Aldrich) συγκέντρωσης 4.5 ng/μl και hexadecane-d_{34} συγκέντρωσης 4.6 ng/μl. Ο παράγοντας σχετικής απόκρισης υπολογίσθηκε με τη παρακάτω σχέση (Σχ. 2.2).

$$RRF_x = \frac{A_X * C_{IS}}{A_{IS} * C_X} \qquad \textbf{(Σχ. 2.2)}$$

Όπου A_x : είναι το εμβαδόν ολοκλήρωσης της κορυφής της ένωσης x
A_{IS}: είναι το εμβαδόν ολοκλήρωσης του εσωτερικού προτύπου
C_x και C_{IS}: είναι οι ποσότητες της ένωσης x και του εσωτερικού προτύπου αντίστοιχα στο συγκεκριμένο διάλυμα

2.2.10 Πιστότητα Μεθόδου

Η πιστότητα (precision) μιας μεθόδου εκφράζεται με την επαναληψιμότητα (repeatability) ενός αποτελέσματος. Η πιστότητα ένεσης είναι η επαναληψιμότητα που παρατηρείται κατά την επαναλαμβανόμενη εισαγωγή της ίδιας ποσότητας δείγματος σε ένα όργανο. Η επαναληψιμότητα είναι μία από τις πιο σημαντικές παραμέτρους που καθορίζουν την αξιοπιστία μιας μεθόδου. Προκειμένου να διαπιστωθεί η πιστότητα της μεθόδου, πραγματοποιήθηκαν 10 εκχυλίσεις άγνωστων δειγμάτων, όπου η κάθε εκχύλιση μετρήθηκε τρεις φορές (Εικ 2.1).



Εικόνα 2.1: Σχηματική απεικόνιση των επαναλήψεων της πειραματικής διαδικασίας

Για κάθε μέτρηση υπολογίσθηκε η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση και η σχετική τυπική απόκλιση. Η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση (s) και η σχετική τυπική απόκλιση (s_r) υπολογίζεται από τις παρακάτω σχέσεις (Σχ. 2.3, 2.4 και 2.5):

$$x = \frac{\Sigma(xi)}{n} \qquad \textbf{(Σχ. 2.3)}$$

$$s = \sqrt{\Sigma(xi - x)^2/(n-1)} \qquad \textbf{(Σχ. 2.4)}$$

$$Sr = s/x \qquad \textbf{(Σχ. 2.5)}$$

Όπου x: η μέση ευρεθείσα τιμή μιας σειράς μετρήσεων, n: ο αριθμός των μετρήσεων

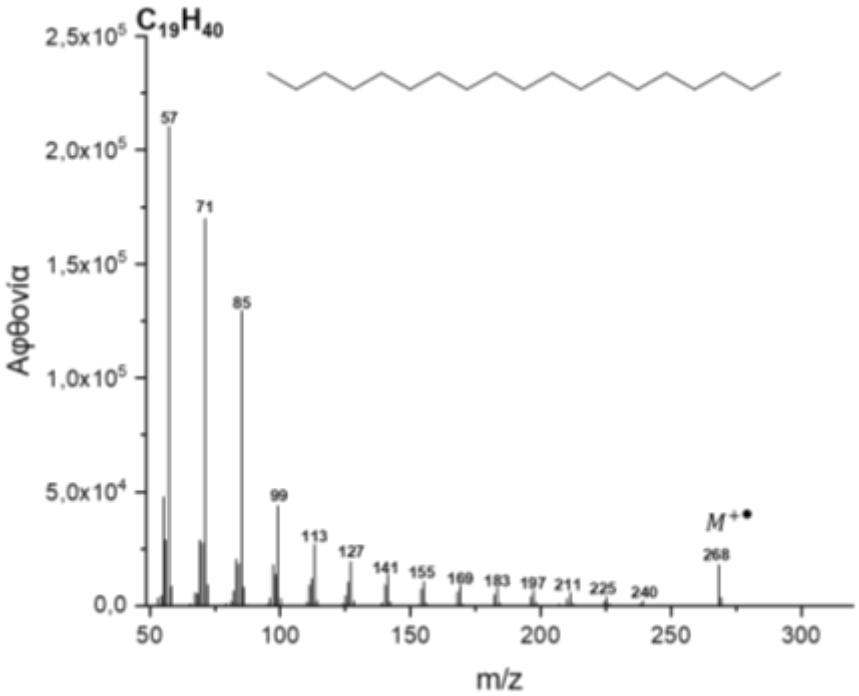
Η επαναληψιμότητα εκφράστηκε ως η σχετική απόκλιση % ή αλλιώς ως συντελεστής μεταβλητότητας (coefficient of variation, CV), που εκφράζεται σε ποσοστό και υπολογίζεται από τη παρακάτω σχέση (Σχ. 2.6):

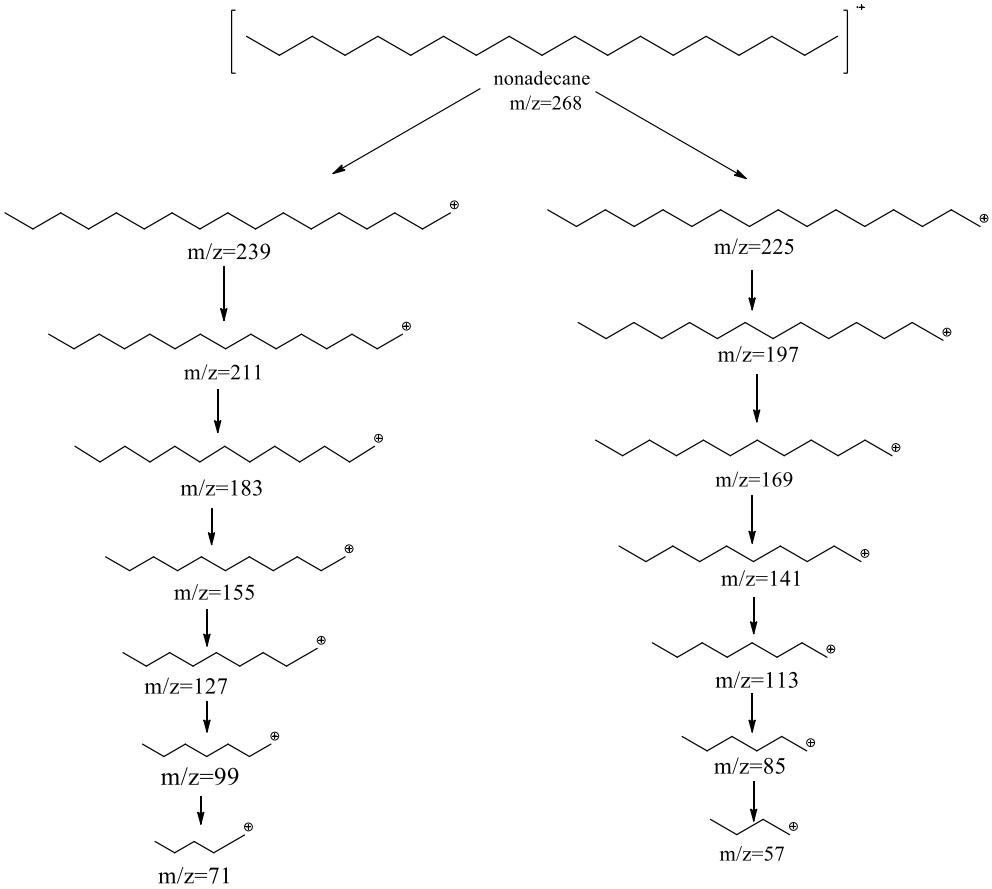
$$RSD\% = CV\% = 100 \times s/x \qquad \textbf{(Σχ. 2.5)}$$

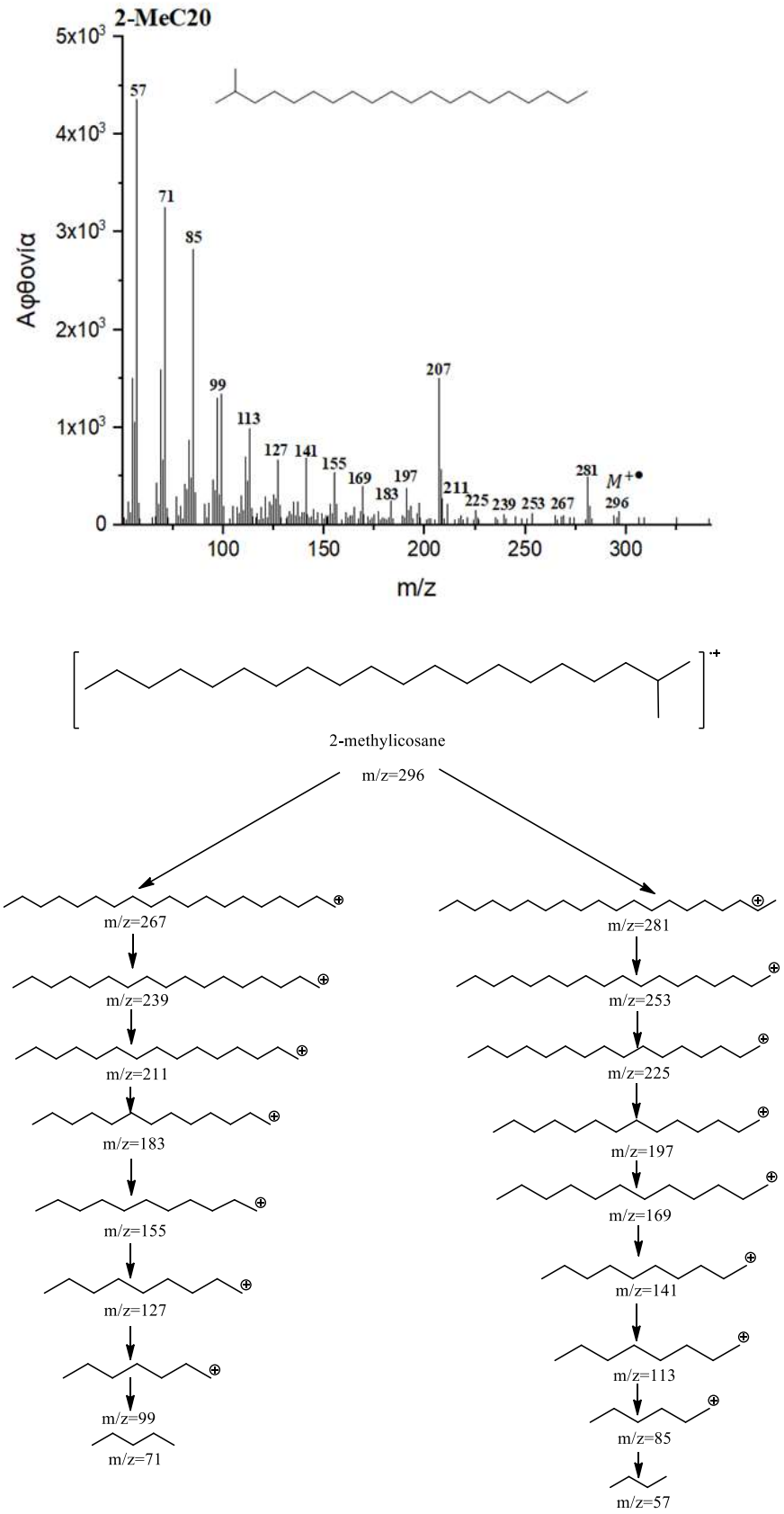
Όσο πιο μικρός είναι ο συντελεστής μεταβλητότητας τόσο πιο επαναλήψιμες είναι οι μετρήσεις συνεπώς έχει μεγαλύτερη πιστότητα η πειραματική διαδικασία.

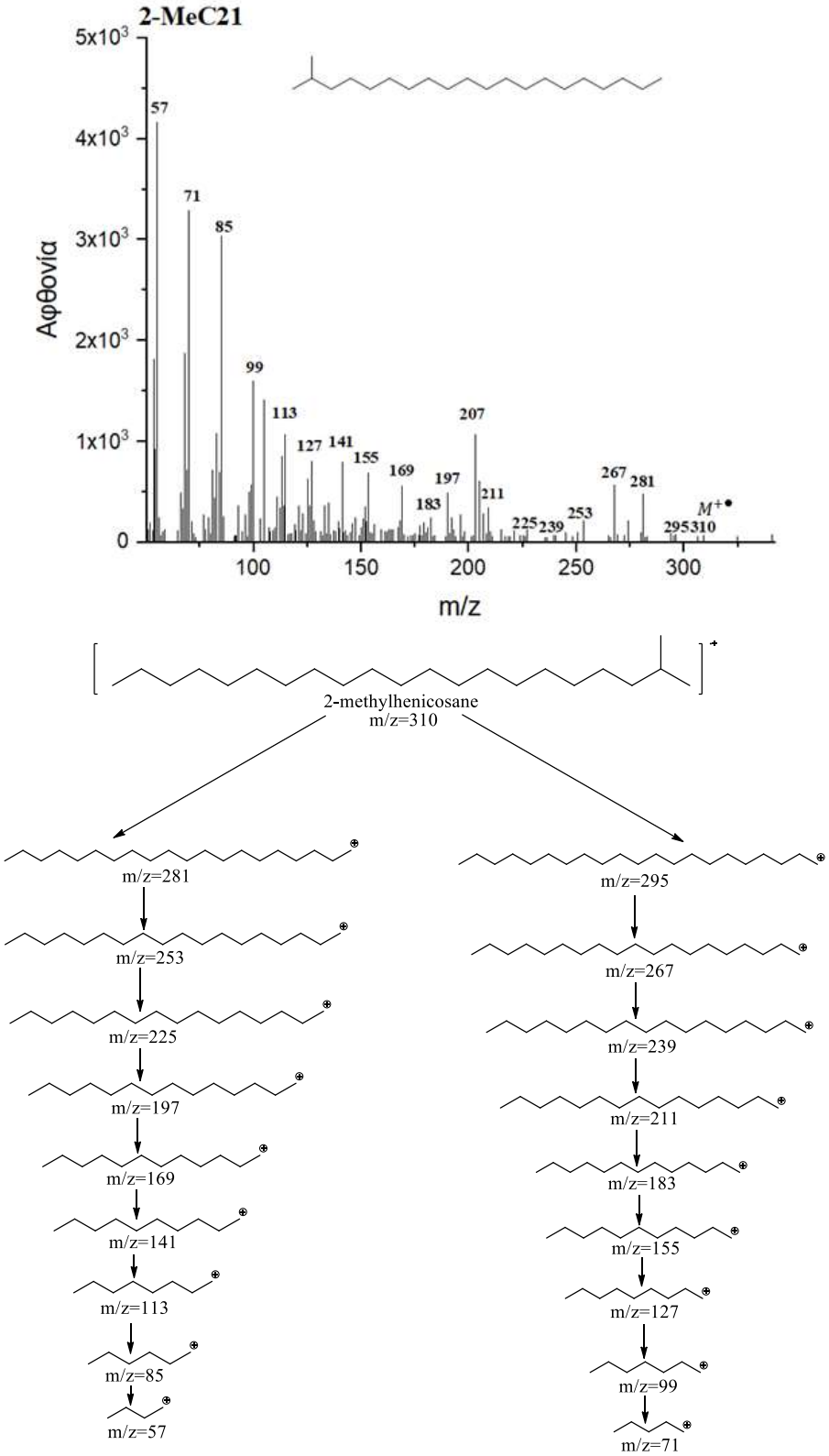
2.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Στον παρόν κεφάλαιο πραγματοποιήθηκε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των CHCs του *D. suzukii*, (για την ανάπτυξη και επιβεβαίωση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν θηλυκά έντομα). Αρχικά επιβεβαιώθηκε η μη ύπαρξη επιμολύνσεων από τη προσθήκη του εξανίου στα Eppendorf tubes. Συνολικά ανιχνεύθηκαν 44 ουσίες, εκ των οποίων οι τέσσερις δεν ταυτοποιήθηκαν. Εφαρμόζοντας διαφορετικό θερμοκρασιακό πρόγραμμα συγκριτικά με ήδη δημοσιευμένες έρευνες (Dekker et al. 2015, Snellings et al. 2018) ταυτοποιήθηκαν τρεις καινούριες ουσίες (Πίνακας 2.1). Οι ουσίες αυτές είναι το δεκαενιάνιο (nonadecane, C19), το 2-μεθυλοεικοσάνιο (2-mehylicosane, 2-MeC20) και το 2-μεθυλοεικοσιενάνιο (2-methylheneicosane, 2-MeC21). Όπως αναφέρεται στο πειραματικό μέρος, η ταυτοποίηση των νέων ουσιών πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση του φάσματος μάζας τους. Συγκεκριμένα ταυτοποιήθηκε η κορυφή του μοριακού ιόντος, συνεπώς προσδιορίστηκε η μοριακή μάζα (Mr) των ουσιών. Επιπλέον ερμηνεύοντας τη σχηματομορφή των θραυσμάτων προσδιορίστηκε η παρουσία ή απουσία λειτουργικής ομάδας. Η οριστική ταυτοποίηση βασίστηκε στη σύγκριση των φασμάτων μάζας των άγνωστων ουσιών με τα φάσματα μάζας των πρότυπων ουσιών C7-C40 (Sigma Aldrich) και με τα φάσματα μάζας από τη βιβλιοθήκη NIST MS. Στην Εικ 2.2 απεικονίζονται τα φάσματα μάζας και ο μηχανισμός θραυσματοποίησης των τριών νέων ουσιών.


C19H40
Αφθονία
m/z
57
71
85
99
113
127
141
155
169
183
197
211
225
240
268
M+•


nonadecane
m/z=268
m/z=239
m/z=211
m/z=183
m/z=155
m/z=127
m/z=99
m/z=71
m/z=225
m/z=197
m/z=169
m/z=141
m/z=113
m/z=85
m/z=57


2-MeC20
Αφθονία
m/z
57
71
85
99
113
127
141
155
169
183
197
207
211
225
239
253
267
281
296
$M^{+\bullet}$
2-methylicosane
m/z=296
m/z=267
m/z=239
m/z=211
m/z=183
m/z=155
m/z=127
m/z=99
m/z=71
m/z=281
m/z=253
m/z=225
m/z=197
m/z=169
m/z=141
m/z=113
m/z=85
m/z=57



Εικόνα 2.2: Φάσματα μάζας και μηχανισμοί θραυσματοποίησης των ουσιών C19, 2-MeC20 και 2-MeC21

Το θραύσμα m/z=207 στα φάσματα μάζας του 2-MeC20 και του 2-MeC21 οφείλεται είτε στο υλικό του πλαστικού διαφράγματος (septum), είτε στο υλικό της στατικής φάσης. Στον έλεγχο σήματος υποβάθρου εντοπίστηκαν οι ίδιες κορυφές.

Το CHC προφίλ του *D. suzukii* αποτελείται από υδρογονάνθρακες που το μήκος τους κυμαίνεται από C19 έως C30. Είναι ένα μείγμα αλκανίων, 2-μεθυλοαλκανίων, αλκενίων και αλκαδιενίων. Χαρακτηριστικό γνώρισμα του CHC προφίλ του εντόμου είναι τα υψηλά επίπεδα αλκενίων, το οποίο έχει παρατηρηθεί και σε άλλα μονομορφικά είδη της οικογένειας Drosophilidae (Gleason et al. 2009). Τα αλκένια του *D. suzukii* είναι μείγμα των 9-, 7- και 5 ισομερών με το 7-ισομερές να βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία. Ειδικότερα, το 7-εικοσιτριένιο (7-tricosene, 7-C23) είναι η ουσία με τη μεγαλύτερη αφθονία στο *D. suzukii*, κοινό γνώρισμα με το *D. virilis* και το *D. simulants* (Jallon, 1984, Jackson & Bartelt, 1985). Επιπλέον, το 2-μεθυλοεικοσιοκτάνιο (2-MeC28) είναι ένα από τα αλκάνια με τη μεγαλύτερη αφθονία στο CHC προφίλ του *D. suzukii*. Αντίστοιχα υψηλά επίπεδα έχουν προσδιοριστεί στο *D. melanogaster* (Jackson et al. 1981) και στο *D. pseudoobscurra* (Blomquist et al. 1985). Συνεπώς, ενισχύεται η θεωρία ότι τα υψηλά επίπεδα των 2-μεθυλοαλκανίων μπορεί να είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα των εντόμων της οικογένειας Drosophilidae (Blomquist et al. 1985).

Στα επόμενα κεφάλαια εφαρμόζεται η μεθοδολογία που βελτιστοποιήθηκε στο παρόν κεφάλαιο με σκοπό τη μελέτη επίδρασης παραγόντων, όπως είναι η ηλικία, το φύλο, ο χρόνος εκχύλισης και η κοινωνικοποίησηση στο CHC προφίλ του *D. suzukii*.

Πίνακας 2.1: Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των CHCs του θηλυκού *D. suzukii*

#	RT	Compound	Abbr.	Mr	ng	sd
1N	34.84	nonadecane	C19	268	4.4	0.5
2	34.92	unidentified 1	UNI1		7.5	0.9
3	35.41	unidentified 2	UNI2		11.0	0.9
4	35.90	eicosane	C20	282	6.6	0.6
5	36.56	9-heneicosene	9-C21:1	294	2.6	0.6
6	36.61	7-heneicosene	7-C21:1	294	22.0	1.6
7	36.66	5-heneicosene	5-C21:1	294	13.7	1.4
8	36.78	heneicosane	C21	296	867.1	57.6
9N	36.92	2-methylicosane	2-MeC20	296	7.1	0.5
10N	37.24	2-methylheneicosane	2-MeC21	310	9.1	0.7
11	37.27	6.9-docosadiene	6,9-C22:2	306	2.6	0.3
12	37.31	9-docosene	9-C22:1	308	14.7	0.6
13	37.36	7-docosene	7-C22:1	308	95.6	6.0
14	37.44	5-docosene	5-C22:1	308	7.3	2.4
15	37.50	docosane	C22	310	39.4	2.6
16	37.93	2-methyldocosane	2-MeC22	324	83.7	5.6
17	37.97	6,9-tricosadiene	6,9-C23:2	320	96.4	6.5
18	38.01	9-tricosene	9-C23:1	322	518.1	36.4
19	38.06	7-tricosene	7-C23:1	322	3297.1	245.1
20	38.12	5-tricosene	5-C23:1	322	206.4	18.4
21	38.17	tricosane	C23	324	995.1	67.68
22	38.38	unidentified 3	UNI3		4.3	2,3
23	38.62	3-methyltricosane	3-MeC23	338	8.4	0.6
24	38.65	9-tetracosene	9-C24:1	336	9.4	1.1
25	38.68	7-tetracosene	7-C24:1	336	33.1	1.7
26	38.72	5-tetracosene	5-C24:1	336	22.1	1.4
27	38.79	tetracosane	C24	338	20.2	1.8
28	39.15	2-methyltetracosane	2-MeC24	352	20.1	1.6
29	39.21	6,9-pentacosadiene	6,9-C25:2	348	40.6	3.7
30	39.22	9-pentacosene	9-C25:1	350	50.9	4.8
31	39.26	7-pentacosene	7-C25:1	350	193.9	14.7
32	39.35	5-pentacosene	5-C25:1	350	19.9	0.5
33	39.36	pentacosane	C25	352	215.9	11.6
34	39.95	hexacosane	C26	366	19.3	4.6
35	40.35	2-methylhexacosane	2-MeC26	380	33.9	2.2
36	40.42	9-heptacosene	9-C27:1	378	10.7	1.3
37	40.50	7-heptacosene	7-C27:1	378	27.2	1.6
38	40.60	heptacosane	C27	380	132.9	7.9
39	41.34	octacosane	C28	394	43.5	3.7
40	41.47	unidentified 4	UNI4		23.9	2.1
41	41.88	2-methyloctacosane	2-MeC28	408	155.1	9.9
42	42.09	7-nonacosene	7-C29:1	406	40.1	3.9
43	42.22	nonacosane	C29	408	98.5	14.6

44	44.00	2-methyltriacontane	2-MeC30	436	13.9	1.6

RT- χρόνο κατακράτησης της ουσίας (retention time) **Abbr.-**συντακτικός τύπος της ουσίας (abbreviation)
M_r – μοριακή μάζα (molecular weight) **N-** ουσία που προσδιορίζεται για πρώτη φορά **sd-** τυπική απόκλιση (standard deviation)

Κεφάλαιο 3

Μελέτη Επίδρασης του Χρόνου Εκχύλισης στους Επιδερμικούς Υδρογονανθράκές του *D. suzukii*

3.1 Εισαγωγή

Όπως έχει αναφερθεί και στα προηγούμενα κεφάλαια, το πρώτο βήμα που απαιτείται για την ανάλυση των CHCs εφαρμόζοντας τη μέθοδο GC-MS είναι η εκχύλισή τους από το δερμάτιο των εντόμων, χρησιμοποιώντας οργανικούς διαλύτες. Η εκχύλιση με διαλύτη είναι μία διαδικασία χημικής ισορροπίας, κατά την οποία οι εκχυλιζόμενες ουσίες εξαρτώνται τόσο από το είδος και την ποσότητα του διαλύτη όσο και από το χρόνο εκχύλισης (Rydberg & Choppin, 2004). Κατά την εκχύλιση τα διαλυτά συστατικά, οι CHCs, απομακρύνονται από το έντομο με την επίδραση του κατάλληλου διαλύτη (Jacqueline & Yew, 2013). Στη συνέχεια μέσα από τον ποιοτικό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των CHCs των εντόμων λαμβάνεται η απαραίτητη πληροφορία, η οποία μπορεί να αποτελέσει τη βάση για το σχεδιασμό και την υλοποίηση των απαραίτητων βιοδοκιμών, με σκοπό τη μελέτη της βιολογικής τους δράσης (Yew & Chung, 2015). Συνεπώς, η εκχύλιση των CHCs διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη μετέπειτα ανάλυσή τους.

Προηγούμενες μελέτες επισημαίνουν ότι ο χρόνος εκχύλισης επηρεάζει την εκχυλιζόμενη ποσότητα των CHCs (Drijfhourt et al. 2010). Για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί ότι η εκχυλιζόμενη ποσότητα του επτακοσανίου (n-heptacosane, C27), ουσία η οποία βρίσκεται σε μεγάλη αφθονία στο δερμάτιο του εντόμου *Solenopsis invicta,* ήταν 0.62 μg μετά από 3 λεπτά, 0.8 μg μετά από 10 λεπτά και έφθασε στα 2.91 μg μετά από 24 ώρες εκχύλισης (Vander et al. 1989).

Στα έντομα της οικογένειας Drosophilidae, οι χρόνοι εκχύλισης των εντόμων κυμαίνονται από 1 λεπτό μέχρι και 24 ώρες, με επικρατέστερο σύμφωνα με τους ερευνητές, χρόνο εκείνο της 1 ώρας (Bartelt & Jackson, 1984, Bartelt et al. 1986, Everaerts et al. 2010, Revadi et al. 2015). Σε ήδη δημοσιευμένες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η επίδραση της φερομόνης cVA στη συμπεριφορά του εντόμου εξαρτάται από την ποσότητα που εφαρμόζεται πάνω σε αυτό (Wang & Anderson, 2010). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις η cVA λειτουργεί ως φερομόνη συνάθροισης,

ενώ σε μεγαλύτερες, η cVA προκαλεί την αύξηση της επιθετικής συμπεριφοράς μεταξύ των αρσενικών εντόμων (Bartelt et al. 1985). Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι η ποσότητα των CHCs ενός εντόμου είναι μεγάλης σημασίας, καθ' ότι μπορεί να προκαλέσει διαφορετικές αντιδράσεις στη συμπεριφορά του. Επομένως, ο ακριβής ποσοτικός προσδιορισμός των CHCs αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για το σωστό σχεδιασμό των βιοδοκιμών.

Στο κεφάλαιο που ακολουθεί μελετήθηκε η επίδραση του χρόνου εκχύλισης στην εκχυλιζόμενη ποσότητα των CHCs του εντόμου *D. suzukii*. Εξετάστηκαν πέντε διαφορετικοί χρόνοι εκχύλισης και στη συνέχεια το εκχύλισμα αναλύθηκε με την τεχνική του GC-MS. Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα του ποιοτικού και του ποσοτικού προσδιορισμού των CHCs επιλέχθηκαν δύο ουσίες για να ερευνηθεί η συμπεριφορά του εντόμου ως προς αυτές, χρησιμοποιώντας διαφορετικές βιοδοκιμές.

3.2 Πειραματικό Μέρος

3.2.1 Εκχύλιση CHCs

Το *D. suzukii* καλλιεργήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες που αναφέρονται στο Παράρτημα Ι. Το πρωί με την έναρξη της φωτόφασης, 15 έντομα ίδιου φύλου (αρσενικά ή θηλυκά) ηλικίας 4 ημερών αναισθητοποιήθηκαν και συλλέχθηκαν τυχαία από τα δοχεία εκτροφής. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η διαδικασία της εκχύλισης όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2. Οι εκχυλιστικές περίοδοι που επιλέχθηκαν ήταν 1, 3, 6, 12 και 24 ώρες. Επιπλέον πραγματοποιούνται πειράματα ελέγχου κατά τα οποία για όλες τις εκχυλιστικές περιόδους προστίθονται εξάνιο σε Eppendorf tubes, με σκοπό να επιβεβαιωθεί η μη ύπαρξη μολύνσεων. Για την κάθε εκχυλιστική περίοδο και για το κάθε φύλο πραγματοποιούνται 10 επαναλήψεις (n=10) και η κάθε επανάληψη μετρήθηκε 3 φορές (Εικ 2.1).

3.2.2 Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζας

Για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των CHCs του *D. suzukii* χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική μέθοδος της Αέριας Χρωματογραφίας-Φασματομετρίας Μάζας και η παρακολούθηση ιόντος έγινε με πλήρη σάρωση (Full Scan, FS). Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και ο τρόπος ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού περιγράφονται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2.

3.2.3 Βιοδοκιμές

Βασιζόμενοι στην ανάλυση των αποτελεσμάτων των διαφορετικών χρόνων εκχύλισης, επιλέχθηκαν δύο ουσίες με σκοπό τη μελέτη της επίδρασής τους στη συμπεριφορά των ακμαίων του *D. suzukii*. Συγκεκριμένα επιλέχθηκε το C12, γιατί ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά στις 24 ώρες εκχύλισης και ελέγχθηκε η επίδραση της εκχυλιζόμενης ποσότητάς του (10.7 ng). Επίσης, επιλέχθηκε το 9-C25, επειδή παρουσίασε λογαριθμική αύξηση κατά τις πέντε διαφορετικές περιόδους εκχύλισης. Μελετήθηκε η ποσότητα που ανιχνεύθηκε στη 1 ώρα εκχύλισης (50.9 ng) και στις 24 ώρες (169.9 ng). Το C12 ήταν εμπορικά διαθέσιμο από τη Sigma Aldrich και το 9-C25 συντέθηκε (Cis:Trans=68:32) από τον υποψήφιο διδάκτορα Εμμανουήλ Σοφιαδή, Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης με υπεύθυνο τον καθ. Γεώργιο Βασιλικογιαννάκη. Η επιλογή των κατάλληλων βιοδοκιμών

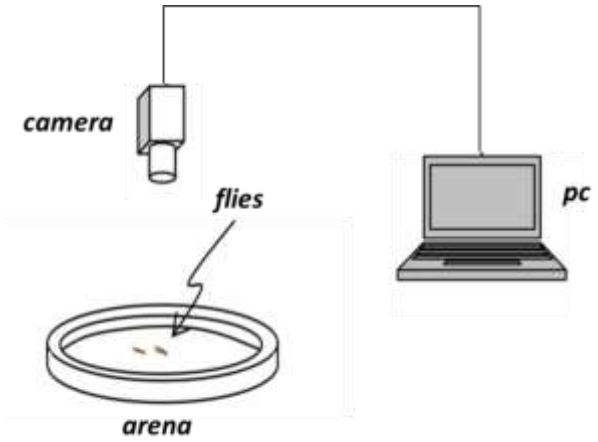
πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις αναμενόμενες αντιδράσεις του εντόμου στις παραπάνω επιλεχθείσες ουσίες. Εφαρμόστηκαν τρία διαφορετικά είδη βιοδοκιμών: βιοδοκιμές ερωτοτροπίας (courtship assay), βιοδοκιμές κινητικότητας (mobility assay) και ελκυστικές-απωθητικές βιοδοκιμές (attraction-repulsion assay). Οι βιοδοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε δωμάτιο με ελεγχόμενες συνθήκες (θερμοκρασία 21±1°C και υγρασία 65±5%) κατά τη διάρκεια 3 ωρών μετά την έναρξη της φωτόφασης (7:00πμ-10:00πμ).

Courtship Assay (Βιοδοκιμή Ερωτοτροπίας): Στις ήδη υπάρχουσες βιβλιογραφικές αναφορές έχει αποδειχθεί ότι το 9-C25 αυξάνει τη σεξουαλική συμπεριφορά του εντόμου *D. melanogaster* (Siwicki et al. 2005). Για τη μελέτη της επίδρασης του 9-C25 στη συμπεριφορά του *D. suzukii* εφαρμόστηκε μια καλά εδραιωμένη πειραματική διάταξη, η courtship assay (Εικ 3.1) (Cobb et al. 1989, Dankert et al. 2009, Koemans et al. 2017).

Αρχικά, παρασκευάστηκε διάλυμα 9-C25 σε εξάνιο σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, το οποίο εφαρμόστηκε στην κοιλιακή χώρα του θηλυκού, ηλικίας 4 ημερών, με σκοπό να εναποτεθούν στο έντομο διαφορετικές ποσότητες της ουσίας που επρόκειτο να ελεγχθούν. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται '*perfuming'* και μελετήθηκαν δύο διαφορετικές τεχνικές. Η μία πραγματοποιείται με τη χρήση ενός λεπτού πινέλου (paintbrush), το οποίο αρχικά εμβαπτίζεται μέσα στο διάλυμα της ουσίας και στη συνέχεια γίνεται 'βάψιμο' της κοιλιακής χώρας του εντόμου (Snellings et al. 2018). Κατά το δεύτερο τρόπο, ποσότητα συγκεκριμένης συγκέντρωσης διαλύματος ουσίας μεταφέρεται σε φιαλίδιο (vial), όπου αφήνεται να εξατμιστεί ο διαλύτης. Έπειτα, προστίθενται στο vial 5 έντομα και πραγματοποιείται ανακίνηση με δίνη (vortex) για 1 λεπτό με σκοπό να εναποτεθεί στο δερμάτιο τους ποσότητα της ουσίας.

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας '*perfuming'*, κάθε έντομο μεταφέρεται σε Eppendorf tube (1.5 ml), όπου πραγματοποιείται η εκχύλιση των επιδερμικών υδρογονανθράκων, προσθέτοντας 200 μl εξανίου (Unisolv). Η εκχύλιση διαρκεί 1 ώρα και στη συνέχεια το εκχύλισμα (100 μl) συλλέγεται και μεταφέρεται σε crimp top vial (Thermo Scientific), όπου προστίθενται C16-d_{34} (0.5 μg/μl) ως εσωτερικό πρότυπο. Σε επόμενο βήμα χρησιμοποιείται η αναλυτική τεχνική GC-MS, SIM μέθοδος (Κεφάλαιο 2) με σκοπό την παρακολούθηση του επιλεγμένου ιόντος της ουσίας που εξετάζεται. Πραγματοποιείται ποσοτικοποίηση της ουσίας που εναποτίθεται στο έντομο και ταυτόχρονα γίνεται η αξιολόγηση των δυο διαφορετικών τεχνικών 'perfuming' ως προς την επαναληψιμότητά τους (n=10).

Μετά την ποσοτικοποίηση της ουσίας που εναποτίθεται, επαναλαμβάνεται η διαδικασία '*perfuming'* στο θηλυκό παρθένο έντομο (ηλικίας 4 ημερών) και μεταφέρεται μαζί με ένα παρθένο αρσενικό (ηλικίας 4 ημερών) σε ύαλο ωρολογίου (4cm εσωτερική διάμετρο), γνωστό και ως courtship arena (Vieillard & Cortot, 2016) (Εικ 3.1).

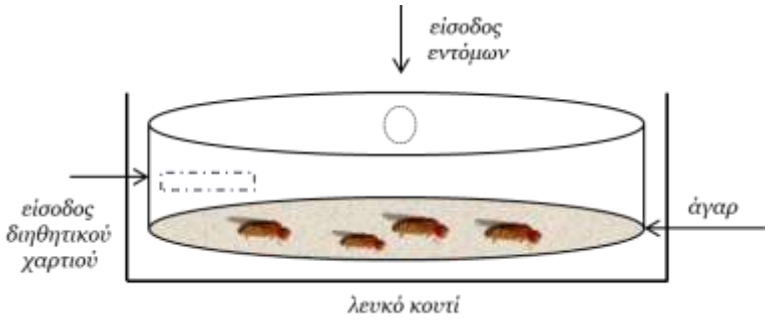


Εικόνα 3.1: Πειραματική διάταξη της courtship assay

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο φύλων καταγράφονται με βίντεο κάμερα για 3600 s (n=60) και τα βίντεο αναλύονται, ενώ καταγράφεται η '*καθυστέρηση σύζευξης'* και ο '*αριθμός συζεύξεων'*. Η '*καθυστέρηση σύζευξης'* είναι ο χρόνος ο οποίος απαιτείται από την έναρξη του πειράματος μέχρι την πρώτη σεξουαλική επαφή (Hwee et al. 2014). Η λειτουργικότητα της πειραματικής διάταξης του courtship assay αξιολογήθηκε με την ουσία 9-εικοσιτριένιο (9-tricosene, 9-C23) καθώς έχει ήδη αποδειχθεί ότι το 9-C23 σε μεγάλες συγκεντρώσεις μειώνει τη σεξουαλική συμπεριφορά του *D. suzukii* (Snellings et al. 2018) (n=60). Για τα πειράματα ελέγχου πραγματοποιήθηκε '*perfuming'* του εντόμου με εξάνιο και κατόπιν πραγματοποιήθηκαν οι βιοδοκιμές (n=60).

<u>Mobility Assay (Βιοδοκιμή Κινητικότητας):</u> Για τα έντομα της οικογένειας Drosophilidae δεν υπάρχει κάποια σχετική βιβλιογραφία, η οποία να αναφέρεται στη βιολογική δράση του C12. Αντιθέτως για άλλα έντομα, όπως τα μυρμήγκια, το C12 θεωρείται φερομόνη συναγερμού (Lofqvist, 1976). Αρχικά, λοιπόν, σχεδιάστηκε μία απλή πειραματική διάταξη με την οποία ελέχθηκε η επίδραση του C12 στην κινητικότητα των εντόμων του *D. suzukii*. Χρησιμοποιήθηκε ένα τρυβλίο Petri (εσωτερική διάμετρος 5 cm), στο οποίο προστέθηκε τροφικό υπόστρωμα

(άγαρ, 5% w/v). Στη συνέχεια, 20 έντομα (αρσενικά ή θηλυκά) μεταφέρθηκαν στο τρυβλίο, το οποίο τοποθετήθηκε μέσα σε λευκό κουτί για να μην επηρεάζονται τα έντομα από εξωτερικά οπτικά ερεθίσματα. Παρέμειναν για 1800 s, ώστε αυτά να εγκλιματιστούν στο νέο τους περιβάλλον. Τοποθετήθηκε διηθητικό χαρτί (1 cm x 1 cm) εμποτισμένο, είτε με 10 μl διαλύματος C12 (1ng/μl σε εξάνιο), είτε με 10 μl εξανίου (control) μέσω μιας οπής στο εσωτερικό του τρυβλίου (Εικ. 3.2). Πραγματοποιήθηκαν 45 επαναλήψεις και τα πειράματα καταγράφηκαν με βίντεο κάμερα για 1920 s, λαμβάνοντας υπόψη και το χρόνο εγκλιματισμού (n=45). Η επίδραση της ουσίας ποσοτικοποιήθηκε μετρώντας το '*δείκτη κινητικότητας',* ο οποίος υπολογίζεται με το ποσοστό των εντόμων που άλλαξαν θέση στη διάρκεια των 120 s. Αλλαγή θέσης θεωρείται όταν ένα έντομο μετακινείται τουλάχιστον 2 θέσεις ίσες με το μήκος του σώματός του.

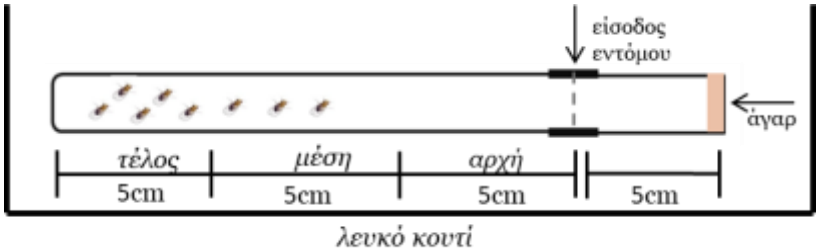


Εικόνα 3.2: Πειραματική διάταξη της mobility assay

<u>Attraction-Repulsion Assay (Βιοδοκιμή Ελκυστικότητας-Απωθητικότητας)</u>: Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα της ανάλυσης των βιοδοκιμών κινητικότητας, χρησιμοποιήθηκε πειραματική διάταξη με δοκιμαστικό σωλήνα, με σκοπό τη μελέτη πτητικών ουσιών, όπως είναι το C12 (Devaud, 2003, Vang et al. 2012). Επιπλέον, εξετάσθηκε διάλυμα 98mM βενζαλδεΰδης σε εξάνιο, με σκοπό να διαπιστωθεί η λειτουργικότητα της πειραματικής διάταξης, καθώς η βενζαλδεΰδη έχει χαρακτηριστεί ως απωθητική ουσία για τα έντομα της οικογένειας Drosophilidae (Vang & Adler, 2016).

Αρχικά, 20 έντομα ίδιου φύλου (αρσενικά ή θηλυκά) τοποθετούνται στο δοκιμαστικό σωλήνα (test tube, 2.5 cm x 15 cm), ο οποίος είναι χωρισμένος ισομερώς σε τρία μέρη (αρχή, μέση, τέλος). Στη συνέχεια τοποθετούνται μέσα σε λευκό κουτί για να μην επηρεάζονται τα έντομα από εξωτερικά οπτικά ερεθίσματα και παραμένουν για 1800 s, με σκοπό τον εγκλιματισμό τους στο νέο περιβάλλον. Έπειτα, προσαρμόζεται στο δοκιμαστικό σωλήνα, φιαλίδιο (vial όγκου 4

ml), που περιέχει τροφικό υπόστρωμα (άγαρ 5% w/v), στο οποίο προστίθενται, είτε 10 μl C12 (1ng/μl σε εξάνιο), είτε εξάνιο ως control. Στην ένωση του δοκιμαστικού σωλήνα με το vial εφαρμόζεται ειδικό διαχωριστικό, με σκοπό να αποφευχθεί η είσοδος των εντόμων στο vial (Εικ. 3.3). Ο δοκιμαστικός σωλήνας αναποδογυρίζεται, έτσι ώστε τα έντομα να μετακινηθούν στην αρχή του, τοποθετείται σε οριζόντια διάταξη και μελετάται η απόκριση των εντόμων (ελκυστική ή απωθητική). Η ποσοτικοποίηση της απόκρισης των εντόμων πραγματοποιείται με τη καταμέτρηση του αριθμού τους ανά ένα λεπτό, στο καθένα από τα τρία τμήματα του σωλήνα για 1200 s (Vang et al. 2012). Όλα τα πειράματα καταγράφονται με βίντεο κάμερα, ενώ για κάθε ουσία πραγματοποιήθηκαν 45 επαναλήψεις (n=45).



Εικόνα 3.3: Πειραματική διάταξη για τις βιοδοκιμές ελκυστικότητας-απωθητικότητας

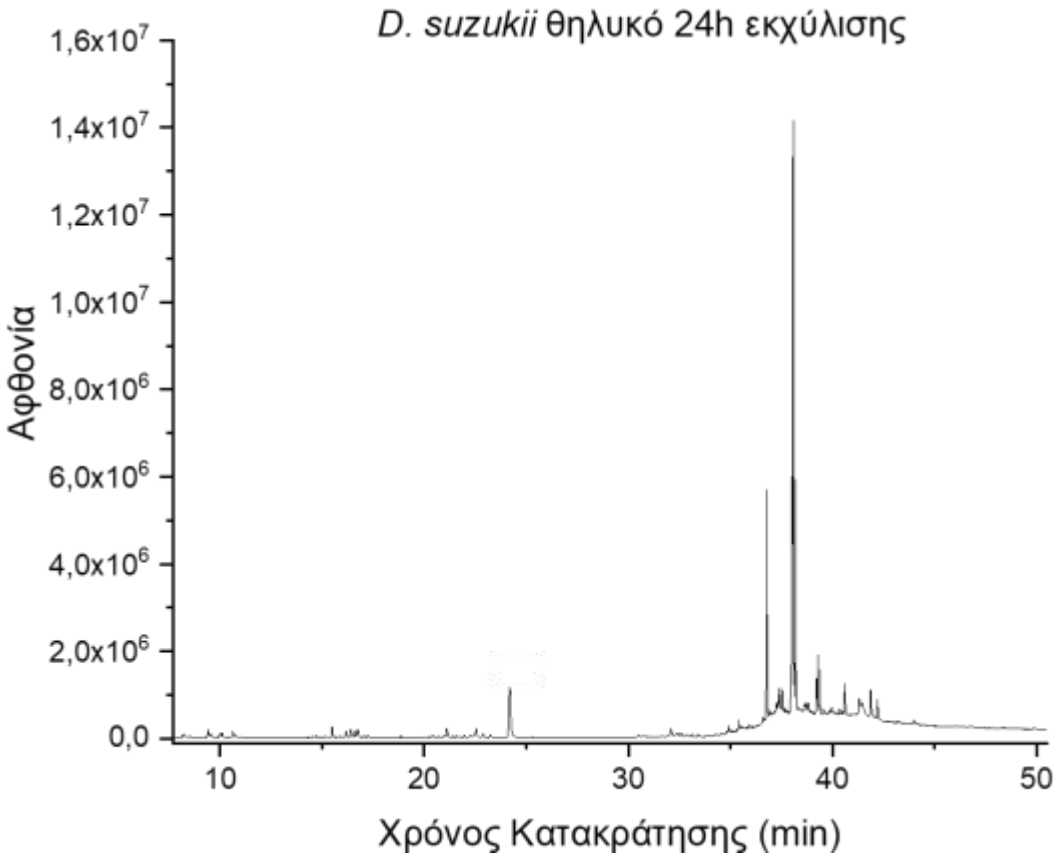
3.2.4 Στατιστική Ανάλυση

Ο μέσος όρος (mean, m), η τυπική απόκλιση (standard deviation, sd) και η στατιστική ανάλυση όλων των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε από το λογισμικό IBM SPSS Statistics 24. Οι *p*-τιμές για τους επιδερμικούς υδρογονάνθρακες προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας τη σύγκριση των μέσων όρων, και συγκεκριμένα εφαρμόστηκε το t-Test. Για την ανάλυση της επίδρασης του χρόνου εκχύλισης στους επιδερμικούς υδρογονάνθρακες εφαρμόστηκε το γραμμικό και το λογαριθμικό μοντέλο. Στα μη επεξεργασμένα δεδομένα της '*courtship assay'*, της '*mobility assay'* και της '*attraction-repulsion assay'* πραγματοποιήθηκε έλεγχος κανονικότητας με το Test Kolmogorov-Smirnov (N>50) για την πρώτη βιοδοκιμή, ενώ για τη δεύτερη και την τρίτη πραγματοποιήθηκε έλεγχος κανονικότητας με το Test of Shapiro-Wilk (N≤50). Ανάλογα με την κατανομή (κανονική ή μη) των δεδομένων, οι *p*-τιμές για τα αποτελέσματα βιοδοκιμών προσδιορίστηκαν, εφαρμόζοντας είτε το Independent samples t-Test είτε το Mann & Whitney Test. Η τιμή *p*-value ορίστηκε στο 0.05, η οποία αντιστοιχεί σε όριο εμπιστοσύνης 95%.

3.3 Αποτελέσματα - Συζήτηση

3.3.1 Ποιοτικός και Ποσοτικός Προσδιορισμός των CHCs του *D. suzukii*

Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκε η επίδραση πέντε διαφορετικών χρόνων εκχύλισης (1, 3, 6, 12 και 24 ώρες), στο προφίλ των CHCs του εντόμου. Αρχικά επιβεβαιώθηκε η μη ύπαρξη επιμολύνσεων με την προσθήκη του εξανίου στα Eppendorf tubes στους διαφορετικούς χρόνους εκχύλισης. Πραγματοποιήθηκε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των CHCs των δύο φύλων του *D. suzukii* και ανιχνεύθηκαν συνολικά 51 CHCs. Στην Εικ. 3.4 απεικονίζεται το χρωματογράφημα του θηλυκού *D. suzukii* μετά από 24 ώρες εκχύλισης, καθώς μετά από τον χρόνο αυτό ανιχνεύονται όλες οι ουσίες.



Εικόνα 3.4: Χρωματογράφημα των CHCs του θηλυκού *D. suzukii* μετά από 24 ώρες εκχύλισης

Όπως έχει αναφερθεί και στην εισαγωγή, στις περισσότερες βιβλιογραφικές αναφορές εφαρμόζεται συνήθως η μία ώρα εκχύλισης για τον προσδιορισμό των CHCs (Bartelt & Jackson, 1984).

Στην παρούσα έρευνα εφαρμόζοντας τους διαφορετικούς χρόνους εκχύλισης ταυτοποιήθηκαν επτά επιπλέον CHCs και για τα δύο φύλα του *D. suzukii* (Snellings et al. 2018, Dekker et al. 2015). Οι ουσίες αυτές είναι το ενδεκάνιο (endecane, C11), δωδεκάνιο (dodecane, C12), δεκατετράνιο (tetradecane, C14), δεκαπεντάνιο (pentadecane, C15), δεκαεξάνιο (hexadecane, C16), δεκαεπτάνιο (heptadecane, C17) και δεκαοκτάνιο (octadecane, C18) (Πίνακας 3.1 για τα θηλυκά, Πίνακας 3.2 για τα αρσενικά).

Πίνακας 3.1: Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των CHCs του θηλυκού *D. suzukii* στις 5 διαφορετικές ώρες εκχύλισης

#	RT	Compound	Abbr.	M_r	1h (ng)	sd	3h (ng)	sd	6h (ng)	sd	12h (ng)	sd	24h (ng)	sd
1N	10.62	undecane	C11	156			8.1	0.3	19.8	0.4	40.5	4.6	78.1	3.4
2N	13.40	dodecane	C12	170									10.7	0.7
3N	18.87	tetradecane	C14	198									5.3	0.8
4N	21.56	pentadecane	C15	212							8.8	0.7	14.4	0.8
I.S	24.17	hexadecane-d_{34}	C16-d_{34}	260	1050	0	1050	0	1050	0	1050	0	1050	0
5N	25.24	hexadecane	C16	226									14.6	1.9
6N	30.75	heptadecane	C17	240			6.6	0.1	11.0	0.5	20.1	1.3	22.9	0.4
7N	33.45	octadecane	C18	254									14.7	6.6
8	34.84	nonadecane	C19	268	4.4	0.5	6.2	0.5	8.7	0.6	12.3	1.2	22.5	2.1
9	34.92	unidentified 1	UNI1		7.5	0.9	14.3	0.5	22.8	0.8	31.5	1.9	37.9	2.4
10	35.41	unidentified 2	UNI2		11.0	0.9	24.1	1.4	36.8	1.8	48.0	3.8	68.6	1.1
11	35.90	eicosane	C20	282	6.6	0.6	10.4	0.3	12.6	2.0	14.6	1.6	20.6	1.3
12	36.56	9-heneicosene	9-C21:1	294	2.6	0.6	3.7	0.1	4.4	0.5	5.6	0.3	5.9	0.3
13	36.61	7-heneicosene	7-C21:1	294	22.0	1.6	19.9	1.3	23.2	1.7	24.0	1.7	22.2	3.0
14	36.66	5-heneicosene	5-C21:1	294	13.7	1.4	12.7	0.5	11.9	0.8	13.4	1.4	13.9	1.3
15	36.78	heneicosane	C21	296	867.1	57.6	799.3	27.33	799.3	29.2	815.7	38.1	1070.7	78.5
16	36.92	2-methyleicosane	2-MeC20	296	7.1	0.5	19.4	0.7	20.2	0.9	22.3	1.8	27.4	9.5
17	37.24	2-methylheneicosane	2-MeC21	310	9.1	0.7	20.3	0.7	20.3	0.8	24.8	0.9	24.8	1.3
18	37.27	6.9-docosadiene	6.9-C22:2	306	2.6	0.3	6.7	1.0	20.1	0.7	20.5	3.7	20.9	1.8
19	37.31	9-docosene	9-C22:1	308	14.7	0.6	28.5	0.8	31.4	1.1	32.7	3.1	33.2	1.7
20	37.36	7-docosene	7-C22:1	308	95.6	6.0	81.4	3.7	81.2	3.4	99.7	9.1	124.5	9.5
21	37.44	5-docosene	5-C22:1	308	7.3	2.4	11.4	3.9	13.2	4.2	13.4	3.6	17.1	1.2
22	37.50	docosane	C22	310	39.4	2.6	95.5	0.1	101.9	2.6	123.5	7.0	130.4	8.3
23	37.93	2-methyldocosane	2-MeC22	324	83.7	5.6	69.5	2.1	73.4	2.8	84.8	8.1	90.0	6.1
24	37.97	6,9-tricosadiene	6,9-C23:2	320	96.4	6.5	114.1	3.1	175.1	7.3	247.2	27.1	179.5	10.6
25	38.01	9-tricosene	9-C23:1	322	518.1	36.4	899.4	29.8	932.1	32.2	938.1	62.9	1270.1	119.1
26	38.06	7-tricosene	7-C23:1	322	3297.1	245.1	3369.5	78.9	3352.4	97.5	3332.2	166.9	3596.8	241.2

27	38.12	5-tricosene	5-C23:1	322	206.4	18.4	126.4	1.6	164.4	11.6	172.8	4.7	243.2	14.3
28	38.17	tricosane	C23	324	995.1	67.68	989.61	11.8	985.4	37.9	992.9	119.9	1312.4	102.7
29	38.38	unidentified 3	UNI3		4.3	2.3	15.8	1.6	18.4	1.4	16.1	1.6	14.8	0.2
30	38.62	3-methyltricosane	3-MeC23	338	8.4	0.6	19.5	0.6	27.8	0.9	41.3	4.4	43.1	3.9
31	38.65	9-tetracosene	9-C24:1	336	9.4	1.1	20.2	1.3	22.9	2.1	21.6	3.4	24.2	2.4
32	38.68	7-tetracosene	7-C24:1	336	33.1	1.7	51.7	1.3	52.1	2.1	54.6	5.6	60.9	3.3
33	38.72	5-tetracosene	5-C24:1	336	22.1	1.4	23.2	0.7	29.1	1.1	32.7	5.1	25. 8	3.7
34	38.79	tetracosane	C24	338	20.2	1.8	40.6	5.1	46.9	1.8	43.0	4.2	44.7	2.2
35	39.15	2-methyltetracosane	2-MeC24	352	20.1	1.6	28.3	0.8	22.9	0.7	28.5	2.7	22.4	2.7
36	39.21	6,9-pentacosadiene	6,9-C25:2	348	40.6	3.7	37.6	1.9	30.9	0. 7	42.7	4.0	50.6	2.5
37	39.22	9-pentacosene	9-C25:1	350	50.9	4.8	170.1	4.7	168.9	13.5	208.5	27.8	169.9	10.3
38	39.26	7-pentacosene	7-C25:1	350	193.9	14.7	305.1	7.3	317.1	16.3	296.8	53.1	299.5	21.8
39	39.35	5-pentacosene	5-C25:1	350	19.9	0.5	33.6	0.56	31.5	0.4	39.9	1.4	31.7	2.2
40	39.36	pentacosane	C25	352	215.9	11.6	221.5	13.9	216.6	10.5	206.8	36.6	251.4	16.3
41	39.95	hexacosane	C26	366	19.3	4.6	24.6	3.5	22.9	5.1	20.5	3.7	23.5	2.9
42	40.35	2-methylhexacosane	2-MeC26	380	33.9	2.2	73.9	1.6	64.5	2.9	71.3	32.6	44.6	2.8
43	40.42	9-heptacosene	9-C27:1	378	10.7	1.3	11.3	1.5	12.9	1.9	16.3	7.3	14.1	2.3
44	40.50	7-heptacosene	7-C27:1	378	27.2	1.6	34.6	1.1	22.7	2.1	25.9	2.5	23.3	1.1
45	40.60	heptacosane	C27	380	132.9	7.9	183.5	5.6	167.5	6.1	178.8	31.8	233.1	12.6
46	41.34	octacosane	C28	394	43.5	3.7	152.8	10.2	159.5	22.6	161.8	5.3	170.9	8.9
47	41.47	unidentified 4	UNI4		23.9	2.1	116.7	10.6	127.5	13.4	162.1	15.4	169.6	4.9
48	41.88	2-methyloctacosane	2-MeC28	408	155.1	9.9	383.1	4.1	309.1	18.1	309.6	44.1	291.8	18.3
49	42.09	7-nonacosene	7-C29:1	406	40.1	3.9	57.9	2.4	44.3	7.1	48.5	2.9	30.1	2.3
50	42.22	nonacosane	C29	408	98.5	14.6	129.9	9.2	120.1	4.4	143.6	28.1	233.3	50.5
51	44.00	2-methyltriacontane	2-MeC30	436	13.9	1.6	86.8	3.7	73.1	13.3	81.4	31.4	58.5	5.6

RT - χρόνο κατακράτησης της ουσίας (retention time)
Abbr. -συντακτικός τύπος της ουσίας (abbreviation)
M_r - μοριακή μάζα (molecular weight)
N - ουσία που ταυτοποιείται για πρώτη φορά
sd - τυπική απόκλιση (standard deviation)
σκιασμένα κελιά – δεν ανιχνεύεται η ουσία

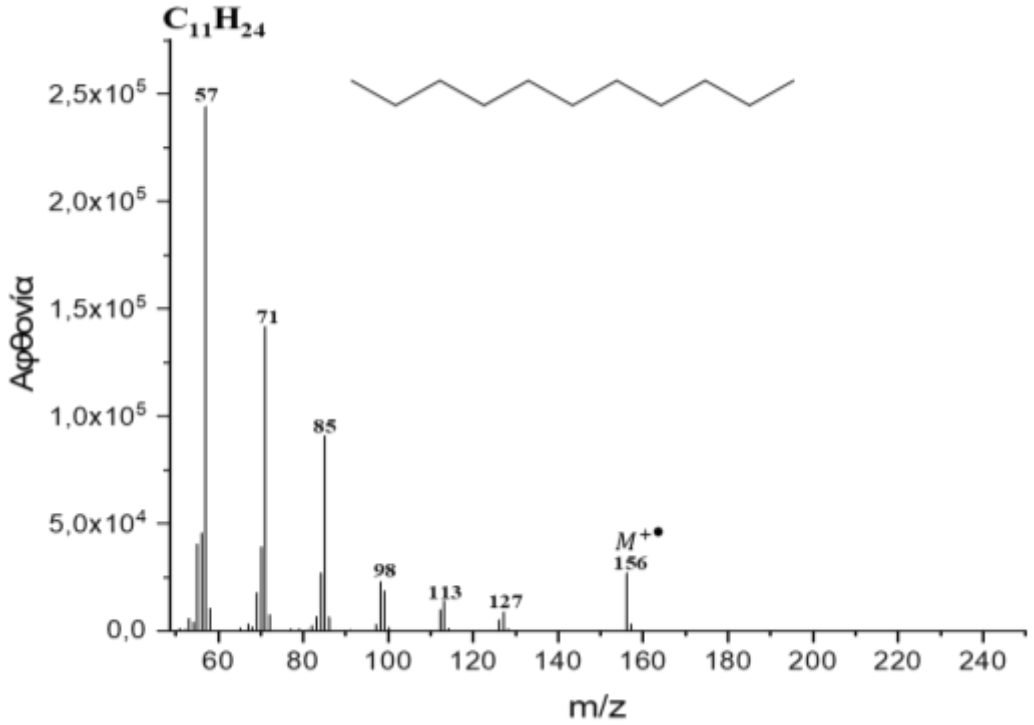
Πίνακας 3.2: Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των CHCs του αρσενικού *D. suzukii* στις 5 διαφορετικές ώρες εκχύλισης

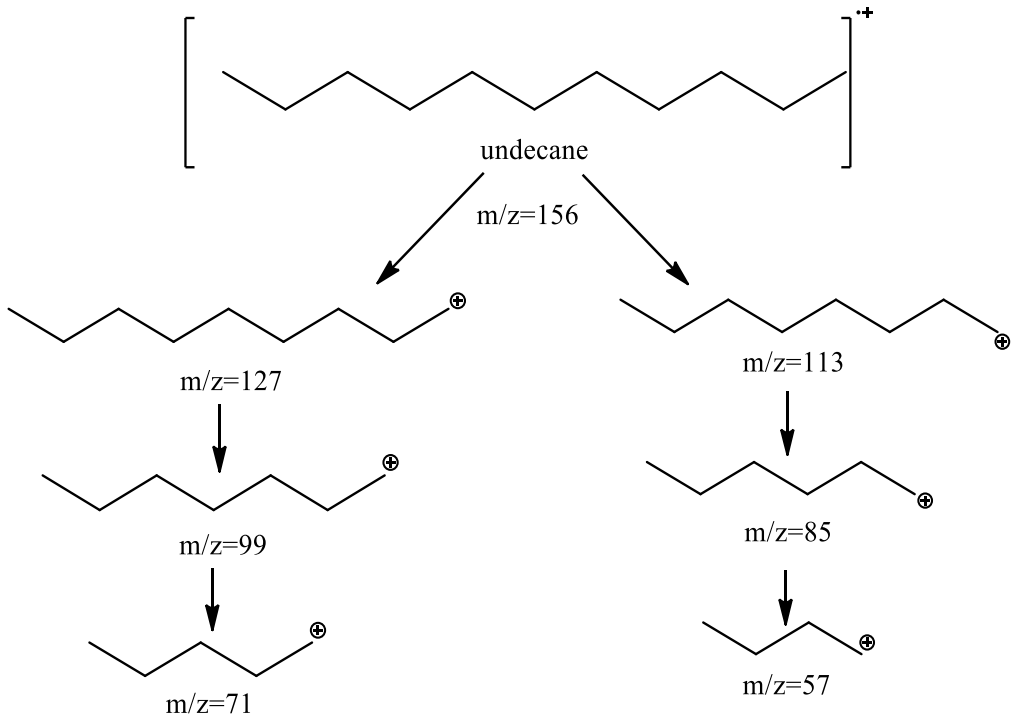
#	RT	Ουσία	Abbr.	M_r	1h (ng)	sd	3h (ng)	sd	6h (ng)	sd	12h (ng)	sd	24h (ng)	sd
1N	10.62	undecane	C11	156			8.8	1.4	21.6	1.2	42.6	1.3	90.9	9.9
2N	13.40	dodecane	C12	170									10.7	0.4
3N	18.87	tetradecane	C14	198									6.2	0.2
4N	21.56	pentadecane	C15	212							11.3	0.5	21.6	2.8
I.S	24.17	hexadecane-d_{34}	C16-d_{34}	260	1050	0	1050	0	1050	0	1050	0	1050	0
5N	25.24	hexadecane	C16	226									12.1	1.1
6N	30.75	heptadecane	C17	240			10.3	1.5	15.0	3.5	27.3	2.0	43.8	5.1
7N	33.45	octadecane	C18	254									12.2	0.9
8	34.84	nonadecane	C19	268	3.9	0.7	5.8	0.5	7.2	0.5	10.2	0.8	18.5	2.5
9	34.92	unidentified 1	UNI1		6.7	1.1	11.0	0.5	20.6	0.2	26.8	0.7	46.1	1.5
10	35.41	unidentified 2	UNI2		9.8	1.2	19.8	1.6	31.1	0.6	42.8	1.9	69.8	0.3
11	35.90	eicosane	C20	282	5.9	0.1	16.1	0.6	30.8	0.6	36.1	1.4	43.3	0.8
12	36.56	9-heneicosene	9-C21:1	294	3.1	0.1	3.1	0.1	2.9	0.4	3.7	0.1	3.4	1.7
13	36.61	7-heneicosene	7-C21:1	294	18.7	3.7	15.4	0.2	17.0	0.4	13.8	0.3	15.4	0.3
14	36.66	5-heneicosene	5-C21:1	294	11.2	0.9	4.8	0.3	4.3	0.3	4.2	1.7	4.5	1.4
15	36.78	heneicosane	C21	296	759.1	113.8	633.1	20.4	616.9	54.8	692.4	14.4	657.3	38.5
16	36.92	2-methyleicosane	2-MeC20	296	6.4	2.1	19.7	0.6	16.9	1.3	18.5	1.2	20.0	0.2
17	37.24	2-methylheneicosane	2-MeC21	310	7.9	1.2	16.4	2.8	21.3	0.8	21.1	1.7	23.3	2.1
18	37.27	6,9-docosadiene	6,9-C22:2	306	2.4	0.4	9.2	0.2	16.1	0.4	14.6	0.	16.2	1.0
19	37.31	9-docosene	9-C22:1	308	11.1	1.8	26.1	3.9	23.9	3.8	26.5	0.3	31.2	1.0
20	37.36	7-docosene	7-C22:1	308	88.9	12.9	74.1	6.0	77.4	7.9	79.4	4.1	108.1	1.4
21	37.44	5-docosene	5-C22:1	308	5.4	1.3	9.4	0.3	6.3	1.1	17.3	5.8	28.4	3.1
22	37.50	docosane	C22	310	35.9	1.7	104.4	4.7	108.2	1.1	103.9	17.1	107.8	2.5
23	37.93	2-methyldocosane	2-MeC22	324	79.8	3.4	42.6	4.1	48.2	1.8	44.9	1.9	49.2	3.4
24	37.97	6,9-tricosadiene	6,9-C23:2	320	89.7	15.1	102.8	7.4	105.3	14.3	123.6	18.5	142.2	3.4
25	38.01	9-tricosene	9-C23:1	322	523.8	31.4	606.6	8.5	551.9	155.2	681.71	32.2	606.3	75.2
26	38.06	7-tricosene	7-C23:1	322	2987.6	154.2	2700.4	42.7	2697.9	227.2	2787.4	82.1	2702.1	95.2
27	38.12	5-tricosene	5-C23:1	322	163.4	26.1	150.5	3.5	137.7	13.9	127.3	5.8	131.3	3.4
28	38.17	tricosane	C23	324	899.7	19.5	814.4	27.5	788.8	95.7	872.7	54.7	778.7	25.8
29	38.38	unidentified 3	UNI3		7.2	1.4	14.1	2.3	14.1	1.2	29.2	4.5	28.2	2.7
30	38.62	3-methyltricosane	3-MeC23	338	4.8	2.7	14.7	0.1	18.4	0.4	16.0	2.0	17.8	0.5
31	38.65	9-tetracosene	9-C24:1	336	9.4	0.3	22.7	0.9	26.4	4.3	23.7	3.1	29.3	0.8
32	38.68	7-tetracosene	7-C24:1	336	26.7	3.9	27.6	0.9	33.6	5.1	32.4	2.8	37.8	0.2
33	38.72	5-tetracosene	5-C24:1	336	7.2	0.3	3.6	0.2	9.8	5.4	11.1	1.8	11.3	0.2
34	38.79	tetracosane	C24	338	18.4	1.2	39.3	1.5	51.5	0.6	52.3	6.3	56.7	0.9

35	39.15	2-methyltetracosane	2-MeC24	352	15.7	5.1	5.4	0.2	11.4	5.1	15.8	2.1	16.5	4.2
36	39.21	6,9-pentacosadiene	6,9-C25:2	348	32.4	2.3	45.8	1.5	42.7	7.1	47.8	2.2	47.8	0.7
37	39.22	9-pentacosene	9-C25:1	350	25.8	1.7	77.3	3.7	86.3	7.4	82.9	1.7	82.8	1.6
38	39.26	7-pentacosene	7-C25:1	350	123.7	6.1	205.1	7.1	194.2	54.3	217.3	18.5	212.9	5.8
39	39.35	5-pentacosene	5-C25:1	350	17.1	1.3	38.8	0.7	37.8	7.8	34.3	3.3	33.2	3.7
40	39.36	pentacosane	C25	352	164.9	1.7	174.6	7.2	191.3	5.2	180.6	9.9	187.7	9.2
41	39.95	hexacosane	C26	366	20.8	1.7	38.7	16.6	32.5	5.6	44.2	0.2	55.5	0.7
42	40.35	2-methylhexacosane	2-MeC26	380	29.1	1.4	13.5	0.5	30.7	8.1	51.5	2.2	39.3	3.6
43	40.42	9-heptacosene	9-C27:1	378	8.7	0.8	6.7	0.1	10.6	0.1	11.7	1.4	10.6	0.1
44	40.50	7-heptacosene	7-C27:1	378	24.8	4.1	12.2	1.2	13.8	2.8	17.8	4.2	11.8	1.7
45	40.60	heptacosane	C27	380	69.7	1.7	160.3	7.7	183.1	9.7	158.1	3.7	165.9	3.9
46	41.34	octacosane	C28	394	38.7	0.8	62.1	3.7	58.5	9.7	61.4	2.5	63.6	3.9
47	41.47	unidentified 4	UNI4		18.9	3.4	86.4	2.9	96.0	1.9	91.9	2.7	97.1	2.5
48	41.88	2-methyloctacosane	2-MeC28	408	123.9	1.7	191.8	6.5	200.3	8.1	197.9	11.4	191.4	1.4
49	42.09	7-nonacosene	7-C29:1	406	36.1	2.8	23.5	1.4	26.3	0.4	24.0	2.6	24.4	4.9
50	42.22	nonacosane	C29	408	78.9	13.6	194.2	13.2	210.4	4.7	189.3	3.0	204.1	6.9
51	44.00	2-methyltriacontane	2-MeC30	436	13.4	2.4	36.9	1.9	37.6	5.3	36.2	1.2	35.4	1.0

RT - χρόνο κατακράτησης της ουσίας (retention time)
Abbr. -συντακτικός τύπος της ουσίας (abbreviation)
M_r – μοριακή μάζα (molecular weight)
N - ουσία που ταυτοποιείται για πρώτη φορά
sd - τυπική απόκλιση (standard deviation)
Σκιασμένα κελιά – δεν ανιχνεύεται η ουσία

Η ταυτοποίηση των ουσιών πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση του φάσματος μάζας της κάθε ουσίας. Συγκεκριμένα ταυτοποιήθηκε η μοριακή κορυφή, συνεπώς προσδιορίστηκε η μοριακή μάζα της ουσίας. Επιπλέον ερμηνεύοντας τη σχηματομορφή των θραυσμάτων προσδιορίστηκε η παρουσία ή απουσία λειτουργικής ομάδας. Η οριστική ταυτοποίηση βασίστηκε στη σύγκριση των φασμάτων μάζας των άγνωστων ουσιών με τα φάσματα μάζας των πρότυπων ουσιών C7-C40 (Sigma Aldrich) και με τα φάσματα μάζας από τη βιβλιοθήκη NIST MS. Στην Εικ 3.5 απεικονίζεται ως παράδειγμα το φάσμα μάζας και ο μηχανισμός θραυσματοποίησης της ουσίας C11. Τα φάσματα μάζας και οι μηχανισμοί θραυσματοποίησης των υπόλοιπων νέων ουσιών περιγράφονται στο Παράρτημα ΙΙ.

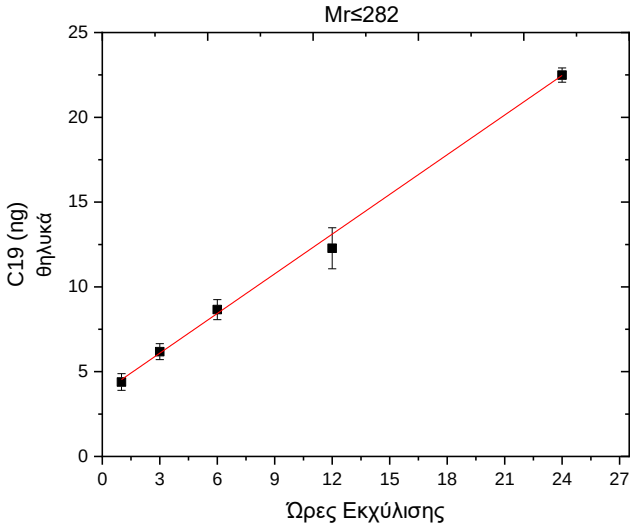




Εικόνα 3.5: Φάσμα Μάζας και μηχανισμός θραυσματοποίησης της ουσίας C11

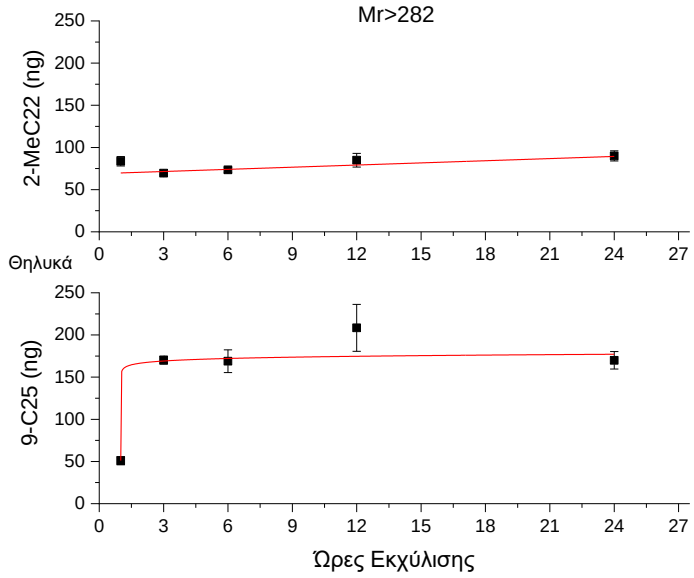
3.3.2 Επίδραση του Χρόνου Εκχύλισης στο Προφίλ των CHCs του *D. suzukii*

Παρατηρήθηκε ότι και στα δύο φύλα του *D. suzukii* η εκχυλιζόμενη ποσότητα των πτητικών CHCs με $M_r \leq 282$ αυξάνεται γραμμικά ως προς το χρόνο εκχύλισης και δε φτάνει σε ισορροπία ούτε στις 24 ώρες. Στην Εικ. 3.6 παρουσιάζεται ως παράδειγμα η ουσία C19 του θηλυκού με M_r=268.



Εικόνα 3.6: Η εκχυλιζόμενη ποσότητα της ουσίας C19 με Mr=268 στις 1, 3, 6, 12 και 24 ώρες εκχύλισης. Ο συντελεστής συσχέτισης για τη γραμμική συνάρτηση είναι R^2=0.999

Αντίθετα, για τις λιγότερο πτητικές ουσίες με Mr>282, η εκχυλιζόμενη ποσότητα των CHCs των εντόμων, είτε παραμένει σταθερή σε όλους τους χρόνους εκχύλισης, είτε παραμένει σταθερή μετα τη 1 ώρα εκχύλισης. Η ισορροπία επέρχεται δηλαδή είτε στη 1 είτε στις 3 ώρες εκχύλισης. Στην Εικ. 3.7 παρουσιάζονται ως παράδειγμα οι ουσίες 2-μεθυλοεικοσιδιάνιο (2-methyldocosane, 2-MeC22, Mr=324) και η 9-C25 (Mr=336), για το θηλυκό *D. suzukii*.

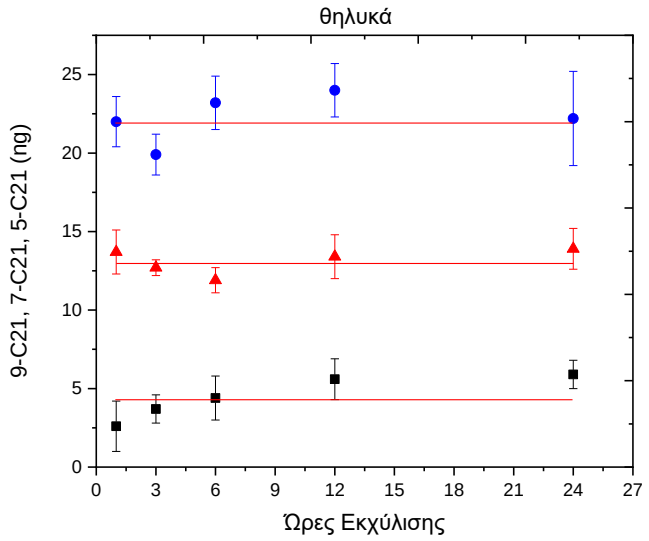


Εικόνα 3.7: Η εκχυλιζόμενη ποσότητα της ουσίας 2-MeC22 με Mr=324 και 9-C25 Mr=336 στις 1, 3, 6, 12 και 24 ώρες εκχύλισης

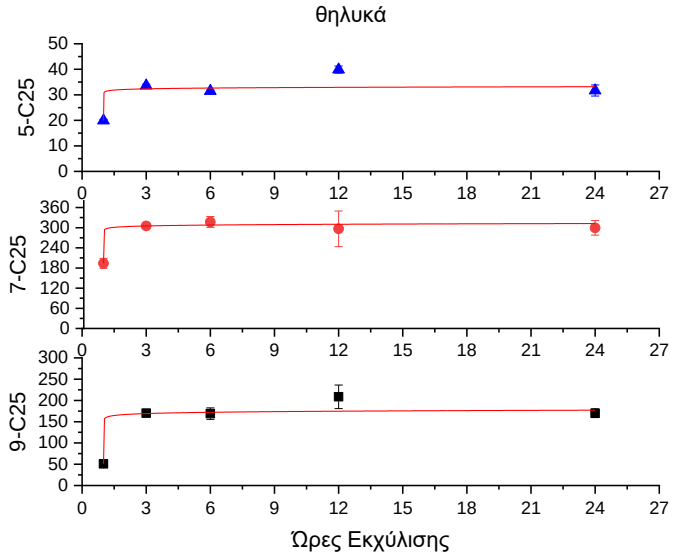
Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ότι οι CHCs δεν κατανέμονται ομοιόμορφα στο δερμάτιο του εντόμου. Η γραμμική αύξηση των εκχυλιζόμενων ουσιών υποδηλώνει ότι οι περισσότερο πτητικές ουσίες (μικρή μοριακή μάζα), βρίσκονται σε βαθύτερα στρώματα στο δέρμα του εντόμου.

Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια να πραγματοποιηθεί μια συσχέτιση μεταξύ της χημική δομής (κορεσμένοι, ακόρεστοι, γραμμικοί ή διακλαδισμένοι) των CHCs με Mr>282 και της εκχυλιστικής τους τάσης, χωρίς όμως να εξαχθεί ξεκάθαρο αποτέλεσμα. Παρατηρήθηκε ότι και στα δύο φύλα υπάρχουν αλκένια, όπως το 9-C21, 7-C21 και το 5-C21 με Mr=294, στα οποία η εκχυλιζόμενη ποσότητά τους παραμένει σταθερή στους διαφορετικούς χρόνους εκχύλισης. Παράλληλα, όμως υπάρχουν αλκένια, όπως το 9-C25, 7-C25 και το 5-C25 με Mr=350, στα οποία η εκχυλιζόμενή τους ποσότητα αυξάνεται λογαριθμικά. Συνεπώς, η χημική δομή της ουσίας δεν είναι αυτή που καθορίζει την εκχυλιστική της τάση, ενώ ο χρόνος που απαιτείται για

να φτάσει η κάθε ουσία σε σημείο ισορροπίας με το διαλύτη ποικίλει. Στην Εικ 3.8 και Εικ 3.9 παρουσιάζονται τα παραπάνω αλκένια για το θηλυκό *D. suzukii*, καθώς δεν υπήρχε διαφοροποίηση στην εκχυλιστική τους τάση μεταξύ των δύο φύλων.



Εικόνα 3.8: Η εκχυλιζόμενη ποσότητα της ουσίας 9-C21 ■, 7-C21 ● και 5-C21 ▲ στις 1, 3, 6, 12 και 24 ώρες εκχύλισης για το θηλυκό *D. suzukii*



Εικόνα 3.9: Η εκχυλιζόμενη ποσότητα της ουσίας 9-C25 ■, 7-C25 ●, 5-C25 ▲ στις 1, 3, 6, 12 και 24 ώρες εκχύλισης

Δημοσιευμένες έρευνες έχουν ήδη αποδείξει ότι η ποσότητα των CHCs φέρει καθοριστικό ρόλο στην επίδρασή τους στη συμπεριφορά του εντόμου (Siwicki et al. 2005). Μία ουσία με μεγάλη συγκέντρωση μπορεί να λειτουργεί απωθητικά στο έντομο, ενώ η ίδια ουσία σε μικρότερη συγκέντρωση μπορεί να λειτουργεί ελκυστικά ή και αντίστροφα. (Siwicki et al. 2005). *Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι ο ακριβής ποσοτικός προσδιορισμός των CHCs είναι*

αναγκαίος, διότι αποτελεί το πρώτο βήμα για τη μετέπειτα μελέτη της βιολογικής τους δράσης και το σχεδιασμό των βιοδοκιμών.

3.3.3 Βιολογική Δράση της Ουσίας 9-C25

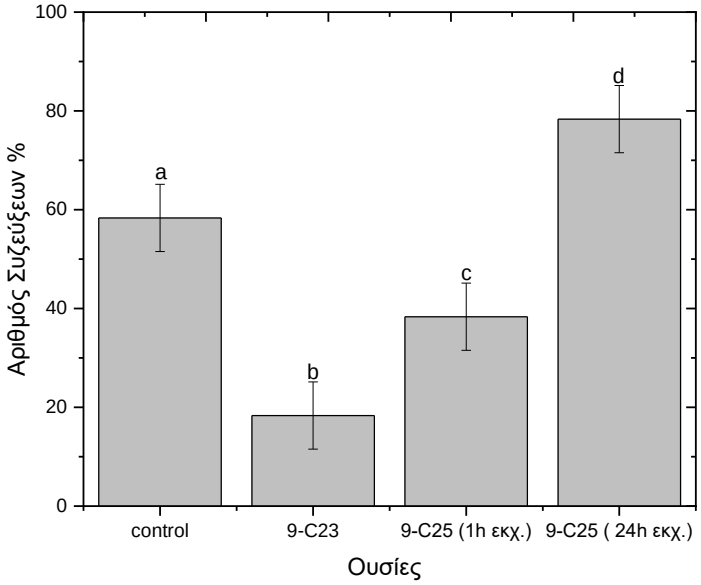
Όπως έχει αναφερθεί και στο πειραματικό μέρος, βασιζόμενοι στα παραπάνω αποτελέσματα επιλέχθηκε να μελετηθεί η βιολογική δράση της εκχυλιζόμενης ποσότητας στη 1 και στις 24 ώρες της ουσίας 9-C25. Το πρώτο βήμα για τη μελέτη της επίδρασης του 9-C25 στη σεξουαλική συμπεριφορά του αρσενικού *D. suzukii* είναι η εναπόθεση της ουσίας στην κοιλιακή χώρα του θηλυκού, το αποκαλούμενο '*perfuming'* του εντόμου. Εξετάστηκαν δύο διαφορετικές τεχνικές, αυτή με τη χρήση '*vortex'* και αυτή με τη χρήση '*paintbrush',* με σκοπό να ελεγχθεί με ποια τεχνική εναποτίθεται η ποσότητα που προσεγγίζει περισσότερο την εκχυλιζόμενη ποσότητα της 1 ώρας (50.9 ng) και των 24 ωρών (169.9 ng) αντίστοιχα. Για την εκχυλιζόμενη ποσότητα της 1 και των 24 ωρών εφαρμόστηκαν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις 9-C25, 785 ng/μl και 2540 ng/μl αντίστοιχα (n=10). Με τη χρήση '*vortex',* ο μέσος όρος (mean) και η τυπική απόκλιση (standard deviation, sd) των εναποτιθέμενων ποσοτήτων είναι 77.2 ± 53.9 ng και 291.7 ± 91.1 ng αντίστοιχα. Αντίθετα με τη χρήση '*paintbrush'*, ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση είναι 46.5 ± 7.7 ng και 153.1 ±6.4 ng αντίστοιχα (Πίνακας 3.3). Σύμφωνα, λοιπόν με τα παραπάνω αποτελέσματα επιλέχθηκε η τεχνική 'paintbrush' για το 'perfuming' των εντόμων, καθώς με αυτόν τον τρόπο προσεγγίζεται με περισσότερη ακρίβεια η εκχυλιζόμενη ποσότητα της 1 και των 24 ωρών.

Πίνακας 3.3: Ποσοτικός προσδιορισμός του 9-C25 που εναποτίθεται στην κοιλιακή χώρα του θηλυκού *D. suzukii με την* εφαρμογή δύο τεχνικών 'perfuming' ('vortex' και 'paintbrush')

Perfuming 50.9 ng 9-C25	**Vortex (n=10)**	**Paintbrush (n=10)**
Mean (ng)	77.2	46.5
Minimum (ng)	12.7	39.8
Maximum (ng)	197.4	58.9
±sd(ng)	53.9	7.7
Perfuming 169.9 ng 9-C25	**Vortex (n=10)**	**Paintbrush (n=10)**
Mean (ng)	291.7	153.1
Minimum (ng)	114.2	132.8
Maximum (ng)	493.1	164.7
±sd (ng)	91.1	6.4

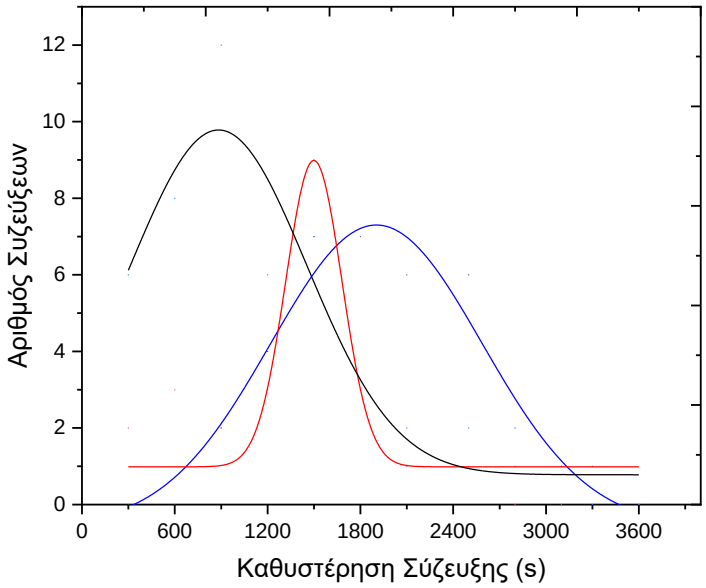
Στη συνέχεια εξετάσθηκε η επίδραση του 9-C23 (1500 ng) και επιβεβαιώθηκε η λειτουργικότητα της πειραματικής διάταξης courtship assay (Εικ. 3.1), καθώς μειώθηκε στατιστικά σημαντικά ο αριθμός των επιτυχημένων σεξουαλικών επαφών (Εικ. 3.10).

Εφαρμόζοντας την εκχυλιζόμενη ποσότητα στη 1 ώρα του 9-C25 μειώθηκε στατιστικά σημαντικά ο αριθμός των επιτυχημένων σεξουαλικών επαφών. Αντίθετα, ο αριθμός αυτός αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά, όταν εφαρμόσθηκε η εκχυλιζόμενη ποσότητα των 24 ωρών (One-Way ANOVA $F(3,36)=666.67$ $p<0.05$) (Εικ. 3.10).



Εικόνα 3.10: Η επίδραση του 9-C23 και των 2 διαφορετικών εκχυλιζόμενων ποσοτήτων (1 και 24 ώρες) του 9-C25 στη σεξουαλική συμπεριφορά του αρσενικού *D. suzukii*. Η σεξουαλική συμπεριφορά ορίζεται ως το ποσοστό των αριθμών συζεύξεων. Η στατιστική σημαντικότητα προσδιορίστηκε με One-Way ANOVA $F(3,36)=666.67$ $p<0.05$. Τα διαφορετικά γράμματα (a, b, c και d) δηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (n=60)

Η σημασία της εκχυλιζόμενης ποσότητας στη συμπεριφορά του εντόμου επιβεβαιώθηκε και με τη μελέτη ενός επιπρόσθετου παράγοντα, αυτού του 'mating latency' (καθυστέρησης σύζευξης). Συγκεκριμένα, με την εναπόθεση του εξανίου (control) και της εκχυλιζόμενης ποσότητας της 1 ώρας, η 'καθυστέρηση σύζευξης' προσδιορίστηκε στα 1900 ± 280s και στα 1500 ± 250s αντίστοιχα. Ενώ, όταν εναποτέθηκε η εκχυλιζόμενη ποσότητα των 24 ωρών διαπιστώθηκε ότι απαιτείται λιγότερος χρόνος για μια επιτυχημένη σύζευξη, 876 ± 192 s (Εικ. 3.11).



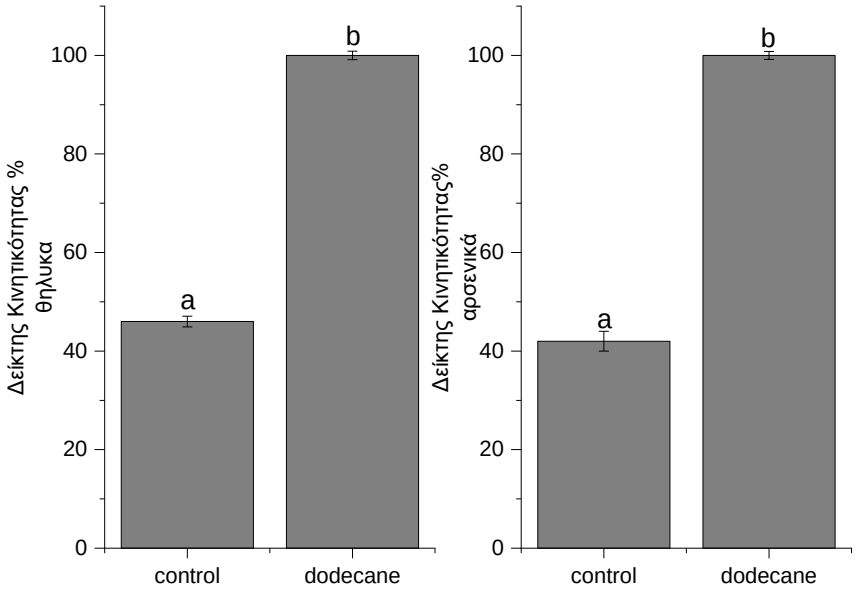
Εικόνα 3.11: Η επίδραση των 2 διαφορετικών εκχυλιζόμενων ποσοτήτων (1 και 24 ώρες) του 9-C25 στη καθυστέρηση σύζευξης (χρόνος που απαιτείται από την έναρξη του πειράματος μέχρι την επιτυχημένη σεξουαλική επαφή). Με τη μπλε γραμμή ▬ ορίζεται το control, με την κόκκινη ▬ η εκχυλιζόμενη ποσότητα της 1 ώρας και με τη μαύρη ▬ των 24 ωρών. Τα δεδομένα αναλύθηκαν μέσω της διασποράς Gauss και ο συντελεστής συσχέτισης είναι R^2=0.944 (control), R^2=0.856 και R^2=0.899 (1 και 24 ώρες εκχυλιζόμενης ποσότητας του 9-C25) (n=60)

Συμπεραίνεται λοιπόν ότι *η εκχυλιζόμενη ποσότητα των 24 ωρών του 9-C25, η οποία αντιπροσωπεύει το σημείο ισορροπίας με το διαλύτη, σε σύγκριση με την εκχυλιζόμενη ποσότητα της 1 ώρας επηρεάζει θετικά τη σεξουαλική συμπεριφορά του αρσενικού D. suzukii*. Αυτά τα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενες δημοσιευμένες έρευνες, οι οποίες αναφέρουν ότι η σεξουαλική συμπεριφορά του παρθένου *D. melanogaster* αυξήθηκε, όταν εφαρμόστηκε στο θηλυκό μεγαλύτερη δόση 9-C25 (Siwicki et al. 2005). Όπως προαναφέρθηκε η ποσότητα μιας ουσίας έχει καθοριστικό ρόλο για την ελκυστικότητα ή την απωθητικότητά της (Devaud, 2003). Ένα από τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα των εντόμων της οικογένειας Drosophilidae είναι η διαφοροποίηση της συμπεριφοράς τους ανάλογα με τη συγκέντρωση της ουσίας, η οποία τους προκαλεί το εκάστοτε ερέθισμα (Devaud, 2003). Το 9-C25 είναι μία ουσία που έχει χαρακτηριστεί ως σεξουαλική φερομόνη για το *D. melanogaster* (Jackson & Bartelt, 1986, Ferveur. & Sureau, 1996). Παράλληλα, βασιζόμενοι στον ποσοτικό προσδιορισμό των CHCs του θηλυκού και του αρσενικού *D. suzukii* (βλ. Πίνακα 3.1 & 3.2), παρατηρήθηκε ότι το θηλυκό σε ηλικία 4 ημερών, στην οποία είναι σεξουαλικά ώριμο και ικανό να παράγει απογόνους (Revadi et al. 2015), έχει τη διπλάσια ποσότητα 9-C25 απ' ότι το αρσενικό στην ίδια

ηλικία. Αυτή η παρατήρηση και σε συνδυασμό με το ότι το ίδιο έχει αναφερθεί και στο *D. melanogaster* (Siwicki et al. 2005), οδηγεί στο συμπέρασμα ότι *το 9-C25 ενδέχεται να λειτουργεί ως σεξουαλική φερομόνη για το D. suzukii*.

3.3.4 Βιολογική Δράση της Ουσίας C12

Η επιλογή του C12 για τη μελέτη της βιολογικής του δράσης πραγματοποιήθηκε καθώς ήταν μία ουσία η οποία ανιχνεύθηκε στις 24 ώρες εκχύλισης και παράλληλα έχει χαρακτηριστεί ως φερομόνη συναγερμού για διάφορα είδη εντόμων, όπως τα μυρμήγκια (Welzel et al. 2018) και τα σκαθάρια (Kou et al. 1989). Αρχικά, η επίδραση του C12 στη συμπεριφορά του *D. suzukii* μελετήθηκε με τον προσδιορισμό της κινητικότητας του εντόμου, εφαρμόζοντας μια απλή πειραματική διάταξη, mobility assay (Εικ. 3.2). Στην Εικ. 3.12 παρουσιάζεται ο 'δείκτης κινητικότητας' των αρσενικών και θηλυκών ακμαίων. Παρατηρήθηκε ότι μετά την προσθήκη 10 ng C12, μετακινήθηκαν και τα δύο φύλα σε ποσοστό 100%, ενώ όταν προστέθηκαν 10 ng εξανίου (control) η κινητικότητα των θηλυκών και των αρσενικών παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση σε ποσοστό 46% και 42% αντίστοιχα (Independent Samples T-test, θηλυκά: $t(88)=44.68$ $p<0.05$, αρσενικά: $t(88)=47.16$ $p<0.05$).

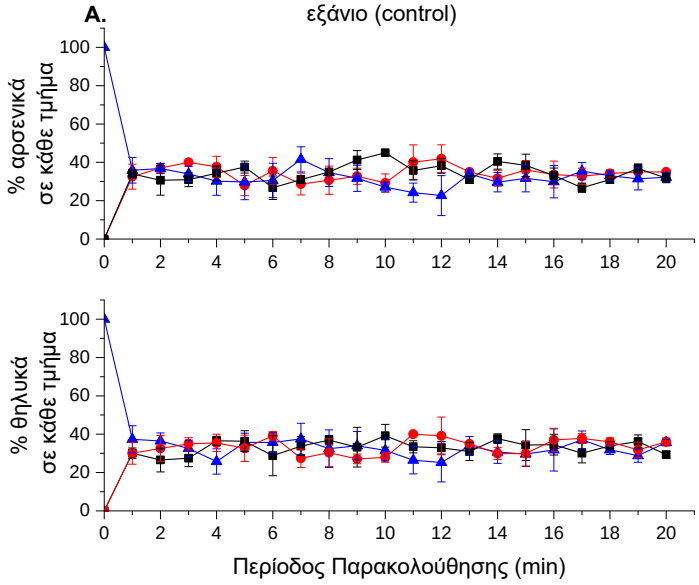


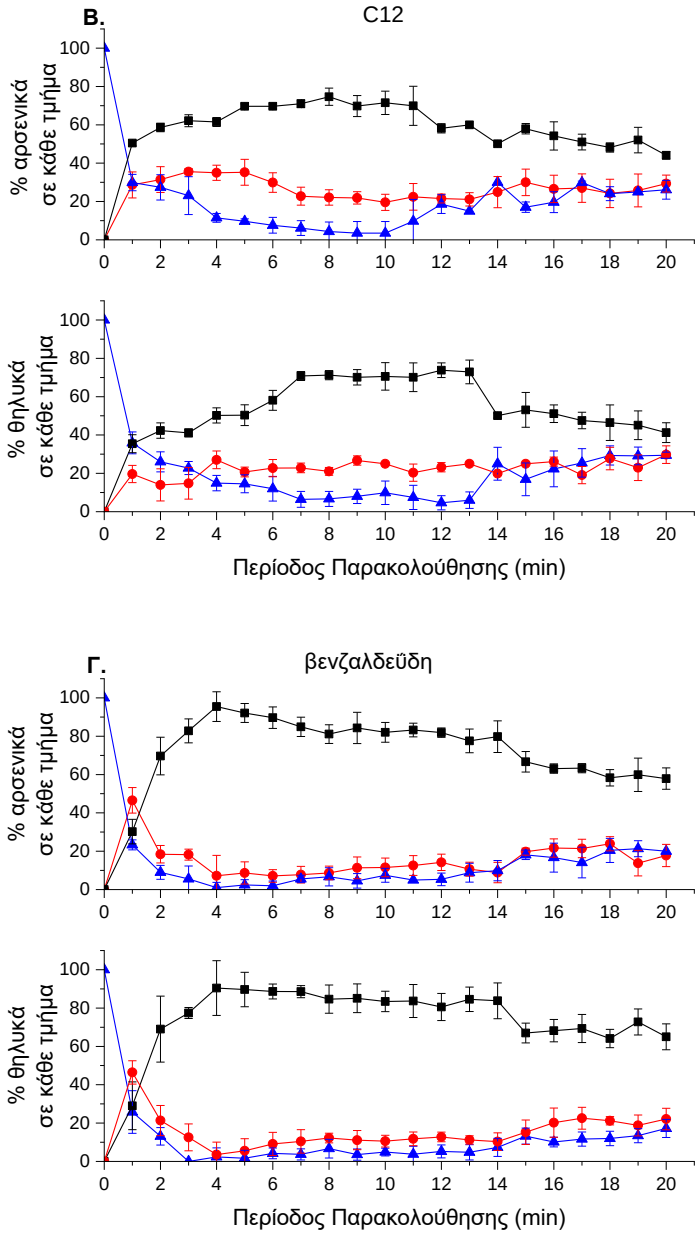
Εικόνα 3.12: Η επίδραση του C12 στην κινητικότητα (Mobility Index) των δύο φύλων του *D. suzukii*. Ως 'Mobility Index' ορίζεται το ποσοστό των εντόμων που κινήθηκαν μετά την προσθήκη του C12. Η στατιστική σημαντικότητα προσδιορίστηκε με Independent samples T-test θηλυκά: $t(88)=44.68$ $p<0.05$,

αρσενικά: $t(88)=47.16$ $p<0.05$). Τα διαφορετικά γράμματα (a και b) δηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (n=45)

Βασιζόμενοι στα παραπάνω αποτελέσματα, και διαπιστώνοντας την απόκριση του *D. suzukii* στο C12, πραγματοποιήθηκαν επιπλέον πειράματα με σκοπό μια ακριβέστερη εκτίμηση της ελκυστικής ή της απωθητικής δράσης της ουσίας. Η απόκριση αυτή ποσοτικοποιήθηκε εφαρμόζοντας τη πειραματική διάταξη test tube (Εικ. 3.3) και μετρώντας τη διασπορά των εντόμων στα τρία ίσα μέρη (αρχή, μέση και τέλος) του test tube ανά ένα λεπτό για 1200 s.

Και για τα δύο φύλα, όταν προστέθηκαν 10 ng εξανίου (control), διαπιστώθηκε ίση διασπορά των εντόμων και στα τρία μέρη του test tube. Αντίθετα, όταν εφαρμόσθηκαν 10 ng C12, παρατηρήθηκε η απωθητική δράση της ουσίας καθώς και τα δύο φύλα μετακινήθηκαν στο τελευταίο μέρος του δοκιμαστικού σωλήνα. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μία μείωση της απωθητικής δράσης του C12 μετά το πέρας των δέκα λεπτών. Αυτή η συμπεριφορά των εντόμων πιθανόν να οφείλεται στη μείωση της συγκέντρωσης του C12 στο εσωτερικό της πειραματικής διάταξης. Η ίδια τάση παρατηρήθηκε, όταν εφαρμόσθηκε η βενζαλδεΰδη, ουσία της οποίας η απωθητική δράση έχει αποδειχθεί σε έντομα της οικογένειας Drosophilidae (Εικ. 3.13 Α) εξάνιο Β) C12 Γ) βενζαλδεΰδη) (Vang et al. 2016).





Εικόνα 3.13: Η απόκριση και των δύο φύλων του *D. suzukii* Α) στο εξάνιο (control), Β) στο C12 και Γ) στη βενζαλδεΰδη. Τα γράφημα απεικονίζει το ποσοστό των εντόμων που καταμετρήθηκαν στο κάθε μέρος του δοκιμαστικού σωλήνα (▲ Αρχή, ● Μέση και ■ Τέλος) για κάθε ένα λεπτό με συνολικό χρόνο παρακολούθησης τα 20 λεπτά (n=45)

Αξιολογώντας τα παραπάνω αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι *το C12 προκαλεί μία απωθητική δράση και στα δύο φύλα του D. suzukii*. Η συμπεριφορά αυτή των εντόμων έρχεται σε συμφωνία με βιβλιογραφικές αναφορές, οι οποίες αναφέρουν ότι τα έντομα της οικογένειας Drosophilidae τείνουν να αποφεύγουν θαλάμους (T-maze assay) που περιέχουν, είτε ουσίες που τους προκαλούν άγχος (Devaud, 2003), είτε ουσίες που δρουν ως φερομόνες συναγερμού (Enjin &

Bae Suh, 2013). *Συμπεραίνεται μέσα από τη μελέτη της επίδρασης της ουσίας C12 στα ακμαία του D. suzukii, ότι η 1 ώρα εκχύλισης που συνηθίζεται να εφαρμόζεται για τον ποιοτικό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των CHCs, δεν είναι πάντα επαρκής, καθώς το C12 ανιχνεύεται μετά τις 24 ώρες εκχύλισης και λειτουργεί απωθητικά για το D. suzukii.*

Κεφάλαιο 4

Μελέτη της Επίδρασης του Φύλου και της Ηλικίας στους Επιδερμικούς Υδρογονάνθρακες του *D. suzukii*

4.1 Εισαγωγή

Η παραγωγή των CHCs επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως είναι το φύλο, η ηλικία (Kuo et al. 2012), η σεξουαλική ωριμότητα (Gibbs & Markow, 2001), η κοινωνικοποίηση, η φωτοπερίοδος, η θερμοκρασία (Gershman et al. 2014) και η τροφή (Carvalho et al. 2012, Fedina et al. 2012). Στον παρόν κεφάλαιο θα μελετηθεί η επίδραση του φύλου και της ηλικίας, καθώς αυτοί οι δύο είναι καθοριστικής σημασίας για το CHC προφίλ ενός εντόμου.

Ο πρώτος πιο σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει το CHC προφίλ ενός εντόμου είναι το φύλο. Σε πολλά διμορφικά είδη της οικογένειας Drosophilidae, όπως για παράδειγμα στο *D. melanogaster*, το *D. sechellia* και το *D. simulans,* το αρσενικό φύλο παράγει CHCs, οι οποίοι δεν ανιχνεύονται στο θηλυκό (Jallon, 1984). Συγκεκριμένα, το αρσενικό *D. melanogaster* παράγει αλκένια και τη φερομόνη (Z) οκταδεκ-1-ένυλο εστέρας (cis-vacenyl-acetate, cVA) ενώ το θηλυκό παράγει διένια (Grillet et al. 2006, Billeter & Levine, 2013). Αντίθετα, στα μονομορφικά είδη, όπως το *D. virillis* και το *D. takahashii*, και τα δύο φύλα παρουσιάζουν το ίδιο CHC προφίλ, το οποίο διαφοροποιείται ως προς την αφθονία των CHCs (Barlet et al. 1986, Toolson & Kuper-Simbron et al. 1989, Shirangi et al. 2009). Παράλληλα, υπάρχουν μονομορφικά είδη, όπως για παράδειγμα το *D. birchii* και το *D. serrata*, στα οποία δεν έχει διαπιστωθεί κάποια ποσοτική διαφοροποίηση των CHCs μεταξύ των δύο φύλων (Howard et al. 2003).

Η αύξηση της ηλικίας στους έμβιους οργανισμούς σχετίζεται άμεσα με τη γήρανσή τους. Η γήρανση ορίζεται ως η μη αναστρέψιμη διαδικασία που οδηγεί στη σταδιακή επιδείνωση της φυσιολογικής λειτουργίας ενός οργανισμού (Grotewiel et al. 2005, Lopez-Otin et al. 2013). Μελέτες έχουν αποδείξει ότι η γήρανση επηρεάζει το CHC προφίλ διαφόρων ειδών εντόμων, όπως είναι τα κουνούπια, οι μέλισσες και τα μυρμήγκια (Hugo et al. 2006, Ichinose & Lenoir, 2009, Nunes et al. 2009). Ένα από τα χαρακτηριστικά της γήρανσης στα έντομα της οικογένειας Drosophilidae είναι η μείωση της γονιμότητάς τους, καθιστώντας, τα νεαρά έντομα σεξουαλικώς ανταγωνιστικότερα σε σύγκριση με εκείνα της μεγαλύτερης ηλικίας (Dickson, 2008, Keller et al.

2009). Οι CHCs αποκαλύπτουν την ηλικία ενός εντόμου λειτουργώντας είτε ως ελκυστικές, είτε ως απωθητικές ουσίες (Hill, 2011, Kuo et al. 2012).

Όπως έχει προαναφερθεί ένας από τους κύριους ρόλους των CHCs είναι η επικοινωνία μεταξύ των εντόμων του ίδιου είδους με σκοπό τη μεταφορά πληροφοριών συνάθροισης, γονιμοποίησης, συναγερμού και αναγνώρισης του είδους (Howard, 1982, Cardé & Baker, 1984, Yew & Chung, 2015). Τα αισθητήρια όργανα της όσφρησης είναι εκείνα τα οποία αντιλαμβάνονται ουσίες που είναι περισσότερο πτητικές δηλαδή με μικρή μοριακή μάζα (Bray & Amrein, 2003). Αντίθετα, τα αισθητήρια όργανα της γεύσης, όπως είναι τα πόδια του εντόμου (ταρσός) και οι προβοσκίδα του αντιλαμβάνονται λιγότερο πτητικές ουσίες, δηλαδή με μεγάλη μοριακή μάζα (Jallon, 1984).

Μέχρι σήμερα λίγες είναι οι βιβλιογραφικές αναφορές που εστιάζονται στο φερομονικό προφίλ του *D. suzukii*. Συγκεκριμένα έχει διαπιστωθεί ότι το *D. suzukii* είναι μονομορφικό είδος και δεν παράγει τη φερομόνη cVA (Dekker et al. 2015). Επιπλέον πρόσφατα αποδείχθηκε ότι οι συνολικοί CHCs του θηλυκού *D. suzukii* αυξάνονται στην ηλικία των 4 ημερών και η αύξηση αυτή σχετίζεται με τη σεξουαλική ωριμότητα του εντόμου καθώς στην ηλικία αυτή το έντομο μπορεί να παράγει απογόνους (Revadi et al. 2015, Snellings et al. 2018). Στον παρόν κεφάλαιο εξετάζεται πώς οι παράγοντες του φύλου και της ηλικίας επηρεάζουν το CHC προφίλ του *D. suzukii*. Πραγματοποιήθηκε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των CHC και των δύο φύλων σε τρεις διαφορετικές ηλικίες, **α)** την ημέρα της εκκόλαψή τους (ηλικίας 1 ημέρας), **β)** την ημέρα όπου θεωρούνται σεξουαλικά ώριμα (ηλικίας 4 ημερών) και **γ)** κατά το τέλος του βιολογικού τους κύκλου (ηλικίας 25 ημερών). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν βιοδοκιμές στην ουσία 9-εικοσιενένιο (9-heneicosene, 9-C21) που ανιχνεύθηκε, με σκοπό να μελετηθεί η βιολογική της δράση.

4.2 Πειραματικό Μέρος

4.2.1 Εκχύλιση CHCs

Το *D. suzukii* καλλιεργήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες που αναφέρονται στο Παράρτημα Ι. Με την έναρξη της φωτόφασης 15 κοινωνικοποιημένα έντομα του ίδιου φύλου ηλικίας 1, 4 και 25 ημερών, συλλέγονται τυχαία από τα δοχεία εκτροφής, αναισθητοποιούνται και ζυγίζονται. Έπειτα τα έντομα τοποθετούνται σε Eppendorf tube και πραγματοποιείται η εκχύλιση των CHCs τους, όπως περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Για τον κάθε παράγοντα που εξετάζεται πραγματοποιούνται 10 επαναλήψεις (n=10) και η κάθε επανάληψη μετριέται 3 φορές (Εικ. 2.1).

4.2.2 Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζας

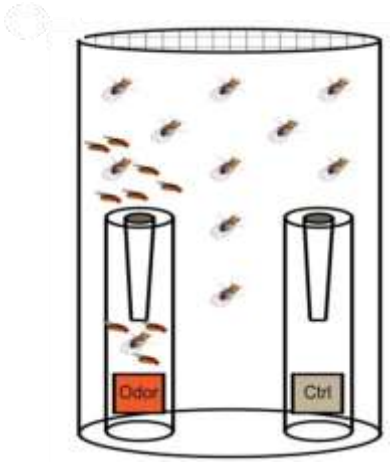
Για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των CHCs του *D. suzukii* χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική μέθοδος GC-MS και η παρακολούθηση ιόντος έγινε με πλήρη σάρωση (Full Scan, FS). Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και ο τρόπος ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού περιγράφονται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2.

4.2.3 Βιοδοκιμές

Βασιζόμενοι στον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των CHCs, των θηλυκών και των αρσενικών *D. suzukii* στις τρεις διαφορετικές ηλικίες, επιλέχθηκε η ουσία 9-C21 με σκοπό τη μελέτη επίδρασής της στη συμπεριφορά του εντόμου. Η ουσία 9-C21 επιλέχθηκε, καθώς στην ηλικία της 1^{ης} ημέρας δεν ανιχνεύεται σε κανένα από τα δύο φύλα του *D. suzukii*, ενώ ανιχνεύεται στην ηλικία των 4 και 25 ημερών. Το 9-C21 σε αναλογία cis:trans=73:27 συντέθηκε από τον υποψήφιο διδάκτορα Εμμανουήλ Σοφιαδή, Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης με υπεύθυνο τον καθ. Γεώργιο Βασιλικογιαννάκη.

Fly Trap Assay (Βιοδοκιμή Παγίδευσης): Στις ήδη υπάρχουσες βιβλιογραφικές αναφορές το 9-C21 έχει χαρακτηριστεί ως φερομόνη συνάθροισης για το *D. americana*, το *D. texana* και το *D. novamexicana* (Bartelt et al. 1986a, Bartelt et al. 1986b). Επομένως, για τη μελέτη της βιολογικής του δράσης εφαρμόστηκε η πειραματική διάταξη ‘fly trap assay’ (Εικ. 4.1)

(Larsson et al. 2004, Ogueta et al. 2010). Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκε ποτήρι ζέσεως (1000 ml), στο οποίο τοποθετήθηκε καπάκι με μικρή οπή, με σκοπό την εισαγωγή των εντόμων στο εσωτερικό του. Δύο κυλινδρικά δοχεία (68 ml το καθένα), στο εσωτερικό των οποίων προστέθηκε τροφικό υπόστρωμα (5 ± 0.5 gr), τοποθετήθηκαν στο εσωτερικό του (Εικ. 4.1). Το κάθε δοχείο σφραγίστηκε με καπάκι, στο οποίο είχε προσαρμοστεί tip πιπέτας.



Εικόνα 4.1: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διάταξης ‘fly trap assay’

Στο ένα δοχείο τοποθετήθηκε διηθητικό χαρτί στο οποίο προστέθηκε 1 μl διαλύματος 9-C21 σε εξάνιο και στο άλλο προστέθηκε 1 μl εξάνιο (control). Μελετήθηκε η επίδραση τεσσάρων διαφορετικών ποσοτήτων 9-C21 (5 ng, 10 ng, 100 ng, και 1000 ng) στη συμπεριφορά των γονιμοποιημένων και μη, θηλυκών και αρσενικών εντόμων (1, 4 και 25 ημερών). Εικοσιπέντε ακμαία (θηλυκά ή αρσενικά) μεταφέρθηκαν στο εσωτερικό της πειραματικής διάταξης, όπου παρέμειναν για 10 λεπτά με σκοπό να επιλέξουν το αντίστοιχο δοχείο. Στη συνέχεια μετρήθηκε ο αριθμός των εντόμων σε κάθε δοχείο και υπολογίστηκε ο ‘δείκτης προτίμησης’.

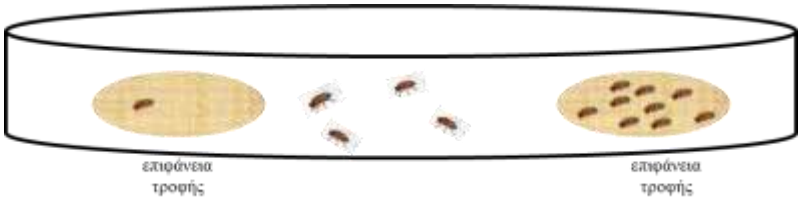
$$\Delta.\Pi. = \frac{N_{9-C21} - N_{control}}{N_{total}} \qquad \textbf{(Σχ. 4.1)}$$

Όπου : Δ.Π.-Δείκτης Προτίμησης
$N_{9\text{-}C21}$- αριθμός εντόμων, που επέλεξαν το δοχείο με την ουσία 9-C21
$N_{control}$- αριθμός εντόμων, που επέλεξαν το δοχείο με το εξάνιο
N_{total}- συνολικός αριθμός εντόμων, που επέλεξαν και τα δύο δοχεία

Όταν η τιμή ήταν Δ.Π.>0 σημειώθηκε η προτίμηση των εντόμων στην ουσία, όταν ήταν Δ.Π.<0 σημειώθηκε η αποστροφή των εντόμων στην ουσία και όταν ήταν Δ.Π.=0 τα έντομα διαχωρίστηκαν εξίσου και στα δύο δοχεία. Η μέτρηση δεν λαμβάνεται υπόψιν στην

περίπτωση που η προτίμηση των δοχείων είναι μικρότερη από το 80% του συνόλου των εντόμων. Ο αριθμός των επαναλήψεων για κάθε παράγοντα (φύλο, ηλικία, ποσότητα ουσίας) ήταν 20 φορές (n=20).

Oviposition Assay (Βιοδοκιμή Ωοτοκίας): Οι βιοδοκιμές ωοτοκίας εφαρμόσθηκαν με σκοπό την περαιτέρω μελέτη του 9-C21 ως ουσία που προκαλεί συνάθροιση προσελκύοντας τα θηλυκά για να ωοτοκήσουν. Σε ένα τρυβλίο Petri (εσωτερικής διαμέτρου 8 cm) τοποθετήθηκαν δύο κυκλικές επιφάνειες υποστρώματος τροφής (5 ± 0.5 gr) (Εικ. 4.2).



Εικόνα 4.2: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διάταξης ‘oviposition assay’

Στη μία επιφάνεια προστέθηκε 1 μl διαλύματος 9-C21 σε εξάνιο και στη δεύτερη προστέθηκε 1 μl εξάνιο. Έπειτα τοποθετήθηκαν 15 παρθένα θηλυκά (ηλικίας 4 ημερών) και 5 παρθένα αρσενικά (ηλικίας 4 ημερών). Τα έντομα παρέμειναν στο τρυβλίο για 24 ώρες με σκοπό τη γονιμοποίηση των θηλυκών και έπειτα απομακρύνθηκαν (Tai et al. 2018). Μετά το πέρας 7 ημερών, καταμετρήθηκε ο αριθμός των αυγών στις δύο διαφορετικές επιφάνειες τροφής (Joseph et al. 2009). Οι συγκεντρώσεις του 9-C21, οι οποίες μελετήθηκαν ήταν τα 5 ng/μl και 10 ng/μl. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ελέγχου προσθέτοντας εξάνιο και στις δύο επιφάνειες τροφής. Πραγματοποιήθηκαν είκοσι επαναλήψεις για κάθε δοκιμή (n=20).

4.2.4 Στατιστική Ανάλυση

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίσθηκε η μέση τιμή (mean) και η τυπική απόκλιση (standard deviation, sd). Οι *p* τιμές για τη στατιστική ανάλυση των CHC του εντόμου στις 3 διαφορετικές ηλικίες καθώς και για την ανάλυση των βιοδοκιμών πραγματοποιήθηκε είτε με το Independent Sample T-test, είτε με One Way Anova. Η *p* τιμή ορίστηκε στο 0.05, η οποία αντιστοιχεί σε όριο εμπιστοσύνης 95%.

4.3 Αποτελέσματα - Συζήτηση

4.3.1 Επίδραση Φύλου και Ηλικίας στο CHC Προφίλ του *D. suzukii*

Αναλύοντας τους CHCs του *D. suzukii* δε διαπιστώθηκε κάποια ποιοτική διαφοροποίηση μεταξύ των δύο φύλων επομένως επιβεβαιώθηκε ότι το CHC προφίλ του εντόμου είναι μονομορφικό (Dekker et al. 2015). Αντίθετα διαπιστώθηκαν ποσοτικές διαφοροποιήσεις. Σε θηλυκά και αρσενικά ηλικίας 1 ημέρας οι CHCs δε διαφοροποιούνται ποσοτικά μεταξύ τους. Αντίθετα, στην ηλικία των 4 ημερών τα θηλυκά παρουσίασαν στατιστικά μεγαλύτερη ποσότητα από τα αρσενικά, στις ουσίες 7-εικοσιτριένιο (7-tricosene, 7-C23), 5-εικοσιτετρένιο (5-tetracosene, 5-C24), 9-εικοσιπεντένιο (9-pentacosene, 9-C25), 7-εικοσιπεντένιο (7-pentacosene, 7-C25), εικοσιπεντάνιο (pentacosane, C25), εικοσιεπτάνιο (heptacosane, C27) και 2-μέθυλοεικοσιοκτάνιο (2-methyloctacosane, 2-MeC28), με τη μεγαλύτερη διαφορά να εμφανίζεται στο 7-C23. Στην ηλικία των 25 ημερών τα θηλυκά εμφάνισαν στατιστικά μεγαλύτερη ποσότητα στις ουσίες 7-C23, 9-C25, 7-C25 και C27 (Πίνακας 4.1, βλ. στήλη Φύλο).

Πίνακας 4.1: Η επίδραση του φύλου και της ηλικίας στους CHCs του *D. suzukii*

								Φύλο				Ηλικία			
1Θ	**1Α**	**4Θ**	**4Α**	**25Θ**	**25Α**	**CHCs**	**1Θ-1Α**	**4Θ-4Α**	**25Θ-25Α**	**1Θ-4Θ**	**1Θ-25Θ**	**4Θ-25Θ**	**1Α-4Α**	**1Α-25Α**	**4Α-25Α**
0.0	0.0	4.4±0.5	3.9±0.7	4.1±0.9	3.1±0.4	**C19**				***	***		***	***	
0.0	0.0	7.5±0.9	6.7±1.1	6.8±1.1	5.1±0.9	**UNI1**				***	***		***	***	
0.0	0.0	11.0±0.9	9.8±1.2	10.9±1.6	8.1±1.7	**UNI2**				***	***		***	***	
0.0	0.0	6.6±0.6	5.9±1.2	7.9±1.2	8.6±1.2	**C20**				***	***		***	***	
0.0	0.0	2.6±0.6	3.1±0.1	3.4±0.8	4.1±1.1	**9-C21:1**				***	***		***	***	
0.0	0.0	22.0±1.6	18.7±3.7	28.7±2.9	23.7±3.4	**7-C21:1**				***	***		***	***	
0.0	0.0	13.7±1.4	11.2±0.9	11.9±3.8	6.1±1.9	**5-C21:1**				***	***		***	***	
211.8±38.7	197.4±19.7	867.1±57.6	759.1±113.8	917.7±86.2	861.9±74.3	**C21**				**	**		**	**	
4.1±0.9	3.9±0.7	7.1±0.5	6.4±2.1	5.9±1.7	6.1±1.9	**2-MeC20**				*			*		
5.4±1.2	4.8±0.4	9.1±0.7	7.9±1.2	8.8±1.6	8.5±0.3	**2-MeC21**				*			*	*	
0.7±0.2	0.5±0.2	2.6±0.3	2.4±0.4	4.8±1.4	5.3±0.6	**6,9-C22:2**				*	*		*	*	
4.7±0.9	3.8±0.7	14.7±0.6	11.1±1.8	18.2±3.7	16.7±2.3	**9-C22:1**				*	*		*	*	
15.7±2.2	11.9±3.5	95.6±6.1	88.9±12.9	148.7±19.7	134.0±14.6	**7-C22:1**				**	**	*	**	**	*
0.8±0.2	0.5±0.1	7.3±2.4	5.4±1.3	8.7±1.4	9.1±2.1	**5-C22:1**				*	*		*	*	
14.5±3.7	12.3±3.9	39.4±2.6	35.9±1.7	48.4±6.9	51.4±5.7	**C22**				*	*		*	*	*
17.8±3.4	15.7±4.6	83.7±5.6	79.8±3.4	104.8±12.1	98.7±11.4	**2-MeC22**				*	*		*	*	
3.4±1.7	4.1±1.3	96.4±6.5	89.7±15.1	117.5±9.7	99.2±5.1	**6,9-C23:2**				**	**		**	**	
83.7±11.7	78.9±9.6	518.1±36.4	523.8±31.4	516.7±24.7	543.9±13.7	**9-C23:1**				**	**		**	**	
614.8±21.4	584.3±42.9	3297.1±245.4	2787.6±154.2	3412.8±176.9	2547.2±85.4	**7-C23:1**		*	*	***	***		***	***	
67.4±8.7	53.9±11.7	206.4±18.4	163.4±26.1	315.4±14.6	299.4±21.3	**5-C23:1**				**	**	*	**	**	*
117.5±7.6	98.2±14.2	995.1±67.7	899.7±19.5	1123.8±134.5	987.6±25.3	**C23**				**	**		**	**	
3.8±1.4	6.4±2.8	4.3±2.3	7.2±1.4	5.1±1.9	5.9±1.7	**UNI3**									
5.1±2.7	2.6±1.4	8.4±0.6	4.8±2.7	12.7±2.4	8.9±2.1	**3-MeC23**									
4.8±1.9	4.1±0.5	9.4±1.1	9.4±0.3	14.1±2.1	13.1±1.3	**9-C24:1**				*	*	*	*	*	*
8.7±3.1	7.4±2.1	33.1±1.7	26.7±3.9	39.8±3.7	37.6±2.4	**7-C24:1**				*	*	*	*	*	*
2.7±0.8	1.1±0.4	22.1±1.4	7.2±0.3	25.7±3.2	17.7±4.7	**5-C24:1**		*		*	*		*	*	*
11.7±2.8	9.7±0.8	20.2±1.8	18.4±1.2	29.7±3.7	31.4±2.4	**C24**				*	*	*	*	*	*
10.4±1.3	7.9±2.6	20.1±1.7	15.7±5.1	21.9±2.3	25.9±3.1	**2-MeC24**				*	*		*	*	*
21.4±2.2	18.7±1.9	40.7±3.4	32.4±2.3	66.7±5.9	61.2±3.7	**6,9-C25:2**				*	*	*	*	*	*

23.4±2.7	12.9±3.2	50.9±4.8	25.8±1.7	79.8±6.4	62.8±4.1	**9-C25:1**	*	*	*	*	*	*	*	*
54.7±3.8	48.9±3.7	193.9±14.7	123.7±6.1	367.7±42.1	287.3±4.7	**7-C25:1**	*	*	**	**	*	**	**	*
1.4±0.7	0.9±0.1	19.9±0.5	17.1±1.3	31.5±6.7	24.9±2.7	**5-C25:1**			*	*	*	*	*	*
38.7±6.9	26.8±3.7	215.9±11.6	164.9±1.7	278.2±86.7	182.7±12.4	**C25**	*		**	**		**	**	*
36.8±8.2	35.7±3.8	19.3±4.6	20.8±1.7	18.1±2.6	15.7±3.1	**C26**			*	*		*	*	
85.7±7.4	76.8±2.8	33.9±2.2	29.1±1.4	19.3±3.8	14.8±2.1	**2-MeC26**			*	*	*	*	*	*
59.4±6.4	59.7±1.7	10.7±1.3	8.7±0.8	0.0	0.0	**9-C27:1**			*	*	***	*	*	***
83.9±9.6	81.5±3.4	27.2±1.6	24.8±4.1	24.1±3.6	12.3±1.8	**7-C27:1**			*	*		*	*	*
87.4±6.1	76.8±8.4	132.9±7.9	69.7±1.7	189.5±20.1	78.3±3.8	**C27**	*	*	*	*	*	*	*	
81.1±8.7	74.6±18.4	43.5±3.7	38.7±0.8	41.2±4.1	30.8±10.8	**C28**			*	*		*	*	
80.9±4.7	78.6±9.7	23.9±2.1	18.9±3.4	20.9±3.7	14.9±4.7	**UNI4**			*	*		*	*	
341.7±39.1	320.9±11.3	155.1±9.9	123.9±1.7	106.7±15.2	95.7±3.9	**2-MeC28**	*		*	*	*	*	*	*
187.7±5.9	201.3±9.4	0.0	0.0	0.0	0.0	**11-C29:1**			***	***		***	***	
151.9±9.1	163.7±3.2	0.0	0.0	0.0	0.0	**9-C29:1**			***	***		***	***	
161.8±6.7	123.7±15.4	40.1±3.9	36.1±2.8	33.1±7.2	26.7±2.9	**7-C29:1**			*	*		*	*	*
134.0±4.1	124.8±11.2	98.5±14.6	78.9±13.6	71.2±6.1	53.6±6.7	**C29**			*	*	*	*	*	*
38.0±6.8	39.7±2.7	0.0	0.0	0.0	0.0	**C30**			***	***		***	***	
51.2±3.1	46.8±2.9	0.0	0.0	0.0	0.0	**x,y-C31:2**			***	***		***	***	
79.7±4.2	64.8±3.1	0.0	0.0	0.0	0.0	**x,y-C31:2**			***	***		***	***	
98.7±9.7	87.8±4.4	13.9±1.6	13.4±2.4	12.7±4.7	11.2±3.1	**2-MeC30**			*	*		*	*	
77.1±6.2	64.1±6.5	0.0	0.0	0.0	0.0	**9-C31:1**			***	***		***	***	
75.9±4.2	68.9±4.7	0.0	0.0	0.0	0.0	**7-C31:1**			***	***		***	***	
19.9±4.1	17.4±2.3	0.0	0.0	0.0	0.0	**C31**			***	***		***	***	
24.7±6.7	23.9±4.1	0.0	0.0	0.0	0.0	**C32**			***	***		***	***	
19.5±3.4	17.9±3.4	0.0	0.0	0.0	0.0	**x,y,z-C33:3**			***	***		***	***	
17.2±4.3	19.1±2.9	0.0	0.0	0.0	0.0	**x,y-C33:2**			***	***		***	***	
31.4±5.9	28.4±1.8	0.0	0.0	0.0	0.0	**C33**			***	***		***	***	

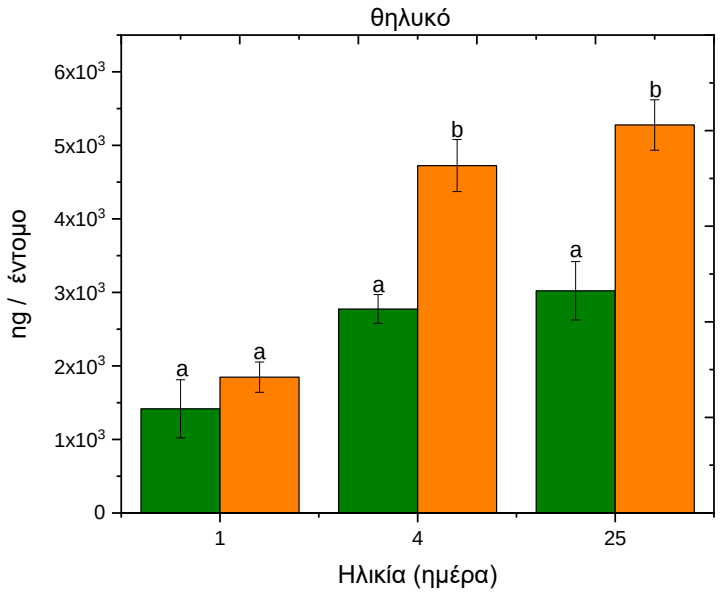
Η επίδραση του φύλου (Θ-θηλυκό, Α-αρσενικό) και της ηλικίας (1, 4, 25 ημερών) του *D. suzukii* στο CHC προφίλ. Οι *p* τιμές υπολογίσθηκαν με Independent Sample T- test, *p* τιμές: *<0.05, **<0.01, ***<0.001.

Αναλύοντας την επίδραση του παράγοντα της ηλικίας διαπιστώθηκε ότι η ηλικία επηρεάζει ποιοτικά και ποσοτικά την παραγωγή των CHCs του *D. suzukii*, παρατήρηση η οποία συμφωνεί με προηγούμενες βιβλιογραφικές αναφορές (Revadi et al. 2015, Snellings et al. 2018). Αναλυτικότερα παρατηρήθηκε ότι την πρώτη ημέρα μετά την εκκόλαψη των εντόμων (ηλικίας 1 ημέρας), το θηλυκό και το αρσενικό είχαν την ίδια συνολική ποσότητα υδρογονανθράκων (3374.7 ± 307.4 ng για το θηλυκό και 3114.5 ± 274.6 ng για το αρσενικό). Η μεγαλύτερη διαφοροποίηση στο CHC προφίλ και των δύο φύλων διαπιστώθηκε, όταν η ηλικία τους αυξήθηκε από την 1 στις 4 ημέρες, καθώς η ποσότητά τους σχεδόν διπλασιάστηκε. Στην ηλικία των 4 ημερών η συνολική ποσότητα ήταν 7545.4 ± 556 ng και 6436.7 ± 456.2 ng για το θηλυκό και το αρσενικό αντίστοιχα. Στην ηλικία της 25^{η} ημέρας, στο θηλυκό παρατηρήθηκε αύξηση της ποσότητας των CHCs (8335 ± 747 ng), ενώ στο αρσενικό η ποσότητα παρέμεινε σταθερή (6830.5 ± 369.1 ng) (Πίνακας 4.2).

Πίνακας 4.2: Συνολική ποσότητα CHCs και για τα δύο φύλα του *D. suzukii* στις 3 ηλικίες

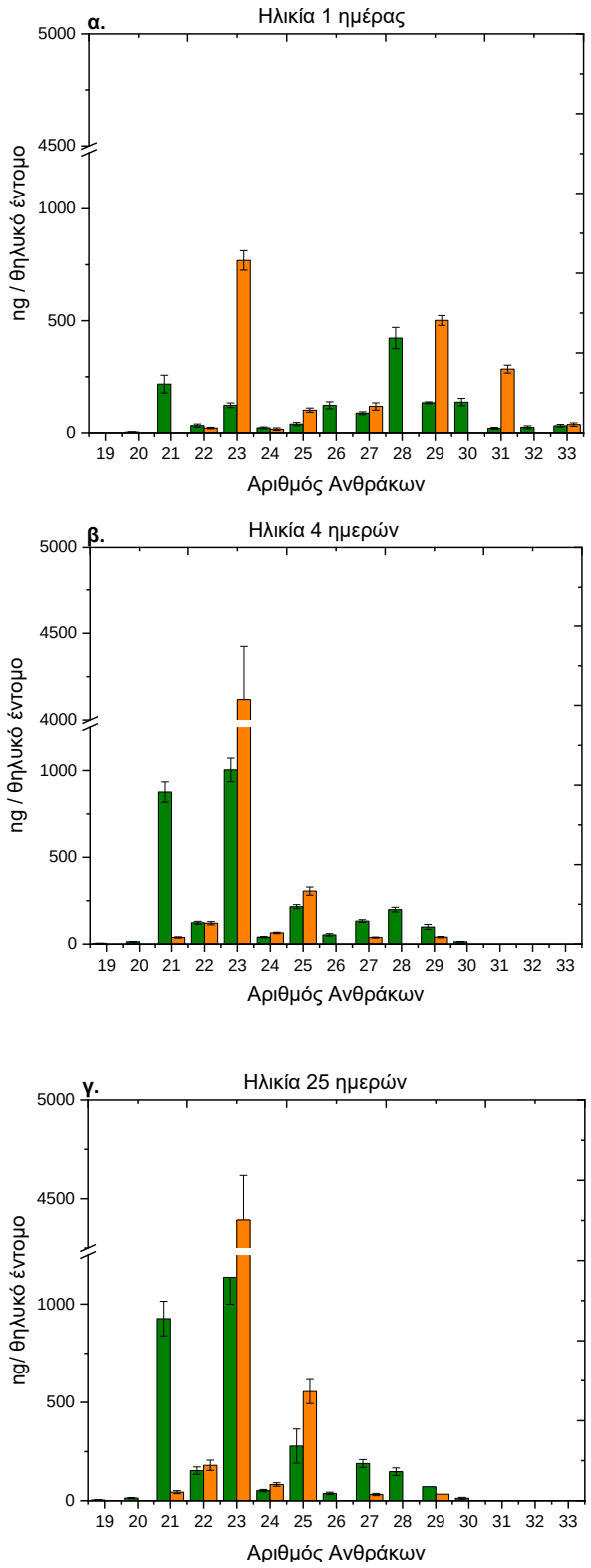
Ηλικία (μέρες)	CHCs (ng) θηλυκό	CHCs (ng) αρσενικό
1	3374.7 ± 307.4	3114.5 ± 274.6
4	7545.4 ± 556.0	6436.7 ± 456.2
25	8335.0 ± 747.0	6830.5 ± 369.1

Επιπλέον, στην ηλικία της 1 ημέρας η ποσότητα των κορεσμένων υδρογονανθράκων και για τα δύο φύλα του *D. suzukii*, ήταν ίδια με εκείνη των ακόρεστων (Independent Sample T-test t(18)=-2.5 *p*=0.22). Αντίθετα, στην ηλικία των 4 και των 25 ημερών οι ακόρεστοι υδρογονάνθρακες ήταν στατιστικά σημαντικά περισσότεροι από τους κορεσμένους (Independent Sample T-test 4 ημερών, t(18)=-9,8 *p*=0.25 ημερών t(18)=-18.3 *p*=0). Στην Εικ. 4.3 απεικονίζονται ως παράδειγμα οι CHCs του θηλυκού.

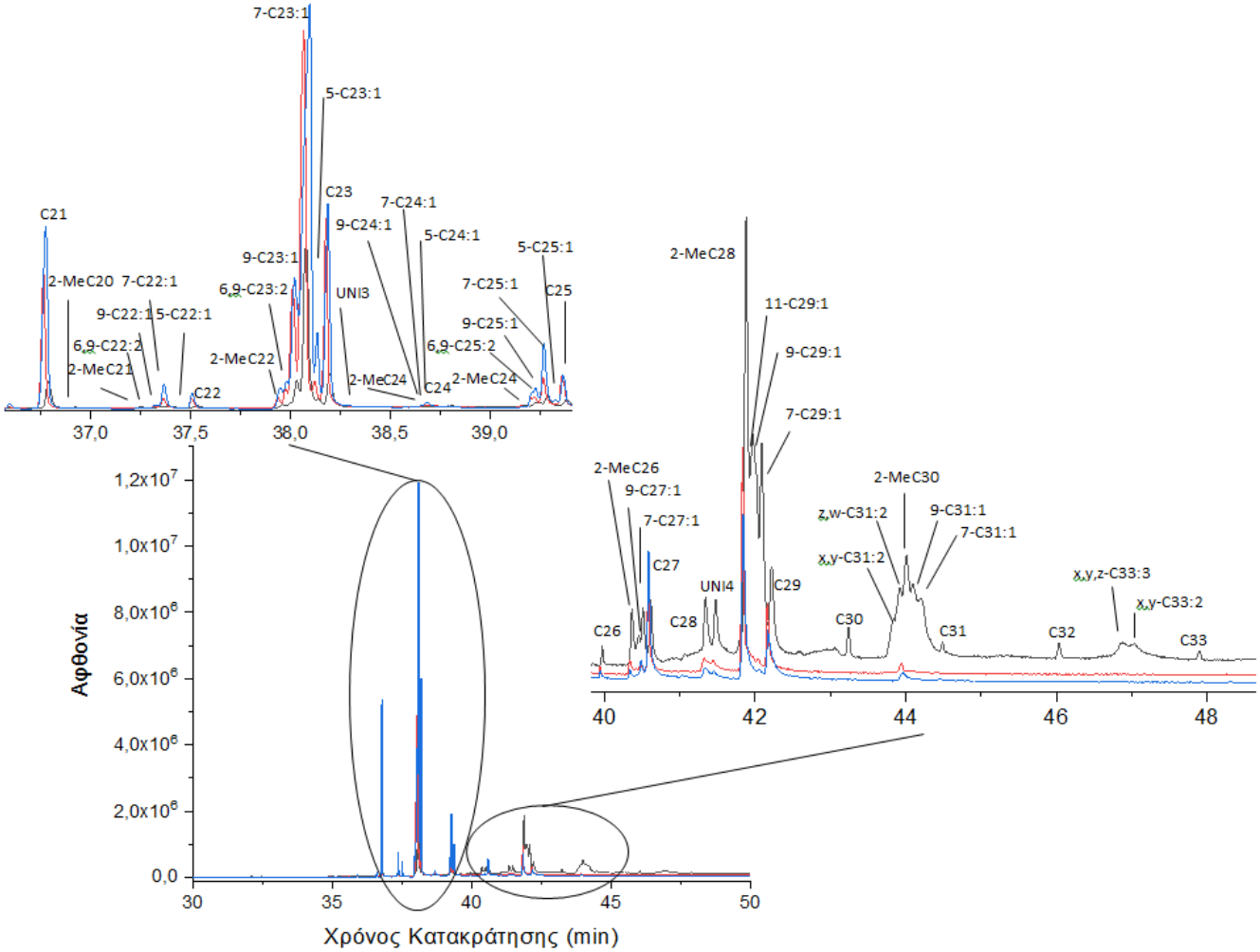


Εικόνα 4.3: Κορεσμένοι και ακόρεστοι CHCs του θηλυκού *D. suzukii* σε τρεις ηλικίες (1, 4 και 25 ημερών). Η πράσινη μπάρα αναπαριστά τους κορεσμένους και η ποστοκαλί τους ακόρεστους υδρογονάνθρακες. Τα διαφορετικά γράμματα (a και b) δηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των κορεσμένων και των ακόρεστων CHCs (n=10) ($p<0.05$)

Η αύξηση της ηλικίας επηρέασε με διαφορετικό τρόπο την παραγωγή των υδρογονανθράκων ως προς το μήκος της ανθρακικής τους αλυσίδας. Συγκεκριμένα και στα δύο φύλα η αύξηση της ηλικίας οδήγησε σε αύξηση των CHCs με μικρή ανθρακική αλυσίδα (C19 έως C25) και σε μείωση των CHCs με μεγάλη ανθρακική αλυσίδα (C26 έως C33). Αναλυτικότερα διαπιστώθηκε οι CHCs του *D. suzukii* με μικρή μοριακή μάζα (Mr = 268 έως 352) αυξήθηκαν με την αύξηση της ηλικίας, ενώ οι CHCs με μεγάλη μοριακή μάζα (Mr = 366 έως 464) είτε δεν παράγονται καθόλου είτε η παραγόμενη ποσότητα τους μειώνεται. Στην Εικ. 4.4 α, β, γ απεικονίζονται ως παράδειγμα οι CHCs του θηλυκού σε ηλικία 1, 4 και 25 ημέρες αντίστοιχα. Οι κορεσμένοι υδρογονάνθρακες C19, C20 και οι ακόρεστοι C21 δεν ανιχνεύονται στην ηλικία της 1 ημέρας, ενώ οι κορεσμένοι υδρογονάνθρακες C30, C31, C32 και C33 και οι ακόρεστοι C29, C31 και C33 δεν ανιχνεύονται στα έντομα ηλικίας 4 και 25 ημερών (Εικ. 4.5). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι επειδή ο τρόπος επίδρασης της ηλικίας είναι κοινός και στα δύο φύλα του *D. suzukii* πιθανότατα οι αλλαγές στο προφίλ του εντόμου να οφείλονται σε παρόμοιους βιοχημικούς μηχανισμούς.



Εικόνα 4.4: Ποσότητα κορεσμένων και ακόρεστων CHC για τοθηλυκό *D. suzukii* στην ηλικία α) 1 ημέρας β) 4 ημερών και γ) 25 ημερών. Η πράσινη μπάρα αναπαριστά τους κορεσμένους και η πορτοκαλί τους ακόρεστους (n=10)



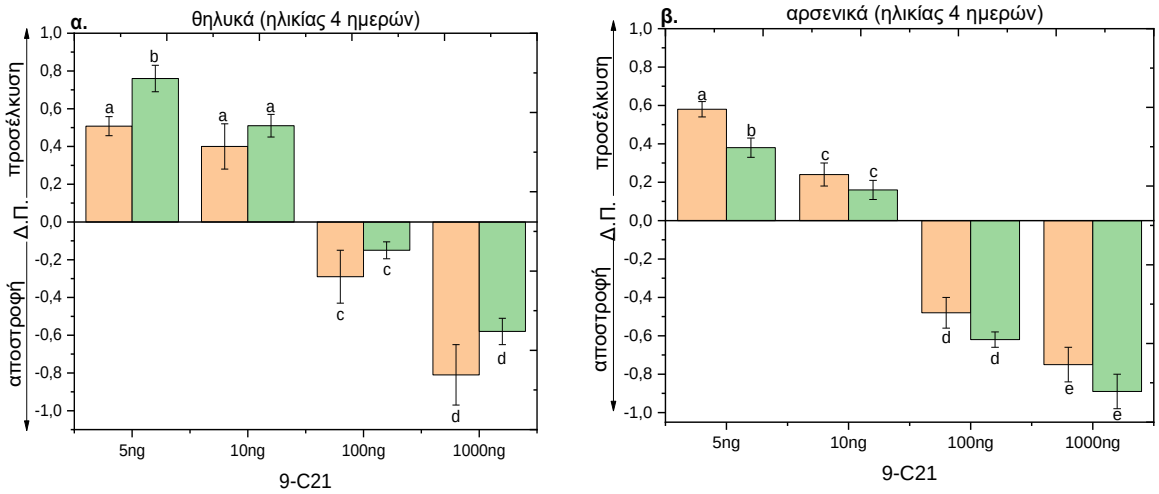
Εικόνα 4.5: Χρωματογράφημα θηλυκού *D. suzukii* στις τρεις διαφορετικές ηλικίες (1 ημέρας με μαύρο, 4 ημερών με κόκκινο και 25 ημερών με μπλε)

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η αυξημένη και η μειωμένη αφθονία των υδρογονανθράκων με μεγάλη και μικρή ανθρακική αλυσίδα αντίστοιχα, στην ηλικία της 1 ημέρας πιθανόν να οφείλεται στη λειτουργία τους. Οι CHCs εκτός ότι λειτουργούν ως φερομόνες, προστατεύουν τα έντομα από πιθανή αφυδάτωση και διαβροχή. Όσο αυξάνεται το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας η ουσία γίνεται λιγότερο πτητική, άρα αυξάνεται το σημείο ζέσεώς της και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ειδικού φιλμ με μικρή διαπερατότητα στο νερό, γεγονός που προστατεύει τα έντομα από τη διαβροχή (Edney, 1977, Gibbs, 1998). Συνεπώς τα έντομα στην ηλικία 1 ημέρας παράγουν περισσότερο υδρογονάνθρακες με μεγάλη ανθρακική αλυσίδα πιθανόν για να προστατευτούν από τη διαβροχή. Αντίθετα στις μεγαλύτερες ηλικίες αυξάνουν την παραγωγή ουσιών με μικρές ανθρακικές αλυσίδες, οι οποίες είναι περισσότερο πτητικές και ενδεχομένως λειτουργούν ως φερομόνες. Σε προηγούμενες βιβλιογραφικές αναφορές έχει αποδειχθεί ότι έντομα σε μεγάλη ηλικία παρουσιάζουν μεγαλύτερα ποσοστά απώλειας νερού και μικρότερη ανθεκτικότητα στην αφυδάτωση (Lamb, 1984, Service et al. 1985, Gibbs & Markow, 2001). Στην παρούσα μελέτη όταν ελέγχθηκε το βάρος των εντόμων *D. suzukii* στις διαφορετικές ηλικίες διαπιστώθηκε μείωση του βάρους στην ηλικία των 25 ημερών (θηλυκά ηλικίας 4 και 25 ημερών: 1.8 ± 0.09 mg και 1.3 ±0.06 mg αντίστοιχα, αρσενικά ηλικίας 4 και 25 ημερών: 1.3 ± 0.09mg και 0.8 ± 0.08 mg αντίστοιχα). Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στην απώλεια υγρασίας εξαιτίας των μειωμένων ποσοτήτων των υδρογονανθράκων με μακριά ανθρακική αλυσίδα. Τέλος διαπιστώθηκε ότι τα ώριμα έντομα ηλικίας 4 και 25 ημερών έχουν μεγαλύτερη ποσότητα ακόρεστων υδρογονανθράκων σε σχέση με τα έντομα ηλικίας 1 ημέρας. Οι ακόρεστοι υδρογονάνθρακες παρουσιάζουν μικρότερο σημείο ζέσεως από τους κορεσμένους, συνεπώς είναι ενώσεις με μεγαλύτερη πτητικότητα άρα υπάρχουν περισσότερες πιθανότητες να δρουν ως φερομόνες.

4.3.2 Βιολογική Δράση της Ουσίας 9-C21

Βασιζόμενοι στην ανάλυση των παραπάνω αποτελεσμάτων επιλέχθηκε η ουσία 9-C21 καθώς είναι μία ουσία η οποία δεν ανιχνεύεται στην ηλικία της 1 ημέρας, αλλά η ποσότητά της αυξάνεται στην ηλικία των 4 και 25 ημερών. Αρχικά, η μελέτη της βιολογικής της δράσης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την πειραματική διάταξη ‘fly trap assay’ (Εικ. 4.1), χωρίς όμως την προσθήκη του τροφικού υποστρώματος. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη μη απόκριση των εντόμων. Στη συνέχεια, όταν προστέθηκε το τροφικό υπόστρωμα διαπιστώθηκε η απόκριση

των εντόμων, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι *η ουσία 9-C21 ενδέχεται να λειτουργεί συνεργιστικά με τις ουσίες που εκλύονται από την τροφή*. Παρατηρήθηκε ότι ο δείκτης προτίμησης για τα θηλυκά και τα αρσενικά έντομα (παρθένα και μη, ηλικίας 4 ημερών) ήταν μεγαλύτερος όταν εφαρμόστηκαν στην πειραματική διάταξη μικρότερες ποσότητες 9-C21 (5 ng και 10 ng), ποσότητες οι οποίες είναι κοντά στις φυσικά απαντώμενες. Αντίθετα, όταν εφαρμόσθηκαν μεγαλύτερες ποσότητες 9-C21 (100 ng και 1000 ng) διαπιστώθηκε μία μείωση στην τιμή του δείκτη προτίμησης (Εικ 4.6 α, β). *Συμπεραίνεται λοιπόν ότι η ουσία 9-C21 σε μικρές ποσότητες προκαλεί την συνάθροιση των αρσενικών και θηλυκών D. suzukii*. Αυτή η παρατήρηση έρχεται σε συμφωνία με ήδη δημοσιευμένες μελέτες, οι οποίες αναφέρουν ότι ουσίες, όπως η φερομόνη συνάθροισης cVA, είναι ελκυστικές σε μικρές δόσεις, ενώ προκαλούν στα έντομα αντιδράσεις αποστροφής όταν εφαρμόζονται μεγαλύτερες δόσεις (Bartelt et al. 1985).



Εικόνα 4.6: Δείκτης προτίμησης θηλυκών (α) και αρσενικών (β) *D. suzukii*, ηλικίας 4 ημερών, στις διαφορετικές ποσότητες 9-C21 (5 ng, 10 ng, 100 ng και 1000 ng). Η πορτοκαλί μπάρα αναπαριστά τα παρθένα έντομα και η πράσινη τα μη παρθένα έντομα. Τα διαφορετικά γράμματα (a και b) δηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0.05$) (n=20)

Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι ο δείκτης προτίμησης, στην ποσότητα των 5 ng ουσίας, ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος στα μη παρθένα θηλυκά απ' ότι στα παρθένα (Independent Sample T test $t(38)=-9.6$ $p<0.05$) (Εικ. 4.6 α). Αντίθετα, στα αρσενικά ο δείκτης προτίμησης για την ίδια ποσότητα ουσίας (5 ng) ήταν μεγαλύτερος στα παρθένα αρσενικά σε σχέση με τα μη παρθένα (Independent Sample T test $t(38)=26.9$ $p<0.05$) (Εικ. 4.6 β). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι φερομόνες συνάθροισης είναι ουσίες, οι οποίες εκπέμπουν πληροφορίες σχετικά με

κατάλληλα-ιδανικά σημεία τροφής, σύζευξης και ωοτοκίας (Bartelt et al. 1985). Βασιζόμενοι σε αυτήν την παρατήρηση *ενδέχεται τα μη παρθένα θηλυκά και τα παρθένα αρσενικά να αποκρίνονται περισσότερο στην ουσία 9-C21 εξαιτίας της ανάγκης τους να ωοτοκήσουν και να συζευχθούν αντίστοιχα.*

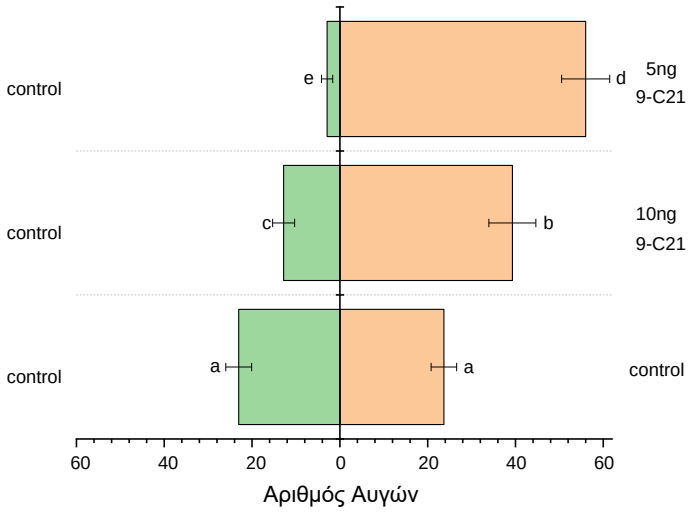
Επιπλέον, μελετήθηκε ο δείκτης προτίμησης των θηλυκών και των αρσενικών ηλικίας 1 και 25 ημερών. Θηλυκά και αρσενικά ηλικίας 1 ημέρας δεν αποκρίθηκαν σε καμία από τις 4 ποσότητες του 9-C21, ενώ η συμπεριφορά των εντόμων ηλικίας 25 ημερών δεν διαφοροποιήθηκε με εκείνη των εντόμων ηλικίας 4 ημερών (Πίνακας 4.2).

Πίνακας 4.2: Δείκτης προτίμησης του *D. suzukii* σε διαφορετικές ποσότητες 9-C21

θηλυκό			***Δείκτης Προτίμησης***			
			9-C21 (5ng)	**9-C21 (10ng)**	**9-C21 (100ng)**	**9-C21 (1000ng)**
ηλικία	4	μη γον.	0.51±0.05	0.4±0.12	-0.29±0.14	-0.81±0.16
		γον.	0.76±0.07	0.51±0.06	-0.15±0.04	-0.58±0.07
	25	μη γον.	0.51±0.09	0.33±0.26	-0.30±0.15	-0.83±0.13
		γον.	0.74±0.07	0.52±0.07	-0.15±0.05	-0.60±0.12
αρσενικό						
ηλικία	4	μη γον.	0.58±0.04	0.24±0.06	-0.48±0.08	-0.75±0.09
		γον.	0.38±0.05	0.16±0.05	-0.62±0.04	-0.89±0.09
	25	μη γον.	0.56±0.03	0.25±0.04	-0.51±0.04	-0.72±0.08
		γον.	0.41±0.2	0.14±0.03	-0.61±0.03	-0.81±0.04

Στη συνέχεια με σκοπό την επιβεβαίωση της παραπάνω υπόθεσης, σχετικά με το ότι ενδέχεται η ουσία 9-C21 να προκαλεί συνάθροιση των μη παρθένων θηλυκών με σκοπό την ωοτοκία, επιλέχθηκαν να μελετηθούν περαιτέρω οι ποσότητες των 5 ng και 10 ng, καθώς παρουσίασαν τον υψηλότερο Δ.Π., χρησιμοποιώντας πειράματα ωοτοκίας (Εικ. 4.2). Διαπιστώθηκε ότι η ποσότητα των 5 ng αύξησε στατιστικά σημαντικά τον αριθμό των αυγών που εναπόθεσαν τα θηλυκά *D. suzukii,* σε σχέση με την ποσότητα των 10 ng και τα πειράματα ελέγχου (One Way Anova $F(2,59)=175.8$ $p=0$) (Εικ. 4.7). Συμπεραίνεται λοιπόν ότι *η ουσία 9-C21 είναι μια ουσία η οποία προκαλεί τη συνάθροιση των θηλυκών εντόμων με σκοπό να ωοτοκήσουν*. Το συμπέρασμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες βιβλιογραφικές αναφορές οι οποίες έχουν δείξει ότι η συμπεριφορά συνάθροισης στα έντομα της οικογένειας Drosophilidae, προκαλείται από

ουσίες, οι οποίες δίνουν στο έντομο-δέκτη πληροφορίες για το ιδανικό περιβάλλον ωοτοκίας (Bartelt et al. 1986b, Schaner et al. 1987).



Εικόνα 4.7: Αριθμός αυγών που καταμετρήθηκε στο υπόστρωμα τροφής που περιείχε 5 ng και 10 ng 9-C21. Τα διαφορετικά γράμματα (a, b, c, d και e) δηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0.05$) ($n=20$)

Κεφάλαιο 5

Η Επιθετική Συμπεριφορά του *D. suzukii* και η Επίδραση των Περιβαλλοντικών και Κοινωνικών Παραγόντων σε αυτήν

5.1 Εισαγωγή

Η επιθετικότητα είναι μία συμπεριφορά που συναντάται σε όλο το ζωικό βασίλειο. Η έκφρασή της εξαρτάται από τρεις βασικές παραμέτρους. Η πρώτη είναι η μειωμένη δυνατότητα πρόσβασης σε τροφή, η δεύτερη είναι η ανάγκη για οριοθέτηση της περιοχής και η τρίτη είναι η ανάγκη για γονιμοποίηση (Kravitz et al. 2015). Η έκφραση της επιθετικής συμπεριφοράς βελτιώνει τη συνολική υγεία του αρσενικού φύλου, βελτιώνει το ρυθμό επιβίωσής του και ταυτόχρονα του επιτρέπει να μεταφέρει το γενετικό του υλικό στις επόμενες γενεές (Dakas et al. 2008).

Η επιθετική συμπεριφορά των εντόμων της οικογένειας Drosophilidae εξαρτάται από διάφορους περιβαλλοντικούς, κοινωνικούς και γενετικούς παράγοντες (Kravitz et al. 2015, Popova, 2006, Siwicki & Ladewski, 2003, Shelly, 1988, Partridge et al. 1987). Παράγοντες όπως είναι το φύλο, η ηλικία (Hoffman, 1990) το είδος της τροφής (Lim et al. 2018), το φερομονικό προφίλ (Wang & Anderson, 2010) η κοινωνικοποίηση (Saltz et al. 2017) και η εμπειρία που αποκτήθηκε από προηγούμενες μάχες (Trannoy et al. 2015) έχουν μελετηθεί λεπτομερώς στο *D. melanogaster*. Έχει αποδειχθεί ότι τα αρσενικά είναι περισσότερο επιθετικά από ότι τα θηλυκά (Nilsen et al. 2004). Μη κοινωνικοποιημένα έντομα *D. melanogaster* ανεξαρτήτου φύλου εκδηλώνουν περισσότερη επιθετικότητα από τα κοινωνικοποιημένα (Neckameyer et al. 2015, Wang et al. 2008). Έχει παρατηρηθεί ότι έντομα ηλικίας 1 έως 2 ημερών δεν εκφράζουν έντονη επιθετικότητα σε σχέση με τα μεγαλύτερα σε ηλικία έντομα (Hoffman, 1990). Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι έντομα τα οποία απέκτησαν εμπειρία από προηγούμενη μάχη έχουν περισσότερες πιθανότητες να κερδίσουν ξανά σε μία επικείμενη, από ότι εκείνα τα οποία έχασαν τη μάχη αυτή (Hsu et al. 2016). Πρόσφατη έρευνα αναφέρει ότι το βάρος του εντόμου φέρει καθοριστικό ρόλο στην εκδήλωση της επιθετικής συμπεριφοράς (Wang et al. 2017). Το βάρος επηρεάζεται άμεσα από την πυκνότητα του καλλιεργούμενου πληθυσμού στον οποίο εκτρέφεται ένα έντομο (Barker et al. 1970). Όσο μεγαλώνει η πυκνότητα, τόσο μειώνεται η επιθετικότητα του εντόμου. Η αφθονία της διαθέσιμης τροφής μειώνεται, συνεπώς και το βάρος των εντόμων.

Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να εκδηλώνεται μειωμένη επιθετική συμπεριφορά εξαιτίας της μη καλής τους υγείας (Barker et al. 1970, Dierrick et al. 2007).

Τα τελευταία χρόνια, σε βιβλιογραφικές αναφορές αναφέρθηκε ότι η μελέτη της επιθετικής συμπεριφοράς των εντόμων οικονομικής σημασίας, όπως είναι οι αφίδες (Haurtbauer et al. 2010), οι τερμίτες (Florane et al. 2004) και τα έντομα της οικογένειας Tephritidae (μύγα της Μεσογείου) (Benelli et al. 2014), μπορεί να βελτιώσει τις μεθόδους της Ολοκληρωμένης Φυτοπροστασίας (Integrated Pest Management, IPM) (Benelli et al. 2014). Για παράδειγμα μπορεί να ενισχύσει την Τεχνική Απελευθέρωσης Στείρων Εντόμων (Sterile Insect Technique, SIT), μία από τις πιο αξιόπιστες μεθόδους της Ολοκληρωμένης Φυτοπροστασίας (Florane et al. 2004). Η τεχνική στείρων εντόμων είναι μια τεχνική βιολογικής καταπολέμησης φιλική προς το περιβάλλον. Τα αρσενικά έντομα εκτρέφονται μαζικά, στη συνέχεα στειρώνονται με εφαρμογή ακτινοβολίας και έπειτα απελευθερώνονται στο περιβάλλον (Ahmadi et al. 2018). Στη φύση τα απελευθερωμένα στείρα αρσενικά ζευγαρώνουν με τα θηλυκά του φυσικού περιβάλλοντος χωρίς όμως να γεννούν απογόνους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη σταδιακή μείωση του φυσικού πληθυσμού. Σε περίπτωση που προκύψουν απόγονοι, πεθαίνουν πρόωρα πριν ολοκληρωθεί η ανάπτυξή τους, λόγω αλλαγών των χρωμοσωμάτων των γαμετών έπειτα από την ακτινοβόληση (Robinson, 2002). Τις τελευταίες δεκαετίες, η μέθοδος SIT εφαρμόζεται με επιτυχία στην καταπολέμηση εντόμων οικονομικής σημασίας όπως είναι η μύγα της Μεσογείου *Ceratitis capitata* (Hendrichs et al. 1973) και ο δάκος της ελιάς *Bactrocera oleae* (Ant et al. 2012). Ένα όμως από τα βασικά μειονεκτήματα της SIT είναι ότι τα στείρα αρσενικά παρουσιάζουν μειωμένη ανταγωνιστικότητα σε σχέση με το φυσικό άγριο πληθυσμό (Benelli et al. 2014). Η μειωμένη ανταγωνιστικότητα οφείλεται στο ότι τα στείρα έντομα εκτρέφονται σε συνθήκες υψηλής πυκνότητας πληθυσμού εντόμων, γεγονός που επηρεάζει αρνητικά την έκφραση της επιθετικής συμπεριφοράς (Benelli et al. 2014).

Ενώ έχει μελετηθεί εκτεταμένα η επιθετικότητα πολλών ειδών της οικογένειας Drosophilidae, δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με την επιθετική συμπεριφορά του *D. suzukii*. Η παρούσα έρευνα επικεντρώνεται στην κατανόηση της επιθετικής συμπεριφοράς των ακμαίων του *D. suzukii* καθώς και στη μελέτη της επίδρασης περιβαλλοντικών (φύλο, ηλικία και φωτοπερίοδος) και κοινωνικών παραγόντων (κοινωνικοποιημένα και μη). Η γνώση που θα δημιουργηθεί θα οδηγήσει αρχικά στην κατανόηση της οικολογίας του *D. suzukii* και

ταυτόχρονα δύναται να βελτιώσει την SIT, αυξάνοντας την ανταγωνιστικότητα των στείρων αρσενικών (Perez-Staples et al. 2013).

5.2 Πειραματικό Μέρος

5.2.1 Καλλιέργεια Εντόμων

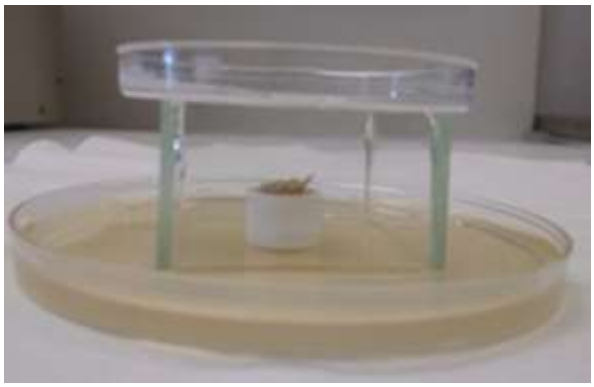
Το *D. suzukii* καλλιεργήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες που αναφέρονται στο Παράρτημα Ι. Στη συνέχεια με σκοπό την εκτροφή των μη κοινωνικοποιημένων εντόμων, πούπες τελευταίου σταδίου συλλέγονται από τα δοχεία εκτροφής και στη συνεχεία τοποθετείται μία πούπα ανά ένα Eppendorf tube, το οποίο περιέχει τροφή (Εικ. 5.1). Για την εκτροφή των κοινωνικοποιημένων εντόμων πραγματοποιείται ανά μία ώρα συλλογή εντόμων, τα οποία μόλις εκκολαφθούν μεταφέρονται σε δοχεία εκτροφής ανά ομάδες των 10, ίδιας ηλικίας και ίδιου φύλου (Hoffmann et al. 1990).

Εικόνα 5.1: Εκτροφή μη κοινωνικοποιημένων εντόμων σε Eppendorf tubes.

5.2.2 Βιοδοκιμές Επιθετικότητας

Οι βιοδοκιμές επιθετικότητας υλοποιούνται στην ακόλουθη πειραματική διάταξη (Εικ. 5.2), η οποία χρησιμοποιείται ως επί των πλείστων για τον έλεγχο της επιθετικής συμπεριφοράς των εντόμων (Dierrick et al. 2007, Popova et al. 2016). Η πειραματική διάταξη αποτελείται από ένα τετράγωνο γυάλινο θάλαμο τοποθετημένο στο εσωτερικό ενός τρυβλίου Petri (εσωτερική διάμετρος 8 cm), το οποίο περιέχει μία στρώση (2 ml) διαλύματος άγαρ (5% w/v). Στο κέντρο του γυάλινου θαλάμου τοποθετείται ένα κυλινδρικό δοχείο, το οποίο είναι πληρωμένο με υπόστρωμα τροφής και με μία σταγόνα μαγιάς (Εικ. 5.2). Το διάλυμα άγαρ και η σταγόνα μαγιάς εφαρμόζονται για να δημιουργηθεί η απαιτούμενη υγρασία στο εσωτερικό της πειραματικής διάταξης και για να προσελκυθούν τα έντομα στο κυλινδρικό δοχείο, όπου και

πραγματοποιούνται οι μάχες (Palavicino-Maggio et al, 2019). Τέλος το καπάκι του τρυβλίου τοποθετείται πάνω από τον γυάλινο θάλαμο με σκοπό να αποφευχθεί η διαφυγή των εντόμων.



Εικόνα 5.2: Πειραματική διάταξη για τη μελέτη της επιθετικής συμπεριφοράς

Οι βιοδοκιμές επιθετικότητας πραγματοποιούνται μεταξύ παρθένων εντόμων ίδιου φύλου και ίδιας ηλικίας. Ανάλογα με τον εκάστοτε παράγοντα κοινωνικοποίησης που μελετάται, δύο έντομα συλλέγονται τυχαία από το δοχείο εκτροφής, είτε των κοινωνικοποιημένων, είτε των μη κοινωνικοποιημένων εντόμων, και τοποθετούνται στο εσωτερικό της πειραματικής διάταξης. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο εντόμων καταγράφονται μέσω βιντεοκάμερας για 3600 s. Η επιθετική συμπεριφορά ποσοτικοποιείται προσδιορίζοντας το χρόνο που απαιτείται από την έναρξη της βιοδοκιμής μέχρι την εκδήλωση της πρώτης μάχης, την αποκαλούμενη *'καθυστέρηση μάχης'* (Wang et al. 2017). Επιπλέον, προσδιορίζεται η συχνότητα εμφάνισης των διαφορετικών μοτίβων συμπεριφοράς, μετρώντας το συνολικό αριθμό εμφάνισης τους κατά τη διάρκεια παρακολούθησης των 3600 s (Dierick, 2007). Το τέλος της μάχης ορίζεται ως η στιγμή όπου η μάχη μεταξύ των δύο εντόμων διακοπεί για παραπάνω από 2 s ή/και τα έντομα απομακρυνθούν μεταξύ τους, ενώ η απόσταση που διατηρείται μεταξύ τους είναι ίση ή μεγαλύτερη με το διπλάσιο μήκος του σώματός τους (Nilsen et al. 2004). Οι βιοδοκιμές πραγματοποιούνται σε δωμάτιο με καλά ρυθμιζόμενες συνθήκες (θερμοκρασία 21±2°C και υγρασία 65±5%).

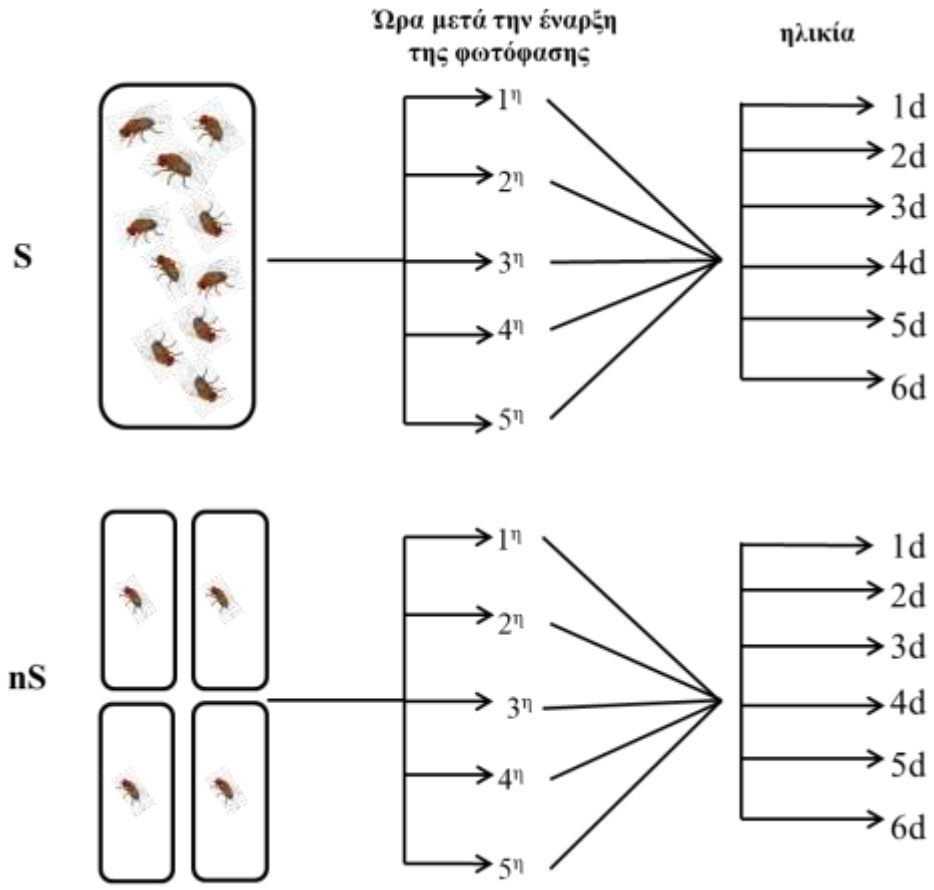
5.2.3 Επίδραση Έλλειψη Τροφής

Βασιζόμενοι σε ήδη υπάρχουσες βιβλιογραφικές αναφορές, τα μη κοινωνικοποιημένα αρσενικά της οικογένειας Drosophilidae εκδηλώνουν περισσότερη επιθετικότητα από ότι τα μη κοινωνικοποιημένα θηλυκά (Ueda & Kidokoro, 2002, Zwarts et al. 2012). Γι αυτό το λόγο, η

επίδραση της έλλειψης τροφής μελετήθηκε μόνο στα μη κοινωνικοποιημένα αρσενικά του *D. suzukii*. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η επίδραση της έλλειψης τροφής για **α)** (0h), **β)** 2 (2h) και **γ)** 12 (12h) ώρες. Δύο και δώδεκα ώρες πριν την έναρξη των βιοδοκιμών τα έντομα συλλέγονται τυχαία από τα δοχεία εκτροφής και υποβάλλονται στην αντίστοιχη συνθήκη ατροφίας, τοποθετώντας τα σε άδειο Eppendorf tube. Τα έντομα ζυγίζονται πριν και μετά από κάθε συνθήκη ατροφίας με σκοπό να προσδιοριστεί η επίδραση της έλλειψης τροφής στο βάρος τους. Στη συνέχεια ένα ζευγάρι εντόμων υποβεβλημένο σε 0h ή 2h ή 12h ατροφίας μεταφέρεται στο εσωτερικό της πειραματικής διάταξης χωρίς αναισθησία. Οι βιοδοκιμές επιθετικότητας λαμβάνουν χώρα την ίδια ώρα καθημερινά (09:00 πμ.). Είκοσι πέντε επαναλήψεις πραγματοποιούνται για κάθε συνθήκη που ελέγχεται (n=25).

5.2.4 Επίδραση Περιβαλλοντικών και Κοινωνικών Παραγόντων

Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα των πειραμάτων σχετικά με την επίδραση της έλλειψης τροφής, η μελέτη της επίδρασης των περιβαλλοντικών και κοινωνικών παραγόντων στην επιθετικότητα πραγματοποιήθηκε υποβάλλοντας τα έντομα σε συνθήκες ατροφίας για 2 ώρες. Μελετήθηκε η επιθετική συμπεριφορά των κοινωνικοποιημένων και των μη κοινωνικοποιημένων αρσενικών και θηλυκών *D. suzukii* σε έξι διαφορετικές ηλικίες (1d, 2d, 3d, 4d, 5d και 6d ημερών) κατά τη διάρκεια πέντε διαφορετικών ωρών μετά την έναρξη της φωτόφασης (07:00 έως 11:00 πμ.). Στην Εικ. 5.3 παρουσιάζεται με τη βοήθεια σχεδιαγράμματος ο σχεδιασμός των πειραμάτων.

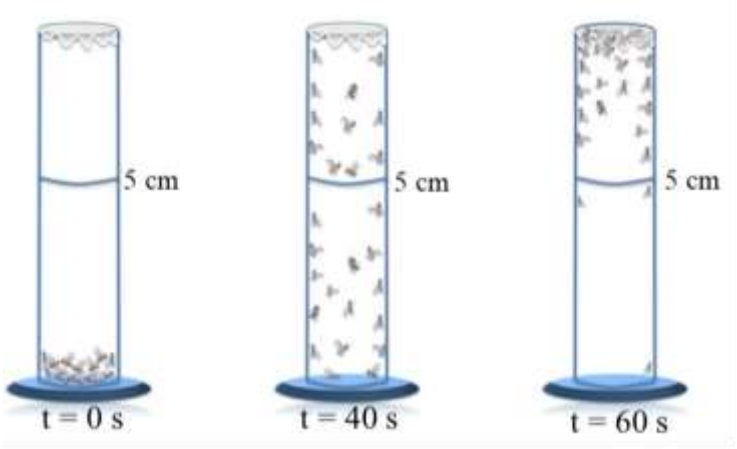


Εικόνα 5.3: Θηλυκά και αρσενικά *D. suzukii* υποβάλλονται σε συνθήκες κοινωνικοποίησης (S: Social) και μη κοινωνικοποίησης (nS: non-Social) και στη συνέχεια μελετάται η επιθετική τους συμπεριφορά σε 5 διαφορετικές ώρες μετά τη έναρξη της φωτόφασης και σε έξι διαφορετικές ηλικίες (1 d, 2d, 3d, 2d, 5d kai 6d) όπου d- η ημέρα

5.2.5 Βιοδοκιμές Κινητικότητας

Η κινητικότητα των εντόμων προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας τις βιοδοκιμές οι οποίες ονομάζονται '*climbing assay'* (Madabattula et al. 2015, Taylor et al. 2019). Δέκα έντομα ίδιου φύλου (αρσενικά ή θηλυκά) μεταφέρονται χωρίς αναισθησία σε δοκιμαστικό σωλήνα (ύψος 10 cm και εσωτερική διάμετρο 0.5 cm) του οποίου το ύψος χωρίζεται στα 5 cm. Τα έντομα παραμένουν στο δοκιμαστικό σωλήνα για 600 s με σκοπό τον εγκλιματισμό τους στο νέο περιβάλλον. Στη συνέχεια με ένα ελαφρύ κάθετο χτύπημα του δοκιμαστικού σωλήνα τα έντομα μετακινούνται στο κάτω-μέρος του και η κινητικότητα προσδιορίζεται με την καταμέτρηση του ποσοστού (%) των εντόμων που πέρασαν το ύψος των 5 cm σε 60 s (Εικ. 5.4). Είκοσι επαναλήψεις πραγματοποιήθηκαν για κάθε παράγοντα (φύλο, ηλικία. φωτοπερίοδο και

κοινωνικοποίηση) (n=20). Το αποτέλεσμα της κάθε επανάληψης είναι ο μέσος όρος τριών μετρήσεων.



Εικόνα 5.4: Πειραματική διάταξη στην οποία μελετήθηκε η κινητικότητα των εντόμων (climbing assay)

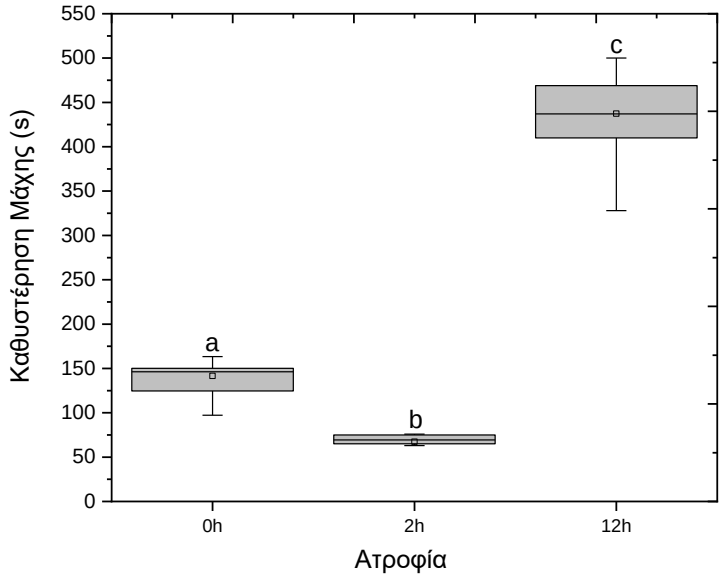
5.2.6 Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα IBM SPSS Statistics 24. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίσθηκαν ο μέσος όρος (mean) και η τυπική απόκλιση (standard deviation, sd). Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με One-Way ANOVA test και με independent samples T-test ανάλογα με το είδος των μεταβλητών και τη διακύμανση των τιμών (Normality Test του Shapiro-Wilk εξαιτίας $n \leq 50$). Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε σε $p<0.05$, το οποίο αντιστοιχεί σε όριο εμπιστοσύνης 95%.

5.3. Αποτελέσματα - Συζήτηση

5.3.1 Επίδραση Έλλειψης Τροφής

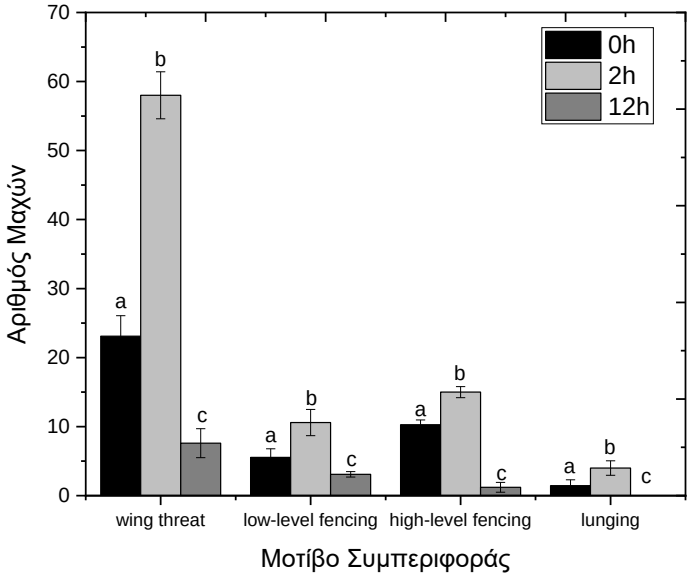
Τόσο στα ασπόνδυλα όσο και στα σπονδυλωτά ζώα η έλλειψη τροφής οδηγεί στην αύξηση της επιθετικής τους συμπεριφοράς (Wilcox & Ruckdeschel, 1982, Ryer & Olla 1995, Stocker & Huber 2001). Όταν η τροφή είναι περιορισμένη, οι ανταγωνιστές εκδηλώνουν αυξημένη επιθετικότητα με σκοπό να διασφαλίσουν την τροφή τους (Wang et al. 2017). Η επίδραση της έλλειψης τροφής (0h, 2h και 12h) μελετήθηκε μόνο στα μη κοινωνικοποιημένα αρσενικά *D. suzukii*, καθ' ότι έχει αποδειχθεί ότι τα μη κοινωνικοποιημένα αρσενικά *D. melanogaster* εκδηλώνουν αυξημένη επιθετικότητα έναντι των θηλυκών ακμαίων (Zwarts et al. 2012). Όπως φαίνεται στην Εικ. 5.5, η '*καθυστέρηση μάχης'* (ο χρόνος που απαιτείται μέχρι την εκδήλωση της πρώτης μάχης) μειώθηκε στατιστικά σημαντικά όταν τα έντομα υποβλήθηκαν σε 2 ώρες ατροφίας (One-Way ANOVA, $F(2, 72) = 12,261.6$ $p<0.05$). Αντίθετα, όταν εφαρμόσθηκαν οι 12 ώρες ατροφίας, η καθυστέρηση μάχης αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά συγκρίνοντας τη, με τους άλλους δύο παράγοντες (0h και 24h ατροφίας). Η καθυστέρηση για τις 0h ατροφίας ήταν 141 ± 25 s, ενώ για τις 2h και 12h ατροφίας η καθυστέρηση μάχης ήταν 67 ± 19 s και 443 ± 56 s αντίστοιχα.



Εικόνα 5.5: Η επίδραση της ατροφίας στην επιθετική συμπεριφορά των μη κοινωνικοποιημένων αρσενικών *D. suzukii*. Το θηκόγραμμα υποδεικνύει το 1^{ο} και το 3^{ο} τεταρτημόριο, και τη δειγματική διάμεσο. Οι απολήξεις υποδεικνύουν την ελάχιστη και τη μέγιστη τιμή. Η στατική διαφορά

υπολογίσθηκε με One Way ANOVA Test $p<0.05$(n=25). Τα διαφορετικά γράμματα (a, b και c) υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά

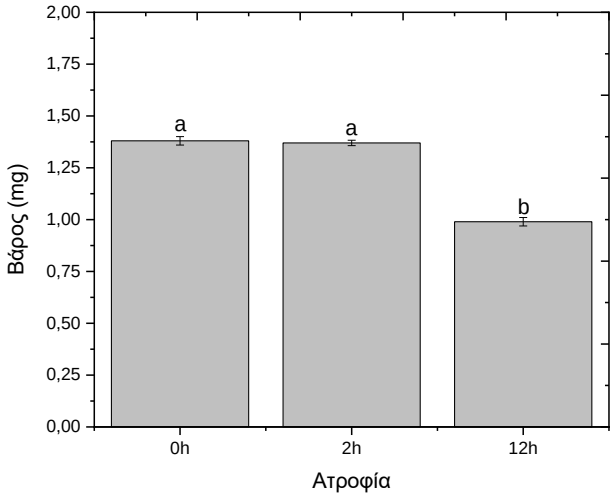
Έπειτα, μελετήθηκε η συχνότητα εμφάνισης των επιθετικών μοτίβων συμπεριφοράς κατά τη διάρκεια των 3600 s και για τους τρεις χρόνους ατροφίας (Versteven et al. 2017). Στην Εικ. 5.6 παρουσιάζεται η συχνότητα εμφάνισης των μοτίβων συμπεριφοράς, '*wing threat'* (απειλή φτερού), '*low & high level fencing'* (μικρής & μεγάλης έντασης μάχη) και '*lunging*' (χτύπημα), που εμφάνισαν τα έντομα τα οποία υποβλήθηκαν σε 0h, 2h και 12h ατροφίας. Παρατηρείται ότι τα έντομα τα οποία υποβλήθηκαν σε 2h ατροφίας εκδήλωσαν περισσότερες φορές τα επιθετικά μοτίβα, από αυτά που υποβλήθηκαν σε 0h και 12h ατροφίας One-Way ANOVA wing threat: $F(2, 72)=2,891.17$ $p<0.05$, low-level fencing: $F(2, 72)=204.04$ $p<0.05$, high-level fencing: $F(2, 72)=116.16$ $p<0.05$, lunging: $F(2, 72)=230.99$ $p<0.05$). Η πολύωρη ατροφία (12h) μείωσε στατιστικά σημαντικά την εμφάνιση των επιθετικών μοτίβων συμπεριφοράς, ενώ η 2h ατροφίας την αύξησε στατιστικά σημαντικά.



Εικόνα 5.6: Η επίδραση της ατροφίας στην επιθετική συμπεριφορά των μη κοινωνικοποιημένων αρσενικών *D. suzukii* στις τρεις διαφορετικούς χρόνους ατροφίας. Η στατιστική διαφορά υπολογίσθηκε με One Way ANOVA Test $p<0.05$ (n=25). Τα διαφορετικά γράμματα (a, b και c) υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά

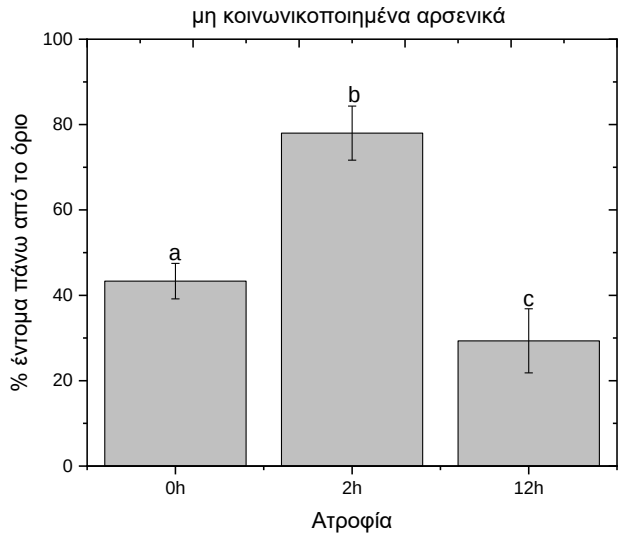
Στη συνέχεια μελετήθηκε την επίδραση της έλλειψη τροφής στο βάρος των εντόμων. Διαπιστώθηκε ότι το βάρος των εντόμων, τα οποία υποβλήθηκαν σε 12h ατροφίας, μειώθηκε στατιστικά σημαντικά (One-Way ANOVA, $F(2, 27) = 1196.8$, $p<0.05$), σε σύγκριση με τις

άλλες δύο συνθήκες ατροφίας, κατά τις οποίες το βάρος τους δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0.473) (Εικ. 5.7). Το βάρος των εντόμων στις 0h, 2h και 12h ατροφίας ήταν 1.38 ± 0.02 mg, 1.37 ± 0.01 mg και 0.99 ± 0.02 mg (mean ± s.d) αντίστοιχα.



Εικόνα 5.7: Η επίδραση της ατροφίας (0h, 2h, 12h) στο βάρος των μη κοινωνικοποιημένων αρσενικών *D. suzukii* (n=25). Η στατιστική διαφορά υπολογίσθηκε με One Way ANOVA Test, p<0.05. Τα διαφορετικά γράμματα (a και b) υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά

Βασιζόμενοι στα παραπάνω αποτελέσματα κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η επίδραση της ατροφίας στην κινητικότητα των εντόμων. Παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική αύξηση της κινητικότητας μεταξύ των 0h και 2h ατροφίας (Εικ. 5.8). Αντίθετα διαπιστώθηκε μια στατιστικά σημαντική μείωση της κινητικότητας μεταξύ των 2h και 12h ατροφίας (One-Way ANOVA, F(2,72) = 4,475.76 p<0.05). Συμπεραίνεται λοιπόν, ότι *η μακράς διάρκεια ατροφία (12h) μείωσε την κινητικότητα των εντόμων, η οποία ενδεχομένως να οφείλεται στην απώλεια βάρους εξαιτίας της πιθανής αφυδάτωσης των εντόμων*. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα και τη μείωση της επιθετικότητας των μη κοινωνικοποιημένων αρσενικών *D. suzukii* μετά από 12h ατροφίας. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και για το *D. melanogaster*, σύμφωνα με τα οποία η επιθετική συμπεριφορά των ακμαίων μειώθηκε όταν εκείνα υποβλήθηκαν σε 24 ώρες ατροφίας (Wang et al. 2011).



Εικόνα 5.8: Η επίδραση της ατροφίας (0h, 2h, 12h) στην κινητικότητα των μη κοινωνικοποι-μένων αρσενικών εντόμων *D. suzukii*. Η κινητικότητα ποσοτικο-ποιήθηκε ως το % των εντόμων που πέρασαν το όριο που τέθηκε στην πειραματική διάταξη (n=20). Η στατιστική διαφορά υπολογίσθηκε με One Way ANOVA Test, $p<0.05$. Τα διαφορετικά γράμματα (a, b και c) υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά

Έχει αναφερθεί στο παρελθόν ότι η μακράς διάρκειας ατροφία μπορεί να εντείνει την επιθυμία για εύρεση τροφής, αλλά την ίδια στιγμή αυξάνει και το ρίσκο-κόστος της εκδήλωσης επιθετικότητας για την υπεράσπισή της (Brown et al, 1987). Συμπεραίνεται λοιπόν, ότι η μείωση της επιθετικότητας στις 12h ατροφίας των μη κοινωνικοποιημένων αρσενικών *D. suzukii* οφείλεται στην αδυναμία έκφρασης κυριαρχίας και υπεράσπισης της τροφής τους, εξαιτίας της μειωμένης δύναμης και αντοχής τους. Οι 2 ώρες ατροφίας είναι αρκετές ώστε να μην μειωθεί η κινητικότητά του εντόμου και κατ' επέκταση να εκδηλωθεί αυξημένη επιθετικότητα.

5.3.2 Ηθόγραμμα[9] της Επιθετικής Συμπεριφοράς του *D. suzukii*

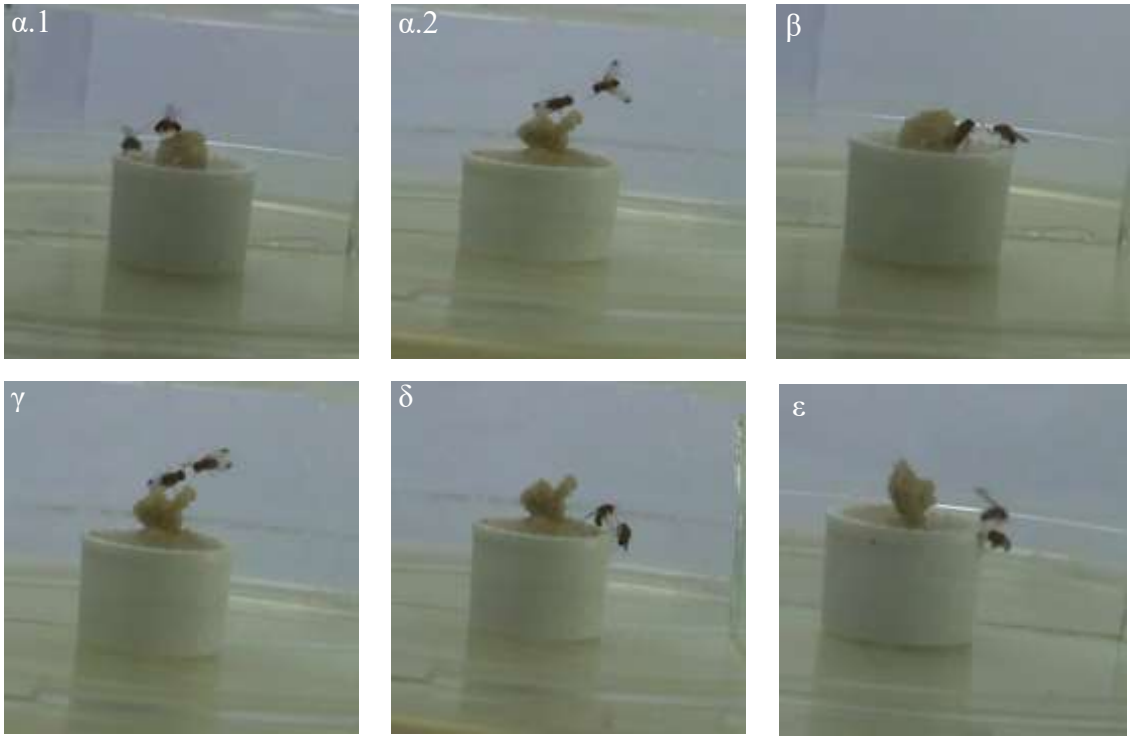
Βασιζόμενοι στα παραπάνω αποτελέσματα, τα υπόλοιπα πειράματα επιθετικότητας πραγματοποιήθηκαν υποβάλλοντας τα έντομα σε συνθήκες ατροφίας για 2h με σκοπό να εκφράσουν το μέγιστο της συμπεριφοράς αυτής.

Αναλύοντας διεξοδικά τα διαφορετικά μοτίβα συμπεριφοράς που εκδηλώθηκαν (Εικ. 5.9) κατά τη διάρκεια των μαχών, δημιουργήθηκε το ηθόγραμμα της επιθετικής και της αμυντικής συμπεριφοράς του αρσενικού και του θηλυκού *D. suzukii* (Πίνακας 5.1). Τα επιθετικά μοτίβα συμπεριφοράς διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: **α)** μοτίβα κατά τα οποία τα έντομα δεν έρχονται σε επαφή και **β)** μοτίβα κατά τα οποία τα έντομα έρχονται σε επαφή. Όταν δύο έντομα του ίδιου

[9] Ηθόγραμμα ονομάζεται ο πίνακας ή περιγραφή των μοντέλων συμπεριφοράς ενός συγκεκριμένου είδους, συνήθως όσον αφορά την ατομική συμπεριφορά ή τις αλληλεπιδράσεις των ζευγών.

φύλου τοποθετήθηκαν στην πειραματική διάταξη, εκδήλωσαν την επιθετική τους προδιάθεση εκτείνοντας τα φτερά τους σε κλίση 45° έως 90° (wing threat). Κατόπιν, ακολούθησε η απειλή του αγγίγματος (tapping threat), κατά την οποία το έντομο προεκτείνει το μεσαίο του πόδι προς την πλευρά του αντιπάλου του χωρίς όμως να έρχεται σε επαφή με εκείνο. Το έντομο χαμηλώνει το σώμα του και αρχίζει να πλησιάζει τον αντίπαλο του είτε αργά (approach), είτε κυνηγώντας το (chasing). Το πιο συχνό μοτίβο επιθετικότητας που παρατηρήθηκε είναι η αποκαλούμενη χαμηλής έντασης μάχης (low-level fencing). Στο μοτίβο αυτό, δύο έντομα, των οποίων τα σώματά τους βρίσκονται παράλληλα, προεκτείνουν το μεσαίο τους πόδι ακουμπώντας το ένα το άλλο. Επιπλέον, παρατηρήθηκε υψηλής έντασης μάχη (high-level fencing), κατά την οποία τα έντομα έρχονται αντιμέτωπα, προεκτείνουν τα πόδια τους και πραγματοποιείται ένα είδος '*ξιφασκίας*'. Ένα ακόμη μοτίβο ήταν αυτό του απότομου χτυπήματος (lunging), κατά το οποίο το έντομο ανασηκώνεται στα οπίσθια πόδια του και χτυπάει με δύναμη το αντίπαλο του. Τέλος, παρατηρήθηκε το ξαφνικό πέταγμα του εντόμου και η επίθεση στον αντίπαλό του (flying attack). Τις περισσότερες φορές, η επιθετική συμπεριφορά των εντόμων ξεκίνησε από χαμηλής έντασης μάχη και στη συνέχεια ανάλογα με την αλληλεπίδραση των εντόμων υπήρξε η αντίστοιχη κλιμάκωση. Μετά από κάθε έντονη μάχη παρατηρήθηκαν ενέργειες '*καλλωπισμού*' (grooming). Εκτός από τα επιθετικά μοτίβα συμπεριφοράς παρατηρήθηκαν και τα αμυντικά. Οι αμυντικές κινήσεις περιελάμβαναν ενέργειες οπισθοχώρησης όπως είναι η απομάκρυνση του χαμένου από την επιφάνεια της τροφής είτε περπατώντας, είτε πετώντας.

Τα περισσότερα μοτίβα συμπεριφοράς του *D. suzukii* ήταν κοινά και στα δύο φύλα, αλλά ορισμένα ήταν χαρακτηριστικά μόνο του ενός. Το 'wing threat', 'chasing', 'lunging', 'flying attack', και 'flying away' εκδηλώθηκε μόνο στο αρσενικό *D. suzukii*. Το μοτίβο 'low & high level fencing' παρουσιάστηκε και στα δύο φύλλα αλλά διαφοροποιήθηκε η διάρκεια εμφάνισής του. Στα αρσενικά διήρκησε περισσότερο από 3 s, ενώ στα θηλυκά λιγότερο από 3 s. Χαρακτηριστική συμπεριφορά για τα θηλυκά ήταν το επίμονο κοίταγμα (staring) και η ταυτόχρονη θρέψη τους σε συνδυασμό με την προέκταση των ποδιών τους (feeding και tapping).



Εικόνα 5.9: Επιθετικά μοτίβα συμπεριφοράς του *D. suzukii*. Στην α.1 και α.2 φωτογραφία απεικονίζεται το επιθετικό μοτίβο συμπεριφοράς'wing threat' από διαφορετικέ γωνίες λήψης, στη β) και γ) το 'low-level' και 'high-level fencing' αντίστοιχα, στη δ) το 'lunging' και τέλος στο ε) το 'flying attack'

Πίνακας 5.1: Ηθόγραμμα των επιθετικών και αμυντικών μοτίβων συμπεριφοράς του αρσενικού και του θηλυκού *D. suzukii*

Αρσενικό	**Θηλυκό**
ΕΠΙΘΕΤΙΚΑ ΜΟΤΙΒΑ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ	
'Wing threat' (απειλή φτερού)	
Το έντομο ανυψώνει ταυτόχρονα τα φτερά του σε άνοιγμα γωνίας 45°έως 90°	Δεν παρατηρείται
'Tapping threat' (απειλή αγγίγματος)	
Το έντομο προεκτείνει το μεσαίο πόδι χωρίς όμως να αγγίζει τον αντίπαλο του	Το έντομο εκτείνει το μεσαίο πόδι χωρίς όμως να αγγίζει τον αντίπαλο του
'Approach' (προσέγγιση)	
Το έντομο χαμηλώνει το σώμα του και προσεγγίζει (αργά ή γρήγορα) τον αντίπαλο του	Το έντομο χαμηλώνει το σώμα του και προσεγγίζει (αργά ή γρήγορα) τον αντίπαλο του
'Low - level fencing' (χαμηλής έντασης μάχης)	
Τα έντομα βρίσκονται παράλληλα μεταξύ τους, εκτείνουν το μεσαίο πόδι τους και αγγίζει το ένα το άλλο	Τα έντομα βρίσκονται παράλληλα μεταξύ τους, εκτείνουν το μεσαίο πόδι τους και αγγίζει το ένα το άλλο
'High – level fencing' (υψηλής έντασης μάχης)	

Και τα δύο έντομα έρχονται αντιμέτωπα, προεκτείνουν τα πόδια τους και σπρώχνονται	Και τα δύο έντομα έρχονται αντιμέτωπα, προεκτείνουν τα πόδια τους και σπρώχνονται
'Feeding and Tapping' (θρέψη και άγγιγμα)	
Δεν παρατηρείται	Το έντομο εκτείνει το πόδι του προς τον αντίπαλο ενώ ταυτόχρονα τρέφεται
'Staring' (επίμονο κοίταγμα)	
Δεν παρατηρείται	Τα έντομα κοιτάζονται επίμονα
'Chasing' (κυνηγητό)	
Το ένα έντομο κυνηγάει το άλλο	Δεν παρατηρείται
Lunging (χτύπημα)	
Το έντομο ανασηκώνεται στα οπίσθια πόδια του και πέφτει πάνω στον αντίπαλο	Δεν παρατηρείται
'Flying and attacking' (πέταγμα και επίθεση)	
Το έντομο ξαφνικά πετάει και επιτίθεται στον αντίπαλο πέφτοντας πάνω του	Δεν παρατηρείται
ΑΜΥΝΤΙΚΑ ΜΟΤΙΒΑ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ	
'Defensive wing threat' (αμυντικό άνοιγμα φτερών)	
Το έντομο εκτείνει και τα δύο φτερά σε κλίση 45° ενώ αντιμετωπίζει επίθεση από τον αντίπαλό του	Δεν παρατηρείται
Walking away (απομάκρυνση με περπάτημα)	
Το έντομο χάνει την μάχη και εγκαταλείπει την επιφάνεια της τροφής περπατώντας μακριά	Το έντομο χάνει την μάχη και εγκαταλείπει την επιφάνεια της τροφής περπατώντας
Flying away (απομάκρυνση με πέταγμα)	
Το έντομο χάνει την μάχη και εγκαταλείπει την επιφάνεια της τροφής πετώντας μακριά	Δεν παρατηρείται

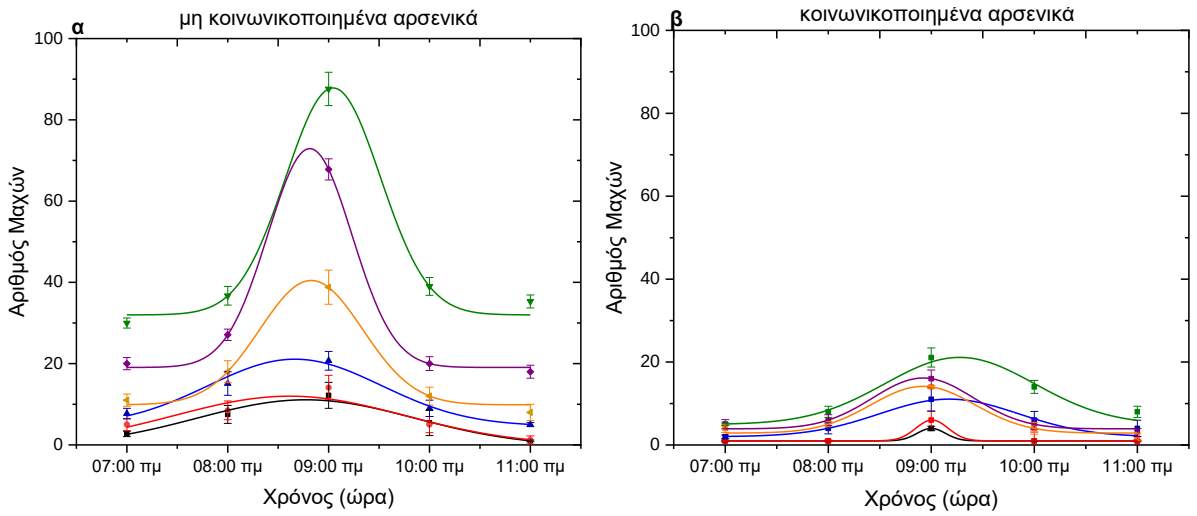
Συγκρίνοντας το ηθόγραμμα του *D. suzukii* (Πίνακας 5.1) και του *D. melanogaster* (Kravitz & Fernandez, 2015) διαπιστώθηκαν αρκετές ομοιότητες και διαφορές. Αναλυτικότερα και τα δύο είδη αλλά και το *D. simulans* εκδήλωσαν τα παρακάτω μοτίβα συμπεριφοράς 'wing threat' 'approach', 'chase', 'low & high level fencing', 'lunge', 'flying & walking away' (Hoffmann, 1987, Chen et al, 2002, Cini et al, 2012). Παρόλα αυτά στο *D. melanogaster* και στο *D. simulans* παρατηρήθηκαν μοτίβα συμπεριφοράς τα οποία δε διαπιστώθηκαν στο *D. suzukii*. Αυτά είναι το 'boxing' κατά το οποίο και τα δύο έντομα ανασηκώνονται στα οπίσθια πόδια τους και ξεκινάνε τη μάχη και το 'holding', κατά το οποίο το ένα έντομο κρατάει το άλλο και προσπαθεί να το ακινητοποιήσει (Chen et al. 2002). *Το μοτίβο συμπεριφοράς 'flying attack' διαπιστώθηκε μόνο στο D. suzukii*. Όπως *στο D. melanogaster* έτσι και στο *D. suzukii* έχει διαπιστωθεί ότι το

αρσενικό εκδηλώνει περισσότερη επιθετικότητα από ότι το θηλυκό (Ueda et al. 2002, Nilsen et al. 2004). Η διαφορά στην έκφραση της επιθετικής συμπεριφοράς μεταξύ αρσενικού και θηλυκού φύλου έγκειται στο γεγονός ότι τα αρσενικά έχουν την ανάγκη της γονιμοποίησης και παράλληλα δεν μοιράζονται την τροφή τους με αποτέλεσμα να εκφράζουν περισσότερη κυριαρχία στην προσπάθειά τους να την εξασφαλίσουν (Ueda et al. 2002).

5.3.3 Επίδραση των Περιβαλλοντικών και Κοινωνικών Παραγόντων

Η επιθετική συμπεριφορά των εντόμων της οικογένειας Drosophilidae επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς και κοινωνικούς παράγοντες (Kravitz & Fernandez, 2015). Στην παρούσα έρευνα τα πειράματα βιοδοκιμών σχεδιάστηκαν με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε η επίδραση της κοινωνικοποίησης στις έξι διαφορετικές ηλικίες (1d, 2d, 3d, 4d, 5d και 6d) να μελετηθεί ταυτόχρονα με τη διάρκεια των πέντε διαφορετικών ωρών μετά την έναρξη της φωτόφασης (07:00 έως 11:00 πμ) (Εικ. 5.3). Στην ηλικία των 4 ημερών, κοινωνικοποιημένα και μη κοινωνικοποιημένα αρσενικά *D. suzukii* εκδήλωσαν τον μεγαλύτερο αριθμό μαχών σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ηλικίες (Εικ. 5.10 α) μη κοινωνικοποιημένα και β) κοινωνικοποιημένα). Για παράδειγμα την $3^{η}$ ώρα μετά την έναρξη τη φωτόφασης τα έντομα, τα οποία ήταν ηλικίας μέχρι και 3 ημερών, ανεξαρτήτου κοινωνικοποίησης, εκδήλωσαν στατιστικά μικρότερη επιθετική συμπεριφορά από εκείνη των εντόμων που ήταν μεγαλύτερα σε ηλικία (One-Way ANOVA, μη κοιν.: $F(5, 114) = 13031.46$, $p<0.05$, κοιν.: $F(5, 114) = 1154.01$, $p<0.05$).

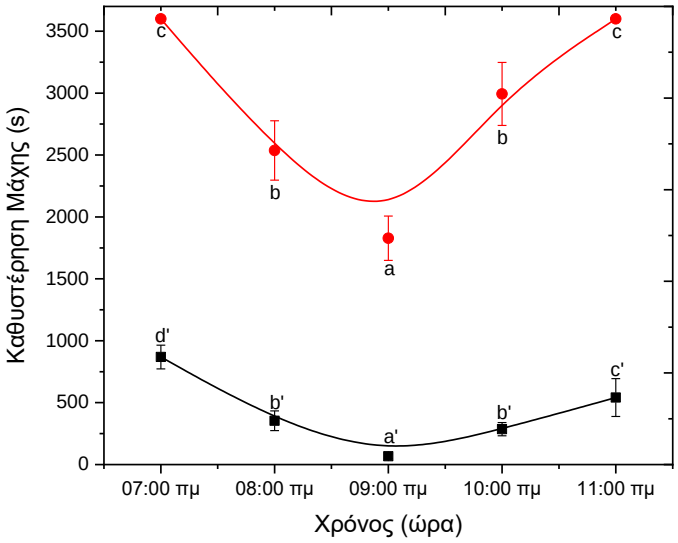
Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί και για άλλα είδη της οικογένειας Drosophilidae, αναφέροντας ότι τα μεγαλύτερα σε ηλικία αρσενικά έχουν λιγότερες πιθανότητες να αναπαραχθούν επομένως η θέλησή τους να ανταγωνιστούν τους αντιπάλους τους και να εμπλακούν σε επισφαλείς μάχες είναι πολύ μεγαλύτερη (Kemp, 2006). Αντίθετα, τα ακόμη μεγαλύτερης ηλικίας αρσενικά, εξαιτίας των μειωμένων αντοχών τους, είναι περισσότερο επιφυλακτικά σε επικείμενες μάχες, με αποτέλεσμα τη μειωμένη επιθετική τους συμπεριφορά (Kemp, 2006, Parker, 1974). Παράλληλα, γνωρίζοντας ότι οι CHCs επηρεάζουν την κοινωνική συμπεριφορά των εντόμων (Hoffmann, 1990, Wyatt et al, 2013) και σε συνδυασμό με το ότι στην ηλικία των 4 ημερών το *D. suzukii* είναι σεξουαλικά ώριμο, καθώς ανιχνεύεται το μεγαλύτερο ποσοστό CHCs στο δερμάτιο, συμπεραίνεται ότι *ενδεχομένως οι CHCs να προκαλούν την αυξημένη επιθετικότητα στην ηλικία των 4 ημερών*.



Εικόνα 5.10: Η επίδραση της ηλικίας και της φωτόφασης στην επιθετική συμπεριφορά των κοινωνικοποιημένων και μη αρσενικών *D. suzukii*.. Μελετήθηκαν έξι διαφορετικές ηλικίες (1d-μαύρο, 2d-κόκκινο, 3d-μπλε, 4d-πράσινο, 5d-μωβ και 6d-πορτοκαλί) κατά τη διάρκεια πέντε διαφορετικών ωρών (07:00 πμ έως 11:00 πμ) και στις δυο κοινωνικές καταστάσεις (n=25). Τα δεδομένα αναλύθηκαν σύμφωνα με τη διασπορά Gaussian όπου για τα α) μη κοινωνικοποιημένα ισχύει 1d-R^2=0.985, 2d-R^2=0.923, 3d-R^2=0.987, 4d-R^2=0.962, 5d-R^2=0.997, 6d-R^2=0.971, και για τα β) κοινωνικοποιημένα ισχύει 1d-R^2= 1, 2d-R^2= 1, 3d-R^2=0.94564, 4d-R^2=0.96358, 5d-R^2=0.94307, 6d-R^2=0.99298

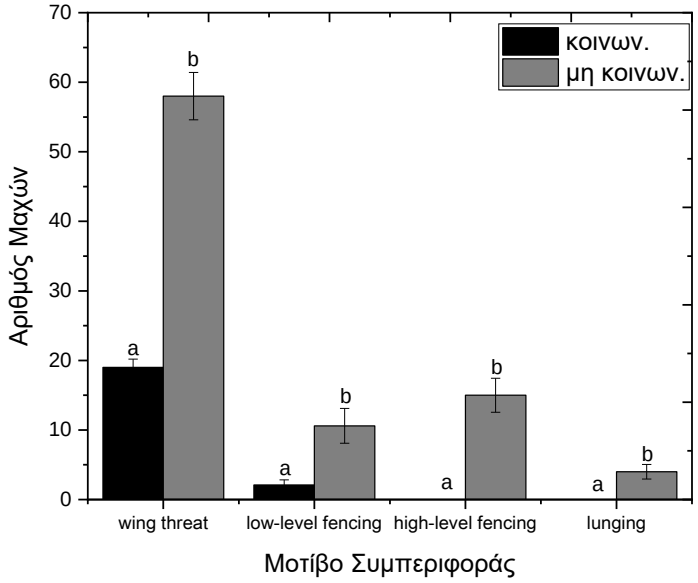
Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι και ο παράγοντας της φωτόφασης επηρεάζει την επιθετική συμπεριφορά των αρσενικών *D. suzukii*. Για παραδείγμα, η επιθετική συμπεριφορά των αρσενικών εντόμων (κοινωνικοποιημένα και μη) ηλικίας 4 ημερών ήταν σε χαμηλά επίπεδα κατά τη διάρκεια των δύο πρώτων ωρών μετά την έναρξη της φωτόφασης (07:00 πμ και 08:00 πμ). Αντίθετα, *η επιθετική συμπεριφορά αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά την 3η ώρα (09:00 πμ έως 10:00 πμ). και ακολούθησε μια έντονη μείωση την 4η και την 5η ώρα αντίστοιχα* (10:00 πμ και 11:00 πμ) (One-Way ANOVA, μη κοιν.: $F(4, 122) = 13{,}960.82$, $p<0.05$, κοιν.: $F(4, 122) = 1{,}816.39$, $p <0.05$).

Η επίδραση της φωτόφασης στην επιθετικότητα των αρσενικών διαπιστώθηκε ακόμα και όταν εξετάσθηκε η 'καθυστέρηση μάχης'. Η τάση της 'καθυστέρηση μάχης' ήταν παρόμοια και για τα μη κοινωνικοποιημένα και για τα κοινωνικοποιημένα αρσενικά (Εικ 5.11). Ειδικότερα, *η 'καθυστέρηση μάχης' ήταν μικρότερη την 3η ώρα της φωτόφασης* και διέφερε στατιστικά σημαντικά σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ώρες που μελετήθηκαν (One-Way ANOVA μη κοιν.: $F(4,122)= 835.05$ $p<0.05$ κοιν.: $F(4,122)=419.43$ $p<0.05$).



Εικόνα 5.11: Η επίδραση της φωτόφασης στην 'καθυστέρηση μάχης' των κοινωνικοποιημένων και μη αρσενικών *D. suzukii*. Η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύει τα μη κοινωνικοποιημένα αρσενικά και η μαύρη τα κοινωνικοποιημένα. Η στατιστική διαφορά υπολογίσθηκε με One Way ANOVA Test, $p<0.05$. Τα διαφορετικά γράμματα (a, b, c και d) υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά

Συγκρίνοντας τη συχνότητα εμφάνισης των διαφορετικών μοτίβων επιθετικής συμπεριφοράς μεταξύ των κοινωνικοποιημένων και μη αρσενικών ακμαίων, διαπιστώθηκε ότι ο παράγοντας κοινωνικοποίησης είναι καθοριστικής σημασίας για την εκδήλωση της επιθετικής συμπεριφοράς (Εικ. 5.12). Συγκεκριμένα, τα *μη κοινωνικοποιημένα αρσενικά εκδήλωσαν στατιστικά μεγαλύτερο αριθμό επιθετικών συμπεριφορών σε σύγκριση με τα κοινωνικοποιημένα* (Independent Samples T-test, wing threat: $t(48)=140.01$ $p<0.05$, low-level fencing $t(48)=58.76$ $p<0.05$, high-level fencing $t(48)=99.45$ $p<0.05$ και lunging $t(48)=30.75$ $p<0.05$). Παράλληλα τα πιο υψηλής έντασης επιθετικά μοτίβα όπως είναι το 'high-level fencing' και το 'lunging' δεν παρατηρήθηκαν καθόλου στις μάχες μεταξύ των κοινωνικοποιημένων αρσενικών. Παλιότερες μελέτες αναφέρουν ότι τα κοινωνικοποιημένα αρσενικά εξοικειώνονται με τα ερεθίσματα που προέρχονται από εκείνα του ίδιου φύλου με αποτέλεσμα να μην επηρεάζονται από αυτά (Dow et al. 1975).

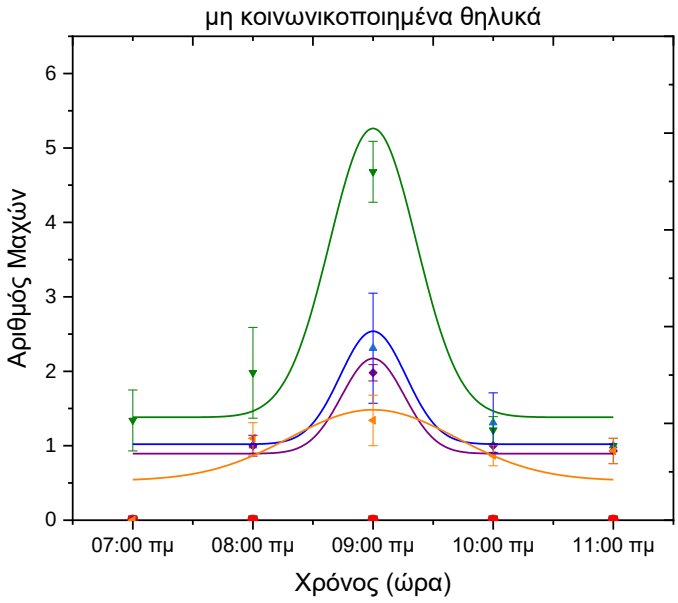


Εικόνα 5.12: Η επίδραση της κοινωνικοποίησης στην συχνότητα εμφάνισης των επιθετικών μοτίβων συμπεριφοράς των αρσενικών ακμαίων *D. suzukii*. Η στατιστική διαφορά υπολογίσθηκε με independent sample T-test, $p<0.05$. Τα διαφορετικά γράμματα (a και b)υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά

Η ανάλυση της επιθετικής συμπεριφοράς πραγματοποιείται κατά κύριο λόγο στο αρσενικό φύλο της οικογένειας Drosophilidae, και λίγες είναι οι βιβλιογραφικές αναφορές που αναφέρονται στο θηλυκό φύλο (Wang et al. 2017). Στην παρούσα έρευνα, πραγματοποιώντας πειράματα σε κοινωνικοποιημένα θηλυκά δεν παρατηρήθηκε εκδήλωση επιθετικής συμπεριφοράς, ως εκ τούτου παρουσιάζονται μόνο τα αποτελέσματα των μη κοινωνικοποιημένων θηλυκών *D. suzukii*. Βέβαια θα πρέπει να επισημανθεί ότι, στα δοχεία εκτροφής των κοινωνικοποιημένων θηλυκών εντόμων παρατηρήθηκαν μοτίβα επιθετικής συμπεριφοράς, όπως για παράδειγμα εκείνο του 'tapping'. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι η αναλογία χώρου και εντόμου ήταν μεγαλύτερη στο εσωτερικό της πειραματικής διάταξης από ότι στο δοχείο εκτροφής με αποτέλεσμα η επιθετικότητα να εμφανισθεί μόνο στο τελευταίο. Επίσης δημοσιευμένες έρευνες αναφέρουν ότι θηλυκά έντομα της οικογένειας Drosophilidae τα οποία καλλιεργήθηκαν σε δοχεία εκτροφής που περιείχαν μαγιά και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε θάλαμο παρακολούθησης στον οποίο έχει τοποθετηθεί επίσης μαγιά, όπως και στη δική μας πειραματική διάταξη, έδειξαν μειωμένη επιθετικότητα σε σύγκριση με εκείνα τα οποία καλλιεργήθηκαν σε δοχεία χωρίς μαγιά (Ueda et al, 2002).

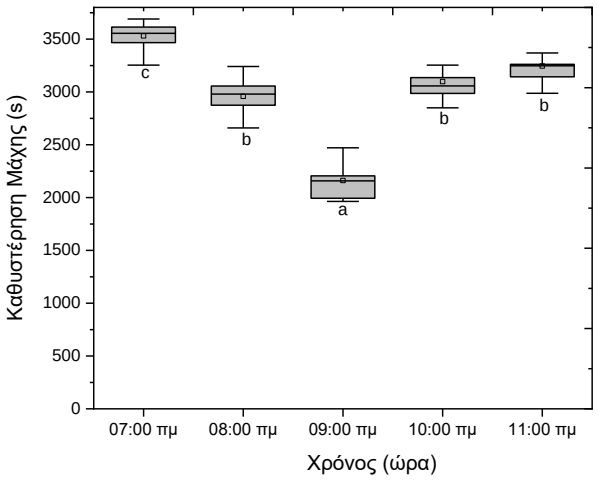
Ο παράγοντας της ηλικίας και της φωτόφασης επηρέασε με τον ίδιο τρόπο τα μη κοινωνικοποιημένα θηλυκά (Εικ. 5.13). Έντομα ηλικίας 1 και 2 ημερών δεν παρουσίασαν καθόλου επιθετικότητα. Για παράδειγμα στην 3^{η} ώρα μετά την έναρξη της φωτόφασης (09:00πμ) παρατηρήθηκε ότι τα μη κοινωνικοποιημένα θηλυκά ηλικίας μέχρι και 3 ημερών

εκδήλωσαν επιθετική συμπεριφορά μικρότερη από εκείνη των μη κοινωνικοποιημένων εντόμων που ήταν μεγαλύτερα σε ηλικία (One-Way ANOVA: $F(5, 114) = 340.22$, $p<0.05$). Όπως και στο αρσενικό φύλο έτσι και στο θηλυκό, στην ηλικία των 4 ημερών τα έντομα εκδήλωσαν την εντονότερη επιθετικότητα. Αναλύοντας την επίδραση της φωτόφασης διαπιστώθηκε ότι και τα θηλυκά ανεξαρτήτου ηλικίας εμφάνισαν στην 3η ώρα (9:00 πμ έως 10:00 πμ) την περισσότερη επιθετικότητα σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ώρες (One-Way ANOVA, $F(4, 122) = 47.21$, $p<0.05$).



Εικόνα 5.13: Η επίδραση της ηλικίας και της φωτόφασης στην επιθετική συμπεριφορά των μη κοινωνικοποιημένων θηλυκών *D. suzukii*. Μελετήθηκαν έξι διαφορετικές ηλικίες (1d-μαύρο, 2d-κόκκινο, 3d-μπλε, 4d-πράσινο, 5d-μωβ και 6d-πορτοκαλί) κατά τη διάρκεια πέντε διαφορετικών ωρών (07:00 π,έως 11:00 πμ) (n=25). Τα δεδομένα αναλύθηκαν σύμφωνα με τη διασπορά Gaussian όπου για τα μη κοινωνικοποιημένα ισχύει 3d-R^2=0.945, 4d-R^2=0.991, 5d-R2=0.897, 6d R^2=0.932

Η ίδια τάση παρατηρείται και όταν ελέγχθηκε η 'καθυστέρηση μάχης' (Εικ. 5.14). Η πιο πρώιμη εκδήλωση της επιθετικής συμπεριφοράς εμφανίστηκε την 3η ώρα της φωτόφασης, στα 2160 ± 185 s, και διαφέρει στατιστικά σημαντικά με τις υπόλοιπες ώρες (One-Way ANOVA $F(4,122)=258.75$ $p<0.05$).



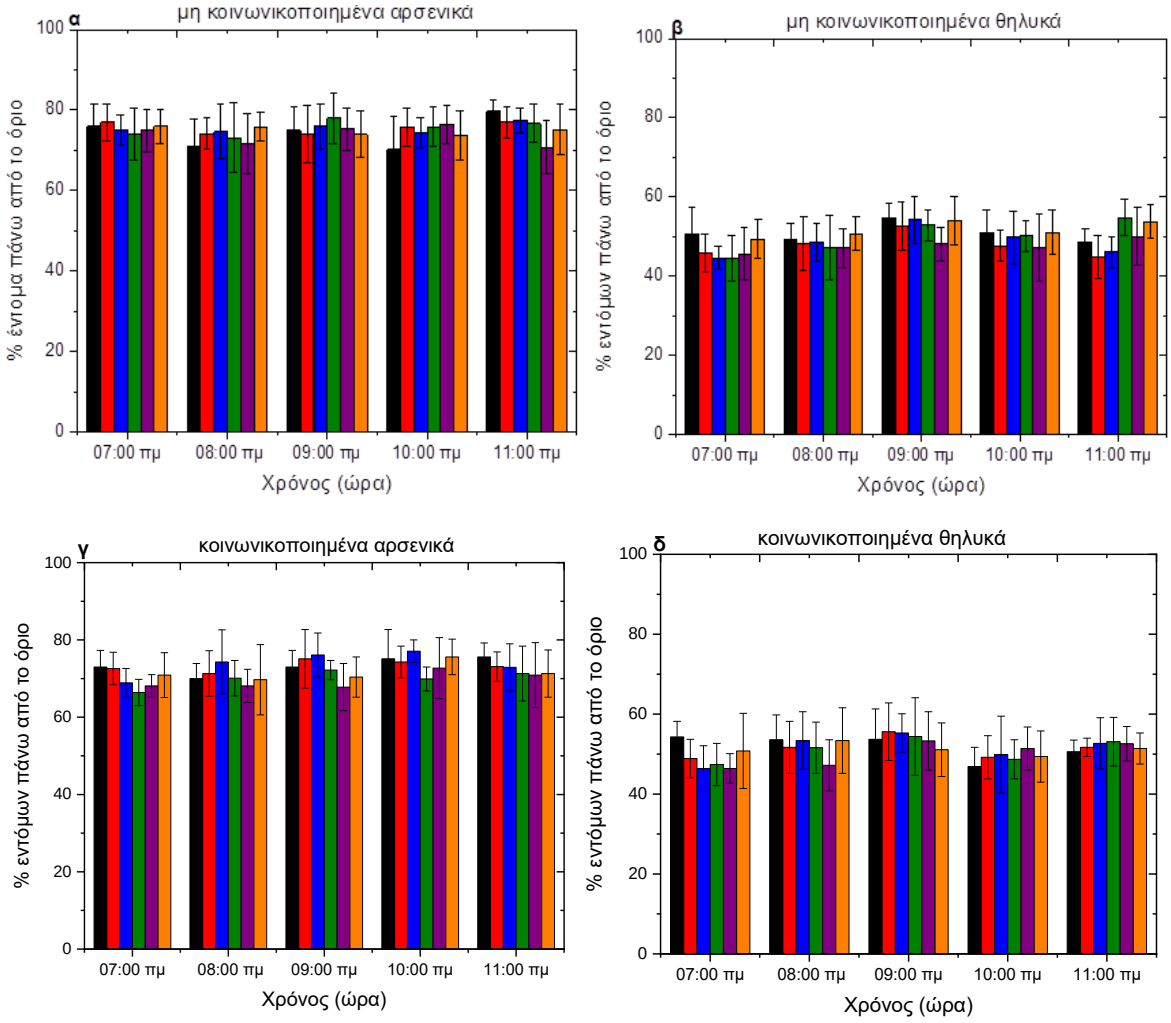
Εικόνα 5.14: Η επίδραση της φωτόφασης στην καθυστέρηση μάχης των μη κοινωνικοποιημένων θηλυκών *D. suzukii* (n=25). Η στατιστική διαφορά υπολογίσθηκε με One Way ANOVA Test, $p<0.05$. Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά. Το θηκόγραμμα υποδεικνύει το 1ο και το 3ο τεταρτημόριο, και τη δειγματική διάμεσο. Οι απολήξεις υποδεικνύουν την ελάχιστη και τη μέγιστη τιμή

Συμπεραίνεται λοιπόν ότι *ανεξαρτήτως ηλικίας, φύλου και κοινωνικοποίησης το D. suzukii εμφανίζει αυξημένα επίπεδα επιθετικότητας την 3η ώρα μετά την έναρξη της φωτόφασης*. Σε προηγούμενες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η συμπεριφορά των εντόμων της οικογένειας Drosophilidae, όπως είναι η επιθετικότητα (Wang et al, 2008), η κινητικότητα, η γονιμοποίηση (Kurtovic et al, 2007) και η θρέψη (Tinette et al, 2004, Giebultowicz et al, 2004) επηρεάζεται άμεσα από τους CHCs. Την ίδια στιγμή ο κιρκάδιος ρυθμός είναι η βασική παράμετρος η οποία επηρεάζει την παραγωγή των CHCs. Η ένταση των παραπάνω συμπεριφορών κορυφώνεται σε συγκεκριμένες ώρες κατά τη διάρκεια της φωτόφασης. (Ferveur et al. 2015). Για παράδειγμα το *D. suzukii* εκδηλώνει μία σταθερά αυξημένη κινητικότητα κατά τη διάρκεια των πρώτων πέντε ωρών μετά την έναρξη της φωτόφασης (Wyatt et al. 2013). Συμπεραίνεται λοιπόν ότι *πιθανόν ο κιρκάδιος ρυθμός και η επιρροή του στην παραγωγή CHCs ίσως είναι η αιτία της αυξημένης επιθετικότητας την 3η ώρα της φωτοπεριόδου.*

5.3.4 Κινητικότητα του *D. suzukii*

Με σκοπό να συσχετιστεί η επίδραση των περιβαλλοντικών και των κοινωνικών παραγόντων με την κινητικότητα του *D. suzukii* πραγματοποιήθηκαν πειράματα κινητικότητας (Madabattula et al, 2015, Taylor et al, 2019). Στην Εικ. 5.15 (α, β, γ, δ) απεικονίζεται η κινητικότητα των μη κοινωνικοποιημένων και κοινωνικοποιημένων αρσενικών και θηλυκών στις 6 διαφορετικές ηλικίες κατά τη διάρκεια των πέντε διαφορετικών ωρών μετά την έναρξη της φωτόφασης. Παρατηρείται ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην κινητικότητα που παρουσίασαν τα μη κοινωνικοποιημένα αρσενικά και θηλυκά *D. suzukii* (One-Way ANOVA μη κοιν. αρσενικά: $F(5, 114)=0.610$ $p=0.692$; μη κοιν. θηλυκά: $F(5,114)=0.988$ $p=0.428$) (Εικ. 5.15

α, β). Η ίδια τάση παρατηρείται και στα κοινωνικοποιημένα αρσενικά και θηλυκά (One-Way ANOVA κοιν. αρσενικά: $F(5,114)=0.766$ $p=0.576$; κοιν. θηλυκά: $F(5.114)=0.723$ $p=0.607$). (Εικ. 5.15 γ, δ). Συνεπώς *αποκλείστηκε το ενδεχόμενο ότι η κινητικότητα είναι αυτή που συμβάλει στα αυξημένα επίπεδα επιθετικότητας*.



Εικόνα 5.15: Η κινητικότητα των κοινωνικοποιημένων και μη αρσενικών και θηλυκών *D. suzukii*. Μελετήθηκαν έξι διαφορετικές ηλικίες (1d-μαύρο, 2d-κόκκινο, 3d-μπλε, 4d-πράσινο, 5d-μωβ και 6d-πορτοκαλί) κατά τη διάρκεια πέντε διαφορετικών ωρών (07:00 πμ έως 11:00 πμ) και στα δυο κοινωνικά στάτους (n=20). Η στατιστική διαφορά υπολογίσθηκε με One Way ANOVA Test, $p<0.05$. Δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών ηλικιών και των διαφορετικών ωρών μετά την έναρξη της φωτόφασης

Κεφάλαιο 6

Μελέτη Επίδρασης του Παράγοντα Κοινωνικοποίησης στο CHC Προφίλ του *D. suzukii* και Μελέτη της Βιολογικής Δράσης του 7-C23 και 7-C25 στη Συμπεριφορά του εντόμου

6.1 Εισαγωγή

Η επιθετικότητα στα έντομα είναι μία εγγενής συμπεριφορά και βασική προϋπόθεση για την εκδήλωσή της είναι η αναγνώριση του πιθανού αντιπάλου (Hoffmann, 1989, Nelson & Trainor, 2007). Στα έντομα της οικογένειας Drosophilidae, όπως και στα περισσότερα είδη εντόμων, η επιθετικότητα εκδηλώνεται μεταξύ εντόμων του ίδιου φύλου (Sturtevant, 1915, Chen et al. 2002, Robin et al. 2007). Η αναγνώριση του αντιπάλου και συγκεκριμένα η αναγνώριση του φύλου εξαρτάται άμεσα από τα χημικά ερεθίσματα που εκλύουν τα έντομα και συγκεκριμένα εξαρτάται από τους επιδερμικούς υδρογονάνθρακες που λειτουργούν ως φερομόνες (Jallon, 1984, Antony et al. 1985, Ferveur, 1997, 2005, Ebbs & Amrein, 2007). Στο προηγούμενο κεφάλαιο αποδείχθηκε ότι στο *D. suzukii,* όπως και στα άλλα είδη της οικογένειας Drosophilidae (Kravitz & Fernandez, 2015), η επιθετικότητα μεταξύ δύο εντόμων εκδηλώνεται αρχικά με χαμηλής έντασης μάχες. Όταν δύο αρσενικά έντομα τοποθετηθούν σε αρένα παρακολούθησης, εκδηλώνουν αμέσως μια επιθετική προδιάθεση εκτείνοντας τα φτερά τους, ‘wing threat’, χωρίς όμως να έρθουν σε επαφή. Στη συνέχεια, εκδηλώνεται το μοτίβο συμπεριφοράς ‘fencing’, κατά το οποίο το έντομο εκτείνει το πόδι του και αγγίζει τον αντίπαλό του. Οι πτητικοί CHCs είναι αυτοί που προκαλούν πρωτίστως την επιθετική προδιάθεση των εντόμων, διότι γίνονται αντιληπτοί μέσω της όσφρησης και ανιχνεύονται από τα έντομα νωρίτερα. Αντίθετα, οι λιγότερο πτητικοί CHCs γίνονται αντιληπτοί δια μέσου της αφής και της γεύσης και ανιχνεύονται από τα έντομα σε δεύτερο στάδιο, μιας και είναι απαραίτητη προϋπόθεση η μεταξύ τους επαφή (Amrein & Thome, 2005, Wicker-Thomas, 2007, Touhara & Vosshall, 2009, Billeter & Levine, 2012).

Πρόσφατες βιβλιογραφικές αναφορές έδειξαν ότι το φερομονικό προφίλ των αρσενικών και των θηλυκών εντόμων του Drosophila μπορεί να μετατραπεί μέσω κάποιων γενετικών και χημικών χειρισμών (Ferveur et al. 2007, Krupp et al. 2008). Για παράδειγμα, όταν τα οενοκύτταρα (oenocytes) (ενός θηλυκού εντόμου υποβληθούν σε αρρενοποίηση, μέσω της έκφρασης ενός RNAi γονιδίου, παράγουν CHCs ίδιους, ποιοτικά και ποσοτικά, με το αρσενικό

φύλο (Fernandez et al. 2010). Όταν το μεταλλαγμένο αυτό θηλυκό έντομο τοποθετηθεί μαζί με ένα αρσενικό, το αρσενικό εκδηλώνει αυξημένη επιθετική συμπεριφορά ως προς το θηλυκό. Σε διαφορετική μελέτη διαπιστώθηκε ότι όταν ένα αρσενικό *D. melanogaster* ήρθε σε επαφή με αρσενικό, του οποίου τα οενοκύτταρα (oenocytes) μειώθηκαν με τη χρήση ενός προ-αποπτωτικού γονιδίου[10] και στη συνέχεια αυτό υποβλήθηκε σε διαδικασία 'perfuming' με εκχύλισμα CHCs από αρσενικά άγριου πληθυσμού, τα επίπεδα επιθετικότητάς του αυξήθηκαν (Wang et al. 2011). Συμπεραίνεται λοιπόν ότι οι CHCs του αρσενικού εντόμου είναι αυτοί που προκαλούν την επιθετικότητα, μιας και το αρσενικό σπάνια θα εκδηλώσει επιθετική συμπεριφορά ως προς το θηλυκό (Fernandez et al. 2010).

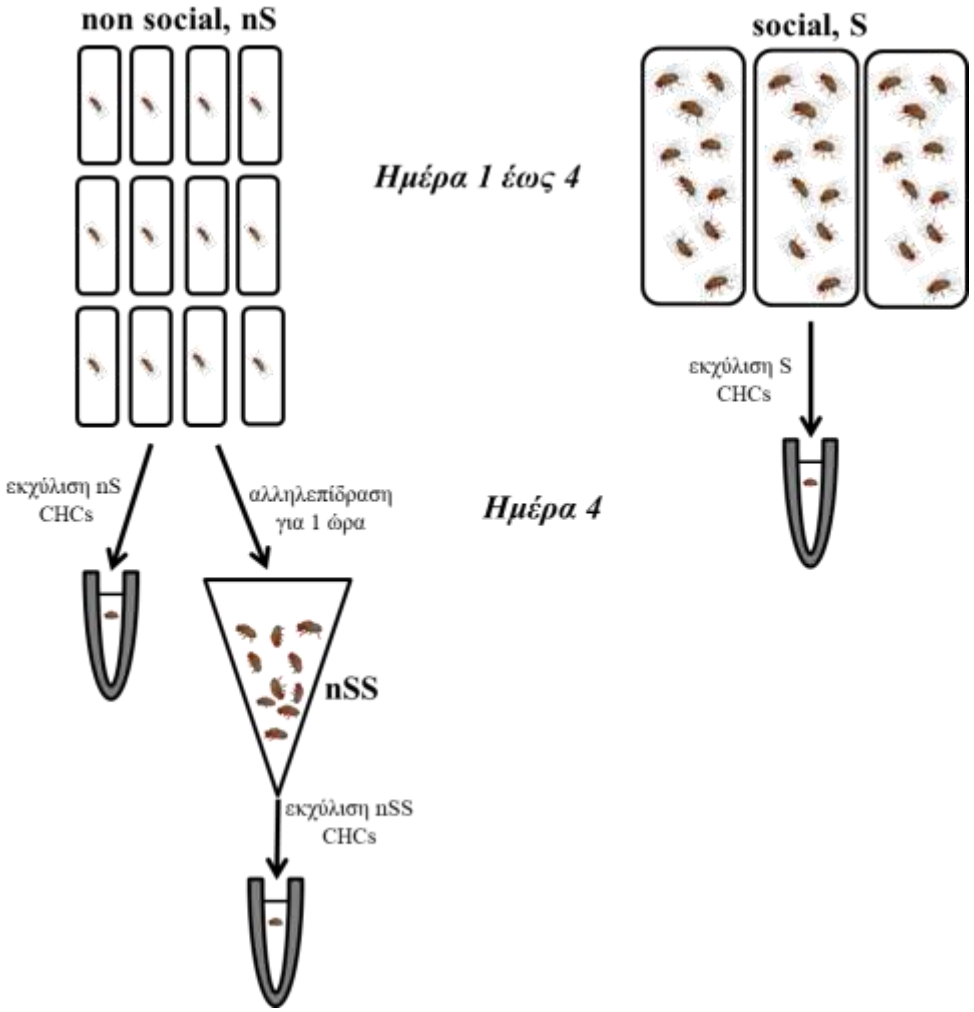
Ενώ η επιθετική συμπεριφορά έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό για το *D. melanogaster* (Kravitz & Fernandez, 2015) δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές, οι οποίες να επικεντρώνονται στο *D. suzukii*. Στο προηγούμενο κεφάλαιο διαπιστώθηκε ότι τα μη κοινωνικοποιημένα *D. suzukii* εκφράζουν μεγαλύτερη επιθετικότητα απ' ότι τα κοινωνικοποιημένα. Πιθανόν αυτό να οφείλεται στους CHCs γι΄ αυτό και στην παρούσα έρευνα μελετήθηκε πως ο παράγοντας της κοινωνικοποίησης επηρεάζει το φερομονικό προφίλ του *D. suzukii*. Συγκεκριμένα αναλύεται το φερομονικό προφίλ των κοινωνικοποιημένων και μη κοινωνικοποιημένων *D. suzukii*. Κατόπιν μη κοινωνικοποιημένα έντομα υποβάλλονται σε συνθήκες κοινωνικοποίησης με σκοπό να μελετηθεί πώς η μεταξύ τους αλληλεπίδραση επηρεάζει το φερομονικό τους προφίλ.

[10] Προ-αποπτωτικό γονίδιο είναι το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για τον κυτταρικό θάνατο.

6.2 Πειραματικό Μέρος

6.2.1 Πειραματική Διαδικασία

Αρσενικά και θηλυκά έντομα καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες μη κοινωνικοποίησης (non-social, nS) και κοινωνικοποίησης (social, S) μέχρι την ηλικία των 4 ημερών. Ο τρόπος εκτροφής των κοινωνικοποιημένων και μη, εντόμων είναι ίδιος με αυτόν που περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο. Στην ηλικία των 4 ημερών πραγματοποιείται εκχύλιση των CHCs των nS και S εντόμων και για τα δύο φύλα (M-αρσενικά, F-θηλυκά). Στη συνέχεια, 10 ζωντανά nS (ίδιου φύλου) τοποθετούνται για 1 ώρα σε Eppendorf tube με σκοπό τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση (nSS). Έπειτα, εκχυλίζονται οι CHCs των nSS εντόμων (Εικ. 6.1).



Εικόνα 6.1:Σχεδιάγραμμα όπου απεικονίζεται η πειραματική διαδικασία, η οποία ακολουθήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης του παράγοντα κοινωνικοποίησης στο φερομονικό προφίλ του *D. suzukii*

6.2.2 Εκχύλιση CHCs

Η εκχύλιση των επιδερμικών υδρογονανθράκων των nS, S και nSS, εντόμων και για τα δύο φύλα πραγματοποιείται με τη μεταφορά 1 εντόμου σε Eppendorf tube (1.5 ml) και την προσθήκη εξανίου (200 μl). Το Eppendorf tube ανακινείται για ένα λεπτό πριν το τέλος της εκχυλιστικής περιόδου διάρκειας 1 ώρας. Έπειτα, συλλέγεται το εκχύλισμα (90 μl), μεταφέρεται σε crimp top vial (Thermo Scientific) όπου και προστίθεται C16 d_{34} (10 μl) ως εσωτερικό πρότυπο. Το τελικό διάλυμα αποθηκεύεται στους -20ºC μέχρι την περαιτέρω ανάλυσή του με την Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζας GC-MS, SIM μέθοδο. Στο Κεφάλαιο 2 περιγράφονται οι πειραματικές συνθήκες της αναλυτικής τεχνικής και ο τρόπος ποσοτικού προσδιορισμού. Για το κάθε φύλο και τον κάθε παράγοντα κοινωνικοποίησης πραγματοποιούνται 10 επαναλήψεις (n=10).

6.2.3 Βιοδοκιμές

Βασιζόμενοι στην ανάλυση των αποτελεσμάτων της επίδρασης της κοινωνικοποίησης στους CHCs του *D. suzukii* επιλέχθηκαν δύο ουσίες για τη μελέτη της βιολογικής τους δράσης. Συγκεκριμένα επιλέχθηκε το 7-εικοσιτριένιο (7-tricosene, 7-C23), και το 7-εικοσιπεντένιο (7-pentacosene, 7-C25). Το 7-C23 ήταν εμπορικά διαθέσιμο από τη Sigma Aldrich και το 7-C25 σε αναλογία cis:trans=71:29 συντέθηκε από τον υποψήφιο διδάκτορα Εμμανουήλ Σοφιαδή, Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης με υπεύθυνο τον καθ. Γεώργιο Βασιλικογιαννάκη.

Βιοδοκιμές Επιθετικότητας

Σε ήδη υπάρχουσες βιβλιογραφικές αναφορές έχει αποδειχθεί ότι οι ουσίες 7-C23 και 7-C25 επηρεάζουν την επιθετική συμπεριφορά του *D. melanogaster* (Wang et al. 2011). Για τη μελέτη της επίδρασης των ουσιών αυτών εφαρμόσθηκαν βιοδοκιμές επιθετικότητας μεταξύ δύο παρθένων εντόμων του ίδιου φύλου (ηλικίας 4 ημερών). Το έντομο, στο οποίο εναποτίθεται η εκάστοτε ουσία αναφέρεται ως *έντομο-αντικείμενο*. Για τις ανάγκες του πειράματος, παρασκευάσθηκαν τα διαλύματα των δύο ουσιών σε εξάνιο. Πραγματοποιήθηκε το '*perfuming*' του *εντόμου-αντικειμένου* με σκοπό την εναπόθεση της εκάστοτε ουσίας προς μελέτη (Snellings et al. 2018). Η διαδικασία του '*perfuming'* πραγματοποιήθηκε με την τεχνική '*paintbrush*',

καθώς σε προηγούμενο κεφάλαιο αποδείχθηκε ότι ήταν ο τρόπος με τον οποίο εναποτίθεται ποσότητα ουσίας πάνω στο έντομο με μικρότερο στατιστικό λάθος. Αφού πραγματοποιηθεί ο ποσοτικός προσδιορισμός, με τη χρήση GC-MS, SIM μέθοδο (Κεφάλαιο 2) της ουσίας που εναποτίθεται, επαναλαμβάνεται η διαδικασία του '*perfuming'* στο *έντομο-αντικείμενο* και μεταφέρεται μαζί με τον αντίπαλό του στην πειραματική διάταξη για τον έλεγχο της επιθετικότητας. Η πειραματική διάταξη στην οποία λαμβάνουν χώρα οι βιοδοκιμές επιθετικότητας περιγράφεται λεπτομερώς στο Κεφάλαιο 5 (Εικ 5.2).

Για τη μελέτη της βιολογικής δράσης του 7-C23 στα δύο φύλα επιλέγονται τυχαία δύο S έντομα όπου στο *έντομο-αντικείμενο* εναποτίθεται η ουσία 7-C23 και στη συνέχεια καταγράφεται η επιθετική συμπεριφορά μέσω μίας βιντεοκάμερας για 3600 s (n=25). Παράλληλα πραγματοποιούνται πειράματα ελέγχου (control) επιθετικότητας μεταξύ nS και S, όπου γίνεται προσθήκη εξανίου στο *έντομο-αντικείμενο*. Για τη μελέτη της βιολογικής δράσης του 7-C25 και στα δύο φύλα επιλέγονται τυχαία δύο nS έντομα, όπου στο *έντομο-αντικείμενο* εναποτίθεται η ουσία 7-C25. Στη συνέχεια, καταγράφεται η επιθετική συμπεριφορά μέσω μίας βιντεοκάμερας για 3600 s (n=25). Η επιθετική συμπεριφορά ποσοτικοποιείται προσδιορίζοντας το χρόνο που απαιτείται από την έναρξη της βιοδοκιμής μέχρι την εκδήλωση της πρώτης μάχης (καθυστέρηση μάχης) (Wang et al. 2017). Οι βιοδοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε δωμάτιο με ελεγχόμενες συνθήκες (θερμοκρασία 21±1°C και υγρασία 65±5%) κατά τη διάρκεια της 3^{ης} ώρας μετά την έναρξη της φωτόφασης (9:00πμ-10:00πμ), καθώς στο προηγούμενο κεφάλαιο αποδείχθηκε ότι στην ώρα αυτή εκδηλώνονται τα μεγαλύτερα ποσοστά επιθετικότητας.

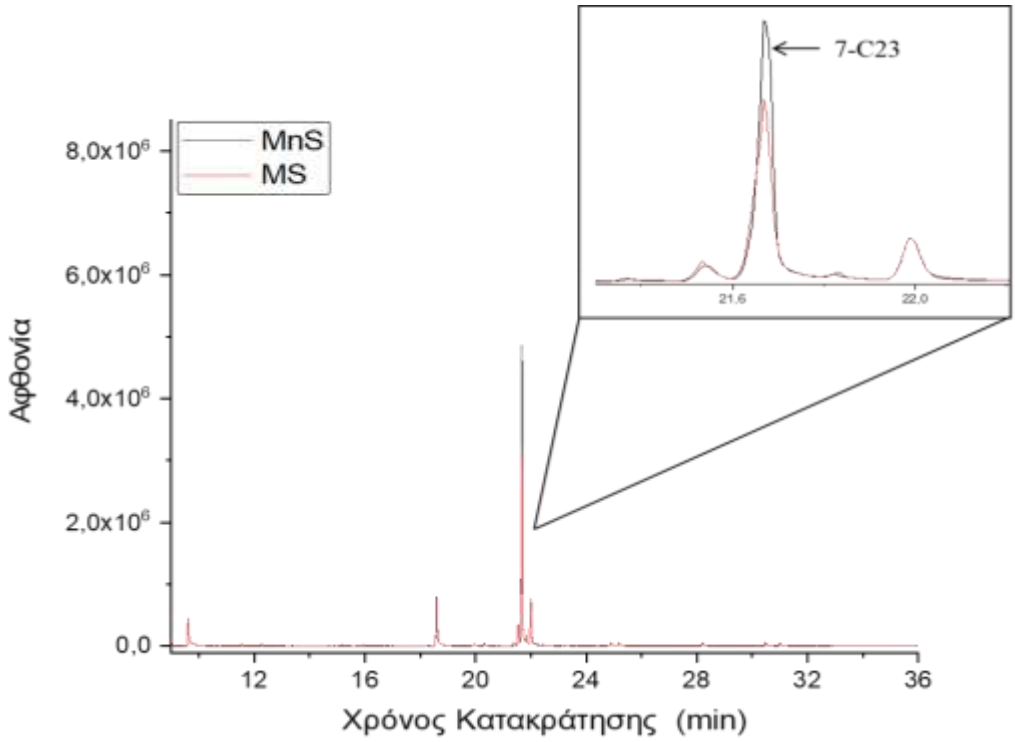
6.2.4 Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα IBM SPSS Statistics 24. Υπολογίστηκε ο μέσος όρος (mean) και η τυπική απόκλιση (standard deviation, s.d.). Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με One-Way ANOVA test και με Independent samples T-test ανάλογα με το είδος των μεταβλητών και με τη διακύμανση των τιμών (Normality Test του Shapiro-Wilk εξαιτίας $n \leq 50$). Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε σε $p<0.05$, το οποίο αντιστοιχεί σε όριο εμπιστοσύνης 95%.

6.3 Αποτελέσματα - Συζήτηση

6.3.1 Επίδραση Κοινωνικοποίησης στους CHCs του *D. suzukii*

Με σκοπό τη μελέτη επίδρασης της κοινωνικοποίησης στο φερομονικό προφίλ του εντόμου, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των CHCs των εντόμων (αρσενικών και θηλυκών), τα οποία υποβλήθηκαν σε διαφορετικές κοινωνικές συνθήκες από την πρώτη μέρα εκκόλαψής τους. Αναλυτικότερα, όταν συγκρίθηκαν οι CHCs των MnS και MS εντόμων διαπιστώθηκε ότι δε διαφέρουν ποιοτικά ή ποσοτικά παρά μόνο στην περίπτωση του 7-C23, το οποίο βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία στα MnS (MnS=590.3±18.9 ng) από ότι στα MS (MSn=440.8 ± 8.1 ng) (Independent-sample T test: $t(18)=64.4$, $p<0.05$) (Πίνακας 6.1 αρσενικά). Το ποσοστό αύξησης κυμάνθηκε στα 33.9 %. Το ίδιο διαπιστώθηκε και όταν συγκρίθηκαν οι CHCs των FnS και FS εντόμων, όπου το 7-C23 ήταν η μόνη ουσία που παρουσίασε αύξηση στα FnS (FnS=457.2 ± 8.5 ng) σε σύγκριση με τα FS (FS=410.6 ± 3.4 ng) (Independent sample T-test: $t(18)=18.87$, $p<0.05$) (Πίνακας 6.2 θηλυκά). Το ποσοστό αύξησης κυμάνθηκε στα 11.4%. Στην Εικ. 6.1 παρουσιάζεται ως παράδειγμα το χρωματογράφημα των αρσενικών *D. suzukii*.



Εικόνα 6.1: Χρωματογράφημα των CHCs των μη κοινωνικοποιημένων (MnS, μαύρο) και κοινωνικοποιημένων (MS κόκκινο) αρσενικών εντόμων *D. suzukii*

Αξίζει να σημειωθεί ότι ενώ το συνολικό ποσό των CHCs ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο στα θηλυκά (FnS= 1199.3 ± 8.7 ng, FS= 1156.5 ± 16.1 ng) σε σύγκριση με τα αρσενικά (MnS= 1014.8 ± 5.4 ng, MS= 872.5 ± 15.4 ng) (Independent samples T-test,nS: $t(18)=55$, $p<0.05$; S: $t(18)=40.5$, $p<0.05$), το 7-C23 ήταν η μόνη ουσία, η οποία παράχθηκε σε μεγαλύτερη ποσότητα στα αρσενικά (MnS και MS) απ' ότι στα θηλυκά (FnS και FS).

Πίνακας 6.1: Ποσοτικός προσδιορισμός των MnS (Male non-Social), MS (Male Social) και MnSS (Male non-Social Socialized) του *D.suzukii*

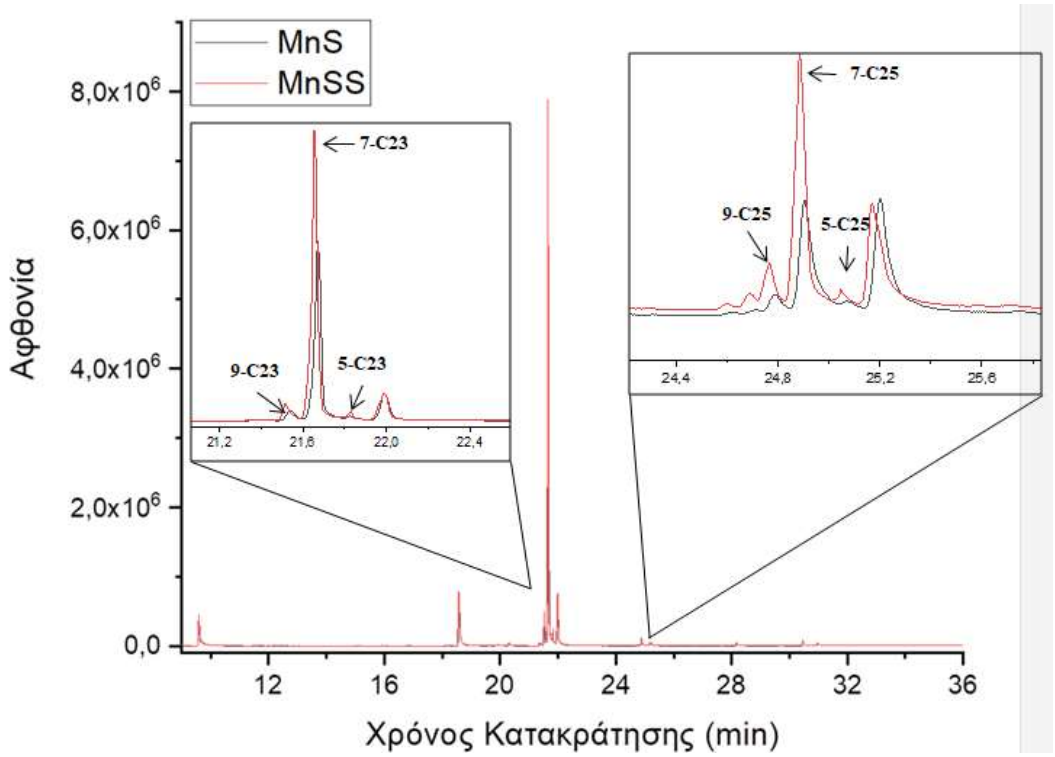
#	R.T	Ουσία	MnS(ng)	sd	MS(ng)	sd	MnSS(ng)	sd
I.S	9.64	I.S	50	0	50	0	50	0
1	15.14	C19	1.1	0.1	0.8	0.2	0.8	0.2
2	15.29	UNI1	2.1	0.0	2.4	0.3	2.2	0.9
3	16.05	UNI2	3.8	0.1	3.9	0.1	3.9	1.4
4	16.92	C20	2.2	0.1	1.9	0.1	1.7	0.5
5	18.21	9-C21	1.0	0.0	0.8	0.1	0.7	0.3
6	18.32	7-C21	4.8	0.1	4.9	0.2	4.7	0.4
7	18.43	5-C21	0.4	0.1	0.2	0.2	0.4	0.2
8	18.69	C21	114.1	1.6	116.2	1.2	116.4	16.0
9	19.02	2-MeC20	2.2	0.2	2.3	0.2	2.8	0.4
10	19.75	2-MeC21	3.3	0.3	3.6	0.2	3.6	0.2
11	19.96	6,9-C22:2	2.8	0.7	3.8	0.3	2.9	0.2
12	20.06	9-C22	3.3	0.5	3.5	0.6	3.2	0.3
13	20.15	7-C22	7.7	2.7	5.1	0.2	5.3	0.5
14	20.24	5-C22	0.8	0.1	0.8	0.1	0.7	0.2
15	20.42	C22	10.1	1.8	7.9	0.8	7.3	0.3
16	21.49	2-MeC22	8.1	0.2	7.9	0.2	7.9	0.2
17	21.56	6,9-C23:2	2.1	0.1	2.5	0.3	1.9	0.2
18	21.66	9-C23	36.1	3.8	40.9	7.0	86.7	2.6
19	21.79	7-C23	590.3	18.9	440.8	8.1	879.0	9.8
20	21.95	5-C23	11.3	1.8	12.3	2.1	38.6	1.5
21	22.11	C23	116.0	2.6	114.0	6.0	112.0	2.6
22	22.56	UNI3	0.8	0.4	0.7	0.1	0.9	0.2
23	23.25	3-MeC23	1.7	0.5	1.5	0.3	1.2	0.2
24	23.36	9-C24	3.0	0.3	2.9	0.2	2.3	0.4
25	23.42	7-C24	0.8	0.3	0.9	0.5	1.1	0.3
26	23.50	5-C24	0.5	0.3	0.5	0.1	0.6	0.2
27	23.74	C24	3.7	0.5	4.9	0.8	4.3	0.5
28	24.73	2-MeC24	1.7	0.4	2.1	1.1	1.7	0.4
29	24.82	6,9-C25:2	2.5	0.4	2.4	0.3	2.9	0.2
30	24.90	9-C25	4.5	0.4	4.9	0.9	8.1	0.3
31	25.02	7-C25	12.1	2.9	12.9	1.7	28.6	2.8
32	25.19	5-C25	1.8	0.2	2.1	0.5	4.5	0.3
33	25.31	C25	13.5	2.0	12.9	0.6	13.4	2.5
34	26.84	C26	1.7	0.4	1.6	0.3	2.0	0.1
35	27.77	2-MeC26	2.5	0.8	2.6	0.5	2.8	0.4
36	27.94	9-C27	1.9	0.6	1.8	0.1	2.1	0.4
37	28.06	7-C27	0.7	0.2	0.6	0.1	0.8	0.1
38	28.31	C27	9.7	1.6	9.4	1.3	8.2	0.4
39	29.74	C28	1.6	0.3	1.5	0.3	1.4	0.2
40	29.87	UNI4	3.6	0.1	3.6	0.4	3.7	0.6
41	30.60	9-C29	12.0	3.1	13.6	4.1	12.6	0.6
42	30.90	7-C29	0.5	0.3	0.6	0.4	0.8	0.1
43	31.11	C29	8.6	0.9	9.4	0.9	7.6	0.8
44	33.26	2-MeC30	1.8	0.6	2.6	1.5	2.7	0.4

Πίνακας 6.2: Ποσοτικός προσδιορισμός των FnS (Female non-Social), FS (Female Social) και FnSS (Female non-Social Socialized) του *D. suzukii*

#	RT	Ουσία	FnS(ng)	sd	FS(ng)	sd	FnSS(ng)	sd
I.S	9.68	I.S	50.0	0.0	50.0	0.0	50.0	0.0
1	15.14	C19	2.1	0.2	1.0	0.2	1.6	0.4
2	15.29	UNI1	3.1	0.1	3.6	0.2	4.1	0.8
3	16.05	UNI2	4.8	0.1	4.6	0.2	4.6	0.7
4	16.92	C20	3.8	0.1	41	0.2	3.6	0.4
5	18.21	9-C21	1.1	0.2	0.9	0.3	0.8	0.1
6	18.32	7-C21	8.4	0.7	69	0.9	7.5	0.4
7	18.43	5-C21	1.4	0.4	0.7	0.3	0.9	0.1
8	18.69	C21	247.0	9.5	251.0	7.6	239.7	4.8
9	19.02	2-MeC20	3.1	0.3	2.9	0.1	3.4	0.2
10	19.75	2-MeC21	3.7	0.9	3.9	0.6	3.0	0.1
11	19.96	6,9-C22:2	2.4	0.6	2.7	0.5	2.8	0.1
12	20.06	9-C22	4.7	0.4	3.8	0.7	4.4	0.6
13	20.15	7-C22	8.1	2.6	6.9	1.6	8.9	0.8
14	20.24	5-C22	1.1	0.4	0.9	0.3	1.1	0.1
15	20.42	C22	16.6	0.9	16.4	0.6	15.9	0.8
16	21.49	2-MeC22	19.1	0.5	17.7	4.9	18.6	0.8
17	21.56	6,9-C23:2	3.1	0.7	3.7	0.4	2.9	0.4
18	21.66	9-C23	85.3	2.8	89.8	4.8	104.7	2.6
19	21.79	7-C23	457.2	8.5	410.6	3.4	501.9	4.7
20	21.95	5-C23	32.1	5.5	33.3	4.2	49.9	1.8
21	22.11	C23	174.0	8.1	168.4	6.4	170.1	7.8
22	22.56	UNI3	0.6	0.4	0.7	0.2	0.7	0.1
23	23.25	3-MeC23	1.7	0.3	1.8	0.6	1.7	0.5
24	23.36	9-C24	3.0	0.5	2.4	0.2	2.9	0.4
25	23.42	7-C24	0.7	0.5	0.7	0.2	0.7	0.1
26	23.50	5-C24	0.6	0.3	0.6	0.1	0.7	0.1
27	23.74	C24	4.6	0.3	4.1	1.1	4.4	0.2
28	24.73	2-MeC24	2.2	0.7	2.1	0.3	28	0.4
29	24.82	6,9-C25:2	2.6	0.3	2.4	0.3	2.3	0.1
30	24.90	9-C25	6.1	1.1	6.9	1.8	10.3	4.1
31	25.02	7-C25	14.7	2.8	14.1	2.4	21.1	1.9
32	25.19	5-C25	1.2	0.2	1.3	0.9	1.6	0.4
33	25.31	C25	23.5	2.1	22.9	3.5	23.4	1.7
34	26.84	C26	1.8	0.4	1.9	0.2	1.8	0.2
35	27.77	2-MeC26	3.9	0.5	3.7	0.4	4.1	0.2
36	27.94	9-C27	1.0	0.1	0.9	0.2	0.7	0.1
37	28.06	7-C27	2.9	0.5	3.1	0.4	3.2	0.2
38	28.33	C27	16.3	2.0	18.9	3.9	18.4	2.7
39	29.74	C28	2.1	0.9	1.9	0.5	1.8	0.3
40	29.87	UNI4	0.7	0.4	1.2	0.4	0.8	0.4
41	30.60	9-C29	13.9	0.6	14.3	2.4	14.8	2.4
42	30.90	7-C29	1.0	0.6	0.8	0.2	1.2	0.4
43	31.11	C29	9.4	1.4	12.6	4.1	13.1	2.4
44	33.26	2-MeC30	2.3	0.2	2.5	0.1	2.7	0.4

Αφού συγκρίθηκαν τα εκχυλίσματα των nS με nSS εντόμων διαπιστώθηκε ότι το CHC προφίλ μεταβλήθηκε ποσοτικά και στα δύο φύλα. Συγκεκριμένα, η ποσότητα των 9-, 7- και 5- C23 καθώς και των 9-, 7- και 5-C25 αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά στα nSS σε σύγκριση με το nS και στα δύο φύλα. Εξαίρεση αποτελεί το 5-C25 το οποίο παρέμεινε σταθερό μόνο στην περίπτωση του θηλυκού. Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι *το CHC προφίλ του D. suzukii, όπως και του D. melanogaster* (Kent et al. 2008), *δεν επηρεάζεται μόνο από περιβαλλοντικούς παράγοντες,*

όπως είναι ηλικία και το φύλο, αλλά επηρεάζεται και από τον παράγοντα της κοινωνικοποίησης. Στον Πίνακα 6.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των συγκρίσεων από το στατιστικό έλεγχο. Στην εικόνα 6.2 απεικονίζεται ως παράδειγμα το χρωματογράφημα των MnS και των MnSS εντόμων.



Εικόνα 6.2: Χρωματογράφημα των CHCs των μη κοινωνικοποιημένων αρσενικών (MnS, μαύρο) σε σύγκριση με τους CHCs των μη κοινωνικοποιημένων αρσενικών *D. suzukii* τα οποία τοποθετούνται σε δοχείο με σκοπό τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση (MnSS, κόκκινο) για 1 ώρα

Πίνακας 6.3: Σύγκριση των μέσων όρων των 9-, 7-,5- C23 και 9-,7-,5-C25 των nS (non-Social) και nSS (non-Social Socialized) *D. suzukii*

	Mean ± sd		***Independent Samples Test***		
			t-test για την σύγκριση των μέσων όρων		
9-C23	***nS***	***nSS***	**t**	**df**	***p***
αρσενικό	36.1±3.8	86.7±2.6	-84.2	18	.000
θηλυκό	85.3±2.8	104.7±2.6	-25.0	18	.000
7-C23					
αρσενικό	590.7±18.9	879±9.8	-86.2	18	.000
θηλυκό	457.2±8.5	501.9±4.7	-15.8	18	.000
5-C23					
αρσενικό	11.3±1.8	38.6±1.5	-76.1	18	.000
θηλυκό	32.1±5.5	49.9±1.8	-28.9	18	.000
9-C25					
αρσενικό	4.5±0.4	8.1±0.3	-22.8	18	.000

θηλυκό	6.1±1.1	10.3±4.1	-13.8	18	.000
7-C25					
αρσενικό	12.1±2.9	28.6±2.8	-39.1	18	.000
θηλυκό	14.7±2.8	21.1±1.9	-9.14	18	.000
5-C25					
αρσενικό	1.8±0.2	4.5±0.3	-22.1	18	.000
θηλυκό	1.2±0.2	1.6±0.4	-1.9	18	.068

6.3.2 Βιολογική Δράση της Ουσίας 7-C23

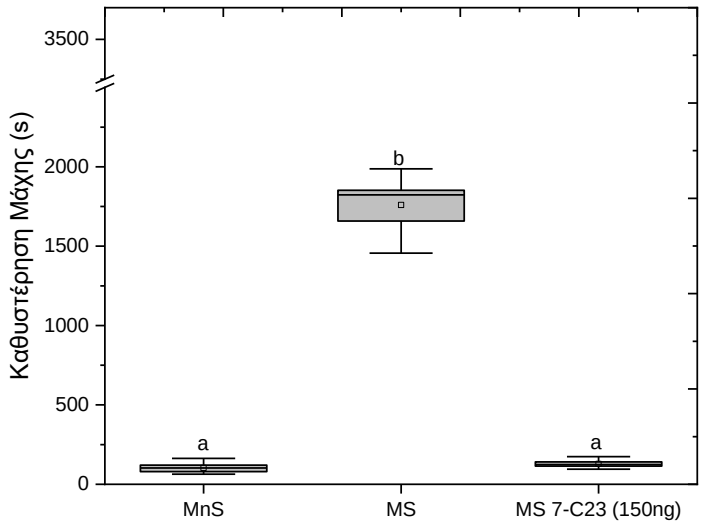
Βασιζόμενοι στα παραπάνω αποτελέσματα επιλέχθηκε η ουσία 7-C23 με σκοπό να μελετηθεί η βιολογική της δράση, καθώς ήταν η μόνη ουσία, η οποία παρουσίασε αύξηση στα nS σε σύγκριση με τα S και στα δύο φύλα του *D. suzukii*. Σύμφωνα με τον ποσοτικό προσδιορισμό των εντόμων στις αντίστοιχες κατηγορίες κοινωνικοποίησης, οι ποσότητες που επιλέχθηκαν να μελετηθούν για το 7-C23 ήταν τα 149.5 ng για το αρσενικό (Πίνακας 6.1) και 46.6 ng για το θηλυκό (Πίνακας 6.2). Οι ποσότητες αυτές επιλέχθηκαν ως αποτέλεσμα της διαφοράς που υπήρξε στην ποσότητα του 7-C23 μεταξύ των nS και S εντόμων. Στον Πίνακα 6.4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη διαδικασία 'perfuming' του εντόμου με σκοπό να τοποθετηθεί ποσότητα ουσίας, η οποία να προσεγγίζει με περισσότερη ακρίβεια τις παραπάνω προς μελέτη ποσότητες.

Πίνακας 6.4: Ποσοτικός προσδιορισμός των ουσιών 7-C23 που εναποτίθενται στην κοιλιακή χώρα του *D. suzukii*

Perfuming	7-C23 (m) (149.5 ng)	7-C23 (f) (46.6 ng)
Mean (ng)	147.7	43.8
Minimum(ng)	132.0	31.6
Maximum (ng)	170.0	53.7
± sd (ng)	14.9	6.3

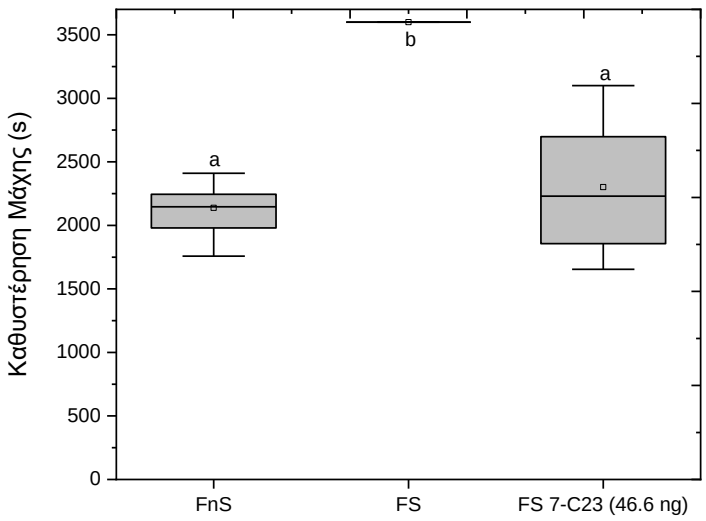
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ελέγχου επιθετικότητας μεταξύ δύο MnS και δύο MS εντόμων, όπου στο *έντομο-αντικείμενο* πραγματοποιείται 'perfuming' με εξάνιο. Διαπιστώθηκε αύξηση της επιθετικότητας στα MnS, καθώς ο χρόνος που χρειάστηκε για να εκδηλωθεί η πρώτη μάχη ήταν πολύ μικρότερος (102.6 ± 26.6 s) απ' ότι στα MS (1759.6 ± 131.5 s). Όταν στη συνέχεια προστέθηκε η ουσία 7-C23 (149.5 ng) σε ένα MS *έντομο-αντικείμενο* και τοποθετήθηκε μαζί με το ζευγάρι του στην αρένα παρακολούθησης, διαπιστώθηκε ότι ο χρόνος εκδήλωσης της πρώτης μάχης μειώθηκε στατιστικά σημαντικά (128 ± 18.3 s) σε σύγκριση με τα MS (1759.6 ± 131.5 s) του πειράματος ελέγχου (One Way ANOVA: $F(2,72)=3684.1$, $p<0.05$) (Εικ.6.3). *Συμπεραίνεται λοιπόν ότι προσθέτοντας στο MS την απαραίτητη ποσότητα 7-C23 (149.5*

ng) ούτως ώστε να ισούται με την αντίστοιχη ποσότητα του MnS, διαπιστώθηκε ότι η επιθετικότητά του S φτάνει στα ίδια επίπεδα με εκείνα του nS.



Εικόνα 6.3: Η επίδραση του 7-C23 στην επιθετικότητα των αρσενικών *D. suzukii*. Το θηκόγραμμα υποδεικνύει το 1ο και το 3ο τεταρτημόριο, και τη δειγματική διάμεσο. Οι απολήξεις υποδεικνύουν την ελάχιστη και τη μέγιστη τιμή. Η στατιστική διαφορά υπολογίσθηκε με One Way ANOVA Test $p<0.05$ (n=25). Τα διαφορετικά γράμματα (a και b) υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση του 7-C23 στην επιθετική συμπεριφορά των θηλυκών εντόμων. Πραγματοποιώντας τα πειράματα ελέγχου επιθετικότητας στα FnS και FS του *D. suzukii* διαπιστώθηκε ότι μόνο τα FnS εκδήλωσαν επιθετική συμπεριφορά. Συγκεκριμένα, ο χρόνος που χρειάστηκε για να εκδηλωθεί η πρώτη μάχη μεταξύ των δύο FnS εντόμων ήταν 2137.9 ± 226.5 s. Εναποθέτοντας την ουσία 7-C23 (46.6 ng) στο FS *έντομο-αντικείμενο* και τοποθετώντας το μαζί με τον αντίπαλό του στην αρένα παρακολούθησης, διαπιστώθηκε ότι ο χρόνος που χρειάστηκε για να εκδηλωθεί η πρώτη μάχη ήταν 2309.68 ± 541.1 s, χρόνος ο οποίος δε διαφέρει στατιστικά σημαντικά με εκείνο των FnS εντόμων (2137.9 ± 226.5 s) του πειράματος ελέγχου (One Way ANOVA: $F(2,72)= 139,2$) (Εικ. 6.4).



Εικόνα 6.4: Η επίδραση του 7-C23 στην επιθετικότητα των θηλυκών *D. suzukii*. Το θηκόγραμμα υποδεικνύει το 1ο και το 3ο τεταρτημόριο, και τη δειγματική διάμεσο. Οι απολήξεις υποδεικνύουν την ελάχιστη και τη μέγιστη τιμή. Η στατιστική διαφορά υπολογίσθηκε με One Way ANOVA Test $p<0.05$ (n=25). Τα διαφορετικά γράμματα (a και b) υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά

Συνοψίζοντας, παρατηρήθηκε ότι μετά την προσθήκη του 7-C23, η επιθετικότητα των κοινωνικοποιημένων εντόμων αυξήθηκε και έφτασε στο ίδιο επίπεδο με εκείνης των μη κοινωνικοποιημένων. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι στο Κεφάλαιο 3 διαπιστώθηκε ότι το *D.suzukii* ηλικίας 1 ημέρας παράγει μειωμένη ποσότητα 7-C23. Επιπλέον, στο Κεφάλαιο 5 παρατηρήθηκε ότι έντομα ηλικίας 1 ημέρας εκδηλώνουν μειωμένη έως και καθόλου επιθετικότητα. Αντίθετα, στην ηλικία των 4 ημερών, όπου η ποσότητα του 7-C23 αυξάνεται, τα έντομα εκδηλώνουν τα μεγαλύτερα ποσοστά επιθετικής συμπεριφοράς. *Συμπεραίνεται λοιπόν, ότι το 7-C23 είναι μία ουσία, η οποία προκαλεί την αύξηση της επιθετικής συμπεριφοράς μεταξύ δύο αρσενικών ή δύο θηλυκών D. suzukii.* Το συμπέρασμα αυτό συμφωνεί με τα ευρήματα ήδη δημοσιευμένων ερευνών για το *D. melanogaster*, οι οποίες αναφέρουν ότι το 7-C23 είναι μία ουσία, η οποία αυξάνει την επιθετικότητα (Wang et al. 2011). Παράλληλα έχει αναφερθεί ότι μικρής ηλικίας αρσενικά *D. melanogaster* δεν παράγουν 7-C23 και αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο δεν εκδηλώνουν έντονη επιθετικότητα (Pechine et al. 1988, Cobb & Jallon, 1990).

6.3.3 Βιολογική Δράση της Ουσίας 7-C25

Το 7-C25 επιλέχθηκε, καθώς παρουσίασε αύξηση στα nSS σε σύγκριση με τα nS και στα δύο φύλα και έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί ομοφυλοφιλική συμπεριφορά στα αρσενικά του *D. melanogaster* (Cobb & Jallon, 1990). Σύμφωνα με τον ποσοτικό προσδιορισμό των εντόμων στις αντίστοιχες κατηγορίες κοινωνικοποίησης, οι ποσότητες που επιλέχθηκαν να μελετηθούν για το 7-C25 ήταν για το αρσενικό τα 16.5 ng (Πίνακας 6.1) ενώ για το θηλυκό ήταν τα 6.4 ng (Πίνακας 6.2). Οι ποσότητες αυτές επιλέχθηκαν ως αποτέλεσμα της διαφοράς που υπήρξε στην

ποσότητα του 7-C25 μεταξύ των nSS και nS. Στον Πίνακα 6.5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη διαδικασία 'perfuming' του εντόμου με σκοπό να τοποθετηθεί ποσότητα ουσίας, η οποία να προσεγγίζει με περισσότερη ακρίβεια τις παραπάνω προς μελέτη ποσότητες.

Πίνακας 6.5: Ποσοτικός προσδιορισμός των ουσιών 7-C23 και 7-C25 που εναποτίθενται στην κοιλιακή χώρα του *D. suzukii*

Perfuming	7-C25 (m) (16.5 ng)	7-C25 (f) (6.4 ng)
Mean (ng)	15.8	6.7
Minimum(ng)	12.3	3.7
Maximum (ng)	19.1	9.1
± sd (ng)	2.2	1.5

Για τη μελέτη της βιολογικής δράσης του 7-C25 πραγματοποιήθηκαν πειράματα επιθετικότητας μεταξύ δυο nS αρσενικών εντόμων, όπου στο *έντομο-αντικείμενο* τοποθετείται 16.5 ng ουσίας και καταγράφεται η επιθετική τους συμπεριφορά. Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν πειράματα ελέγχου, κατά τα οποία εναποτίθεται στο nS αρσενικό εξάνιο. Διαπιστώθηκε λοιπόν, μείωση της επιθετικής συμπεριφοράς καθώς, ο απαιτούμενος για την εκδήλωση μάχης χρόνος αυξήθηκε (198.1 ±11.1 s) σε σύγκριση με τα control nS αρσενικά (102.6 ± 26.6 s) (Independent samples T-test: $t(48)=-16.6$, $p<0.05$).

Ενδιαφέρον προκάλεσε το γεγονός ότι εκδηλώθηκε ερωτική συμπεριφορά προς το *έντομο-αντικείμενο*. Η ερωτική συμπεριφορά ποσοτικοποιήθηκε προσδιορίζοντας το συνολικό χρόνο εκδήλωσής της κατά τη διάρκεια παρακολούθησης των πειραμάτων επιθετικότητας (Roche et al. 1998) και υπολογίσθηκε στα 206.8 ± 27.5 s. Παρατηρήθηκαν ερωτικά μοτίβα συμπεριφοράς, όπως για παράδειγμα το '*άνοιγμα φτερών'* και το '*κυνήγι*', τα οποία φέρονται ως χαρακτηριστικά της αλληλεπίδρασης αρσενικού-θηλυκού του *D. suzukii* (Revadi et al. 2015). Αντίστοιχα πειράματα εφαρμόσθηκαν και στην περίπτωση του θηλυκού με τη μόνη διαφορά να έγκειται στην ποσότητα της ουσίας 7-C25 που εναποτίθεται στο *έντομο-αντικείμενο.* Διαπιστώθηκε ότι η επιθετική συμπεριφορά των FnS εντόμων, που φέρουν την ουσία δε μεταβλήθηκε (2058.8 ± 176.3 s) σε σύγκριση με εκείνη των FnS control (2137.9 ± 226.5 s) (Independent samples T test, $t(48)=1.4$, $p=0.58$), ενώ δεν εμφάνισαν ομοφυλοφιλική συμπεριφορά. Γενικά στα έντομα της οικογένειας Drosophilidae και συγκεκριμένα τα θηλυκά ακμαία δεν έχει αναφερθεί ομοφυλοφιλική συμπεριφορά (Revadi et al. 2015).

Η ομοφυλοφιλική συμπεριφορά μεταξύ δύο μη κοινωνικοποιημένων αρσενικών είναι μία συμπεριφορά η οποία έχει περιγραφεί σε διάφορα είδη του ζωικού βασιλείου (Issa, & Edwards, 2006), όπως και για έντομα της οικογένειας Drosophilidae (Cobb & Jallon, 1990). Η φερομόνη cVA έχει αναφερθεί ότι προκαλεί τέτοιου είδους συμπεριφορά στο *D. melanogaster* (Kurtovic et al. 2007). Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι η cVA προκαλεί αύξηση της επιθετικότητας και ταυτόχρονα προκαλεί μία μείωση στη σεξουαλική συμπεριφορά (Kurtovic et al. 2007). Γενικά, η επιθετικότητα και η σεξουαλική συμπεριφορά είναι δύο είδη συμπεριφοράς τα οποία λειτουργούν αντιστρόφως ανάλογα, η έκφραση της σεξουαλικής συμπεριφοράς οδηγεί στη μείωση της επιθετικής (Certel et al. 2007). Συνεπώς από τη στιγμή που τοποθετήθηκε το 7-C25 στο MnS *D. suzukii* και εκδηλώθηκε σεξουαλική συμπεριφορά ήταν αναμενόμενη η μείωση της επιθετικής συμπεριφοράς. Τα δύο αυτά είδη συμπεριφορών συνδέονται με την ικανότητα αναγνώρισης του φύλου (Wang et al. 2011). Τα είδη όμως, όπως το *D. suzukii,* τα όποια δεν παρουσιάζουν ποιοτικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο φύλων (Κεφάλαιο 4), εμφανίζουν συχνότερα ομοφυλοφιλική συμπεριφορά μιας και δεν είναι σε θέση να αναγνωρίζουν τα σεξουαλικά ερεθίσματα (Cobb & Jallon, 1990).

Επίσης, σε προηγούμενες βιβλιογραφικές αναφορές έχει αναφερθεί ότι μη κοινωνικοποιημένα αρσενικά εκδηλώνουν πιο έντονη ερωτική συμπεριφορά και έχουν μεγαλύτερα ποσοστά επιτυχημένων συζεύξεων (Ferveur, 2005). Η έντονη σεξουαλική τους επιθυμία σε συνδυασμό με τη μη ικανότητά τους να διαχωρίσουν το αντίπαλο φύλο οδηγεί στην έκφραση ομοφυλοφιλικής συμπεριφοράς. Παρ’ όλα αυτά είναι μία συμπεριφορά, η οποία δεν παρατηρήθηκε στα πειράματα επιθετικότητας του *D. suzukii* παρά μόνον όταν αυξήθηκε η ποσότητα το 7-C25. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η έντονη σεξουαλική συμπεριφορά μεταξύ αρσενικών εμφανίζεται σε έντομα της οικογένειας Drosophilidae, όταν τοποθετούνται σε δοχεία με μεγάλους πληθυσμούς (Hing & Carlson, 1966). Στη δική μας πειραματική διάταξη μπορεί αφενός, να τοποθετήθηκε μικρός αριθμός εντόμων (10 έντομα) για τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση, αφετέρου όμως τοποθετήθηκαν σε Eppendorf tube των 1.5 ml και αυτό είχε ως αποτέλεσμα η αναλογία χώρου και αριθμού των εντόμων να είναι μικρή. Συνεπώς, υπάρχει η πιθανότητα τα αυξημένα ποσοστά του 7-C25 να οφείλονται στο γεγονός ότι ο χώρος που τοποθετήθηκαν τα έντομα ήταν αρκετά μικρός ως προς το μέγεθος του πληθυσμού τους.

Κεφάλαιο 7

Συμπεράσματα –Μελλοντικοί Στόχοι

Κατά τη διάρκεια της παρούσας διδακτορικής διατριβής μελετήθηκαν οι σημειοχημικές ουσίες του ζημιογόνου εντόμου *Drosophila suzukii*. Αναλυτικότερα βελτιστοποιήθηκε η μέθοδος για την ανάλυση των επιδερμικών υδρογονανθράκων του και πραγματοποιήθηκε ο πλήρης ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός τους. Μελετήθηκε πώς οι κοινωνικοί και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν το φερομονικό προφίλ του εντόμου, καθώς και η βιολογική δράση αρκετών ουσιών από αυτές που προσδιορίστηκαν. Τα συμπεράσματα που προέκυψαν συνοψίζονται στα εξής:

Βελτιστοποιήθηκε η μέθοδος ανάλυσης των CHCs του *D. suzukii*. Εφαρμόζοντας διαφορετικό θερμοκρασιακό πρόγραμμα συγκριτικά με ήδη δημοσιευμένες έρευνες ταυτοποιήθηκαν τρεις καινούριες ουσίες. Οι ουσίες αυτές είναι το C19, το 2-MeC20 και το 2-MeC21.

Εφαρμόζοντας πέντε διαφορετικές ώρες εκχύλισης στο έντομο *D. suzukii* διαπιστώθηκε ότι η απαιτούμενη ώρα εκχύλισης για να εκχυλιστεί η μέγιστη ποσότητα του κάθε CHC διαφοροποιείται. Η χημική δομή της ουσίας δεν είναι αυτή που καθορίζει την τάση εκχύλισης στο διαλύτη εξάνιο. Η ουσία C12, η οποία ανιχνεύεται στις 24 ώρες εκχύλισης, παρουσίασε απωθητική δράση και στα δύο φύλα του *D. suzukii*. Όταν μελετήθηκε η ποσότητα του 9-C25 ίση με την εκχυλιζόμενη ποσότητα των 24 ωρών, η σεξουαλική συμπεριφορά του αρσενικού εντόμου προς το θηλυκό αυξήθηκε. Αντίθετα, όταν εφαρμόσθηκε ποσότητα του 9-C25 ίση με την εκχυλιζόμενη ποσότητα της 1 ώρας, η σεξουαλική συμπεριφορά του αρσενικού εντόμου μειώθηκε. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι πειραματικές παράμετροι, όπως η ώρα εκχύλισης θα πρέπει να μελετώνται περαιτέρω, έτσι ώστε να προσδιορίζεται με ακρίβεια η ποσότητα των CHCs που περιέχεται στο δερμάτιο ενός εντόμου, καθώς σύμφωνα με αυτή την ποσότητα μελετάται η βιολογική δράση της εκάστοτε ουσίας. Η 1 ώρα εκχύλισης, που συνήθως εφαρμόζεται δεν είναι αρκετή για να πραγματοποιηθεί ακριβής ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός για όλες τις ουσίες.

Μελετώντας την επίδραση του παράγοντα του φύλου και της ηλικίας στο CHC προφίλ του εντόμου διαπιστώθηκε ότι το προφίλ του εντόμου δε διαφοροποιήθηκε ποιοτικά ως προς το φύλο. Συνεπώς το *D. suzukii* είναι ένα μονομορφικό είδος. Ταυτόχρονα αποδείχτηκε ότι ο

παράγοντας της ηλικίας είναι καθοριστικής σημασίας για τους CHCs που προσδιορίστηκαν. Με την αύξηση της ηλικίας αυξήθηκαν οι υδρογονάνθρακες με μικρή ανθρακική αλυσίδα και μειώθηκαν οι υδρογονάνθρακες με μεγάλη ανθρακική αλυσίδα. Ο τρόπος επίδρασης της ηλικίας στο CHC προφίλ του *D. suzukii* ήταν κοινός και για τα δύο φύλα, γεγονός που υποδηλώνει ότι παρόμοιοι βιοχημικοί μηχανισμοί είναι υπεύθυνοι για τις αλλαγές του φερομονικού προφίλ του εντόμου. Η διαφοροποίηση της αφθονίας των υδρογονανθράκων στις διαφορετικές ηλικίες του εντόμου πιθανόν να οφείλεται στη λειτουργία τους. Οι υδρογονάνθρακες με μακριές ανθρακικές αλυσίδες έχουν μειωμένη πτητικότητα και αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τη δημιουργία ενός ειδικού φιλμ με μικρή διαπερατότητα στο νερό, γεγονός που προστατεύει τα έντομα από τη διαβροχή τους. Οι υδρογονάνθρακες με λιγότερο μακριές ανθρακικές αλυσίδες έχουν αυξημένη πτητικότητα και ενδέχεται να λειτουργούν ως φερομόνες. Συμπεραίνεται, ότι η αφθονία των υδρογονανθράκων είναι ανάλογη του λειτουργικού τους ρόλου στο κάθε στάδιο της ανάπτυξης του εντόμου.

Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι η ουσία 9-C21 δρα ως φερομόνη συνάθροισης, αλλά μόνο σε μικρές συγκεντρώσεις. Παρθένα αρσενικά *D. suzukii*, έχοντας ως κίνητρο τη σύζευξη, προσελκύονται περισσότερο από το 9-C21, απ' ότι τα μη παρθένα. Αντίστοιχα, τα μη παρθένα θηλυκά έχοντας ως κίνητρο την ωοτοκία, προσελκύονται περισσότερο από το 9-C21, απ' ότι τα παρθένα. Συνεπώς, η συνάθροιση των εντόμων, η οποία προκαλείται από το 9-C21, επηρεάζεται και από το κίνητρο το οποίο έχουν τα έντομα.

Επιπλέον, στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε για πρώτη φορά η επιθετική συμπεριφορά του *D. suzukii*. Η δημιουργία του ηθογράμματος του *D. suzukii* και η σύγκριση που πραγματοποιήθηκε με άλλα είδη της οικογένειας Drosophilidae δύναται να παρέχει καινούριες προοπτικές για τη μελέτη της επιθετικής συμπεριφοράς των 'fruit flies'.

Η κατανόηση των επιθετικών αλληλεπιδράσεων του *D. suzukii* είναι σημαντική, καθώς όπως έχει αναφερθεί μπορεί να βελτιώσει την τεχνική στείρωσης εντόμων (SIT). Αποδείχθηκε ότι μη κοινωνικοποιημένα αρσενικά είναι περισσότερο επιθετικά από τα κοινωνικοποιημένα *D. suzukii*. Συνεπώς, ο παράγοντας της κοινωνικοποίησης δύναται να αυξήσει την επιθετικότητα των στείρων εντόμων του *D. suzukii*. Αυτή η υπόθεση χρειάζεται περαιτέρω επιβεβαίωση πραγματοποιώντας μελλοντικά πειράματα, με σκοπό τη μελέτη του ποσοστού επιθετικότητας

των στείρων αρσενικών του *D. suzukii* έναντι του άγριου φυσικού πληθυσμού. Γνωρίζοντας ότι η προηγούμενη εμπειρία σε μάχες μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της επιθετικότητας στα αρσενικά του *D. melanogaster*, η αντίστοιχη έρευνα και η επιβεβαίωση της ίδιας τάσης και στο *D. suzukii* αποτελεί μελλοντικό στόχο.

Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι στην 3^{η} ώρα μετά την έναρξη της φωτόφασης, *D. suzukii,* θηλυκά και αρσενικά, ηλικίας 4 ημερών εκδήλωσαν τη μέγιστη επιθετικότητα. Συμπεραίνεται ότι παράγοντες, όπως είναι η ηλικία του εντόμου και η φωτόφαση είναι καθοριστικής σημασίας για την εκδήλωση της επιθετικότητας.

Στη συνέχεια, όταν ερευνήθηκε η επίδραση του παράγοντα κοινωνικοποίησης στο φερομονικό προφίλ του *D. suzukii* διαπιστώθηκε ότι η παραγωγή των CHCs μεταβάλλεται. Η μη κοινωνικοποίηση και των δύο φύλων του *D. suzukii* οδήγησε σε αυξημένα ποσοστά της ουσίας 7-C23. Η αλληλεπίδραση των μη κοινωνικοποιημένων εντόμων αύξησε την αφθονία των ισομερών με 23C και 25C. Μελετώντας τη βιολογική δράση της ουσίας 7-C23, παρατηρήθηκε ότι η επιθετική συμπεριφορά και στα δύο φύλλα του *D. suzukii* αυξήθηκε. Η ουσία 7-C25 αύξησε την ομοφυλοφιλική συμπεριφορά των αρσενικών, ενώ συνάμα μείωσε την επιθετική τους συμπεριφορά. Βασιζόμενοι στα παραπάνω αποτελέσματα, η τροποποίηση του CHC προφίλ του αρσενικού στείρου *D. suzukii,* με χρήση γενετικών τεχνικών, θα μπορούσε να αποτελέσει έναν τρόπο αύξησης της παραγόμενης ποσότητας του 7-C23 και μείωση της παραγόμενης ποσότητας του 7-C25 με τελικό στόχο την αύξηση της επιθετικότητας των στείρων εντόμων.

Τα αποτελέσματα αυτά δύναται να προσφέρουν νέες κατευθύνσεις στην αντιμετώπιση του επιζήμιου οργανισμού *D. suzukii*. Η μελέτη και η αποσαφήνιση της χημικής οικολογίας και κατ' επέκταση του φερομονικού προφίλ του *D. suzukii* μπορεί να παρέχει άμεσες εφαρμογές στον τομέα της γεωργίας.Η μελέτη της βιολογικής δράσης των ουσιών που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή μπορεί να αποτελέσει τον πυλώνα για την εξέλιξη των τεχνικών παγίδευσης τύπου '*attract & kill*' και '*push & pull'*. Οι τεχνικές αυτές αποτελούν βασικά εργαλεία της Ολοκληρωμένης Φυτοπροστασίας. Για να επιτευχθεί αυτό, είναι αναγκαίο να υλοποιηθούν στο μέλλον πειράματα πεδίου, με στόχο την επιβεβαίωση των εργαστηριακών αποτελεσμάτων σχετικά με τη βιολογική δράση των ουσιών, δεδομένου ότι οι εξωτερικές συνθήκες μπορεί να επηρεάσουν τη συμπεριφορά του εντόμου.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Παράρτημα Ι

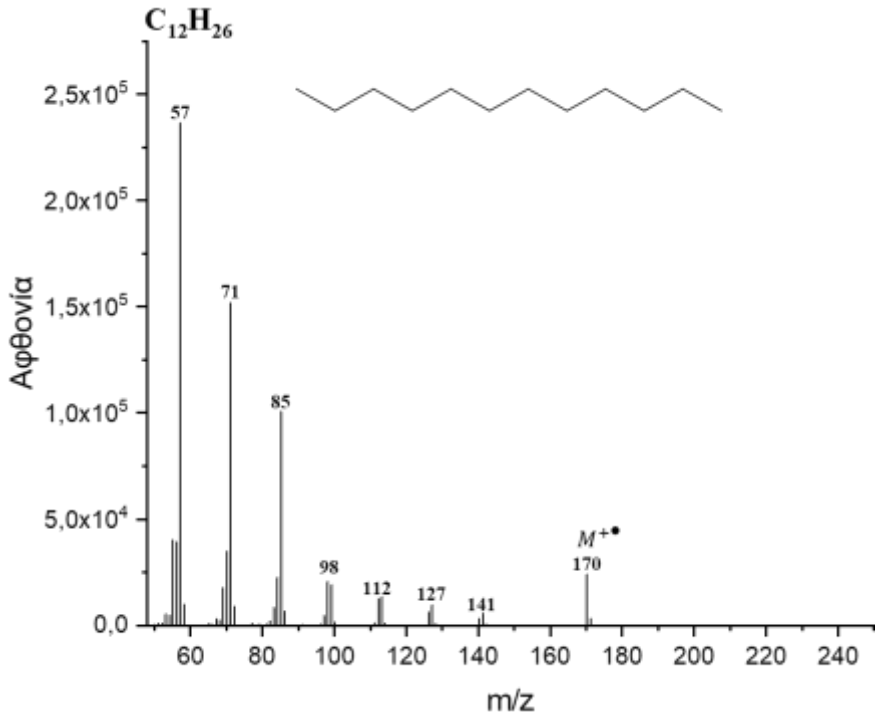
Καλλιέργεια Εντόμων

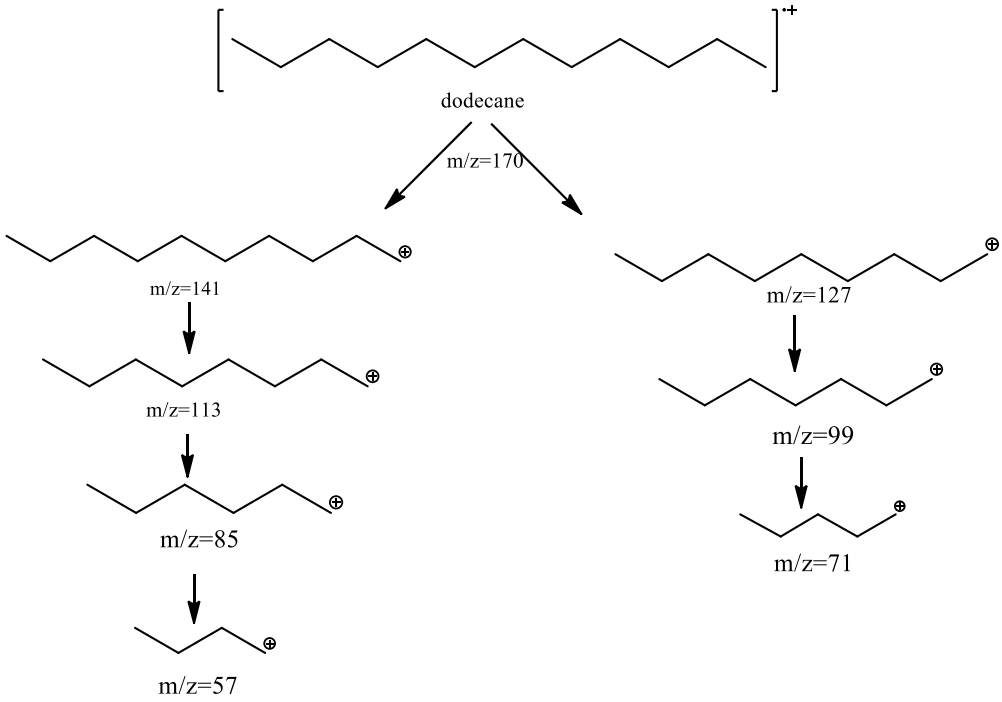
Η καλλιέργεια του πληθυσμού πραγματοποιήθηκε σε εργαστηριακές υποδομές για οργανισμούς καραντίνας, στο Εργαστήριο Εντομολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Η προμήθεια του εργαστηριακού πληθυσμού πραγματοποιήθηκε από το Beldade Laboratory, Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, της Πορτογαλίας. Τα έντομα τοποθετούνται σε αποστειρωμένα δοχεία εκτροφής που περιέχουν ειδική τροφή (Εικ. Π.1). Η τροφή παρασκευάσθηκε με προσθήκη άγαρ (5 g), ζάχαρης (11.6 g), μαγιάς (28.33 g) καλαμποκάλευρου (33.33 g) και υπερκάθαρου νερού (1 L). Έπειτα θερμαίνεται στους 60°C για πέντε ώρες. Τέλος προστίθεται Nipagin (0.83 g) διαλυμένη σε αιθανόλη (8.33 ml) με σκοπό την αποστείρωση της τροφής. Οι συνθήκες καλλιέργειας του πληθυσμού είναι φωτοπερίοδος 12:12 LD (Light-Dark, 12 ώρες φως και 12 ώρες σκοτάδι), θερμοκρασία 23±2°C και σχετική υγρασία 65±5% (Revadi et al. 2015).

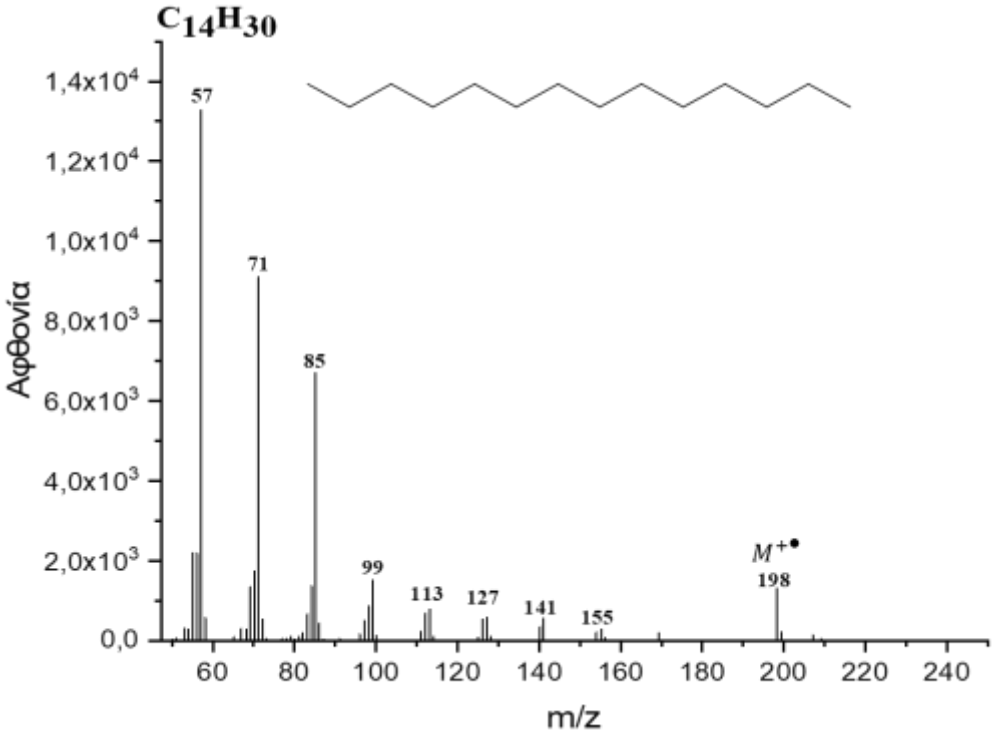
Εικόνα Π.1: Δοχεία εκτροφής του *D. suzukii*

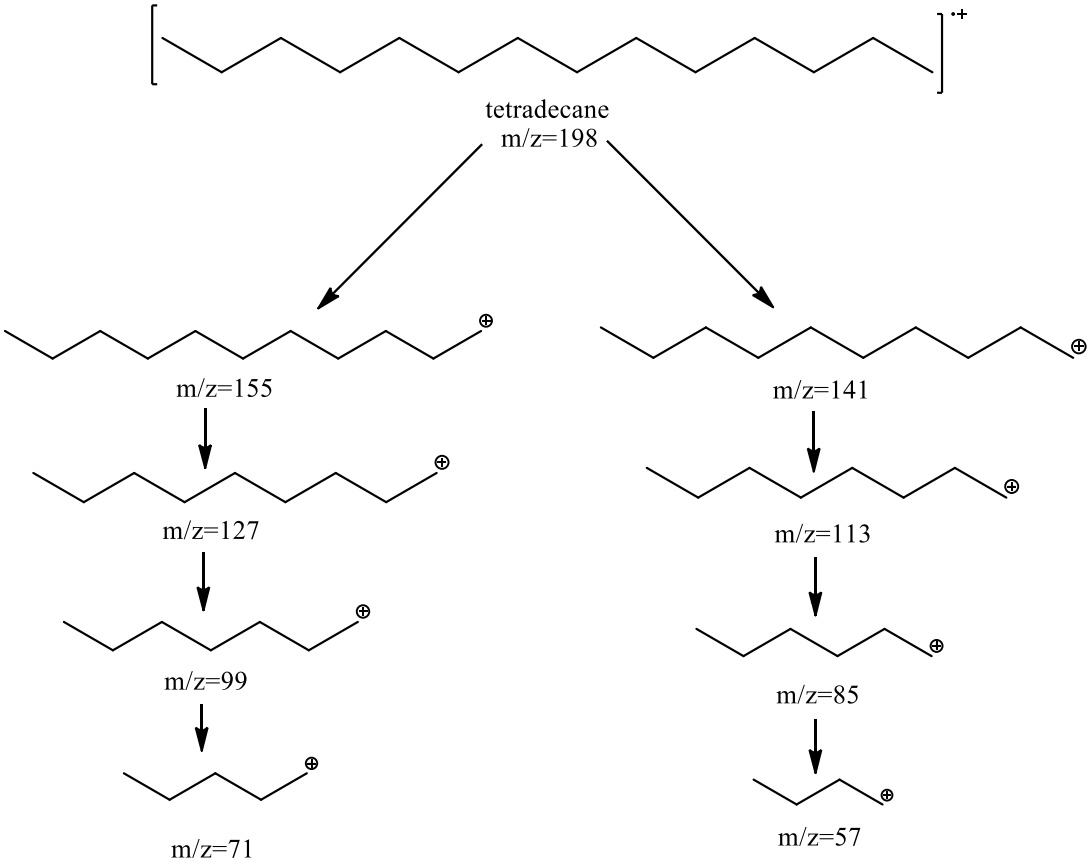
Παράρτημα ΙΙ

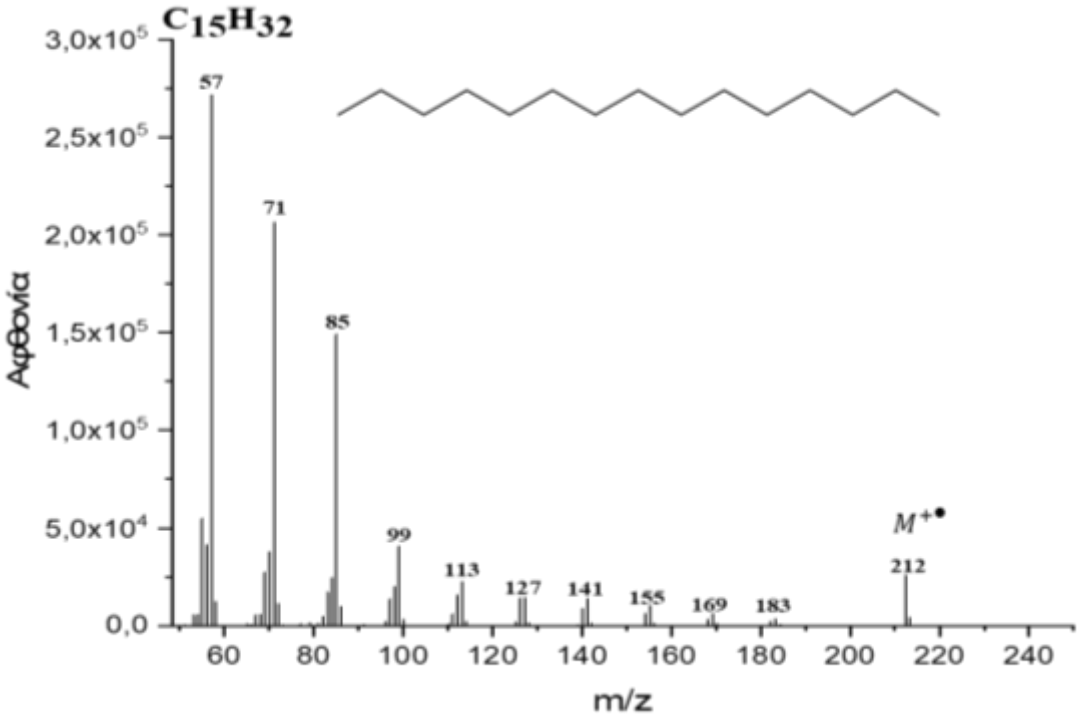
Φάσματα Μάζας – Μηχανισμοί Θραυσματοποίησης

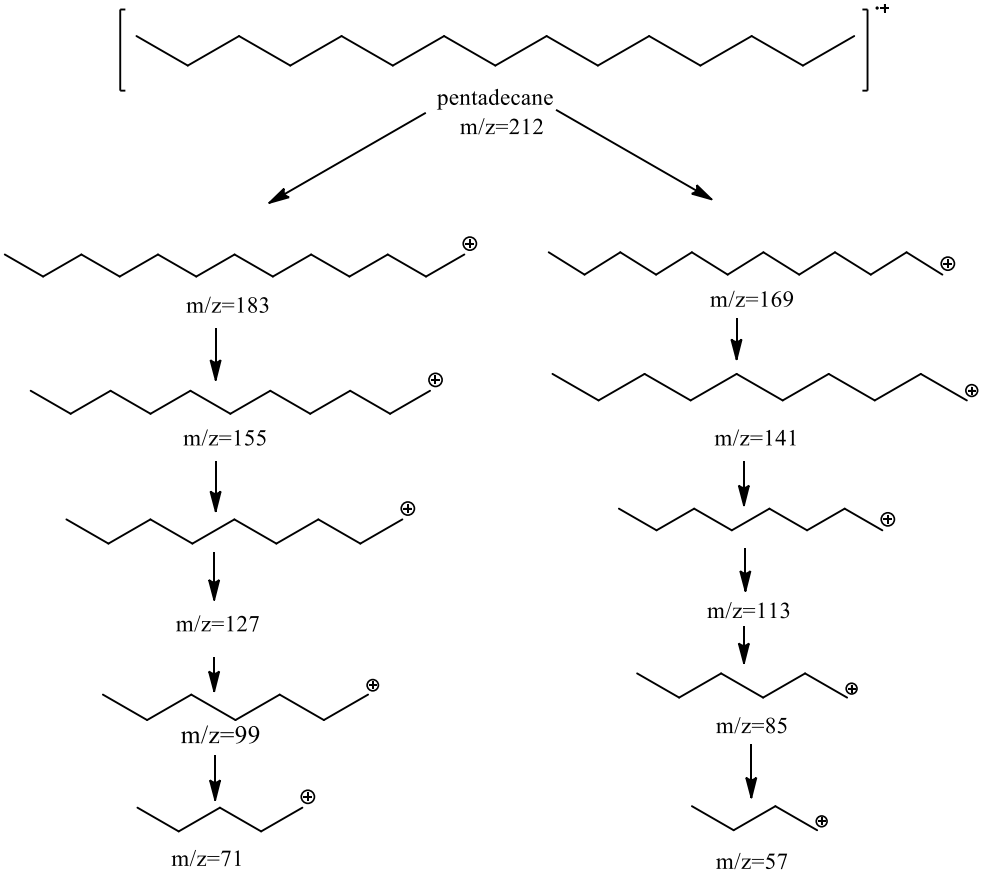


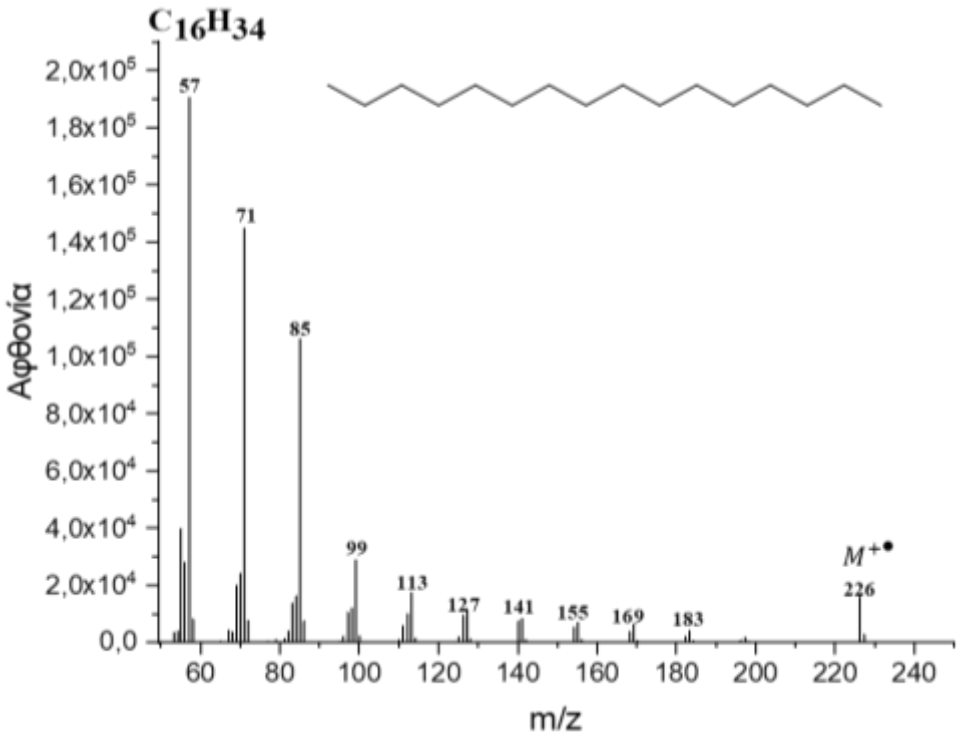


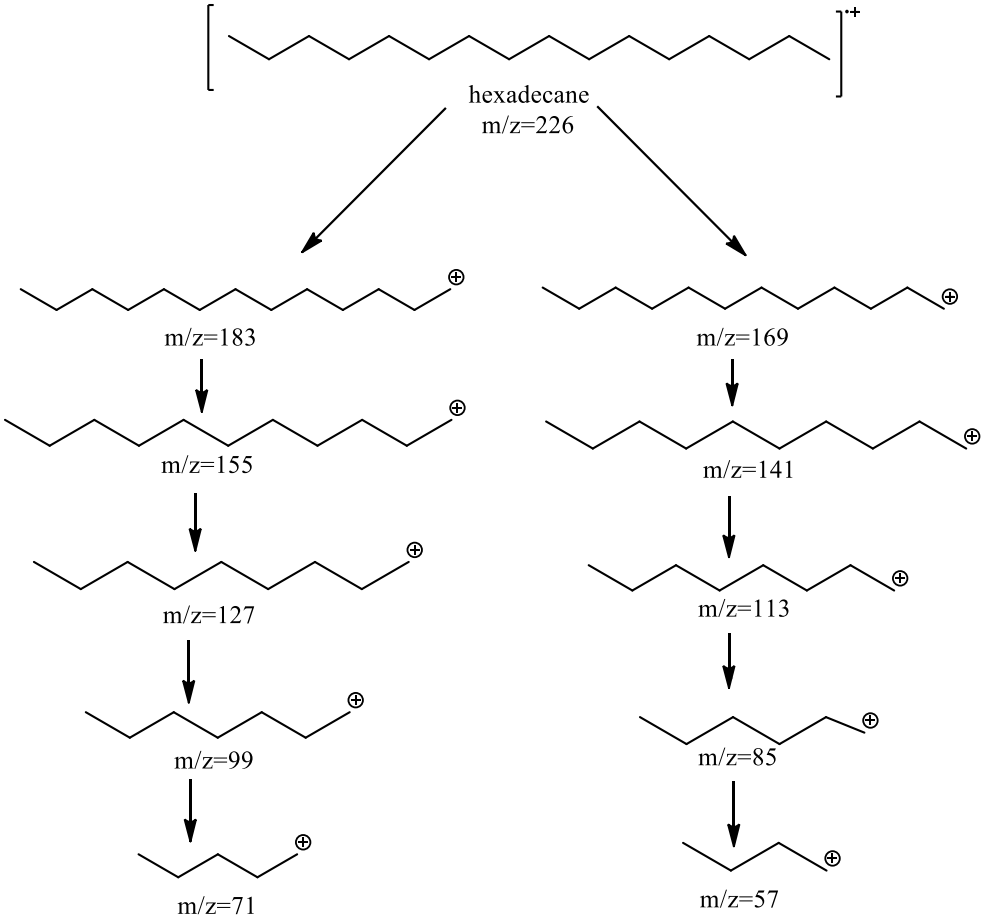

C14H30
Αφθονία
1,4x10^4
1,2x10^4
1,0x10^4
8,0x10^3
6,0x10^3
4,0x10^3
2,0x10^3
0,0
57
71
85
99
113
127
141
155
M+•
198
60
80
100
120
140
160
180
200
220
240
m/z

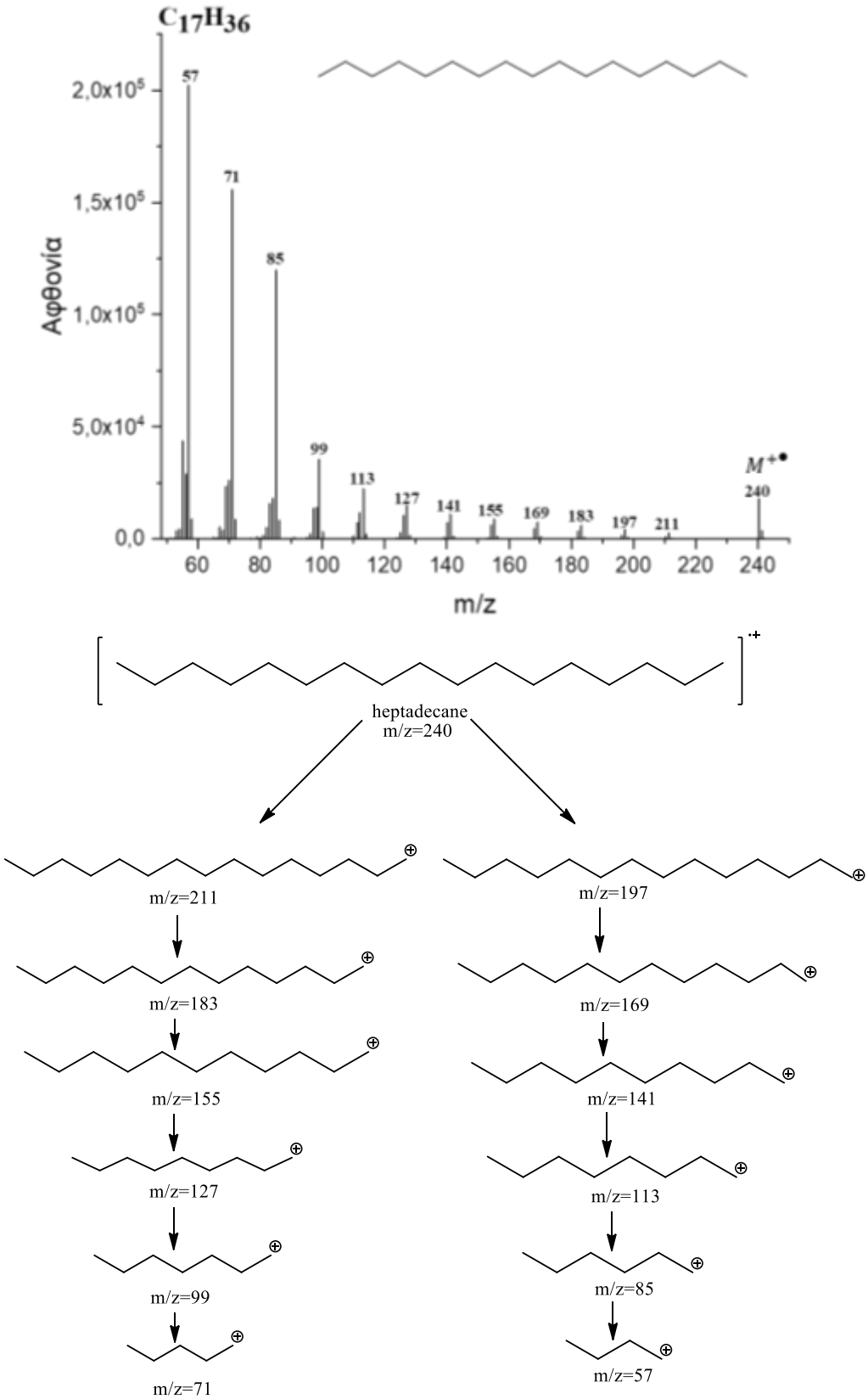

tetradecane
m/z=198
m/z=155
m/z=127
m/z=99
m/z=71
m/z=141
m/z=113
m/z=85
m/z=57

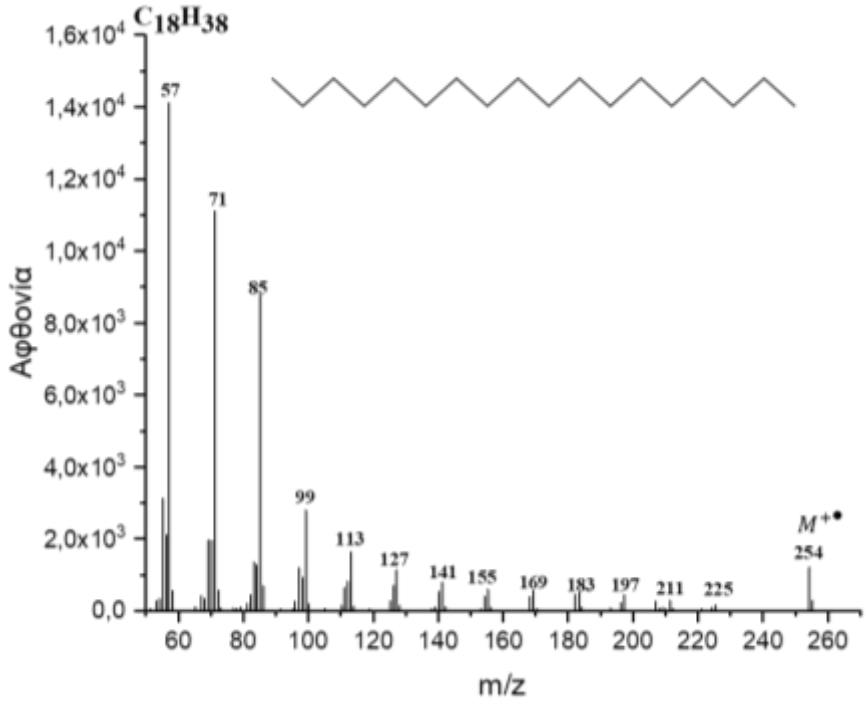

C15H32
3,0x10^5
2,5x10^5
2,0x10^5
1,5x10^5
1,0x10^5
5,0x10^4
0,0
Αφθονία
57
71
85
99
113
127
141
155
169
183
212
M+•
60
80
100
120
140
160
180
200
220
240
m/z

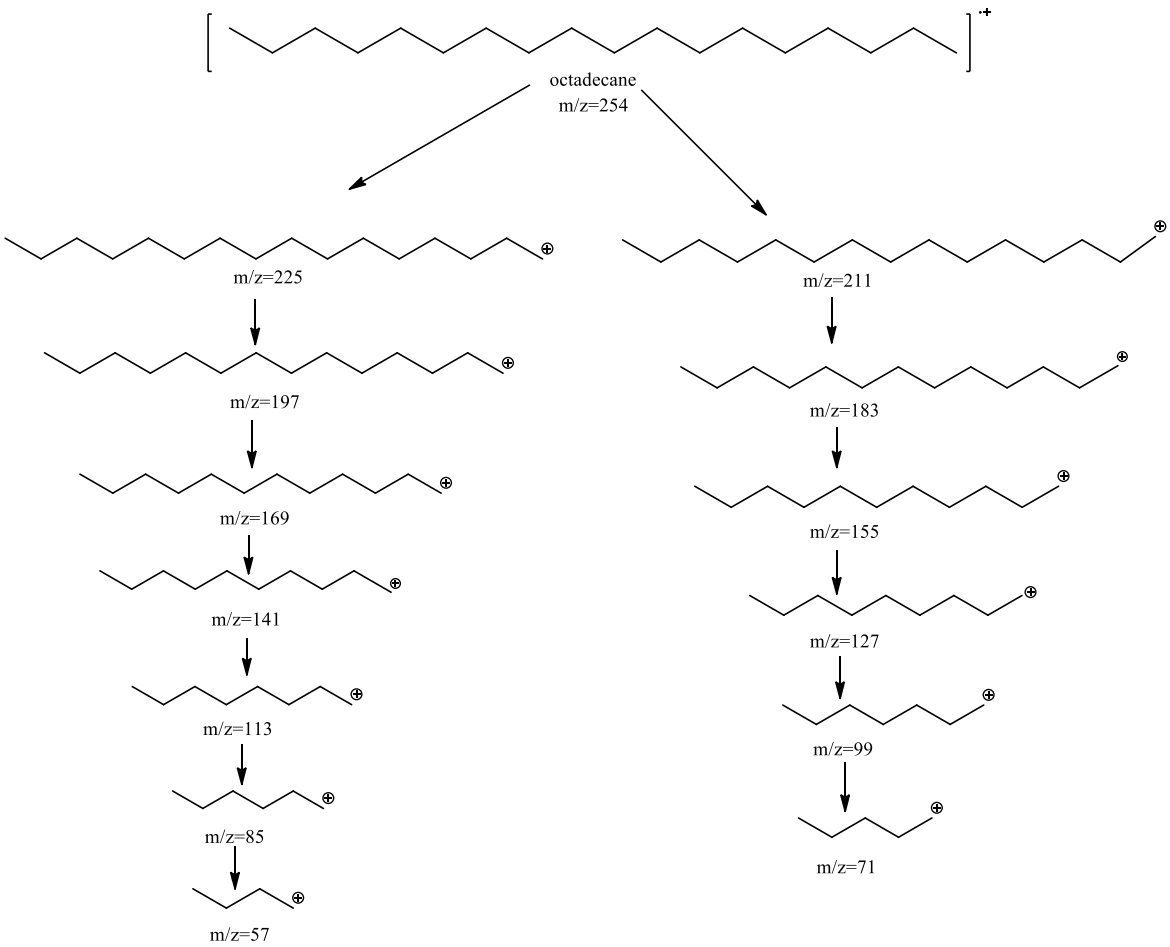

pentadecane
m/z=212
m/z=183
m/z=155
m/z=127
m/z=99
m/z=71
m/z=169
m/z=141
m/z=113
m/z=85
m/z=57


C16H34
Αφθονία
m/z
57
71
85
99
113
127
141
155
169
183
M+•
226


hexadecane
m/z=226
m/z=183
m/z=155
m/z=127
m/z=99
m/z=71
m/z=169
m/z=141
m/z=113
m/z=85
m/z=57


C17H36
Αφθονία
2,0x10^5
1,5x10^5
1,0x10^5
5,0x10^4
0,0
57
71
85
99
113
127
141
155
169
183
197
211
M+•
240
60
80
100
120
140
160
180
200
220
240
m/z
heptadecane
m/z=240
m/z=211
m/z=183
m/z=155
m/z=127
m/z=99
m/z=71
m/z=197
m/z=169
m/z=141
m/z=113
m/z=85
m/z=57


C18H38
Αφθονία
m/z
57
71
85
99
113
127
141
155
169
183
197
211
225
M+•
254


octadecane
m/z=254
m/z=225
m/z=197
m/z=169
m/z=141
m/z=113
m/z=85
m/z=57
m/z=211
m/z=183
m/z=155
m/z=127
m/z=99
m/z=71

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abraham J., Zhang A., Angeli S., Abubeker S., Michel C., Feng Y., & Rodriguez-Saona C. (2015) Behavioral and antennal responses of Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae) to volatiles from fruit extracts. *Environ Entomol* **44**, 356–367.

Acebes A., & Ferrús A., (2001) Increasing the number of synapses modifies olfactory perception in Drosophila. J. *Neurosci*. **21**, 6264–6273

Ahmadi M., Salehi B., Abd-Alla A. M. M. & Babaie M. (2018). Feasibility of using the radiation-based sterile insect technique (SIT) to control the olive fruit fly, Bactrocera oleae Gmelin (Diptera: Tephritidae) in Iran. *Appl Radiat Isotopes* **139**, 279-284,

Aktar M. W., Sengupta D., & Chowdhury A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Inte. Tox.* **1**, 1–12.

Alcorta E. & Rubio J., (1988) Genetical analysis of intrapopulational variation in olfactory response in Drosophila melanogaster. *Heredity* **60**, 7–14.

Alcorta, E. & Rubio, J., (1989) Intrapopulational variation of olfactory responses in Drosophila melanogaster. *Behav. Genet*. **19**, 285– 299.

Allemand R. & Boulétreau-Merle J. (1989) Correlated responses in lines of Drosophila melanogaster selected for different oviposition behaviours. *Experientia*, **45**, 1147–1150.

Amin ud Din M., Mazhar K., Haque S., Ahmed M. (2005) A preliminary report on Drosophila fauna of Islamabad (Capital, Pakistan). *DIS* **88**, 6–7.

Amirav A., Gordin A., Poliak M. & Fialkov A.B. (2008) Gas chromatography–mass spectrometry with supersonic molecular beams. *J. M. Spect.* **43**, 141–63.

Amrein, H. (2016). Mechanism of Taste Perception in Drosophila. *Chemosensory Transduction*, 245–269.

Amrein, H., & Thorne, N. (2005). Gustatory perception and behavior in Drosophila melanogaster. *Current Biology*, **15**, 673–684.

Andreu V, Pico' Y. (2004) Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods. *Trends Anal Chemistry*.**23**, 772–789.

Anfora G., Grassi A., Revadi S. & Graiff M. (2012) Drosophila suzukii. A new Invasive Species threatening European fruit production. *EnviroChange Project*. 1 – 7.

Angilletta M. J. & Dunham A.E. (2003) The temperature-size rule in ectotherms: simple evolutionary explanations may not be general. *Am. Nat*. **162**, 332–342.

Ant T., Koukidou M., Rempoulakis P., Gong H. F., Economopoulos A., Vontas J., & Alphey L. (2012). Control of the olive fruit fly using genetics-enhanced sterile insect technique. *BMC Biology*, **10**, 51.

Antony, C., Davis, T. L., Carlson, D. A., Pechine J-M & Jallon J-M (1985) Compared behavioral responses of male Drosophila melanogaster (Canton-S) to natural and synthetic aphrodisiacs. *J. Chem. Ecol.* **11**, 1617–1629.

Ashburner M., Golic K. & Hawley, SH. (2005) Drosophila: A Laboratory Handbook. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Ayer R.K. & Carlson J., (1992) Olfactory physiology in the Drosophila antenna and maxillary palp: acj6 distinguishes two classes of odorant pathways. *J. Neurobiol*. **23**, 965–982.

Ayyub C., Paranjape J., Rodrigues V. & Siddiqi O., (1990) Genetics of olfactory behavior in Drosophila melanogaster. *J. Neurogenet.* **6**, 243–262.

Baier A., Wittek B. & Brembs, B. (2002) Drosophila as a new model organism for the neurobiology of aggression? *J. Exp. Biol.* **205**, 1233-1240.

Barbercheck ME & Zaborski E (2015) Insect pest management: Differences between conventional and organic farming systems http://articles.extension.org/pages/19915/insect-pest-management:-differences-betweenconventional-and-organic-farming-systems (access on 08.02.2020).

Barker J. S. F. & Podger R. N. (1970) Interspecific Competition between Drosophila-Melanogaster and Drosophila-Simulans - Effects of Larval Density and Shortterm Adult Starvation on Fecundity, Egg Hatchability and Adult Viability. *Ecology* **51**, 855-875.

Baroffio C. & Fischer S., (2011) Neue Bedrohung für Obstplantagen und Beerenpflanzen: die Kirschessigfliege.- *UFARevue*, **11**,46-47.

Barron M.G., Galbraith H. & Beltman D. (1995) Comparative reproduction and developmental toxicology of birds. *Comp. Biochem Physiol.*112c:1–14.

Barron, A.B. (2000) Anaesthetizing Drosophila for behavioural studies. *J. Ins. Phys*. **46**,442 439-4.

Bartelt R. J., Schaner A. M., & Jackson L. L. (1985). cis-Vaccenyl acetate as an aggregation pheromone in Drosophila melanogaster. *J. Chem. Ecol*. **11**, 1747–1756.

Bartelt R.J. & Jackson L.L. (1984) Hydrocarbon component of the *Drosphila virilis* (Diptera: Drosophilidae) aggregation pheromone: *(2)*-10-heneicosene. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **77,** 364-371.

Bartelt RJ, Armold MT, Schaner AM & Jackson LL. (1986a) Comparative analysis of cuticular hydrocarbons in the Drosophila virilis species group. *Comp. Biochem. Physiol.* **83B,** 731–42.

Bartelt RJ, Schaner AM & Jackson LL. (1986b) Aggregation pheromones in five taxa of the Drosophila virilis species group. *Phys. Ent*. **11**, 367-376.

Bartelt RJ., Armold M.T., Schaner A.M. & Jackson L.L. (1986). Comparative analysis of cuticular hydrocarbons in the *Drosophila virilis* species group. *Comp. Biochem. Physiol.* **83B**, 731-742.

Beale MH, Birkett MA, Bruce TJA, Chamberlain K, Field LM, & Huttly AK, (2006) Aphid alarm pheromone produced by transgenic plants affects aphid and parasitoid behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 10509–13.

Beers H., Van Steenwyk R., Shearer P., Coates W. & Grant J. (2011) Developing Drosophila suzukii management programs for sweet cherry in the western United States. *Pest Manag Sci* 67, 1386–1395.

Benelli G. (2014) Aggression in Tephritidae Flies: Where, When, Why? Future Directions for Research in Integrated Pest Management. *Insects* **6**, 38-53.

Benelli G. (2015) Should I fight or should I flight? How studying insect aggression can help integrated pest management. *Pest man.Sc.* **71**, 885-892.

Benelli G. et al (2014). Sexual communication and related behaviours in Tephritidae: current knowledge and potential applications for Integrated Pest Management. *J. Pest Sc.***87**, 385-405.

Benton R., Vannice K.S., Gomez-Diaz C. & Vosshall L.B., (2009) Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in Drosophila. *Cell* **136,** 149–62.

Billeter J.C., Joel & Levine D. (2013) Who is he and what is he to you? Recognition in Drosophila melanogaster. *Cur. Op. Neur*. **23**, 17-23.

Billeter JC, Atallah J, Krupp JJ, Millar JG & Levine JD (2009) Specialized cells tag sexual and species identity in Drosophila melanogaster. *Nature* **461**, 987–991.

Blomquist G, Nelson D, de Renobales M (1987) Chemistry, biochemistry, and physiology of insect cuticular lipids. Arch Insect *Biochem. Physiol*. **6**, 227–265.

Blomquist G. J. & Howard R. W. (2003) Pheromone biosynthesis in social insects. In Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology (ed. G. J. Blomquist & R. G. Vogt), London: Elsevier Academic, 321-340.

Blomquist G.J., Toolson E.C., Nelson D.R. (1985) Epicuticular hydrocarbons of *Drosophila pseudoobscura* (Diptera: Drosophilidae): Identification of unusual alkadiene and alkatriene positional isomers**.** *Insect Biochem.***15**, 25-34.

Blomquist GJ, Jurenka R, Schal C, Tittiger C.(2012) Pheromone production: biochemistry and molecular biology. In: Gilbert L, editor. Insect Endocrinol. Oxford: Elsevier. 523–67.

Boeckh J, Kaisslin K, Schneide D. (1965) Insect olfactory receptors. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 30:263.

Bolda M., Coates WW., Grant JA., Zalom FG., Van Steenwyk R., Caprile J., Flint ML (2009) Spotted Wing Drosophila, Drosophila suzukii: A New Pest in California. University of California Statewide Integrated Pest Management Program.

Bolda M.P., Goodhue R E. & Zalom F.G. (2010) Spotted wing drosophila: potential economic impact of a newly established pest. *Agricultural and Resource Economics.* Update, Giannini Foundation of Agricultural Economics, University of California **13**, 5-8.

Bowers WS, Webb RE, Nault LR, Dutky SR. (1972) Aphid alarm pheromone – isolation, identification, Synthesis. *Science*, **177,** 1121.

Bray S. & Amrein, H. (2003) A putative Drosophila pheromone receptor expressed in male-specific taste neurons is required for efficient courtship. *Neuron* **39**, 1019–1029.

Brown J. L. (1964). The Evolution of Diversity in Avian Territorial Systems. *Wil. Bull.* **76**, 160-169.

Burrack HJ. (2010) NC Small Fruit, Specialty Crop, and Tobacco IPM Blog. Assistant Professor & Extension Specialist, North Carolina University. http://ncsmallfruitsipm.blogspot.com/. (accessed on 11.12.2019)

Calabria G., Máca J., Bächli G., Serra L. & Pascual M. (2012) First records of the potential pest species Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae) in Europe. *J. Appl. Entomol*. **136**, 139–147.

Cardé R.T. & Baker, T.C. (1984) Sexual communication with pheromones. Chemical ecology of insects (eds , Bell WJ& Cardé RT), London, UK: Chapman & Hall, pp. 355–383..

Carlson D. A., Roan C-S., Yost R. A. & Hector J. (1989) Dimethyl disulfide derivatives of long chain alkenes, alkadienes, and alkatrienes for gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* **61**, 1564-1571.

Carlson DA, Mayer MS, Silhacek DL, James JD, Beroza M & Bierl BA. (1971) Sex attractant pheromone of the house fly: isolation, identification and synthesis. *Science* **174**,76–8.

Carlson J.R., (1996) Olfaction in Drosophila: from odor to behavior. Trends Genet. 12, 175–180.

Carvalho M., Sampaio J.L., Palm W., Brankatschk M., Eaton, S. & Shevchenk, A. (2012) Effects of diet and development on the Drosophila lipidome. *Mol. Syst. Biol.* **8**,600.

Certel S. J., Savella M. G., Schlegel D. C. F.& Kravitz, E. A. (2007) Modulation of Drosophilamale behavioral choice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 4706–4711.

Cha D.H., Hesler S., Wallingford A. Zaman F., Jentsch P., Nyrop J., Loeb G. (2018a) Comparison of commercial lures and food baits for early detection of fruit infestation risk by Drosophila suzukii (Diptera:Drosophilidae). *J. Econ. Entomol.* **111,** 645–652.

Chen, S., Lee, A. Y, Bowens, N. M., Huber, R., & Kravitz, E. A. (2002) Fighting fruit flies: a model system for the study of aggression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 5664–5668.

Chertemps T., Duportets L., Labeur C., Ueda R., Takahashi K., Saigo K., & Wicker-Thomas C. (2007). A female-biased expressed elongase involved in long-chain hydrocarbon biosynthesis and courtship behavior in Drosophila melanogaster. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA **104**, 4273–4278.

Christopher, J. T., & de Belle, J. S. (2014) Olfactory learning and memory assays. In J. Dubnau (Ed.), Behavioral Genetics of the Fly (Drosophila Melanogaster) (Cambridge Handbooks in Behavioral Genetics, 231–249) Cambridge: Cambridge University Press.

Cini, A., Ioriatti, C. & Anfora, G. (2012) A review of the invasion of Drosophila suzukii in Europe and a draft research agenda for integrated pest management. *Bul. Insectol.* **65**, 149-160.

Cloonan K. R., Abraham J., Angeli S., Syed Z. & Saona R. C. (2018) Advances in the chemical ecology of the Spotted Wing Drosophila (Drosophila suzukii) and its applications. *J. Chem. Ecol.*4: 922-939.

Cobb M. & Jallon, J. M. (1990) Pheromones, mate recognition and courtship stimulation in the Drosophila melanogaster species sub-group. *Anim. Behav*. **39**, 1058-t067.

Cobb M. Burnet, B. Blizard R. & Jallon, J.M. (1989) Courtship in Drosophila sechellia: its structure, functional aspects, and relationship to those of other members of the drosophila melanogaster species subgroup. *J. lns. Beh.***1**, 63-69.

Cody RB, Laramee JA & Durst HD. (2005) Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions. *Anal. Chem.* 77: 2297–302.

Cook S, Khan Z & Picket J (2007) The use of push-pull strategies in integrated pest management. *Annu Rev Entomol* **52**, 375–400.

Coyne J.A., Crittenden A.P. & Mah K., (1994) Genetics ofpheromonal difference contributing to reproductive isolation in Drosophila. *Science 265*, 1461–1464.

Cvacka J, Jiros P, Sobotnik J, Hanus R & Svatos A. (2006) Analysis of insect cuticular hydrocarbons using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Chem. Ecol.* **32**, 409–34

Dallerac R, Labeur C, Jallon JM, Knipple DC, Roelofs WL & Wicker-Thomas C. (2000) A delta 9 desaturase gene with different substrate specificity is responsible for the cuticular diene hydrocarbon polymorphism in Drosophila melanogaster. Proc. *Natl. Acad. Sci. U.S.A*. **97**, 9449–54.

Dankert H., Wang L., Hoopfer E.D., Anderson D.J. & Perona, P. (2009) Automated Monitoring and Analysis of Social Behavior in Drosophila. *Nat. Methods*. **6**, 297-303.

Datta SR, Vasconcelos ML, Ruta V, Luo S & Wong A, (2008) The Drosophila pheromone cVA activates a sexually dimorphic neural circuit.n *Nature* **452**, 473–477.

Dave K.A., Headlam M.J., Wallis T.P. & Gorman J.J. (2011) Preparation and analysis of proteins and peptides using MALDI TOF/TOF mass spectrometry. *Curr. Protoc. Protein Sci.* Chapter 16, Unit 16.13.

De Bruyne M., Smart R., Zammit E.& Warr C.G., (2010) Functional and molecular evolution of olfactory neurons and receptors for aliphatic esters across the Drosophila genus. J. Comp. Physiol. A. Neuroethol. *Sens. Neural. Behav. Physiol*. **196**, 97–109.

De Ros G., Anfora G., Grassi A. & Ioriatti C. (2013) The potential economic impact of Drosophila suzukii on small fruits production in Trentino (Italy). *IOBC-WPRS Bulletin.* **91**, 317–321.

Dekker T., Revadi S, Mansourian S., Ramasamy S., Lebreton S., Paul G., Becher Angeli S., Rota-Stabell O. & Anfora, G. (2015) Loss of Drosophila pheromone reverses its role in sexual communication in Drosophila suzukii, *Proc. Biol. Sc.* **282**, 20143018.

Dembeck L.M., Böröczky K., Huang W., Schal, C., Anholt R.R. & Mackay, T.F. (2015) Genetic architecture of natural variation in cuticular hydrocarbon composition in Drosophila melanogaster. *eLife* 4:e09861.

Devaud J.-M., Acebes, A. & Ferrús, A., (2001) Odor exposure causes central adaptation and morphological changes in selected olfactory glomeruli in Drosophila. *J. Neurosci*. **21**, 6274–6282.

Devaud J.M. (2003) Experimental studies of adult Drosophila chemosensory behavior. *Beh. Proc.* **4**, 177–196.

Devaud J.-M., Acebes A., Ramaswami M. & Ferrús A., (2003a). Structural and functional changes in the olfactory pathway of adult Drosophila take place at a critical age. *J. Neurobiol*. **56**, 13–23.

Devaud J.-M., Keane J. & Ferrús, A., (2003b) Blocking sensory inputs to identified antennal glomeruli selectively modifies odorant perception in Drosophila. *J. Neurobiol*. **56**, 1–12.

Dickson B. J. (2008). Wired for sex: the neurobiology of Drosophila mating decisions. *Science* **322**, 904-909.

Dierick H. (2007) A. A method for quantifying aggression in male Drosophila melanogaster. *Nature protocols* **2**, 2712-2718.

Dossey A.T., Walse S.S., Rocca J.R. & Edison A.S. (2006) Single-insect NMR: a new tool to probe chemical biodiversity. *ACS Chem. Biol.* 511–4.

Dow M. A. & von Schilcher, F. (1975) Aggression and mating success in Drosophila melanogaster. *Nature* **254**, 511-512.

Dreves AJ., Walton V. & Fisher G. (2009) A new pest attacking healthy ripening fruit in Oregon. Spotted wing Drosophila: Drosophila suzukii (Matsumara). EM 8991 October 2009. Oregon State University.

Drijfhourt F.P., Kather R. & Martin S.J. (2010) The role of cuticular hydrocarbons in insects (pp. 91-114). Behavioral and chemical ecology. Nova Science Publishers UK

Dukas, R. (2008) Evolutionary biology of insect learning. *Annu. Rev. Entomol.* **53,** 145-160.

Durisko Z, Kemp R, Mubasher R & Dukas R. (2014) Dynamics of social behavior in fruit fly larvae. *PLoS ONE*, 9:e95495.

Dutta T. K. & Harayama, S. (2001) Time-of-flight mass spectrometric analysis of high-molecular-weight alkanes in crude oil by silver nitrate chemical ionization after laser desorption. *Anal. Chem*. **73**, 864–869.

Dweck HK, Ebrahim SA, Kromann S, Bown D, Hillbur Y, & Sachse S (2013) Olfactory preference for egg laying on citrus substrates in Drosophila. *Curr. Biol*. **23**, 2472–80.

Dyck, V., Hendrichs, J. & Robinson.(2005) Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management. (Springer Netherlands).

Ebbs, M. L., Amrein, H. (2007) Taste and pheromone perception in the fruit fly Drosophila melanogaster. *Pflugers Arch* **454,** 735–747.

Edney E. B. (1977) Water balance in land arthropods. New York: Springer.

Ejima A., & L.C. Griffith. (2007). Measurement of courtship behavior in Drosophila melanogaster, 4847. New York: Cold Spring Harbor protocols.

El-Sayed A., Suckling D., Byers J., Jang E., & Wearing C.(2009) Potential of Blure and kill^ in long-term pest management and eradication of invasive species. *J. Econ. Entomol.* **102**, 815–835.

Enjin A. & Bae Suh, G.S. (2013) Neural Mechanisms of Alarm Pheromone Signaling. *Molecules and Cells* **35**, 177-181.

EPPO (2010a) First record of Drosophila suzukii in Italy: addition to the EPPO Alert List, 2010/007. EPPO Reporting Service No. 1 Paris, 2010-01-01.

EPPO (2010b) First record of Drosophila suzukii in France: EPPO Reporting Service No. 6 Paris, 2010-06-01.

EPPO (2010c) **Factsheet:** Drosophila suzukii, (Diptera: Drosophilidae), spotted wing drosophila; A pest from the EPPO Alert List. http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert_List/insects/Drosophila%20suzukii-control%20factsheet%2016-7-2010.pdf (Accessed 1 September 2010).

EPPO (2012a) Status of Drosophila suzukii in Belgium, 2012/010. EPPO Reporting Service, No. 1 Paris, 2012-01-01.

EPPO (2012b) First report of Drosophila suzukii in Austria, 2012/033. EPPO Reporting Service, No. 2 Paris, 2012-02-01.

EPPO A2 List of pest recommended for regulation as quarantine pests. https://www.eppo.int/ (accessed on 09.12.2019)

Etges W.J., Veenstra C.L. & Jackson, L.J. (2006) Premating isolation is determined by larval rearing substrates in cactophilic Drosophila mojavensis. VII. Effects of larval dietary fatty acids on adult epicuticular hydrocarbons. *J. Chem. Ec.* **32**:2629-2646.

Everaerts C., Farine J.P., Cobb M. & Ferveu J.F. (2010) Drosophila Cuticular Hydrocarbons Revisited: Mating Status Alters Cuticular Profiles. *PLoS ONE* **5(3):**e9607.

Fedina T.Y., Kuo T-H., Dreisewerd K., Dierick H.A., Yew J.Y. & Pletcher S.D. (2012) Dietary effects on cuticular hydrocarbons and sexual attractiveness in Drosophila. *Public Library of Science.* **7**, e49799.

Fernández M. P., Chan Y. B., Yew J. Y., Billeter J. C., Dreisewerd K., Levine J. D., & Kravitz E. A. (2010). Pheromonal and behavioral cues trigger male-to-female aggression in *Drosophila*. *PLoS Biology* **8, (**11).

Fernández M. P., & Kravitz, E. A. (2013). Aggression and courtship in *Drosophila*: Pheromonal communication and sex recognition. *J. Comp. Phys. Neur. Sens. Neur. Beh. Phys.* **199,** 1065–1076.

Ferveur J.F. & Sureau, G. (1996) Simultaneous influence on male courtship of stimulatory and inhibitory pheromones produced by live sex-mosaic *Drosophila melanogaster*. *Proc. Roy. Biol. Sc.* **63**,967–97.

Ferveur J.F. (1997). The pheromonal role of cuticular hydrocarbons in Drosophila melanogaster. *BioEssays*, **19**, 353–358.

Ferveur J.F. (2005) Cuticular hydrocarbons: Their evolution and roles in *Drosophila* pheromonal communication. *Behav. Genet*. **35**, 279–295.

Ferveur J.F., Cobb M, Boukella H, Jallon JM. (1996) World-wide variation in Drosophila melanogaster sex pheromone: behavioural effects, genetic bases and potential evolutionary consequences. *Genetica* **97**, 73–80.

Ferveur J.F., Savarit F, O'Kane CJ, Sureau G & Greenspan RJ (1997) Genetic feminization of pheromones and its behavioral consequences in Drosophila males. Science **276**, 1555–1558.

Florane C. B., Bland J. M., Husseneder C. & Raina A. K. (2004) Diet-mediated inter-colonial aggression in the formosan subterranean termite Coptotermes formosanus. *J. Chem. Ecol*. **30**, 2559-2574.

Forget G. (1993) Balancing the need for pesticides with the risk to human health. In: Forget G, Goodman T, de Villiers A, editors. Impact of Pesticide Use on Health in Developing Countries. IDRC, Ottawa: 2.

Foster SP, Clearwater JR, Muggleston SJ & Shaw PW. (1990) Sex-pheromone of a Planotortrix excessana sibling species and reinvestigation of related species. *J. Chem. Ecol.***;16**, 2461–74.

Francke W & Shulz S. (1999) Pheromones. In: Meth-Cohn DB, Nakanishi K, editors. Comprehensive Natural Products Chemistry. Oxford: Pergamon.

Fuchs B, Suss R & Schiller J. (2010) An update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research. *Prog. Lipid Res*. **50**, 132.

Fuyama Y., (1976) Behavior genetics of olfactory responses in Drosophila. I. Olfactometry and strain differences in Drosophila melanogaster. *Behav. Genet.* **6**, 407–420.

Galbreath R.A., Benn MH, Young H & Holt VA. (1985) Sex-pheromone components in the New Zealand Greenheaded Leafroller Planotortrix excessana (Lepidoptera, Tortricidae). Z. *Naturforsch*. C, **40**, 266–71.

Galizia C.G. & Rössler W., (2010) Parallel olfactory systems in insects: anatomy and function. *Annu. Rev. Entomol*. **55**, 399–420.

Gamberale G, Tullberg BS. (1998) Aposematism and gregariousness: the combined effect of group size and coloration on signal repellence. *Proc. R. Soc. Lond. [Biol.]*, **265**, 889–94.

Garantonakis N, Varikou K & Birouraki A (2016) Spread of Drosophila suzukii in orchards of Crete. Entomologia Generalis **36**, 63-70.

Gershman S.N., Toumishey, E. & Rundle, H. D (2014) Time flies: time of day and social environment affect cuticular hydrocarbon sexual displays in Drosophila serrata. *Proc. R. S. B*, 281

Gibbs A. G. & Pomonis J. G. (1995) Physical properties of insect cuticular hydrocarbons: The effects of chain length, methyl-branching and unsaturation. *Comp. Bioch. Phys.* **112**B, 243-249.

Gibbs, A. G. (1998) The role of lipid physical properties in lipid barriers. Am. Zool. 38, 268-279

Gibbs, A.G. & Crockett, E.L. (1998). The biology of Lipids: Integrative and Comparative Perspectives. *American Zoologist*, **38**, 265-267

Gibbs, A.G. & Markow, T.A. (2001) Effects of age on water balance in Drosophila species. *Physiological and Biochemical Zoology*. **74**, 520–530

Gibbs A.G, Fukuzato F. & Matzkin L.M. (2003) Evolution of water conservation mechanisms in Drosophila. *Journal Experimental Biology* **206**, 1183–1192.

Giebultowicz J. (2004) Chronobiology: Biological Timekeeping. *Integr. Comp. Biol.* **44**, 266-266.

Gleason J.M., James R.A., Wicker-Thomas C. & Ritchie, M.G. (2009) Identification of quantitative trait loci function through analysis of cuticular hydrocarbons differing between Drosophila simulans and Drosophila sechellia females. *Heredity* **103**,416-424.

Gold, G.B, Rivers, N., Ahmed O.M. and. Bresli P., (2008) Drosophila melanogaster Prefers Compounds Perceived Sweet by Humans. Chem. Sens. **33**, 301-9.

Goodhue R. E., Bolda M., Farnsworth D., Williams J. C., Zalom F. G., (2011) Spotted wing drosophila infestation of California strawberries and raspberries: economic analysis of potential revenue losses and control costs.- *Pest Manag. Sci*. 67, 1396-1402.

Gregg P., Del Socorro A., Landolt P. (2018) Advances in attract-and-kill for agricultural pests: beyond pheromones. *Annu. Rev. Entomol.* **63**,453–470

Griffo R., Frontuto A., Cesaroni C., Desantis M., (2012) L'insetto Drosophila suzukii sempre più presente in Italia.- *L'Informatore Agrario*, 68 (9), 56-60.

Grillet M, Dartevelle L, Ferveur JF (2006) A Drosophila male pheromone affects female sexual receptivity. *Proc. Biol. Sci.* **273** 315–323.

Grotewiel MS, Martin I, Bhandari P & Cook-Wiens E (2005). Functional senescence in Drosophila melanogaster. *Ageing Res. Rev.* **4**, 372–397.

Guiraudie-Capraz, G., Pho, D. B., & Jallon, J. M. (2007). Role of the ejaculatory bulb in biosynthesis of the male pheromone cis-vaccenyl acetate in *Drosophila melanogaster*. *Integr. Zool.* **2**, 89–99.

Hallem E.A., Ho M.G. & Carlson J.R., (2004) The molecular basis of odor coding in the Drosophila antenna. *Cell* **117**, 965–979.

Hartbauer, M. (2010) Collective Defense of Aphis nerii and Uroleucon hypochoeridis (Homoptera, Aphididae) against Natural Enemies. *Plos One* 5 (4): e10417.

Hauser M. (2011) A historic account of the invasion of Drosophila suzukii (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae) in the continental United States, with remarks on their identification. *Pest Manag. Sci*. **67**, 1352–1357.

Hauser M., Gaimari S. & Damus M. (2009) Drosophila suzukii new to North America. *Fly Times* **43**, 12–15.

Hausmann S.M. & Miller J.R. (1989) Ovipositional preference and larval survival of the onion maggot (Diptera, Anthomyiidae) as influenced by previous maggot feeding. *J. Econ. Entomol*. **82**, 426–9.

Hawkins N. J., Bass C., Dixon A., & Neve, P. (2018). The evolutionary origins of pesticide resistance. *Biol. Cambr. Philos. Soc.* **94**, 135–155.

Hendrichs J., Ortiz G., Liedo P. & Schwarz A., (1983) Six years of successful medfly program in Mexico and Guatemala. 353-365. In R. Cavalloro (ed.), Proceediungs, Symposium: Fruit Flies of ECONOMIC Importance, CEC/IOBC International Symposium, 16-19 November 1982, Athens, Greece.

Hill, G. E. (2011). Condition-dependent traits as signals of the functionality of vital cellular processes. *Ecol. Lett.* **14**, 625-63.

Hing A.L & Carlson, J.R. (1966) Male-male courtship behavior induced by ectopic expression of the Drosophila white gene: role of sensory function and age. *J. Neurobiol.* **4**, 454-64.

Ho K. S., & Sehgal, A. (2005). Drosophila melanogaster: An Insect Model for Fundamental Studies of Sleep. *Circadian Rhythms*, 772–793.

Hoffmann E. & Stroobant V. (2007) Mass Spectrometry. 3rd Ed. John Wiley & Sons.

Hoffmann A. A. (1987) A Laboratory Study of Male Territoriality in the Sibling Species Drosophila-Melanogaster and Drosophila-Simulans. *Anim. Behav.* **35**, 807-818.

Hoffmann A. A. & Cacoyianni, Z. (1989) Selection for territoriality in Drosophila melanogaster: correlated responses in mating success and other fitness components. *Anim. Behav.* **38**, 23-34.

Hoffmann A.A. (1989) Geographic variation in the territorial success of Drosophila melanogaster males. *Behav. Genet.* **19**, 241–255.

Hoffmann A. A. (1990) The Influence of Age and Experience with Conspecifics on Territorial Behavior in Drosophila-Melanogaster. *J. Ins. Beh*. **3**, 1-12.

Howard RW. (1962) A study of heating of stored grain caused by insects. *Ann. Appl.Biol.*,**50**, 137.

Howard R.W. (1982) Chemical ecology and biochemistry of insect hydrocarbons. *Ann. Rev. Entom.* **27**, 149–172.

Howard R.W., Jackson L.L.,Banse H., & Blows M.W. (2003) Cuticular hydrocarbons of *Drosophila birchii* and *D. serrata*: identification and role in mate choice in *D. serrata*. *J. Chem. Ecol.*, **29**, 961-976.

Howard R.W. & Blomquist G.J. (2005) Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annu. Rev. Entomol.* **50**, 371–393.

Hsu Y., Earley R. L. & Wolf L. L. (2006) Modulation of aggressive behaviour by fighting experience: mechanisms and contest outcomes. *Biol. Cambr. Philos. Soc.* **81**, 33-74.

Hueppelsheuser T. (2009) Spotted Wing Drosophila (SWD) (Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae): Update November 25,. British Columbia Ministry of Agriculture and Lands.

Hugo L. E., Kay B. H., Eaglesham, G. K., Holling, N. & Ryan, P. A. (2006). Investigation of cuticular hydrocarbons for determining the age and survivorship of australasian mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. **74**, 462-474.

Hwee S.N, Shankara S., Shikichic Y., Akasakad K., Moric K. & Yewa Y.J.. (2014) Pheromone evolution and sexual behavior in Drosophila are shaped by male sensory exploitation of other males. *Proc. Nat Ac. Sc. U S A.* **25**, 3056-3061.

Ichinose K. & Lenoir A. (2009) Ontogeny of hydrocarbon profiles in the ant Aphaenogaster senilis and effects of social isolation. *C. R. Biol*. **332**, 697-703.

Ioriatti C., Frontuto A., Grassi A., Anfora G. & Simoni S. (2011) Drosophila suzukii, una nuova specie invasiva dannosa alle colture di piccoli frutti.- Accademia dei Georgofili, Giornata di studio "Criticità e prospettive delle emergenze fitosanitarie, 1 December 2011, Firenze, Italy.

Isaacs R, Hahn N, Tritten B & Garcia C (2010) Spotted Wing Drosophila: A new invasive pest of Michigan fruit crops, MSU Extension Bulletin E-3140. Michigan State University.

Issa F.A. & Edwards D.H. (2006) Ritualized submission and the reduction of aggression in an invertebrate. *Curr. Biol.* **16**, 2217–2221.

Jackson, L.L. & Bartelt, R.J. (1986) Cuticular hydrocarbons of Drosophila virilis comparison by age and sex. *Ins. Bioch.***16**, 433-439.

Jallon J. M., Antony C., & Benamar, O. (1981) Un anti-aphrodisiaque produit par les mâles de *Drosophila melanogaster* et transferé aux femelles lors de la copulation. *Compt. Ren. Ac. Sc.* **292**, 1147–1149.

Jallon J.M. (1984) A few chemical words exchanged by Drosophila during courtship and mating. *Behavior Genetics* **14**, 441–478.

Jallon J.M. & David J.R. (1987) Variations in cuticular hydrocarbons along the eight species of the Drosophila melanogaster subgroup. *Evolution* **41**, 294-302.

Jallon J. M. & Wicker-Thomas, C. (2003) Genetic studies on pheromone production in Drosophila. In Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology (ed. G. J.Blomquist & R. G. Vogt), pp. 253-281. London: Elsevier Academic.

Josepha R. M., Devinenib A. V., Kingc I. F. G., & Heberlein U. (2009) Oviposition preference for and positional avoidance of acetic acid provide a model for competing behavioral drives in Drosophila. *PNAS* **106**, 11352–11357.

Kaib M., Brandl R. & Bagine, R.K.N. (1991) Cuticular hydrocarbon profiles: A valuable tool in termite taxonomy. *Naturwissenschaften*, **78**, 176-179.

Kaneshiro KY (1983) Drosophila (Sophophora) suzukii (Matsumura). *Proc. Hawaiian Entomol. Soc.* **24**, 179.

Kanzawa T. (1939) Studies on *Drosophila suzukii* Mats. Kofu, Yamanashi Agric Exp Sta. 49

Kanzawa T. (1935) Research into the Fruit-fly *Drosophila suzukii* Matsumura (Preliminary Report). Yamanashi Prefecture Agricultural Experiment Station Report.

Karageorgi M., Bräcker L., Lebreton S., Minervino C, Cavey M, Siju K, Kadow I & Gompel N, Prud'homme B (2017) Evolution of multiple sensory systems drives novel egg-laying behavior in the fruit pest Drosophila suzukii. *Curr. Biol*. **27**, 847–853.

Karlson P, Luscher M. (1959) Pheromones: a new term for a class of biologically active substances. Nature, 183:55–6.

Keller M., Baum M. J., Brock O., Brennan P. A. & Bakker, J. (2009) The main and the accessory olfactory systems interact in the control of mate recognition and sexual behavior. *Behav. Brain Res.* **200**, 268-276.

Kemp DJ. (2006) Ageing, reproductive value, and the evolution of lifetime fighting behaviour. *Biol. J. Linn. Soc*. **88**, 565-578.

Kent C., Azanchi R., Smith B., Formosa A. & Devine J. D. (2008) Social Context Influences Chemical Communication in *D. melanogaster* Males. *Curr. Biol*. **18**, 1384-1389.

Kim J. & Carlson J.R., (2002). Gene discovery by e-genetics: Drosophila odor and taste receptors. *J. Cell Sci.* **115**, 1107–1112.

Kimura M. T. (1990) Quantitative response to photoperiod during reproductive diapause in the *Drosophila auraria* species-complex. *J. Insect Physiol.* 36:147–152.

Kinjo H., Kunimi Y., Nakai M. (2014) Effects of temperature on the reproduction and development of Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae). *Appl. Entomol. Zool*. **49**, 297– 304.

Koemans, T.S., Oppitz, C., Donders, R.A., van Bokhoven, H., Schenck, A., Keleman, K., Kramer, J.M. (2017) Drosophila courtship conditioning as a measure of learning and memory. *J. Vis. Exp*. **124**, e55808.

Kole R.K., Banerjee H. & Bhattacharyya A. (2001) Monitoring of market fish samples for Endosulfan and Hexachlorocyclohexane residues in and around Calcutta. *Bull. Envirron. Contam. Toxicol*. 67:554–559.

Kou R., Tang D.S. & Chow, Y.S. (1989) Alarm pheromone of pentatomid bug, Erthesina fullo Thunberg (Hemiptera: Pentatomidae). *J. Chem. Eol.* **15**, 2695-2702.

Krause Pham C. & Ray A (2015) Conservation of olfactory avoidance in drosophila species and identification of repellents for Drosophila suzukii. *Sci. Rep.* **5**, 11527.

Kravitz E. A. & Fernandez, M. P. (2015) Aggression in Drosophila. *Beh. Neur.***129**, 549-563.

Krupp J. J., Kent C., Billeter J. C., Azanchi R., So A. K., Schonfeld, J. A. & Levine, J. D. (2008). Social experience modifies pheromone expression and mating behavior in male Drosophila melanogaster. *Cur. Biol.* **18**, 1373–1383.

Kubli E. (2003) Sex-peptides: seminal peptides of the Drosophila male. *Cell. Mol. Life Sci*. **60**, 1689–704.

Kuhn G., Weidner S., Just U. & Hohner G. (1996). Characterization of technical waxes—comparison of chromatographic techniques and matrix-assisted laser-desorption/ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **732**, 111–117.

Kuo T.H., Yew J.Y., Fedina T.Y., Dreisewerd K., Dierick H.A. & Pletcher S.D. (2012) Aging modulates cuticular hydrocarbons and sexual attractiveness in Drosophila melanogaster. *J. Exp. Biol.* **5**, 814–821.

Kurtovic A., Widmer A. & Dickson B. J. (2007) A single class of olfactory neurons mediates behavioural responses to a Drosophila sex pheromone. *Nature* **446**, 542-546.

Lacaille F, Hiroi M, Twele R, Inoshita T. & Umemoto K. (2007) An inhibitory sex pheromone tastes bitter for Drosophila males. PLoS One 2: e661.

Lamb M.J. 1975. Age-related differences in the water content of normal and irradiated *Drosophila melanogaster*. *Exp Gerontol* **10**, 351–357.

Larsson MC, Domingos AI, Jones WD, Chiappe ME, Amrein H, Vosshall LB. (2004) Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for Drosophila olfaction. *Neuron.* **43**,703–714.

Lee J. (1964) Taxonomy, and Geographical Distribution of Drosophilidae (Diptera) in Korea. Reprinted from the Chungang University Theses Collection 9, 424–459.

Lee J., Bruck D., Curry H., Edwards D., Haviland D., Van Steenwykd R. & Yorgey B. (2011a) The susceptibility of small fruits and cherries to the spotted-wing drosophila, Drosophila suzukii. *Pest Manag. Sci.* **67**, 1358–1367.

Lee J., Bruck D., Dreves A., Ioriatti C., Vogt H. & Baufeld P. (2011b) In focus: spotted wing drosophila, Drosophila suzukii, across perspectives. *Pest. Manag. Sci.* **67**, 1349–1351.

Lee J., Shearer P., Barrantes .L, Beers E., Burrack H., Dalton D., Dreves A., Gut L., Hamby K., Haviland D., Isaacs R, Nielsen A., Richardson T., Rodriguez-Saona C., Stanley C., Walsh D., Walton V., Yee W., Zalom .F. & Bruck D (2013) Trap designs for monitoring Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae). *Environ. Entomol.* **42**, 1348–1355.

Lee J., Dreves A., Cave A., Kawai S., Isaacs R., Miller J., Van Timmeren S. & Bruck D (2015) Infestation of wild and ornamental non-crop fruits by Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **108**, 117–129.

Lee J., Dalton D., Swoboda-Bhattarai K., Bruck D., Burrack H., Strik B., Woltz J. & Walton V. (2016) Characterization and manipulation of fruit susceptibility to Drosophila suzukii. *J. Pest. Sci.* **89**, 771–780.

Legendre A., Miao X.-X., Da Lage J.-L. & Wicker-Thomas. C. (2008). Evolution of a desaturase involved in female pheromonal cuticular hydrocarbon biosynthesis and courtship behavior in Drosophila. *Ins. Bioch. Mol. Biol*. **38**, 244-255.

Levine J. D., Funes P., Dowse H. B. & Hall J. C. (2002) Resetting the Circadian Clock by Social Experience in Drosophila melanogaster. *Science* **298**, 2010.

Lim R. S., Eyjolfsdottir E., Shin. E., Perona P. & Anderson, D. J. (2014).How Food Controls Aggression in Drosophila. *Plos One* **9**.

Little C, Chaptman T, Moreau D. & Hillier N (2017) Susceptibility of selected boreal fruits and berries to the invasive pest Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae). *Pest. Manag. Sci.* **73**, 160–166.

Lockey K. H. (1988) Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp. Bioch. Phys*. **89B**, 595-645.

Lockwood JA & Story RN. (1986) Adaptive functions of nymphal aggregation in the southern green stink bug, Nezara viridula (L) (Hemiptera, Pentatomidae). *Environ. Entomol*.**15**, 739–49.

Lofqvist J. (1976) formic acid and saturated hydrocarbons as alarm pheromones for the ant *Formica rufa*. *J. lns. Physiol.* **22**, 1331-1346.

López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M. & Kroemer G (2013). The hallmarks of aging. *Cell* **153**, 1194–1217.

Madabattula, S. T. (2015) Quantitative Analysis of Climbing Defects in a Drosophila Model of Neurodegenerative Disorders. *J. Vis. Exp*. e52741-e52741,

Mandrin J. F., Weydert C. & Trottin-Caudal Y., (2010) Un nouveau ravageur des fruits: Drosophila suzukii. Premiers dégâts observés sur cerises. *Infos CTIFL* **266**, 26-33.

Marcillac F, Grosjean Y. & Ferveur JF. (2005) A single mutation alters production and discrimination of Drosophila sex pheromones. *Proc. R. Soc. Lond*. **272**, 303–309.

Mart´ın F., Charro M.J. & Alcorta E., (2001) Mutations affecting the cAMP transduction pathway modify olfaction in Drosophila. *J. Comp. Physiol. A* **187**, 359–370.

Martineau D., Be′land P., Desjardins C. & Lagace′ A. (1987) Levels of organochlorine chemicals in tissues of beluga whales (Delphinapterusleucas) from the St. Lawrence Estuary, Que′bec, Canada. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*. **16**, 137–147.

Masse N Y, Turner G C & Jefferis G S X E (2009) Olfactory information processing in Drosophila. *Curr. Biol*. **19**, 700–713.

Masters G. & Norgrove L. (2010) Climate change and invasive alien species. *CABI Working Paper* **1**, 1–30.

Mazzi D., Bravin E., Meraner M., Finger R. & Kuske S. (2017) Economic impact of the introduction and establishment of Drosophila suzukii on sweet cherry production in Switzerland. *Insects* **8**, 18.

McCall PJ & Cameron MM (1995) Oviposition in insect vectors. *Paras. Tod.* **11**, 352-355.

McNair, H., Miller, J. (1998) Basic Gas Chromatography, John Wiley & Sons, Inc. Cambridge.

Metcalf R. L., & E. R. Metcalf. (1992) Plant kairomones in insect ecology and control. Chapman and Hall, London

Mitsui H., Beppu K. & Kimura M.T., (2010) Seasonal life cycles and resource uses of flower- and fruit-feeding drosophilid flies (Diptera: Drosophilidae) in central Japan. *Entomol. Sci.* **13**, 60-67.

Mitsui H., Takahashi K.H, & Kimura M.T. (2006) Spatial distributions and clutch sizes of Drosophila species ovipositing on cherry fruits of different stages. *Popul. Ecol*. **48**,233-237.

Moczek A. P. (2010) Phenotypic plasticity and diversity in insects. *Phil. Trans. R. Soc. B*. **365**, 593–603.

Morgan E. D. (2004) Biosynthesis in insects. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.

NAPPO (2011) Detection of spotted-winged drosophila (Drosophila suzukii Matsumura) in the Municipality of Los Reyes, State of Michoacan, Mexico. Official Pest Reports. North America‟s Plant Protection Organization.

Neckameyer W. S. & Nieto-Romero A. R.(2015) Response to stress in Drosophila is mediated by gender, age and stress paradigm. *Stress* **18**, 254-266.

Nelson D. R. & Blomquist, G. J. (1995). Insect waxes. In Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions (ed. R. J. Hamilton), pp. 1-90. Dundee, Scotland: Oily Press.

Nelson, R.J, Trainor B.C. (2007) Neural mechanisms of aggression. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 536–546.

Ng SH, Shankar S, Shikichi Y, Akasaka K, Mori K. & Yew JY. (2014) Pheromone evolution and sexual behavior in Drosophila are shaped by male sensory exploitation of other males. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*,**111**, 3056–61.

Nilsen S. P., Chan Y. B., Huber R. & Kravitz E. A. (2004) Gender-selective patterns of aggressive behavior in Drosophila melanogaster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*,**101**, 12342-12347.

Niwa R. &. Niwa Yuko S. (2011) The Fruit Fly Drosophila melanogaster as a Model System to Study Cholesterol Metabolism and Homeostasis, Article ID 176802.

Nunes T. M., Turatti I. C., Lopes N. P. & Zucchi, R. (2009). Chemical signals in the stingless bee, Frieseomelitta varia, indicate caste, gender, age, and reproductive status. *J. Chem. Ecol*. **35**, 1172-1180.

Ogueta M., Cibik O., Eltrop R., Schneider A. & Scholz H. (2010) The Influence of Adh Function on Ethanol Preference and Tolerance in Adult Drosophila melanogaster. *Chem. Senses* **35**, 813–822.

Okada T., (1976) New distribution records of the Drosophilids in the oriental region.- *Makunagi*, **8**, 1-8 (in Japanese).

Ometto L., Cestaro A., Ramasamy S., Grassi A., Revadi S., Siozios S., Moretto M., Fontana P., Varotto C., Pisani D., Dekker T., Wrobel N., Viola R., Pertot I., Cavalieri D., Blaxter M., Anfora G. & Rota-Stabelli O. (2013) Linking genomics and ecology to investigate the complex evolution of an invasive Drosophila pest. *Genome Biol. Evol*. **5,** 745–757.

Orsted V.I & Orsted M., (2018) Species distribution models of the Spotted Wing Drosophila (Drosophila suzukii, Diptera: Drosophilidae) in its native and invasive range reveal an ecological niche shift. *J. Ap. Ec.* **56**,423-435.

Palavicino-Maggio, C. B. (2019).Aggression and courtship differences found in Drosophila melanogaster from two different microclimates at Evolution Canyon, Israel. *Scientific Reports* **9.**

Pansa M. G., Frati S., Baudino M., Tavella L. & Alma A. (2011) Prima segnalazione di Drosophila suzukii in Piemonte.- *Prot. Colt.* **2**, 108.

Parker GA. (1974) Assessment strategy and the evolution of fighting behaviour. *J. Theor. Biol.***47**, 223-243.

Parker J., Crowder D., Eigenbrode S. & Snyder W. (2016) Trap crop diversity enhances crop yield. *Agric. Ecosys. Environ.* **232,** 254–262**.**

Partridge L., Hoffmann A. & Jones, J. S. (1987) Male Size and Mating Success in Drosophila-Melanogaster and Drosophila-Pseudoobscura under Field Conditions. *Anim. Behav.* **35**, 468-476.

Pechine J.M., Perez F., Antony C. & Jallon J.M. (1985) A further characterization of Drosophila cuticular monoenes using a mass spectrometry method to localize double bonds in complex mixtures. *Anal. Bioch.* **145**, 177-182.

Peng CW & Weiss MJ. (1992) Evidence of an aggregation pheromone in the flea beetle, Phyllotreta cruciferae (Goeze) (Coleoptera, Chrysomelidae). *J. Chem. Ecol*. **18**, 875–84.

Pennanec'h M., Ferveur J-F., Pho D-B. & Jallon J-M. (1991**)** Insect fatty acid related pheromones: A review of their biosynthesis, hormonal regulation and genetic control. *Ann. Soc. Entom. Fr.* **27**, 245-263.

Perez-Staples, D., Shelly, T. E. & Yuval, B. (2013) Female mating failure and the failure of 'mating' in sterile insect programs. *Entomol. Exp. Appl.* **146**, 66-78.

Popova N. K. (2006) From genes to aggressive behavior: the role of serotonergic system. *BioEssays* **28**, 495-503.

Potter C. J. & Luo, L. Q. (2008) Octopamine fuels fighting flies. *Nature Neurosc.* **11**, 989-990.

Prado E. & Tjallingii W.F. (1997) Effects of previous plant infestation on sieve element acceptance by two aphids. *Entomol. Exp. Appl.*, **82,** 189–200.

Pungaliya C., Srinivasan J., Fox B.W., Malik R.U., Ludewig A.H. & Sternberg P.W., (2009) A shortcut to identifying small molecule signals that regulate behavior and development in Caenorhabditis elegans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 7708–13.

Ray A., Zunic A., Alten R., McElfresh J.S., Hanks L. & Millar J. (2011) Cis-vaccenyl acetate, a female-produced sex pheromone component of Ortholeptura valida, a longhorned beetle in the subfamily Lepturinae. *J. Chem. Ecol*. **37**, 173–8.

Revadi S., Lebreton S., Witzgal P., Anfora G., Dekker T., & Becher, P.G. (2015) Sexual Behavior of *Drosophila suzukii Insects* **6**,183-196

Revadi S., Vitagliano S., Rossi Stacconi V., Ramasamy S., Mansourian S., Carlin C., Vrhovsek U., Becher G., Mazzoni V., Stabelli R., Angeli S., Dekker T. & Anfora G. (2015) Olfactory responses of Drosophila suzukii females to host plant volatiles. *Phys. Entomol.* **0**, 56-64.

Riipi M, Alatalo RV, Lindstrom L. & Mappes J. (2001) Multiple benefits ofgregariousness cover detectability costs in aposematic aggregations. *Nature*, **413**, 512–4.

Robin C., Dabor, P. J. & Hoffmann, A. A. (2007) Fighting fly genes. *Trends Genet.* **23**, 51–54.

Robinson A. S. van Heemert C., (1982) Ceratitis capitat a suitable case for genetic sexing, *Genetica* **58**, 229-237.

Roche J.P., Talyn B.C.P. & Dowse H.B. (1998) Courtship Bout Duration in per Circadian Period Mutants In Drosophila melanogaster. *Behav. Genet.* **28**, 391.

Rouault J.D., Marican C., Wicker-Thomas C. & Jallon J-M. (2004) Relations between cuticular hydrocarbon (HC) polymorphism, resistance to desiccation and breeding temperature; a model for HC evolution in D. melanogaster and D. simulans. *Genetica* **120**, 195-212.

Rydberg J.C. & Choppin. G.R (2004) Principles and practices of solvent extraction Solvent Extraction Equilibria , New York, 760 pp, ISBN 0 8247 5053 2.

Ryer, C. H. & Olla, B. L. (1995) The Influence of Food Distribution Upon the Development of Aggressive and Competitive Behavior in Juvenile Chum Salmon, Oncorhynchus-Keta. *J. Fish Biol.* **46**, 264-272.

Saltz, J. B. (2017) Genetic variation in social environment construction influences the development of aggressive behavior in Drosophila melanogaster. *Heredity* **118**, 340-347.

Santosh Revadi S., Lebreton S., Witzgall P., Anfora G., Dekker T. & Becher P. G. (2015) Sexual Behavior of Drosophila suzukii. *Insects* **6**, 183-196.

Sasaki M. & Sato R. (1995) Bionomics of the cherry drosophila, Drosophila suzukii Matsumura (Diptera: Drosophilidae) in Fukushima prefecture (Japan) – *An. Rep. Society Pl. Pr. N. Japan*, **46**, 164-172.

Savarit F., Sureau G., Cobb M. & Ferveur J.F. (1999) Genetic elimination of known pheromones reveals the fundamental chemical bases of mating and isolation in Drosophila. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A* **96**, 9015–9020.

Schal C., Sevala V. L., Young H. P. & Bachmann J. A. S. (1998) Sites of synthesis and transport pathways of insect hydrocarbons: cuticle and ovary as target tissues. *Am. Zool.* **38**, 382-387.

Schaner A. M., Bartelt R. J., & Jackson L. L. (1987) (Z)-II-octadecenyl acetate, an aggregation pheromone in *Drosophila simulans. J. Chem. Ecol.* **13**, 1777-1786.

Schiestl F.P., Ayasse M., Paulus H.F., Löfstedt C., Hansson B.S. & Ibarra. F, (2000) Sex pheromone mimicry in the early spider orchid (Ophrys sphegodes): patterns of hydrocarbons as the key mechanism for pollination by sexual deception. *J. Comp. Physiol. A.***186**, 567–74.

Seljak G. (2011) Spotted wing Drosophila, Drosophila suzukii (Matsumura), a new pest of berry-fruit in Slovenia *Sadjarstvo* **22** , 3-5.

Service P.M., E.W. Hutichinson, M.D. MacKinley, and M.R. Rose (1985). Resistance to environmental stress in *Drosophila melanogaster* selected for postponed senescence. *Physiol. Zool.* **58**, 380–389.

Seybold S.J. & Tittiger C. (2003) Biochemistry and molecular biology of de novo isoprenoid pheromone production in the Scolytidae. *Annu. Rev. Entomol*., **48**, 425–53.

Shelly T. E. (1988) Lek Behavior of Drosophila-Cnecopleura in Hawaii. *Ecol. Entomol.* **13**, 51-55.

Shikichi Y., Akasaka K., Tamogami S., Shankar S., Yew J.Y. & Mori K. (2012) Pheromone synthesis. Part 250: determination of the stereostructure of CH503 a sex pheromone of male Drosophila melanogaster, as (3R,11Z,19Z)-3-acetoxy-11,19-octacosadien-1-ol by synthesis and chromatographic analysis of its eight isomers. *Tetrahedron* **68**, 3750–60.

Shirangi T.R., Dufour H.D., Williams T.M., Carroll S.B. (2009) Rapid Evolution of Sex Pheromone-Producing Enzyme Expression in Drosophila. *PLoS Biol.* **7(8)**, e1000168

Sidorenko V. S., (1992) New and unrecorded species of Drosophilidae from Soviet Far East (Diptera, Brachycera).- *Spix.***15**, 93-95.

Singh B.K. & Bhatt M (1988) A preliminary report on the Drosophilidae of the Kumaun region with description of two new species and three new records. *Or. Ins*. **22**, 147-161.

Singh B.K. & Negi N.S. (1989) Drosophilidae of the Garhwal region with the description of one new species. Proc. Zool. Soc. Calcutta **40**, 19-26.

Siwicki K. K. & Ladewski L. (2003) Associative learning and memory in Drosophila: beyond olfactory conditioning. *Behav. Proc.* **64**, 225-238.

Siwicki K.K, Riccio P., Ladewski L., Marcillac F., Dartevelle L., Cross S.A. & Ferveur J.F.. (2005) The role of cuticular pheromones in courtship conditioning of Drosophila males. *Learn. Mem.* **12**, 636-645.

Skoog D., Holler F. J. & Nieman T.A, (2002) 5η Έκδοση, Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, Ελληνική Μετάφραση Καραγιάννη-Ευσταθίου-Χανιωτάκη publisher, Town.

Sledge M.F., Boscaro F. & Turillazzi S. (2001) Cuticular hydrocarbons and reproductive status in the social wasp Polistes dominulus. *Behav. Ecol. Sociob*. **49**,401-409.

Snellings Y., Herrera B., Wildermann B., Beelen M., Zwarts L., Wenseleers T. & Callaerts, P. (2018). The role of cuticular hydrocarbonds in mate recognition in *Drosophila suzukii*. *Sc. Rep.* ***8***, 4996.

Stephens A. R., Asplen M. K., Hutchison W. D. & Venette R. C. (2015) Cold hardiness of winteracclimated Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae) Adults. *Physiol. Entomol*. **44**, 1619–1626.

Stocker R.F., (1994) The organization of the chemosensory system in Drosophila melanogaster: a rewiew. *Cell Tissue Res*. **275**, 3-26.

Stocker A. M. & Huber R. (2001) Fighting strategies in crayfish Orconectes rusticus (Decapoda, Cambaridae) differ with hunger state and the presence of food cues. *Ethology* **107**, 727-736.

Strauch M., Lüdke A., Münch D. Laudes T. C., Galizia G., Martinelli E., Lavra L., Paolesse R., Ulivieri A., Catini A., Capuano R. & Natale C.(2015) More than apples and oranges - Detecting cancer with a fruit fly's antenna. *Sci. Rep.* **4,** 3576.

Struble D.L. &Arn H. (1984) Techniques in pheromone research. In: Hummel HR, Miller TA, editors. New York: Springer

Sturtevant, A. H. (1915) Experiments on sex recognition and the problems of sexual selection in Drosophila. *Anim Behav* **5**, 351–366

Süss L. & Costanzi M., (2011) Presence of Drosophila suzukii (Matsumura, 1931) (Diptera Drosophilidae) in Liguria (Italy) - *J. Ent. and Acar. Res.*, **42**, 185-188.

Syed Z. & Leal W.S. (2009) Acute olfactory response of Culex mosquitoes to a humanand bird-derived attractant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 18803.

Tait G., Kaiser C., Rossi-STacconi M. V., Dalton D. T., Anfora G., & Walton V.M. (2018) A food-grade gum as a management tool for *Drosophila suzukii*. *Bul. Insect.* **71,** 295-307.

Takahashi A., Tsaur S.C., Coyne J.A. & Wu C.I. (2001) The nucleotide changes governing cuticular hydrocarbon variation and their evolution in Drosophila melanogaster. *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. 8:3920–5.

Tanimura T., Isono K., Takamura T. & Shimada I., (1982) Genetic dimorphism in taste sensitivity to trehalose in Drosophila melanogaster. *J. Comp. Physiol. A* **147**, 265–269.

Taylor, M. J. & Tuxworth, R. I (2019) Continuous tracking of startled Drosophila as an alternative to the negative geotaxis climbing assay. *J. Neurogen*. **33**, 190-198.

Teal P.E.A. (2008) Sex Attractant Pheromones. In: Capinera J.L. (eds) Encyclopedia of Entomology. Springer, Dordrecht

Tillman J. A., Seybold S. J., Jurenka, R. A. & Blomquist, G. J. (1999). Insect pheromones -an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Ins. Bioch. Mol. Biol*. **29**, 481-541

Timmeren S.V, Diepenbrock L.M, Bertone M.A., Burrack H.J. & Isaacs R. (2017) A Filter Method for Improved Monitoring of Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae) Larvae in Fruit. J. Int. P. Man., 8, Issue 1,

Tinette S., Zhang L. & Robichon A. (2003) Cooperation between Drosophila flies in searching behavior. *Gen. Br. Beh.* **3**, 39-50

Tochen S., Woltz J. M., Dalton D. T., Lee J. C., Wiman N. G. & Walton V. M. (2016) Humidity affects populations of Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae) in blueberry. *J. Appl. Entomol*. **140**, 47–57.

Toda M.J. (1991) Drosophilidae (Diptera) in Myanmar (Burma) VII. The Drosophila melanogaster species-group, excepting the D. montium species sub-group. *Orient. Ins*. **25**, 69-94.

Toolson E.C. & Kuper-Simbron R. (1989) Laboratory evolution of epicuticular hydrocarbon composition and cuticular permeability in Drosophila pseudoobscura: effects on sexual dimorphism and thermal acclimation ability. *Evolution* **43**, 468–73

Touhara K., & Vosshall L. B. (2009). Sensing odorants and pheromones with chemosensory receptors. Ann. Rev. Phys. 71, 307–332.

Trannoy, S. & Kravitz, E. A. (2015) Learning and memory during aggression in Drosophila: handling affects aggression and the formation of a "loser" effect. *J. Nat. Sc.* **1**, e56.

Tzanakakis M. E. (1995) Entomology, University Studio Press, Thessaloniki.

Ueda, A. & Kidokoro, Y. (2002) Aggressive behaviours of female Drosophila melanogaster are influenced by their social experience and food resources. *Physiol. Entomol.* **27**, 21-28.

Ueyama M, Chertemps T, Labeur C, Wicker-Thomas C. (2005) Mutations in the desat1 gene reduces the production of courtship stimulatory pheromones through a marked effect on fatty acids in Drosophila melanogaster. *Insect Biochem. Mol. Biol*. **35**, 911–20.

Vander Meer, R.K., Saliwanchik, D. & Lavine, B. (1989). Temporal changes in colony cuticular hydrocarbon patterns of *Solenopsis invicta*. Implications for Nestmate Recognition. *J. Chem. Ecol.* ***5,*** 2115-2125.

Vang L.L., Medvedev A.V. & Adler, J.. (2012) Simple Ways to Measure Behavioral Responses of Drosophila to Stimuli and Use of These Methods to Characterize a Novel Mutant. *PLoS ONE* **7**, e37495.

Vang L. & Adler J. (2016) Drosophila Mutants that Are Motile but Respond Poorly to All Stimuli Tested: Mutants that have a large defect in interaction with stimuli or in executive function. *BioRχiv.*

Verhoef H.A. & Nagelkerke C.J. (1977) Formation and ecological significance of aggregations in Collembola – experimental-study. *Oecologia*, **31**, 215–26.

Versteven M. (2017) Hearing regulates Drosophila aggression. PNAS **114**, 1958-1963.

Vieillard D.A. & Cortot, J. (2016) When Choice Makes Sense: Menthol Influence on Mating, Oviposition and Fecundity in Drosophila melanogaster. *Front. Integr. Neurosc.***0**, 5.

Vogt H., Bauerfeld P., Gross J., Köppler K. & Hoffmann C. (2012) Drosophila suzukii. Eine neue Bedrohung für den Europäischen Obst und Weinbau. Bericht über eine internationale Tagung in Trient am 2. Dezember 2011. *J. Kult*. **64**, 68–71.

Vosshall L B. & Reinhard F Σ (2007) Molecular Architecture of Smell and Taste in Drosophila, *Ann. Rev. Neurosc*., **30**, 505-533.

Wagner D., Brown M. J. F., Broun P., Cuevas W., Moses L. E., Chao D. L. & Gordon, D. M. (1998) Task-related differences in the cuticular hydrocarbon composition of harvester ants, Pogonomyrmex barbatus. *J. Chem. Ecol*., **24**, 2021-2037

Wallingford A, Cha D, Linn J,Wolfin M, Loeb G (2017) Robust manipulations of pest insect behaviour using repellents and practical application for integrated pest management. *Environ. Entomol.* **46**, 1041–1050.

Walsh D.B., Bolda M.P., Goodhow R.E, Dreves A.J., Lee J., Bruck D.V., Walton M., O'neal S.D. & Zalom F.G. (2011) Drosophila suzukii (Diptera:Drosophilidae): invasive pest of ripening soft fruit expanding its geographic range and damage potential. *J. Integr. P. Manag.***06**, 289-295.

Wang L., Dankert H., Perona P. & Anderson, (2008) D. J. A common genetic target for environmental and heritable influences on aggressiveness in Drosophila. *PNAS* **105**, 5657-5663.

Wang L. & Anderson, D.J. (2010) Identification of an aggression-promoting pheromone and its receptor neurons *Drosophila*. *Nature* **463**, 227–231

Wang L., Han X., Mehren J., Hiroi M., Billeter J. C., Miyamoto, T., Amrein H., Levine D. J., & Anderson, D. J. (2011). Hierarchical chemosensory regulation of male-male social interactions in Drosophila. *Nature Neurosc.***14**, 757–762.

Wang, S. & Sokolowski, M. B. Aggressive behaviours, food deprivation and the foraging gene. *R. Soc. Sc*., 170042, (2017).

Welzel K.F, Lee S.H,. Dossey A.T, Chauhan K.R. & Choe, D.H (2018) Verification of Argentine ant defensive compounds and their behavioral effects on heterospecific competitors and conspecific nestmates. *Sci. Rep.* **8**, 1477.

Wertheim B, van Baalen EJA, Dicke M. & Vet LEM (2005) Pheromone-mediated aggregation in nonsocial arthropods: an evolutionary ecological perspective. *Annu. Rev. Entomol*., **50**, 321–46.

Weydert C. & Bourgouin B., (2011) Drosophila suzukii menace l'arboriculture fruitière et les petits fruits. Point de situation sur cette mouche, ravageur nouveau et déjà très nuisible, et ce qu'on peut faire contre elle. *Phytoma*, 650,16-20.

Wheeler, M.R., (1981) The Drosophilidae: A taxonomic overview. In: The Genetics and Biology of Drosophila (Ashburner, M., H.L. Carson, and J.N. Thompson, Jr., Eds.), Academic Press, New York. 3a, 1-97.

Wicker-Thomas C (2007) Pheromonal communication involved in courtship behavior in Diptera. *J. Insect Physiol.* **53**, 1089–1100.

Wicker-Thomas, C., Guenachi, I., & Keita, Y. F. (2009). Contribution of oenocytes and pheromones to courtship behaviour in Drosophila. BMC *Biochemistry*, **10**, 21.

Wicker-Thomas, C., Garrido, D., Bontonou, G., Napal, L., Mazuras, N., Denis, B., Rubin, T., Parvy, J-P. & Montagne, J. (2015) Flexible origin of hydrocarbon/ pheromone precursors in Drosophila melanogaster. *J. L. Res.* **56**, 2094-2101.

Wilcox, R. S. & Ruckdeschel, T. (1982) Food Threshold Territoriality in a Water Strider (Gerris-Remigis). *Behav. Ecol. Sociobiol.* **11**, 85-90.

Wilm M. (2011) Principles of electrospray ionization. *Mol. Cell. Proteomics* **10** (M111):009407.

Wilson EO, Regnier FE. (1971) Evolution of alarm-defense system in formicine ants. *Am. Nat.* **105**, 279–89.

Witzgall P, Kirsch P & Cork A. (2010) Sex pheromones and their impact on pest management. *J. Chem. Ecol*. **36**, 80–100.

Witzgall P, Stelinski L, Gut L & Thomson D. (2008) Codling moth management and chemical ecology. *Annu. Rev. Entomol.*, **53**, 503–22.

Wyatt, T. (2003) Pheromones and animal behaviour: communication by smell and taste (book). Vol. 41 1-22 (Cambridge: Cambridge University Press.

Yacqueline S.R.C & Yew, Y.Y. (2013) Pheromone Signaling: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Kazushige Touhara (ed.), **1068,** Springer Science Cambridge.

Yang Y, Hou Z, Qian Y, Kang H, Zeng Q (2012) Increasing the data size to accurately reconstruct the phylogenetic relationships between nine subgroups of the *Drosophila melanogaster* species group (Drosophilidae, Diptera). Mol. Phyl. and Evol. 62, 214-223.

Yao C.A., Ignell R. & Carlson J.R., (2005) Chemosensory coding by neurons in the coeloconic sensilla of the Drosophila antenna. *J. Neurosci.* 25, 8359-67.

Yew JY, Dreisewerd K, Luftmann H, Müthing J, Pohlentz G & Kravitz E. (2009) A new male sex pheromone and novel cuticular cues for chemical communication in Drosophila. *Cur. Biol.* **19**, 1–10.

Yew YJ, Chung H (2015) Insect pheromones: An overview of function, form and discovery *Prog. Lip. Rese*., **59**, 88-105.

Yu D, Zalom F, Hamby K (2013) Host status and fruit odor response of Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae) to figs and mulberries. *J. Econ. Entomol*. **106**, 1932–1937.

Zwarts, L., Versteven, M. & Callaerts, P. (2012) Genetics and neurobiology of aggression in Drosophila. *Fly* **6**, 35-48.

Hermant. Spieth (1966) *Drosophilid* mating behavior: the decapitated females behavior *Anim. Behav*. **14**, 226-235.

Μιχόπουλος Φ. (2008) Υγρή Χρωματογραφία συζευγμένη με Φασματομετρία Μζών (LC-MS) για την ανάλυση ολικού προφίλ μεταβολιτών. Μελέτη κατεργασίας βιολογικών δειγμάτων με εκχύλιση στερεής φάσης (SPE). Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία Τμήμα Χημείας ΑΠΘ, Θεσ/νίκη

Στρατής, Γ., Ζαχαριάδης, Β., Σαμανίδου, Γ.Α, Θεοδωρίδης, (2003) Ειδικές Μέθοδοι Διαχωρισμού και Χημικής Ανάλυσης Φασματομετρίας Μαζών Κεφ.10-12 Ζήτη, Θεσσαλονίκη.