

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ – ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΧΕΡΣΑΙΩΝ ΚΑΙ
ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ »

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : Α.Π. ΟΙΚΟΝΟΜΟΠΟΥΛΟΣ
ΔΕΥΤΕΡΟΣ ΕΞΕΤΑΣΤΗΣ (Αν. Καθηγητής) : Κ. ΜΠΟΥΡΤΖΗΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΘΕΜΑ :

«Η ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΟΥ
ΔΑΚΟΥ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ, *Bactrocera (Dacus) oleae* (Rossi) (Diptera:
Tephritidae)»

ΧΡΥΣΑΡΓΥΡΗΣ ΑΝΤΩΝΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2007

Ευχαριστίες

Η συγκεκριμένη διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Εφαρμοσμένης Εντομολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, με κύριο επιβλέποντα τον Καθηγητή Εντομολογίας κ. Α.Π. Οικονομόπουλο και δεύτερο εξεταστή τον Αναπληρωτή Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας και Βιοχημείας κ. Κ. Μπούρτζη και χρηματοδοτήθηκε από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα Κρήτης 2000 – 2006, Μέτρο 1.2: “Κοινοπραξίες Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης σε τομείς Εθνικής Προτεραιότητας, Πρόγραμμα ΚΡ 20” .

Μέρος της διατριβής πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Βιοχημείας του Τμήματος Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (στο Αγρίνιο). Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ.Μπούρτζη για την πολύτιμη βοήθειά του τις εβδομάδες που πέρασα στο εργαστήριό του, καθώς επίσης και την ερευνητική του ομάδα που με δέχτηκε στο εργαστήριο σαν μέλος της και πραγματικά με καθοδήγησε, με βοήθησε και μου έμαθε πολλά καινούργια για μένα πράγματα, και κυρίως την Αθηνά Χαμαλάκη και τον Παναγιώτη Σαπουντζή.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Μ.Κωνσταντοπούλου για τη βοήθειά της στα πρώτα μου βήματα πάνω στο συγκεκριμένο θέμα.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ το οφείλω στα μέλη του δικού μας εργαστηρίου, με πρώτο (ίσως και τελευταίο) τον Χρόνη Ρεμπουλάκη, που για αρκετά χρόνια (ακόμη και προπτυχιακά) ήταν πάντα δίπλα μου και έτοιμος να με βοηθήσει σε οτιδήποτε χρειαζόμουν. Επίσης δε μπορώ να ξεχάσω την βοήθεια της Μαρίνας Κονσολάκη, στα πρώτα μου βήματα ως μεταπτυχιακός φοιτητής καθώς επίσης και τα νεότερα μέλη του εργαστηρίου μας : το Γιάννη Δήμου και τον Issa Chahine, που ήταν εκεί, αν και στο τρίτο όροφο, τις περιόδους που πέρασα στο εντομοτροφείο μόνος, παρέα με 60.000 δίπτερα!

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ξεχωριστά τους φίλους μου αυτά τα χρόνια στο Ηράκλειο που είτε μέσα είτε απ’ έξω από το Πανεπιστήμιο, με στήριξαν και με βοήθησαν, ο καθένας με τον τρόπο του σε κάθε δύσκολη στιγμή αλλά και για τις πολύ ξεχωριστές στιγμές που περάσαμε μαζί. Παλιούς συμφοιτητές (και όχι μόνο), τη Μαρία, τον Γιάννη, τη Μήνα, την Αφροδίτη, τη Δέσποινα, τη Δήμητρα (στις δύο τελευταίες χρωστάω περίπου 1000 πιάτα με θρεπτικό υλικό!!!). Αλλά και τους φίλους που είναι ακόμη εδώ και πάλευαν μαζί μου να «τελειώσω επιτέλους από τις μύγες», όπως πολύ συχνά μου έλεγαν. Μιράντα, Ράνια, Λευτέρη, ευχαριστώ για τις στιγμές που περάσαμε αυτά τα χρόνια και ελπίζω να έρθουν κι άλλες.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ ανήκει στην οικογένεια μου και κυρίως στους γονείς μου για την αμέριστη συμπαράσταση και στήριξη όλα αυτά τα χρόνια που πέρασα μακριά τους. Δεν ήταν εύκολο για αυτούς, αλλά ούτε και για μένα. Ίσως όλη η προσπάθεια που έκανα να ανήκει σε εσάς. Δε μπορώ να ξεχάσω και τις δύο μου αδελφές Αγγελική και Αντιγόνη (γιατί όταν θα το διαβάσουν, σίγουρα θα θέλουν να δουν το όνομά τους, αλλά το θέλω και εγώ!) που ήταν πάντα κοντά μου και στήριζαν την κάθε μου επιλογή και πίστευαν πάντα ότι μπορώ να τα καταφέρω.

Άφησα για το τέλος τον άνθρωπο που θέλω να ευχαριστήσω πρώτα και περισσότερο απ’ όλους. Και αυτό γιατί ίσως ένα ευχαριστώ από μένα είναι πολύ λίγο μπροστά σε αυτά που μου έδωσε. Έτσι θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κ. Οικονομόπουλο για τη στήριξη, καθοδήγηση και εμπιστοσύνη αλλά και την υπομονή του όλα αυτά τα χρόνια. Μου έμαθε και μου έδωσε πραγματικά πολλά.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1.1 Η ΕΛΙΑ	4
1.2 Ο ΔΑΚΟΣ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ	5
1.2α ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ	5
1.2β ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ	6
1.2γ ΠΡΟΣΒΟΛΗ ΤΟΥ ΚΑΡΠΟΥ ΑΠΟ ΤΟ ΕΝΤΟΜΟ	8
1.2δ ΕΛΕΓΧΟΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ	8
1.2ε ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ	9
1.2στ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΚΤΡΟΦΗΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ	10
1.2ζ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ	11
2. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ («ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ»)	14
3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	16
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	17
4.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	17
4.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	18
4.3 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	22
4.3α PCR COLONY	22
4.3β GEL ELECTROPHORESIS	25
4.3γ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ PCR PRODUCT	30
4.3δ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ PCR PRODUCT	30
4.3ε RFLPs	31
4.3στ SEQUENCING	33
4.3ζ GLYCEROL STOCK	33
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	34
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ	37
7. ABSTRACT- ΠΕΡΙΛΗΨΗ	42
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	43

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η δημιουργία μιας εργαστηριακής αποικίας του δάκου της ελιάς, από άγριο πληθυσμό αποτελεί μια πολύ δύσκολη και ευαίσθητη διαδικασία. Απαιτούνται ιδιαίτερες διατροφικές συνθήκες, όπως γίνεται σε κάθε προσπάθεια αποικιοποίησης μονοφάγων ή ολιγοφάγων εντόμων. Κατά την προσαρμογή τους στο εργαστήριο τα έντομα υφίστανται αυστηρό γενετικό πολυμορφισμό (Loukas 1989), που έχει να κάνει με τις συνθήκες κάτω από τις οποίες διατηρείται ο πληθυσμός τους. Η φυσική μικροβιακή χλωρίδα του εντόμου υφίσταται δραστικές αλλαγές κατά την εκτροφή λόγω των αντιμικροβιακών ουσιών (αντιβιοτικά και συντηρητικά) που προστίθενται στα σιτηρέσια ενηλίκου και προνύμφης για την διαφύλαξή τους από την ανάπτυξη μικροοργανισμών (Tsiropoulos 1983, Belcari *et al.* 2003). Η προσαρμοστική διαδικασία στο νέο περιβάλλον είναι αποτέλεσμα των γενετικών αλλαγών που υιοθετούνται μετά από 2-3 γενεές και μπορούν να ανιχνευτούν και βιολογικά και βιοχημικά (Zouros *et al.* 1982).

Κατά τη μελέτη ενός οργανισμού πρέπει πάντα να λαμβάνουμε υπ' όψιν μας την επίδραση που έχουν σ' αυτόν οι διάφοροι μικροοργανισμοί που φέρει. Η μόνιμη παρουσία μικροοργανισμών γενικά στην οικογένεια των Tephritidae (Ratner and Stoffolano 1982, 1984) δικαιολογεί το πόσο σημαντικοί αυτοί είναι, παρέχοντας απαραίτητα θρεπτικά με το να αποικοδομούν πρωτεΐνες ή με το να συνθέτουν απαραίτητα συστατικά για τη βιολογία του εντόμου (Boller and Prokopy 1976, Howard *et al.* 1985). Επιπλέον προσφέρουν προστασία ενάντια σε πιθανά παθογόνα ή μπορούν να απομακρύνουν τοξίνες (Luethy *et al.* 1983, Rositer *et al.* 1982).

Η γνώση μας σήμερα για τους μικροοργανισμούς του συγκεκριμένου εντόμου είναι κάθε άλλο παρά πλήρης. Η περαιτέρω κατανόηση όμως και γνώση καθώς και ταυτοποίηση των βακτηρίων και όποιων άλλων μικροοργανισμών αυτό φέρει θα είναι πολύ χρήσιμη και για την καταπολέμηση του εντόμου.

1.1 Η ΕΛΙΑ

Το ελαιόδεντρο παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη ζωή των ανθρώπων, κυρίως της Μεσογείου. Επηρεάζει, πέρα από τη διατροφή τους, την οικονομική, κοινωνική πολιτιστική και πολιτική τους καθημερινότητα. Από πολύ παλιά είχε αυτόν το σημαντικό ρόλο, είτε στην αρχαία Ελλάδα, είτε στη Ρωμαϊκή και Βυζαντινή αυτοκρατορίες, αλλά και σε περιοχές περιφερειακά τους. Η χρήση των προϊόντων του καρπού της ελιάς ήταν πολύπλευρη (στη διατροφή, ως καύσιμο για κεριά, ως φαρμακευτικό και αρωματικό, για το μαγείρεμα και τη θέρμανση κ.α.). Επίσης, αποτέλεσε ένα από τα πρώτα εμπορεύσιμα προϊόντα και συνέβαλε στη διάνοιξη των πρώτων οδών επικοινωνίας μεταξύ των λαών και των πολιτισμών.

Σημερινή κατανομή του ελαιόδέντρου: Σήμερα καλλιεργούνται παγκοσμίως πάνω από ένα δισεκατομμύριο ελαιόδεντρα, ενώ πάνω από το 98% από αυτά βρίσκονται στη λεκάνη της Μεσογείου. Η καλλιέργεια της ελιάς εξαπλώνεται συνεχώς και σήμερα καλλιεργείται σε πέντε από τις έξι ηπείρους, ενώ παραμένει ζωτικής σημασίας για τις οικονομίες των μεσογειακών χωρών. Είναι χαρακτηριστικό ότι στην Ελλάδα βρίσκεται το 14,7% των ελαιοδέντρων παγκοσμίως, στην Ιταλία το 22,6% και στην Ισπανία το 23,5% και για αυτές τις χώρες οι ελαιοκαλλιέργειες αποτελούν πάνω από το 33% των μόνιμων καλλιεργειών τους. Στην Τυνησία ειδικά φτάνει το 93% των μόνιμων καλλιεργειών. Η συνολική έκταση που κάλυπταν οι καλλιέργειες ελιάς για τα έτη 1996-2003 ήταν περίπου σταθερή και ίση με 8 εκ. εκτάρια. Οι πρώτες χώρες σε έκταση καλλιεργειών τα ίδια έτη ήταν η Ισπανία με περίπου 2,2 εκ. εκτάρια, η Τυνησία με 1,3 εκ. εκτάρια, η Ιταλία με 1,2 εκ. εκτάρια και η Ελλάδα με 750 χιλιάδες εκτάρια (στοιχεία από FAO, <http://faostat.fao.org>).

Παραγωγή ελαιοκάρπου: Η παγκόσμια παραγωγή για τα έτη 1996-2003 ήταν περίπου σταθερή, κοντά στα 16 εκατομμύρια τόνους. Τη μεγαλύτερη παραγωγή είχε η Ισπανία με 3,4 ως 5,8 εκ. τόνους, η Ιταλία με 2,1 ως 3,7 εκ. τόνους και η Ελλάδα με 2,1 ως 2,3 εκ. τόνους (στοιχεία από FAO). Με δεδομένο ότι το μεγαλύτερο ποσοστό από την παραγωγή αυτή εξάγεται σε άλλες χώρες, γίνεται φανερό η μεγάλη οικονομική σημασία της καλλιέργειας αυτής για χώρες όπως η Ελλάδα. Είναι αναγκαία λοιπόν η καλύτερη δυνατή προστασία από όλους εκείνους τους παράγοντες που μειώνουν την ποσότητα και την ποιότητα της σοδιάς και κυριότερος από αυτούς είναι ο δάκος της ελιάς.

1.2 Ο ΔΑΚΟΣ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

1.2a ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΕΝΤΟΜΟΥ

Ο δάκος της ελιάς *Bactrocera oleae* ανήκει στην τάξη Diptera , υπόταξη Brachycera, οικογένεια Tephritidae, γένος *Bactrocera*. Η οικογένεια Tephritidae είναι μια συγκριτικά νέα οικογένεια των Δίπτερων που εμφανίστηκε στα μέσα του Τεταρτογενούς αιώνα, πριν 50 εκατομμύρια χρόνια περίπου. Στην οικογένεια αυτή έχουν αναφερθεί ότι ανήκουν 5000 είδη, κάποια από τα οποία έχουν μεγάλη οικονομική σημασία και ζουν σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές (Christenson and Foote 1960).

ΦΥΛΟ	Arthropoda
ΥΠΟΦΥΛΟ	Atelocerata
ΚΛΑΣΗ-ΟΜΟΤΑΞΙΑ	Insecta
ΥΠΟΚΛΑΣΗ	Neoptera
ΔΙΑΙΡΕΣΗ	Homometabola
ΤΑΞΗ	Diptera
ΥΠΟΤΑΞΗ	Brachycera
ΔΙΑΙΡΕΣΗ	Schizophora
ΤΜΗΜΑ	Acalyptratae
ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Tephritoidea
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Tephritidae
ΥΠΟΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Dacinae
ΦΥΛΗ	Dacini
ΓΕΝΟΣ	<i>Bactrocera</i>
ΥΠΟΓΕΝΟΣ	<i>Daculus</i>
ΕΙΔΟΣ	<i>oleae</i>

Πίνακας 1. Συστηματική κατάταξη του εντόμου σύμφωνα με τους White and Elson-Harris 1992 και White and Wang 1992.

Ο δάκος της ελιάς *Bactrocera oleae*, περιγράφηκε αρχικά από τον Gmelin ως *Musca oleae* το 1790. Στη συνέχεια μετονομάστηκε διαδοχικά σε *Dacus (Daculus) oleae* (Hardy 1951), *Dacus (Polistomimetes) oleae* (Hardy 1977, Foote 1984) και

Daculus oleae (Cogan and Munro 1980). Αργότερα κατατάχθηκε στο γένος *Bactrocera* (Rossi) (White and Wang 1992) λόγω της μορφολογίας των κοιλιακών του τεργιτών. Τα είδη του γένους *Bactrocera* έχουν διακριτούς κοιλιακούς τεργίτες και προσβάλλουν κυρίως ενδημικά τροπικά και υποτροπικά είδη φρούτων ενώ τα είδη του γένους *Dacus* έχουν ενωμένους κοιλιακούς τεργίτες και προσβάλλουν κυρίως τα ενδημικά Asclepiadaceae και Cucurbitaceae (Drew 1989). Ο δάκος είναι το μόνο είδος που σήμερα κατατάσσεται στο υπογένος *B. (Daculus)*, παρόλο που ο Drew 1989a,b το κατέταξε στο *B. (Polistomimetes)* με είδη που έχουν καταταγεί στο *B. (Tetradacus)* (White and Elson-Harris 1992).

Η οικογένεια Tephritidae αποτελείται από πολλά είδη εντόμων, οι προνύμφες των οποίων τρέφονται με διάφορους ιστούς φυτών. Όπως ρίζες, βλαστούς, φύλλα, άνθη αλλά και καρπούς, όπως το *B.oleae* και σε πολλές περιπτώσεις είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία υπερπλασιών ή παραμορφώσεων ιστών ή οργάνων (κηκίδες, κτλ) (Cristenson and Foote 1960).

1.2β ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΕΝΤΟΜΟΥ

Αυγό

Πολύ στενόμακρο, κάπως οξύ στον ένα πόλο, λευκό (Εικόνα 1). Τοποθετείται στο μεσοκάρπιο του φυτού ξενιστή (Τζανακάκης-Κατσόγιαννος 1998) .



Εικόνα 1:
Αυγό δάκου

Προνύμφη

Υπόλευκη ή ανοιχτοκίτρινη , μέγιστου μήκους 7-8 mm, με το πρόσθιο μέρος του σώματος στενότερο από το οπίσθιο. Όπως και τα άλλα Tephritidae, δεν έχει κεφαλική κάψα και στο πρόσθιο μέρος του σώματος διακρίνονται τα στοματικά άγκιστρα τα οποία είναι σκοτεινόχρωμα και ο υπόλοιπος κεφαλοφαρυγγικός σκελετός (Εικόνα 2). Μέχρι



Εικόνα 2 : Προνύμφη δάκου

την νόμφωση της διακρίνονται τρία αναπτυξιακά στάδια (Τζανακάκης 1980).

Νύμφη

Το σχήμα της είναι ελλειψοειδές, έχει χρώμα ανοιχτό καφέ και μήκος περίπου 2.5-4 mm (Εικόνα 3). Το περίβλημα της είναι σκληρυμένο δερμάτιο της αναπτυγμένης προνύμφης (Τζανακάκης 1980).



Εικόνα 3 : *Νύμφη δάκου*

Ενήλικο

Έχει μήκος 5 mm περίπου και χρώμα ανοιχτό έως σκοτεινό καστανό (Εικόνα 4). Οι σύνθετοι οφθαλμοί έχουν πρασινοπορφυρές μεταλλικές ανταύγειες. Ο θώρακας στα νώτα του έχει σκοτεινό χρώμα, με τρεις συνήθως κατά μήκος σκοτεινές γραμμές, ένα υπόλευκο στίγμα στην άκρη. Ο ωοθέτης του θηλυκού είναι ευδιάκριτος.



Εικόνα 4 : *Ενήλικο θηλυκό*

Ο δάκος της ελιάς είναι αποκλειστικά μονοφάγο και καρποφάγο είδος. Προσβάλλει τον καρπό της ελιάς και αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους εντομολογικούς εχθρούς στις περιοχές καλλιέργειας της ελιάς. Τα όρια εξάπλωσης του είδους εκτείνονται στα όρια κατανομής της ελιάς. Τα τελευταία χρόνια η καλλιέργεια της ελιάς έχει εξαπλωθεί και σε άλλες περιοχές, όπως στη Βόρεια και Κεντρική Αμερική (Καλιφόρνια, Αριζόνα, Μεξικό και Ελ Σαλβαδόρ), στη Νότια Αμερική (Αργεντινή, Χιλή, Περού, Ουρουγουάη), στην κεντρική Ασία (Κίνα) και την Αυστραλία. Η αντιμετώπιση του δάκου της ελιάς και η προστασία της ελαιοπαραγωγής από τις ζημιές του καταστροφικού αυτού διπτέρου, δεν έπαψε, παρά την πρόοδο που έχει σημειωθεί την τελευταία 30ετία, να συγκεντρώνει το ιδιαίτερο ενδιαφέρον των επιστημόνων, ερευνητικών ιδρυμάτων και των αρμόδιων κρατικών υπηρεσιών και να αποτελεί ένα από τα φλέγοντα εντομολογικά θέματα.

1.2γ ΠΡΟΣΒΟΛΗ ΤΟΥ ΚΑΡΠΟΥ ΑΠΟ ΤΑ ΕΝΤΟΜΑ

Τα θηλυκά άτομα του είδους προσελκύνονται από τον ξενιστή τους όταν οι ελιές είναι κατάλληλες για ωοαπόθεση (Fiestas *et al.* 1972; Girolami *et al.* 1983). Κατάλληλες θεωρούνται οι πιο ώριμες και όσες είναι μεγαλύτερες και πλουσιότερες σε υγρασία. Κάθε θηλυκό τείνει να αποθέσει τα αυγά σε καρπούς που δεν έχουν αποθέσει άλλα άτομα προηγουμένως. Αφού ανοίξει την οπή με τον ωοαποθέτη του, το θηλυκό αποθέτει τα αυγά και πριν φύγει από το φρούτο χρησιμοποιεί τον ωοαποθέτη για να απλώσει στην επιφάνεια του καρπού το χυμό που εκλύεται. Αυτό αποτρέπει άλλα θηλυκά από το να αφήσουν στον ίδιο καρπό τα αυγά τους.

Η ζημιά που κάνει ο δάκος στην παραγωγή μπορεί να συνοψισθεί στα εξής: α) πτώση του καρπού πριν την περίοδο της συγκομιδής, β) μείωση απόδοσης λόγω της κατανάλωσης του εσωτερικού του καρπού από τις προνύμφες που τρέφονται από αυτό, γ) μείωση της ποιότητας του ελαιολάδου, λόγω αυξημένης οξύτητας, η οποία προκύπτει επειδή οι οπές που ανοίγει ο ωοαποθέτης λειτουργούν ως σημεία εισόδου για παθογόνους μύκητες, και δ) οι οπές αυτές οδηγούν στην άμεση απόρριψη από την αγορά των επιτραπέζιων βρώσιμων ελιών. Το μέγεθος της βλάβης έχει υπολογιστεί με διάφορους τρόπους και σε διάφορες περιοχές. Για παράδειγμα στη Σαρδηνία της Ιταλίας, τη χρονική περίοδο 1974-76 χάθηκε το 19% της παραγωγής (Proto 1979). Στην Ελλάδα, οι απώλειες μπορούν να φτάσουν και το 30-40% της παραγωγής, η συνδυασμένη δράση των εντομοκτόνων όμως τις κρατά στο επίπεδο του 5% (Economidou 1979). Από την άλλη όμως, η χρήση των εντομοκτόνων έχει τις γνωστές αρνητικές συνέπειες στην ποιότητα του προϊόντος, αλλά και το περιβάλλον.

1.2δ ΕΛΕΓΧΟΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ

Για την καταπολέμηση του εντόμου χρησιμοποιείται σήμερα η συνδυασμένη δράση πολλών διαφορετικών μεθόδων, φιλικών ή μη προς το περιβάλλον. Δυστυχώς η βάση της καταπολέμησης παραμένει και σήμερα η χρήση εντομοκτόνων. Θα πρέπει να τονιστεί ότι η σύγχρονη τάση για την αντιμετώπιση των επιβλαβών εντόμων είναι η ολοκληρωμένη διαχείριση (IPM ή integrated pest management), η οποία είναι μια στρατηγική που συνδυάζει διάφορες πρακτικές και προσπαθεί να βελτιστοποιήσει τα πλεονεκτήματα κάθε μιας από αυτές, ενώ παράλληλα ελαχιστοποιεί τα μειονεκτήματά τους. Για να έχει επιτυχία, θεωρείται δεδομένο ότι θα υπάρχει μια

μικρής κλίμακας ζημιά στην καλλιέργεια, η οποία και θεωρείται αποδεκτή. Δίδεται έμφαση σε φυσικούς περιοριστικούς παράγοντες και καλλιεργητικές πρακτικές. Αν αυτές οι πρακτικές αποτύχουν να κρατήσουν τον πληθυσμό του εντόμου κάτω από το προβλεπόμενο όριο, επιπρόσθετες μέθοδοι ελέγχου χρησιμοποιούνται, με τέτοιο τρόπο ώστε να επιβαρύνουν όσο το δυνατό λιγότερο το περιβάλλον. Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα, όπως συμβαίνει και σε άλλα είδη εντόμων καθιστά τη συνεχή χρήση των εντομοκτόνων προβληματική. Ήδη έχουν ανιχνευτεί μεταλλάξεις που σχετίζονται με την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο δάκο της ελιάς (Vontas *et al.* 2001, 2002, Stasinakis *et al.* 2001). Οι φιλικές προς το περιβάλλον μέθοδοι που έχουν μέχρι τώρα χρησιμοποιηθεί δεν έδωσαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα (π.χ. SIT) (Economopoulos *et al.* 1977a). Αυτό οφείλεται, μεταξύ άλλων, στις σχετικά περιορισμένες γνώσεις που υπάρχουν μέχρι σήμερα για τη βιολογία-οικολογία του εντόμου, τη γενετική του και τη γενετική δομή των φυσικών πληθυσμών του.

1.2ε ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ

Ο καρύοτυπος του εντόμου αποτελείται από έξι ζεύγη χρωμοσωμάτων, ένα φυλετικό, με το αρσενικό να είναι το ετερογαμετικό φύλο (Mavragani-Tsipidou *et al.* 1992, Krimbas 1963) και πέντε αυτοσωμικά. Το Y είναι πολύ μικρό, ενώ το X είναι μικρότερο από όλα τα αυτοσωματικά χρωμοσώματα. Έχει βρεθεί ότι το Y και το μεγαλύτερο μέρος του X είναι υψηλά ετεροχρωματινικές περιοχές (Mavragani-Tsipidou *et al.* 1992). Τα χρωμοσώματά του πολυταινίζονται, εκτός των φυλετικών (γεγονός που δείχνει την ετεροχρωματινική τους φύση) και έχουν απομονωθεί από τους σιελογόνους αδένες, το λιπαρό σώμα και τα μαλπιγιανά σωληνάκια προνυμφών του είδους (Mavragani-Tsipidou *et al.*, 1992, Zambetaki *et al.* 1995, Krimbas 1963), χωρίς να έχει βρεθεί τυπικό χρωμόκεντρο σε καμία περίπτωση. Σε μελέτες που έχουν γίνει σε άτομα εργαστηριακών και φυσικών πληθυσμών, δεν έχουν βρεθεί χρωμοσωματικές αναδιατάξεις (Mavragani-Tsipidou 2002).

1.2στ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΚΤΡΟΦΗΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ

Η διαδικασία εκτροφής του εντόμου στο εργαστήριο έχει ως εξής: Τα ενήλικα διατηρούνται σε κλωβούς από σκελετό αλουμινίου, πλαστικό και ανοξείδωτο δίχτυ, διαστάσεων 40x33x100 cm. Ο αριθμός των ενηλίκων στο κλωβό δεν ξεπερνά τα 2.000 άτομα. Τα ενήλικα παραμένουν σε ειδικούς θαλάμους με σταθερή θερμοκρασία $25\pm 0.5^\circ$ C, σχετική υγρασία $65\pm 5\%$ και φωτοπερίοδο 14:10 LD. Στα ενήλικα προσφέρονται νερό και στερεή τροφή με την ακόλουθη σύσταση: ενζυμικά υδρολυμένη πρωτεΐνη 100 gr, άχνη ζάχαρη 400 gr, ξηρός κρόκος αυγού 30 gr και στρεπτομυκίνη 250 mg (Tsitsipis and Kontos 1983). Πέντε περίπου μέρες μετά την έξοδο των ενηλίκων τοποθετείται το υπόστρωμα ωτοκίας. Στην πάνω πλευρά του κλωβού (από πλεξιγκλάς) έχουν προσαρμοστεί 4 κώνοι ωοαπόθεσης. Οι κώνοι ωοαπόθεσης αποτελούνται από λεπτό τούλι, το οποίο έχει εμποτιστεί σε σερεζίνη, η οποία θερμαίνεται μέχρι να γίνει υγρή στους $70-90^\circ$ C. Το ενήλικο θηλυκό δημιουργεί τρύπα με τον ωοθέτη στο κώνο σερεζίνης και γεννάει το αυγό του. Η κατάλληλη υγρασία στο εσωτερικό τμήμα του κώνου διατηρείται με υγρούς σπόγγους. Η συλλογή των αυγών γίνεται ανά 24 ώρες και πραγματοποιείται με διαβροχή του εσωτερικού τμήματος του κώνου, ο οποίος συνδέεται με κατάλληλο σύστημα σωληνώσεων που καταλήγει σε κοινό σημείο εξόδου στο οποίο προσαρμόζεται πλαστικό δοχείο όπου καταλήγουν τα αυγά. Τα αυγά μετά τη συλλογή τους τοποθετούνται πάνω σε λευκό διηθητικό χαρτί εμβαπτισμένο σε διάλυμα προπιονικού οξέος 0.3%, μέσα σε τριβλίο στους $25\pm 0.5^\circ$ C (Manoukas and Mazomenos 1977). Η διαδικασία αυτή διευκολύνει την εκκολαπτικότητα των αυγών και κυρίως την προστασία τους από μολύνσεις. Η επώαση διαρκεί 48 ώρες.

Στη συνέχεια τα αυγά τοποθετούνται σε θεραπευτικό υπόστρωμα, όπου εκκολάπτονται, γίνονται προνύμφες τρώνε για περίπου 9 ημέρες και στη συνέχεια νυμφώνονται. Στη φάση αυτή και αφού έχουν νυμφωθεί τοποθετούνται σε κλουβί αναπαραγωγής μαζί με την κατάλληλη τροφή και νερό, μέχρι να βγουν τα ενήλικα έντομα (10 περίπου μέρες μετά τη περάτωση της νύμφωσης) τα οποία θα δώσουν νέα αυγά ώστε να συνεχιστεί η διαδικασία εκτροφής εντόμων του δάκου όπως προαναφέρθηκε.

Η σύσταση του προνυμφικού υποστρώματος που χρησιμοποιείται σήμερα και εφαρμόζεται με επιτυχία για πολλά χρόνια, με πολύ καλές αποδόσεις (Tzanakakis et al. 1970, Manoukas 1975), παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2).

Συστατικά	Ποσότητα
Νερό	110 ml
Μαγιά μύρας	15 gr
Σόγια υδρολυμένη	6 gr
Σορβικό κάλιο	0.1 gr
Νιπαγίνη (p-Hydroxy-benzoic acid methyl ester)	0.4 ml
Ελαιόλαδο	4 ml
Tween-80 (Polyoxyethylene-sorbitan-monooleate)	1.5 ml
Ζάχαρη	4 gr
Κυτταρίνη	55 gr
Υδροχλωρικό οξύ (HCL) 2N	6 ml

Πίνακας 2. Η σύνθεση του προνυμφικού υποστρώματος, που χρησιμοποιείται σήμερα (Tzanakakis et al. 1970, Manoukas 1975).

Σε αυτό το προνυμφικό υπόστρωμα τα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη της προνύμφης αποτελούν η μαγιά μύρας, η υδρολυμένη σόγια, η ζάχαρη και το ελαιόλαδο, για τη διάλυση του οποίου στο νερό προστίθεται Tween-80 (Polyoxyethylene-sorbitan-monooleate). Ως αντιμικροβιακοί παράγοντες χρησιμοποιούνται η νιπαγίνη (μέθυλο-p-υδροξυβενζοϊκό) και το σορβικό κάλιο, ενώ για τη ρύθμιση του pH σε κατάλληλα επίπεδα (περίπου 4) προστίθεται υδροχλωρικό οξύ (HCL). Για την ενοποίηση των προαναφερθέντων συστατικών και την δημιουργία κατάλληλης υφής του μείγματος, χρησιμοποιείται νερό και κυτταρίνη χρωματογραφίας.

1.2ζ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ

Οι συνθήκες που επικρατούν στο εργαστήριο κατά την εκτροφή ενός εντόμου, συμπεριλαμβανομένου των τροφών που δίδονται στο έντομο, οι οποίες είναι κατ' ανάγκη διαφορετικές από τις συνθήκες του αγρού έχουν σημαντικές επιπτώσεις στο έντομο. Στη φύση ο πληθυσμός ενός εντόμου βρίσκεται σε δυναμική ισορροπία με το περιβάλλον του, δηλαδή την τροφή του, τους βιολογικούς (φυσικούς) εχθρούς του (παράσιτα, αρπακτικά), τις κλιματολογικές συνθήκες, το χρόνο και τη μετανάστευση (ανταλλαγή γενετικού υλικού με άλλους πληθυσμούς του είδους). Οι παράγοντες

αυτοί επηρεάζουν ζωτικά το έντομο, δηλαδή τη φυσιολογία, τη μορφολογία, τη συμπεριφορά, τη γενετική του και καθορίζουν την εξέλιξη του.

Στο εργαστήριο όμως υπάρχει μια σχετική στατική ισορροπία στο είδος, η οποία απορρέει από τη σταθερότητα της επιδράσεως των εξωτερικών παραγόντων επί ενός πληθυσμού με περιορισμένο γενετικό υλικό. Ο εκτρεφόμενος στο εργαστήριο πληθυσμός είναι απομονωμένος από άλλους πληθυσμούς του είδους, ή στην καλύτερη περίπτωση, έχει περιορισμένη ανταλλαγή γενετικού υλικού με την περιοδική εισαγωγή φυσικών πληθυσμών στο εργαστήριο (Τσιτσιπής 1981).

Για τον περιορισμό μερικών γενετικών προβλημάτων και προβλημάτων ποιότητας των εντόμων, οι γενετιστές συνιστούν ορισμένες αρχές, που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την εγκατάσταση εκτροφής στο εργαστήριο και έχουν σχέση με το μέγεθος και το είδος του φυσικού πληθυσμού, ο οποίος θα αποτελέσει τον ιδρυτικό πληθυσμό της αποικίας (Mackauer 1972, 1976, Wood et al. 1980).

Τα προβλήματα που δημιουργούνται από την εργαστηριακή εκτροφή και οι τρόποι με τους οποίους μπορούν να επισημανθούν διαφορές σε βιολογικές παραμέτρους, έχουν αποτελέσει αντικείμενο μελέτης, ιδιαίτερα σε έντομα η ποιότητα των οποίων είναι σημαντική κατά την εφαρμογή μεθόδων καταπολεμήσεως, όπως η τεχνική του στείρου εντόμου (Sterile Insect Technique, SIT). Η τεχνική του στείρου εντόμου περιλαμβάνει ένα συντονισμένο πρόγραμμα μαζικής εκτροφής, στείρωσης και εξαπόλυσης στον αγρό στείρων εντόμων, εάν είναι δυνατό μόνο αρσενικών σε πολλαπλάσιους αριθμούς των φυσικών πληθυσμών με σκοπό να υπερισχύσουν συζευκτικά και να μεταφέρουν το στείρο σπέρμα στα θηλυκά του φυσικού πληθυσμού (Boller 1972, Boller and Chambers 1977a, Huettel 1977, Chambers 1977, 1980). Έχει επινοηθεί ολόκληρη σειρά από μεθοδολογίες ελέγχου διαφόρων παραμέτρων ποιότητας σε Δίπτερα της οικογένειας Tephritidae, όπως *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (μύγα Μεσογείου), *Anastrepha suspense* (Loew), *Anastrepha ludens* (Loew) και πολλά έντομα του γένους *Bactrocera*, τα οποία εκτρέφονται μαζικά για την εφαρμογή της μεθόδου του στείρου εντόμου (Boller and Chambers 1977b). Η επιτυχία ενός προγράμματος εξαπολύσεων στείρων εντόμων εξαρτάται από την ποιότητα των εντόμων, την ικανότητα τους να επιβιώνουν και να διασπείρονται στο φυσικό περιβάλλον και την ικανότητα τους να συζεύγνυνται ανταγωνιστικά με τους φυσικούς πληθυσμούς. Στους τρόπους ελέγχου της ποιότητας των εντόμων τεχνητής εκτροφής περιλαμβάνονται δοκιμές που διεξάγονται σε κάθε

γενιά των εντόμων, όπως τεστ βάρους νυμφών, τεστ εξόδου ενηλίκων και πτητικής ικανότητας, τεστ διάρκειας επιβίωσης σε συνθήκες στρες, τεστ αναλογίας φύλου και χρόνου εξόδου, επίσης περιλαμβάνονται τεστ που διεξάγονται περιοδικά, όπως το τεστ συζευκτικής συμβατότητας με το φυσικό πληθυσμό και το τεστ απελευθέρωσης–επανασύλληψης για τη μελέτη της διασποράς και της επιβίωσης (USDA, FAO, IAEA 1998).

Τα έντομα τεχνητής εκτροφής του δάκου της ελιάς, δηλαδή έντομα περιορισμένου γενετικού δυναμικού, αναπτύσσονται σε τεχνητές τροφές υπό σταθερές σχετικά συνθήκες θερμοκρασίας, σχετικής υγρασίας και φωτισμού, διαφέρουν από τα αντίστοιχα έντομα της φύσεως που προέρχονται από ελαιόκαρπο, σε αρκετές παραμέτρους φυσιολογίας και συμπεριφοράς, όπως π.χ. την περιεκτικότητα σε λιπίδια (Vakirtzi-Lemonias *et al.* 1969), τη σεξουαλική ανταγωνιστικότητα (Economopoulos 1972, 1977b), την ικανότητα διακρίσεως αποχρώσεων διαφόρων χρωμάτων (Prokopy *et al.* 1975a, 1975b), την ικανότητα πτήσεως (Remund *et al.* 1977), την παραγωγή φερομονών (Haniotakis 1979), τη συχνότητα εμφανίσεως ορισμένων γονιδίων (Bush and Kitto 1979). Οι βιοχημικές και βιολογικές αλλαγές που επιφέρονται στον φυσικό πληθυσμό δάκου της ελιάς που εισάγεται στο εργαστήριο και συντηρείται σε συνθήκες τεχνητής εκτροφής πραγματοποιούνται με γρήγορους ρυθμούς και ολοκληρώνονται μέσα σε τέσσερις με πέντε γενεές. Κατά τη διάρκεια αυτών των πρώτων γενεών το μέγεθος της αποικίας μειώνεται δραστικά, ως αποτέλεσμα της ελαττωμένης ωοαπόθεσης στα τεχνητά υποστρώματα ωοτοκίας και της υψηλής προνυμφικής θνησιμότητας, η οποία οφείλεται στην μειωμένη προσαρμογή του εντόμου στο τεχνητό προνυμφικό υπόστρωμα και στην προσθήκη συντηρητικών και αντιβιοτικών στη τροφή των προνυμφών και των ενηλίκων αντίστοιχα. Οι βιολογικές διαφορές που παρατηρούνται ανάμεσα σε εργαστηριακούς και φυσικούς πληθυσμούς είναι προφανώς αποτέλεσμα βαθύτερων γενετικών αλλαγών που συντελούνται κατά τη διαδικασία προσαρμογής των φυσικών πληθυσμών στο νέο περιβάλλον (Zouros *et al.* 1982).

Ο αντικειμενικός σκοπός της έρευνας που σχετίζεται με την εκτροφή εντόμων σήμερα διεθνώς έχει επικεντρωθεί και στη βελτίωση της ποιότητας των εντόμων που παράγονται υπό εργαστηριακές συνθήκες. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό, σε ορισμένες περιπτώσεις καθοριστικό, όταν τα εκτρεφόμενα έντομα πρόκειται να διασπαρούν στη φύση σε προγράμματα καταπολέμησης. Δηλαδή αναμένεται τα

έντομα αυτά να εκδηλώσουν στο φυσικό περιβάλλον την τυπική συμπεριφορά του είδους.

2. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ («ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΑ» ΒΑΚΤΗΡΙΑ)

Πολλά είδη εντόμων έχουν συμβιωτικούς μικροοργανισμούς, συνήθως μύκητες ή βακτήρια, χρήσιμους ή απαραίτητους για την επιβίωση τους. Σε ορισμένα είδη οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι εξωκυτταρικοί και βρίσκονται συνήθως στον πεπτικό σωλήνα. Σε άλλα είδη οι συμβιωτικοί μικροοργανισμοί είναι ενδοκυτταρικοί και βρίσκονται σε ειδικά κύτταρα, που ονομάζονται μυκητοκύτταρα. Γενικά, οι συμβιωτές αυτοί έχουν ένζυμα για την πέψη ορισμένων συστατικών της τροφής του εντόμου, που το έντομο δε τα έχει, ή δίνουν στο έντομο ορισμένες βιταμίνες, αμινοξέα ή άλλες θρεπτικές ουσίες που το έντομο δε μπορεί να συνθέσει, ούτε να πάρει από την τροφή του. Τις ουσίες αυτές, που του παρέχουν οι συμβιωτικοί μικροοργανισμοί, το έντομο τις παίρνει είτε από τον περιβάλλοντα των συμβιωτών χώρο, είτε πέπτοντας τα κύτταρα των συμβιωτών (Τζανακάκης 1995).

Συμβιωτικές σχέσεις έχουν περιγραφεί σε πολλά είδη της οικογένειας Tephritidae. Ο Stammer (1929) εξέτασε 37 είδη της οικογένειας Tephritidae και κατέληξε ότι όλα σχετίζονται με συμβιωτικά βακτήρια. Η Hellmuth (1956) επέκτεινε τις έρευνες σε 43 είδη καταλήγοντας στο ίδιο συμπέρασμα, ενώ διαπίστωσε σημαντικό βαθμό συν-εξέλιξης εντόμων και συμβιωτικών βακτηρίων, ιδιαίτερα στα είδη του γένους *Dacus* της υποοικογένειας Dacinae (Tsiropoulos 1992).

Πρώτος ο Petri (1910) περιέγραψε τη συμβιωτική σχέση του δάκου της ελιάς με το βακτήριο *Bacillus (Pseudomonas) savastanoi*. Από τότε οι περισσότερες μελέτες συνεχίζουν να αναφέρονται στα βακτήρια που σχετίζονται με τα δίπτερα των φρούτων, ως συμβιωτικοί οργανισμοί (Manousis and Ellar 1988). Μελετώντας τα βακτήρια που βρίσκονται στον πεπτικό σωλήνα του δάκου, ο Petri περιέγραψε και ένα άλλο βακτήριο το *Ascobacterium luteum*. Στην εργασία αυτή δηλώνεται ότι τα βακτήρια επαλείφονται στην επιφάνεια του αυγού από αδένες στο ορθό του εντόμου, που εκβάλουν στον οαγωγό. Στην συνέχεια τα βακτήρια εισέρχονται στο αυγό μέσω της μικροπύλης. Στην προνύμφη τα βακτήρια αναπτύσσουν αποικίες σε τέσσερις θυλάκους στο μπροστινό τμήμα του μέσου εντέρου και από εκεί μεταφέρονται στο ενήλικο όπου ενσωματώνονται στον οισοφαγικό θύλακο (oesophageal diverticulum) που αναπτύσσεται στη νύμφη των

πέντε ημερών (Mazzini and Vita 1981). Το *P. savastanoi* είναι ο συχνότερα απαντώμενος μικροοργανισμός της μικροχλωρίδας των φύλλων της ελιάς (Ercolani 1978).

Σύμφωνα με τους Hagen *et al.* (1963), η προνύμφη του δάκου της ελιάς έχει την ανάγκη παρουσίας εξωκυτταρικών συμβιωτικών βακτηρίων στον πεπτικό της σωλήνα για να μπορέσει να πέψει τις πρωτεΐνες του μεσοκαρπίου της ελιάς. Σύμφωνα με τους Narasaki and Katakura (1954), το βακτήριο *P. savastanoi* υδρολύει την πρωτεΐνη του φρούτου για να την κάνει προσιτή στις προνύμφες και να τις εφοδιάσει με τα απαραίτητα αμινοξέα, μεθειονίνη και θρεονίνη στα οποία ο ελαιόκαρπος είναι ελλιπής.

Ο Hagen (1966) αναφέρει ότι η προσθήκη στρεπτομυκίνης, ως αντιβιοτικό, στην δίαιτα των ενηλίκων θανατώνει τα συμβιωτικά βακτήρια *P. savastanoi*. Σε αντίθεση με τους άλλους ερευνητές οι Yamnias *et al.* (1970) σημειώνουν την πλήρη αδυναμία ανίχνευσης τόσο του *P. savastanoi* όσο και του *A. luteum* στα αυγά και τον οισοφαγικό θύλακο φυσικών πληθυσμών του δάκου της ελιάς.

Οι Luethy *et al.* (1983) παρουσιάζουν στοιχεία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, οισοφαγικών θυλάκων του δάκου της ελιάς όπου εμφανίζονται συμβιωτικά βακτήρια παρόλο που η αναγνώριση τους δεν έγινε δυνατή. Ο Tsiropoulos (1983) μετά από εξέταση οισοφαγικών θυλάκων και ωοθετών από πληθυσμούς εργαστηριακών και φυσικών εντόμων, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι υπάρχει ένα αρκετά πιο πολύπλοκο σύστημα απ' ό,τι αρχικά πιστευότο. Η ύπαρξη εξωκυτταρικών συμβιωτικών βακτηρίων στον πεπτικό σωλήνα της προνύμφης είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη της σε ανώριμους (πράσινους) ελαιοκάρπους. Αυτό αποδείχθηκε με πειράματα κατά τα οποία προνύμφες που προήλθαν από θηλυκά τα οποία είχαν λάβει αντιβιοτικό, ή τοποθετήθηκαν σε καρπούς που υποβλήθηκαν σε αντιβιοτικά δεν κατόρθωσαν να αναπτυχθούν (Hagen 1966, Tzanakakis and Stavrinidis 1973). Στην περίπτωση κατά την οποία οι προσφερόμενοι καρποί έχουν περάσει σε στάδιο ωρίμανσης ή στην περίπτωση που συλλέχθηκαν ανώριμοι και τοποθετήθηκαν για μεγάλο χρονικό διάστημα στο ψυγείο πριν να χρησιμοποιηθούν ως τροφή για τις προνύμφες, η ύπαρξη συμβιωτικών βακτηρίων δεν είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των προνυμφών (Fytizas and Tzanakakis 1966a, b). Τα συμβιωτικά βακτήρια φαίνεται ότι βοηθούν την προνύμφη να αξιοποιεί καλύτερα τις πρωτεΐνες του μεσοκαρπίου της ελιάς, καθώς προνύμφες προερχόμενες από έντομα που τρέφονται με τροφή που περιέχει στρεπτομυκίνη δεν κατορθώνουν να αναπτυχθούν σε τεχνητή τροφή, εκτός εάν περιλαμβάνονται σε αυτή υδρολυμένες πρωτεΐνες (Hagen *et al.* 1963, Hagen 1966). Πρέπει να σημειωθεί ότι

ώριμοι καρποί ή καρποί που αποθηκεύονται για μεγάλες περιόδους στο ψυγείο περιέχουν περισσότερα ελεύθερα αμινοξέα, τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά, απ' ό,τι οι ανώριμοι καρποί (Savva-Dimoroulou and Fytizas 1967).

Η ύπαρξη βακτηρίων στον οισοφαγικό θύλακο (Ratner and Stoffolano 1982, 1984) και στον πεπτικό σωλήνα σε διάφορα έντομα της οικογένειας Tephritidae, υποστηρίζει τη σπουδαιότητα της ύπαρξης των συμβιωτικών βακτηρίων για τα έντομα της οικογένειας αυτής, προσφέροντας ουσιώδη θρεπτικά συστατικά είτε αποικοδομώντας διάφορες πρωτεΐνες του καρπού, είτε βιοσυνθέτοντας χημικές ουσίες απαραίτητες στη θρέψη και βιοχημεία του εντόμου (Boller and Prokopy 1976, Howard *et al.* 1985, Howard 1987). Τα συμβιωτικά βακτήρια προσφέρουν προστασία από πιθανά παθογόνα και χρησιμοποιούνται ως τροφή και ως αποτοξινωτικοί παράγοντες αποικοδομώντας βλαβερές ουσίες, όπως τους οργανοφωσφορικούς εστέρες (Τζανακάκης 1980, Rossiter *et al.* 1982, Luethy *et al.* 1983). Η μεταβολική αυτή ικανότητα των βακτηρίων ίσως βοηθά τον ξενιστή τους στην αποικοδόμηση φυσικών εστέρων εφοδιάζοντας τον με χρήσιμα θρεπτικά στοιχεία (Boush and Matsumura 1967, Miyazaki *et al.* 1968, Τζανακάκης 1980, Girolami 1982).

3.ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Αντικείμενο της παρούσας μελέτης είναι ο εντοπισμός τυχόν διαφορών στη μικροχλωρίδα σε στελέχη του δάκου διαφορετικών προελεύσεων (δηλαδή διαφορετικών στελεχών του εντόμου), με στόχο τον εντοπισμό τυχόν δραστικών αλλαγών που επηρεάζουν τη βιολογία του εντόμου, στα πλαίσια βελτίωσης και απλοποίησης της τεχνητής εκτροφής. Μελετήθηκαν εργαστηριακά στελέχη καθώς και άγρια στελέχη προερχόμενα από διαφορετικούς οικοτόπους, ποικιλίες ελαιοκάρπου και εποχές μέσα στο χρόνο. Τα παραπάνω στελέχη μελετήθηκαν για να βρεθούν τυχόν διαφορές ανάμεσα σε εργαστηριακά και άγρια έντομα, αλλά και για το αν τα άγρια στελέχη διαφέρουν μεταξύ τους, ανάλογα με την περιοχή-μικροκλίμα που ζουν, την εποχή (γενεά) του χρόνου αλλά και το είδος του καρπού από το οποίο τρέφονται.

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

A) ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ: τα εργαστηριακά στελέχη (Lab) που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από την αποικία που διατηρείται για περίπου επτά χρόνια στο Εργαστήριο Εφαρμοσμένης Εντομολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, και η οποία προέρχεται από την αποικία του Εργαστηρίου Εντομολογίας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» η οποία δημιουργήθηκε πριν από περίπου 42 χρόνια, με την εγκατάσταση εντόμων από φυσικούς πληθυσμούς της Αττικής στο εργαστήριο. Έγινε επίσης προσπάθεια προσδιορισμού της μικροχλωρίδας του στελέχους του δάκου EGFP. Πρόκειται για ένα γενετικά τροποποιημένο στέλεχος το οποίο προέκυψε από την παραπάνω αποικία με την εισαγωγή σε αυτό του γονιδίου GFP που προέρχεται από μια μέδουσα του Ειρηνικού και έχει την ιδιότητα να φθορίζει (πράσινο φθορίζουσα πρωτεΐνη) (Koukidou *et al.* 2006).

B) ΑΓΡΙΑ ΣΤΕΛΕΧΗ: τα άγρια στελέχη (W) που μελετήθηκαν προέρχονταν από προσβεβλημένους καρπούς των οποίων η συλλογή έγινε από διαφορετικές ποικιλίες ελαιοδέντρων, διαφορετικές περιοχές και διαφορετικές εποχές του έτους. Οι καρποί μεταφέρονταν στο εργαστήριο και τοποθετούνταν πάνω σε πλέγμα με διάκενο τέτοιο ώστε να επιτρέπει το πέρασμα της προνύμφης. Κάτω από το πλέγμα υπήρχε δίσκος με πριονίδι μέσα στον οποίο έπεφταν οι προνύμφες μόλις εξέρχονταν από τους καρπούς και ήταν έτοιμες να νυμφωθούν. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι συνθήκες του χώρου μέσα στον οποίο γινόταν η νύμφωση των άγριων στελεχών ήταν όσο το δυνατόν πιο κοντά στις ανάλογες συνθήκες του περιβάλλοντος την κάθε χρονική περίοδο, δηλαδή δεν υπήρχε κλιματισμός ή τεχνητός φωτισμός. Οι ελαιώνες από τους οποίους γίνονταν οι συλλογές ήταν ή βιολογικοί ή εγκαταλελειμμένοι (δηλ. δε γινόταν χρήση εντομοκτόνων σκευασμάτων). Οι συλλογές γινόντουσαν κάθε 15 ημέρες και κάθε φορά συλλεγόntonταν ποσότητες προσβεβλημένων ελαιοκάρπων αρκετές για να δώσουν τουλάχιστον 30 νύμφες από κάθε διαφορετικό στέλεχος.

Τα διαφορετικά στελέχη άγριων εντόμων που μελετήθηκαν είναι :

α) Άγρια στελέχη προερχόμενα από διαφορετικές περιοχές. Από την περιοχή Βουτών και Αγίου Μύρωνα του Νομού Ηρακλείου και από τον Νομό Χανίων (15^ο χμ Χανίων- Ηρακλείου). Η επιλογή των περιοχών έγινε με βάση τόσο την χιλιομετρική τους απόσταση (περίπου 150χμ) αλλά και με βάση τις κλιματικές διαφορές που

παρουσιάζουν, κυρίως όσον αφορά στην υγρασία, με την περιοχή των Χανίων να εμφανίζεται με μεγαλύτερη υγρασία κατά την διάρκεια του έτους. Και από τις δύο περιοχές οι ελαιόκαρποι ήταν ποικιλίας Κορωνέικης.

β) Άγρια στελέχη προερχόμενα από καρπούς της ίδιας ποικιλίας (Κορωνέικης), της ίδιας περιοχής (Άγιος Μύρωνας και Βούτες Ηρακλείου), από τα ίδια ελαιόδεντρα σε διαφορετικές χρονικές περιόδους μέσα στο χρόνο. Οι μήνες που έγιναν οι συλλογές ήταν οι Σεπτέμβριος και Δεκέμβριος 2006 και επιλέχθηκαν λαμβάνοντας υπ' όψιν τον διαφορετικό βαθμό ωρίμανσης του ελαιοκάρπου που παρατηρείται στις περιόδους αυτές.

γ) Άγρια στελέχη προερχόμενα από προσβεβλημένους καρπούς διαφορετικών ποικιλιών ελιάς. Οι ποικιλίες που μελετήθηκαν είναι η Κορωνέικη και η Χονδρολιά (Θρουμπολιά), ποικιλίες με διαφορετικό σχήμα καρπού, μέγεθος, βάρος, σχέση σάρκας καρπού- πυρήνα και διαφορετική βιοχημική σύσταση (Ποντίκης 1992).

Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 3) φαίνονται τα στελέχη που μελετήθηκαν με το διακριτικό σύμβολο που θα χρησιμοποιείται στην πορεία της μελέτης.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΣΥΜΒΟΛΟ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΤΟΜΑ ¹	LAB
EGFP ²	GFP
ΑΓΡΙΑ ΚΟΡ. ΗΡΑΚΛ. ΣΕΠΤ. ³	WHS
ΑΓΡΙΑ ΚΟΡ. ΗΡΑΚΛ. ΔΕΚΕΜ. ⁴	WHD
ΑΓΡΙΑ ΧΟΝΔ. ΗΡΑΚΛ. ΣΕΠΤ. ³	WXS
ΑΓΡΙΑ ΧΟΝΔ. ΗΡΑΚΛ. ΔΕΚΕΜ. ⁴	WXD
ΑΓΡΙΑ ΚΟΡ. ΧΑΝΙΑ ΣΕΠΤ. ⁵	WCS
ΑΓΡΙΑ ΚΟΡ. ΧΑΝΙΑ ΔΕΚΕΜ. ⁶	WCD

Πίνακας 3. Στελέχη του εντόμου που μελετήθηκαν.

- 1) Εργαστηριακά άτομα, 2) διαγονιδιακό στέλεχος, 3) άγρια έντομα τα οποία τα συλλέξαμε από προσβεβλημένους καρπούς ποικιλίας Χονδρολιάς ή Κορωέικης, της περιοχής των Βουτών και Αγίου Μύρωνα Ηρακλείου, το μήνα Σεπτέμβριο, 4) σαν 3, το Δεκέμβριο
- 5) άγρια έντομα τα οποία τα συλλέξαμε από προσβεβλημένους καρπούς ποικιλίας Κορωνέικης της περιοχής των Χανίων, το μήνα Σεπτέμβριο, 6) σαν 5, το Δεκέμβριο

4.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Η πειραματική διαδικασία απομόνωσης των βακτηρίων ξεκινάει με την παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος ανάπτυξης των βακτηρίων το οποίο στην

συγκεκριμένη μελέτη είναι το στερεό υπόστρωμα L.B. (Luria- Broth). Τα συστατικά για την παρασκευή του είναι τα παρακάτω :

16gr peptone
5gr yeast
5gr NaCl
15gr Agar
+SDW* μέχρι τελικό όγκο 1l
(για 1 λίτρο υποστρώματος)
(+2% D-Glucose)

*νερό το οποίο είναι απιονισμένο και αποστειρωμένο

Αξίζει στο σημείο αυτό να σημειωθεί ότι η παραπάνω συνταγή για το θρεπτικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε στις πρωτογενείς καλλιέργειες των βακτηρίων. Οι επανακαλλιέργειες (streaking) έγιναν πάλι σε θρεπτικό L.B. αλλά λιγότερο θρεπτικά πλούσιο. Στην παραπάνω συνταγή χρησιμοποιήθηκε περισσότερη πεπτόνη και γλυκόζη, με σκοπό να αναπτυχθούν όσο το δυνατόν περισσότεροι μικροοργανισμοί. Ταυτόχρονα όμως λόγω του πλούσιου θρεπτικού που χρησιμοποιήθηκε, δημιουργήθηκαν προβλήματα επιμόλυνσης του θρεπτικού από εξωτερικούς παράγοντες. Κάθε σειρά δοκιμών στην οποία παρατηρήθηκε επιμόλυνση, δε χρησιμοποιήθηκε στην πορεία των πειραμάτων. Οι επιμολύνσεις στην αρχή των πειραμάτων εμφανίστηκαν πολύ έντονες. Υπήρξαν μολύνσεις κυρίως από τη μόλυνση των τρυβλίων με το θρεπτικό από υφομύκητες που πιθανόν είχαν αναπτυχθεί στον περιβάλλοντα χώρο του εργαστηρίου ή από μολύνσεις λόγω μη ολοκληρωμένης και σωστής αποστείρωσης των νυμφών ή των οργάνων.

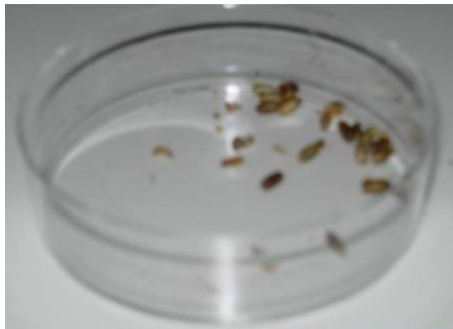
Η διαδικασία παρασκευής του θρεπτικού έχει ως εξής: τοποθετείται το απεσταγμένο νερό σε γυάλινο μπουκάλι πάνω σε συσκευή ανάδευσης (Stirrer), και κατόπιν αναμιγνύεται μέσα σ' αυτό το NaCl, η πεπτόνη και μετά η μαγιά. Αφού αναδευτεί και λίγο πριν την αποστείρωση σε κλίβανο στους 120°C για 20 λεπτά, ρίχνεται μέσα και το άγαρ. Αφού αποστειρωθεί το υπόστρωμα, τοποθετείται σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri και αφού αφεθεί να στερεοποιηθεί, διατηρείται σε θερμοκρασία 3-4°C. Τα τρυβλία μετά τη στερεοποίησή τους τοποθετούνται με το καπάκι προς τα κάτω, έτσι ώστε οι όποιοι υδρατμοί να συσσωρεύονται στο καπάκι και όχι πάνω στο θρεπτικό, γεγονός που μπορεί να δημιουργήσει ανάπτυξη ξένων οργανισμών.

Αφού έχουν ετοιμαστεί τα τρυβλία με το θρεπτικό, αρχίζει η διαδικασία απομόνωσης των βακτηρίων από τα στελέχη του εντόμου. Η όλη διαδικασία λαμβάνει χώρα σε αυστηρά αποστειρωμένες συνθήκες, μέσα σε απαγωγό (Laminar Hood), για την αποφυγή επιμολύνσεων. Προηγουμένως έχει γίνει η αποστείρωση όλων των οργάνων και εργαλείων που θα χρησιμοποιηθούν σε κλίβανο στους 120°C για 20 λεπτά, με τη χρήση πάντα ως δείκτη αποστειρωτικής ταινίας η οποία έχει την ιδιότητα να μαυρίζει όταν η αποστείρωση έχει πετύχει.

Η διαδικασία ξεκινάει με την αποστείρωση των εξωτερικών περιβλημάτων των νυμφών (Εικ. 5, 6). Αυτό γίνεται με την εμβάπτισή τους σε 1% διάλυμα sodium hypochloride για δύο λεπτά περίπου. Στη συνέχεια γίνονται τρία ξεπλύματα με αποστειρωμένο νερό. Για την πιστοποίηση της πλήρους αποστείρωσης της εξωτερικής επιφάνειας των νυμφών, νύμφες τοποθετούνταν ολόκληρες σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό, για τη χρησιμοποίησή τους ως μάρτυρας στην όλη διαδικασία του πειράματος (Κωνσταντοπούλου 1997). Αν σε κάποιο από τα τρυβλία του μάρτυρα εμφανιζόταν κάποια αποικία, τότε η όλη σειρά δοκιμών δε χρησιμοποιούνταν στην συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας.

Στη συνέχεια γινόταν η λειοτρίβιση των νυμφών (Εικ. 7) μέσα σε φιαλίδια (erppendorf tubes) με 1ml υγρού θρεπτικού, που πρόκειται για θρεπτικό L.B. χωρίς την προσθήκη άγαρ το οποίο το σταθεροποιεί. Σε κάθε φυαλίδιο γινόταν η λειοτρίβιση δύο (2) αποστειρωμένων νυμφών. Ποσότητα διαλύματος 0,5ml από το κάθε φιαλίδιο τοποθετούνταν στα τρυβλία με το θρεπτικό, απλώνονταν (Εικ. 8, 9) και αφήνονταν σε θερμοκρασία 25°C (Εικ. 10). Γίνονταν πέντε (5) επαναλήψεις για κάθε χειρισμό, δηλαδή τοποθετούνταν διάλυμα σε πέντε (5) τρυβλία για κάθε διαφορετικό στέλεχος. Κάθε χειρισμός στελέχους είχε το δικό του τρυβλίο μάρτυρα. Λίγες ημέρες μετά, αφού παρατηρούσαμε καθημερινά την εξέλιξη των αποικιών που σταδιακά αναπτύσσονταν, γίνονταν επανακαλλιέργεια των διαφορετικών βακτηρίων (που μπορούσαν τουλάχιστον σε πρώτο στάδιο μακροσκοπικά να διακριθούν) που υπήρχαν σε κάθε τρυβλίο. Οι πρωτογενείς καλλιέργειες κρατήθηκαν, παρά την απομόνωση των όποιων αποικιών που παρατηρήθηκαν.

Από τις πρωτογενείς αυτές καλλιέργειες επιλέχθηκαν οι καλύτερες δυνατές (δηλαδή αυτές με την καλύτερη ανάπτυξη βακτηριακών αποικιών και με τις λιγότερες δυνατές μολύνσεις από μύκητες) και έτσι βρέθηκαν τα 8 τρυβλία (από τα 8 διαφορετικά στελέχη) και ξεκίνησε η καταγραφή και η επανακαλλιέργεια (streaking) των διαφορετικών αποικιών που παρατηρήθηκαν μακροσκοπικά (η επανακαλλιέργεια



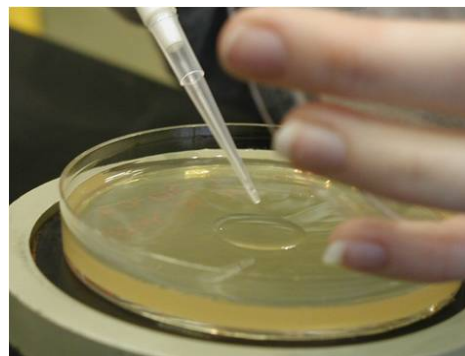
Εικόνα 5. Συλλογή νυμφών



Εικόνα 6. Αποστείρωση νυμφών



Εικόνα 7. Λειοτριβίση νυμφών



Εικόνα 8. Έκχυση διαλύματος στο τρυβλίο



Εικόνα 9. Απλωμα διαλύματος



Εικόνα 10. Διατήρηση τρυβλίων

έγινε σε θρεπτικό L.B. όπως παραπάνω, με τη διαφορά ότι τα 16gr peptone έγιναν 10gr tryptone και δεν περιείχε γλυκόζη, για αποφυγή επιμολύνσεων).

Σε πρώτο στάδιο, όπου γίνεται η εκτίμηση της βακτηριακής ποικιλότητας για την περαιτέρω μελέτη των βακτηριακών στελεχών, γίνεται επιλογή σε μορφολογικό επίπεδο όπου με τη χρήση στερεοσκοπίου είναι δυνατή η καταγραφή των βασικών μορφολογικών χαρακτηριστικών των βακτηριακών αποικιών που αναπτύσσονται. Έτσι βρέθηκαν 34 διαφορετικές αποικίες (διαφορετικές όσον αφορά στα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά, όπως το μέγεθος, το σχήμα, το χρώμα, ο τρόπος απλώματος, η διαμόρφωση στις άκρες και οι διαστάσεις ανάπτυξης της αποικίας) οι οποίες κατανέμονταν στα διαφορετικά στελέχη ως εξής :

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	# ΑΠΟΙΚΙΩΝ
LAB	5
GFP	2
WHS	3
WHD	7
WXS	2
WXD	2
WCS	4
WCD	9

Πίνακας 4. Βακτηριακά στελέχη που βρέθηκαν μακροσκοπικά στα διαφορετικά στελέχη του εντόμου.

Στη συνέχεια έγιναν 3 επανακαλλιέργειες (streaking)(Εικ.11) όλων των αποικιών αυτών από 2 φορές (a και b) έτσι ώστε να υπάρχουν καθαρές και μοναδικές αποικίες. Η επανακαλλιέργεια γίνεται πολύ προσεκτικά με μικρά αποστειρωμένα ακροφύσια (tips). Από τις πρωτογενείς καλλιέργειες (στις οποίες έχουν ήδη μαρκαριστεί οι όποιες διαφορετικές αποικίες) γίνεται η επανακαλλιέργεια της κάθε αποικίας σε ήδη μαρκαρισμένα και ονοματισμένα από πριν τρυβλία. Μετά από 2-3 ημέρες οι μονοκαλλιέργειες έχουν αναπτυχθεί και η διαδικασία συνεχίζεται με την αντίδραση PCR για τον πολλαπλασιασμό του DNA αποικιών.

4.3 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

4.3 a PCR Colony (Polymerase Chain Reaction)

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Αφού χωρίστηκαν οι αποικίες σε 3 σειρές των 20 (τα a και b, παρά το γεγονός ότι πρόκειται για την ίδια αποικία θεωρήθηκαν ως διαφορετικά στελέχη, καθώς επίσης πρέπει να αναφερθεί ότι μερικές αποικίες δεν είχαν δεύτερο στέλεχος, οπότε γι' αυτές υπήρχε μόνο a), η διαδικασία συνεχίστηκε με τις αντιδράσεις PCR για τις τρεις σειρές των αποικιών, PCR COLONY, κατά την οποία αντί για χρήση απευθείας μορίου DNA χρησιμοποιείται διάλυμα που περιέχει σπασμένα βακτηριακά κύτταρα.

Πρόκειται για μια τεχνική η οποία επωφελείται της ευκολίας παραγωγής συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό περιοχών DNA για τις οποίες έχουμε γνωστή αλληλουχία. Συνίσταται από επαναληπτικούς κύκλους αντιγραφής DNA, αρχίζοντας από μια μήτρα και δύο σύνθετους εκκινητές που συνθέτουν προς την αντίθετη κατεύθυνση, ο ένας προς τον άλλον. Κάθε κύκλος αποτελείται από άνοδο της θερμοκρασίας για τήξη του DNA και στη συνέχεια πτώση της θερμοκρασίας για συστοιχισμό των εκκινητών στις αντίστοιχες μήτρες και σύνθεση νέου DNA. Σε κάθε κύκλο η ποσότητα του DNA ανάμεσα στους δύο εκκινητές διπλασιάζεται. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε ειδικά προγραμματισμένους θερμοεπωαστές (Εικ.12) (Suzuki *et al.* 2000).

Για αντιδράσεις των 50μl χρησιμοποιήθηκαν:

- 1) Διάλυμα Buffer NH₄ 5μl
- 2) MgCl₂ 1,5 μl (50mM)
- 3) dNTPs 0,25μl (25mM)
- 4) pAF 1,25μl (25mM)
- 5) pHR 1,25μl (25mM)
- 6) Taq DNA Polymerase 0,3μl
- 7) SDW 40,45μl

Ως εκκινητές (primers) χρησιμοποιήθηκαν οι pAF και pHR για το γονίδιο 16S rDNA το οποίο αποτελεί ένα γονίδιο «ταυτότητα» για τα βακτήρια και δίνει PCR product 1500 ζευγών βάσεων (Weisburg *et al.* 1991). Οι εκκινητές αποτελούν σημαντικά συστατικά της αντίδρασης, γιατί αντιπροσωπεύουν τα νουκλεοτιδικά άκρα του DNA στόχου και είναι απαραίτητοι προκειμένου να προστεθούν τα υπόλοιπα νουκλεοτίδια της αλληλουχίας. Πρόκειται για ολιγονουκλεοτίδια μικρού μήκους που στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι :

pAF : AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG

pHR :AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA

Η DNA πολυμεράση είναι το ένζυμο με το οποίο επιτυγχάνεται η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του στόχου DNA μετά από κάθε αποδιάταξη και υβριδισμό των εκκινητών. Η Taq πολυμεράση που χρησιμοποιείται εδώ έχει απομονωθεί από βακτήρια που ζουν σε περιβάλλον με υψηλές θερμοκρασίες (*Thermus aquaticus*) και είναι πολυμεράση τύπου I με 5' → 3' εξωνουκλεϊκή δράση. Η ιδανική θερμοκρασία για την δράση της είναι 55-75 °C και ο χρόνος ημιζωής της είναι 50 κύκλοι στους 95 °C (Lawyer et al. 1993).

Τα τέσσερα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), dATP, dTTP, dCTP και dGTP, είναι απαραίτητα για τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού.

Τα ιόντα μαγνησίου επηρεάζουν τον υβριδισμό του εκκινητή, τη θερμοκρασία αποδιάταξης του DNA και των PCR προϊόντων, τη δημιουργία διμερών από τους εκκινητές, την εξειδίκευση των προϊόντων και τη δραστηριότητα και πιστότητα της πολυμεράσης. Τα ιόντα μαγνησίου προέρχονται από την προσθήκη χλωριούχου μαγνησίου, που εμφανίζεται να είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο αντιδραστήριο στο χειρισμό.

Τέλος το ισοτονικό διάλυμα της αντίδρασης δημιουργεί ένα ιοντικό περιβάλλον για να διευκολύνει την ένωση του εκκινητή με το στόχο DNA.

Αφού έχει ετοιμαστεί το κυρίως διάλυμα από όλα τα συστατικά (master mix), ετοιμάζονται οι 20 πρώτες αντιδράσεις από 2 φορές. Το κυρίως διάλυμα μοιράζεται σε φιαλίδια του 0,5ml (από 50 μl) και με ένα αποστειρωμένο ακροφύσιο παίρνεται μια μικρή αποικία από το κάθε δείγμα η οποία διαλύεται σε 2 φιαλίδια. Μαζί με αυτά, υπάρχει και ένα διάλυμα το οποίο δεν περιέχει κύτταρα μέσα, και το οποίο θα το χρησιμοποιείται ως αρνητικός μάρτυρας. Ταυτόχρονα ετοιμάζεται και ένα τρυβλίο με θρεπτικό (master plate), στο οποίο συγκεντρώνονται όλες οι αποικίες μαζί, έτσι ώστε σε περίπτωση επανάληψης της αντίδρασης να έχουμε τις αποικίες όλες μαζί έτοιμες για τη δημιουργία νέων αντιδράσεων. Έτσι έχουν ετοιμαστεί 40 φιαλίδια τα οποία είναι έτοιμα για να μπουν στον κυκλοποιητή PCR, αφού προηγουμένως τους έχει γίνει μια γρήγορη φυγοκέντρηση για 1-2sec, έτσι ώστε να πέσουν όλες οι σταγόνες του διαλύματος κάτω.

Η PCR αντίδραση περιλαμβάνει τους εξής κύκλους :

- 1) Σπάσιμο κυττάρων και μερική αποδιάταξη του DNA στους 94°C για 15'
- 2) Πλήρης αποδιάταξη του DNA στους 94°C για 1'

- 3) Υβριδοποίηση στους 50°C για 1΄
- 4) Επιμήκυνση (πολυμερισμός) στους 72°C για 2΄
- 5) 34 κύκλους με τις διαδικασίες 2-4
- 6) Τελικό στάδιο πολυμερισμού στους 72°C για 10΄.

4.3β Gel electrophoresis of PCR product

Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Μετά το τέλος της αντίδρασης PCR, τα προϊόντα της αντίδρασης ετοιμάζονται για ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση τους. Με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης μπορούν γενικά να διαχωριστούν μόρια DNA, RNA και πρωτεϊνών με κριτήριο το μήκος τους. Τα δείγματα τοποθετούνται σε μια χαραγή που έχει δημιουργηθεί στο ένα άκρο της πλάκας του πηκτώματος και καλύπτονται από ένα ρυθμιστικό διάλυμα. Με την τοποθέτηση ηλεκτροδίων στα άκρα της πλάκας εξασφαλίζεται η εφαρμογή τάσης μεταξύ τους (Εικ.13,14). Η τάση αυτή έχει αποτέλεσμα την μετακίνηση των διαφόρων θραυσμάτων DNA προς το θετικό πόλο, καθώς αποτελούνται από νουκλεοτίδια τα οποία είναι φορτισμένα αρνητικά. Επειδή όμως η ταχύτητα μετακίνησης ενός θραύσματος εξαρτάται από το μέγεθός του (τα μεγάλα θραύσματα κινούνται αργότερα από τα μικρά), σε μια δεδομένη χρονική στιγμή τα μικρότερα θραύσματα προπορεύονται έναντι των μεγαλύτερων κατά την κίνησή τους προς τον θετικό πόλο, με αποτέλεσμα να μπορούν να διακριθούν μεταξύ τους.

Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR τοποθετούνται λοιπόν σε ένα φιαλίδιο για το κάθε δείγμα, επομένως από τα διπλά δείγματα τώρα υπάρχει μια ποσότητα 100μl. Από αυτά αφαιρούνται 5μl από το καθένα, τοποθετούνται σε άλλα φιαλίδια τα οποία περιέχουν 5μl χρωστικής orange G (για να δούμε τον φθορισμό) και τοποθετούνται στις οπές (Εικ.15) του πηκτώματος αγαρόζης 1% , το οποίο περιέχει τα εξής :

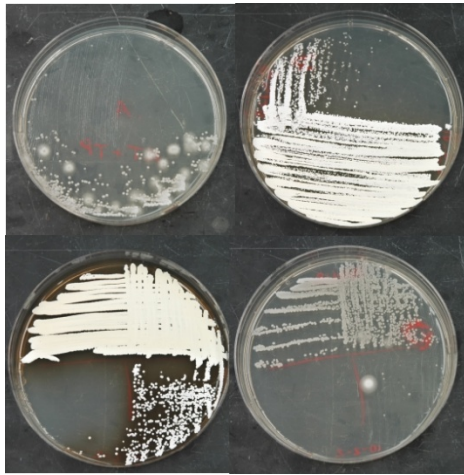
100ml TAE Buffer 50x

1gr agarose

3μl βρωμιούχο εθίδιο

(TAE Buffer 50x- 242gr Tris base, 57,1ml glacial acetic acid, 37,2gr

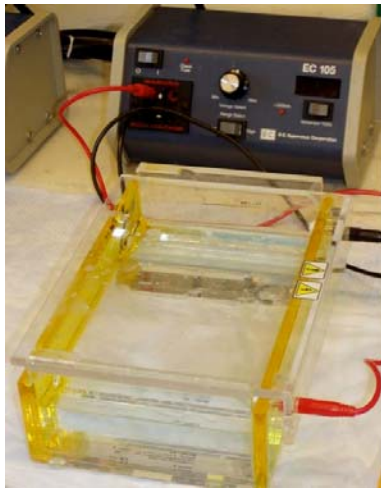
Na₂EDTA.2H₂O, H₂O μέχρι τελικό όγκο 1lt)



Εικόνα 11. Επίστρωση αποικιών



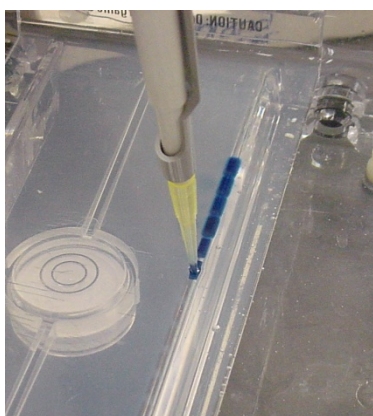
Εικόνα 12. Κυκλοποιητής PCR



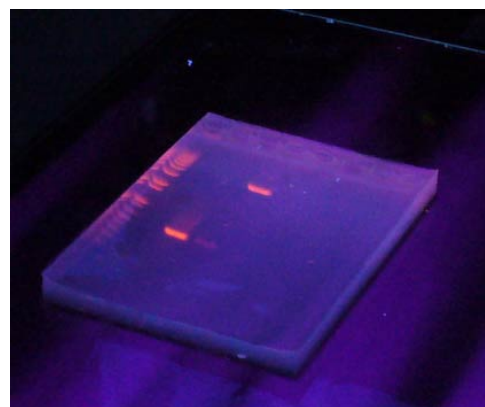
Εικόνα 13. Συσκευή ηλεκτροφόρησης



Εικόνα 14. Προετοιμασία πηκτώματος



Εικόνα 15. Τοποθέτηση DNA στο πήκτωμα

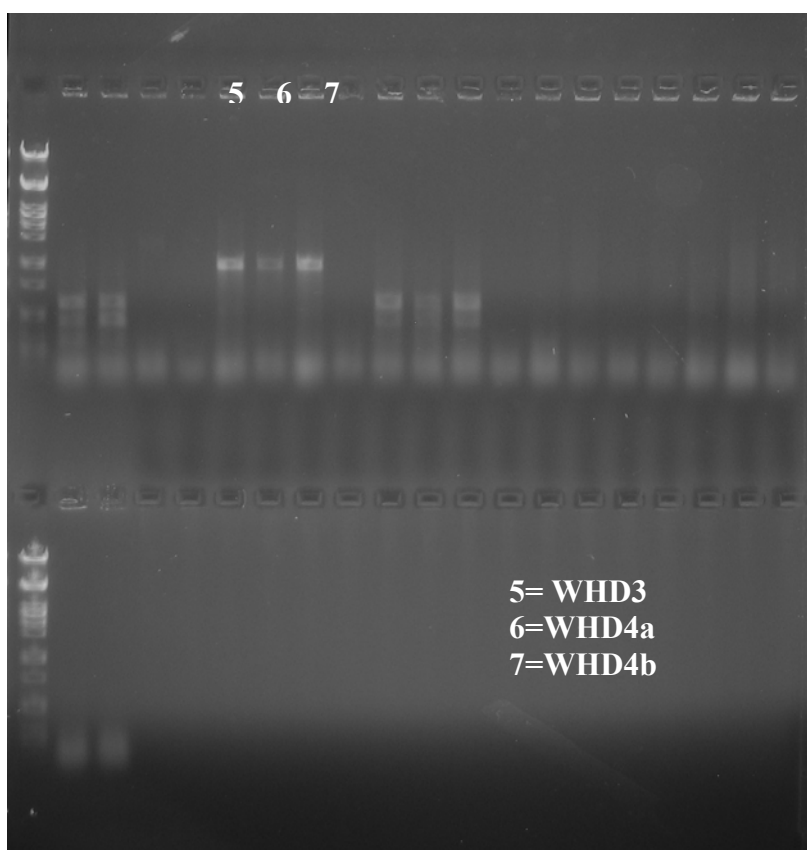


Εικόνα 16. Πήκτωμα σε UV πλάκα

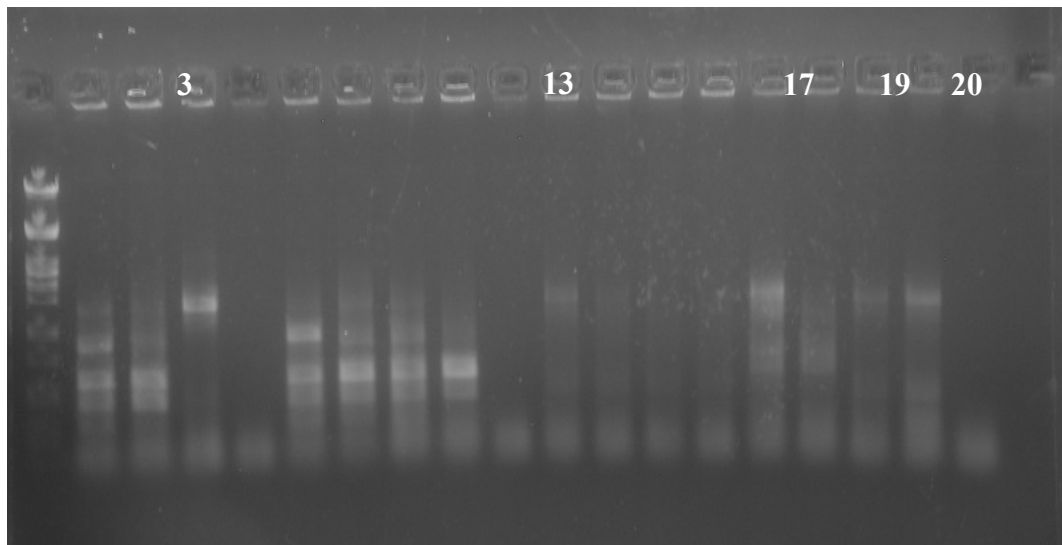
Μαζί στο πήκτωμα τοποθετείται και ένα θραύσμα γνωστού μεγέθους (ladder) με το οποίο θα συγκριθούν τα θραύσματα και στη προκειμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε το λ PstI. Η σύγκριση της απόστασης που διένυσαν τα θραύσματα με την γνωστή απόσταση που διανύει το θραύσμα του γνωστού μεγέθους, δίνει πληροφορίες για το μέγεθος των πρώτων. Αφού το πήκτωμα ηλεκτροφορηθεί για περίπου 25-30 λεπτά, αφαιρείται από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και τοποθετείται σε UV πεδίο (Εικ. 16), φωτογραφίζεται το πήκτωμα και εμφανίζονται οι ζώνες του DNA.

Οι διαδικασίες αυτές επαναλήφθηκαν για όλα τα δείγματα.

Παρακάτω παρατίθενται οι φωτογραφίες (Φ. 1-5) από τις ηλεκτροφορήσεις των PCR προϊόντων των βακτηρίων που είχαν επιλεγεί. Αξίζει να σημειωθεί ότι όσες από τις αντιδράσεις δεν έδωσαν θετική αντίδραση (δεν δίδεται φωτογραφία) επαναλήφθηκαν για την επιβεβαίωση του αρνητικού αποτελέσματος. Οι πιο καλές αντιδράσεις με τα επιθυμητά αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω, καθώς αναγράφεται και το στέλεχος από το οποίο προήλθε το βακτηριακό DNA.

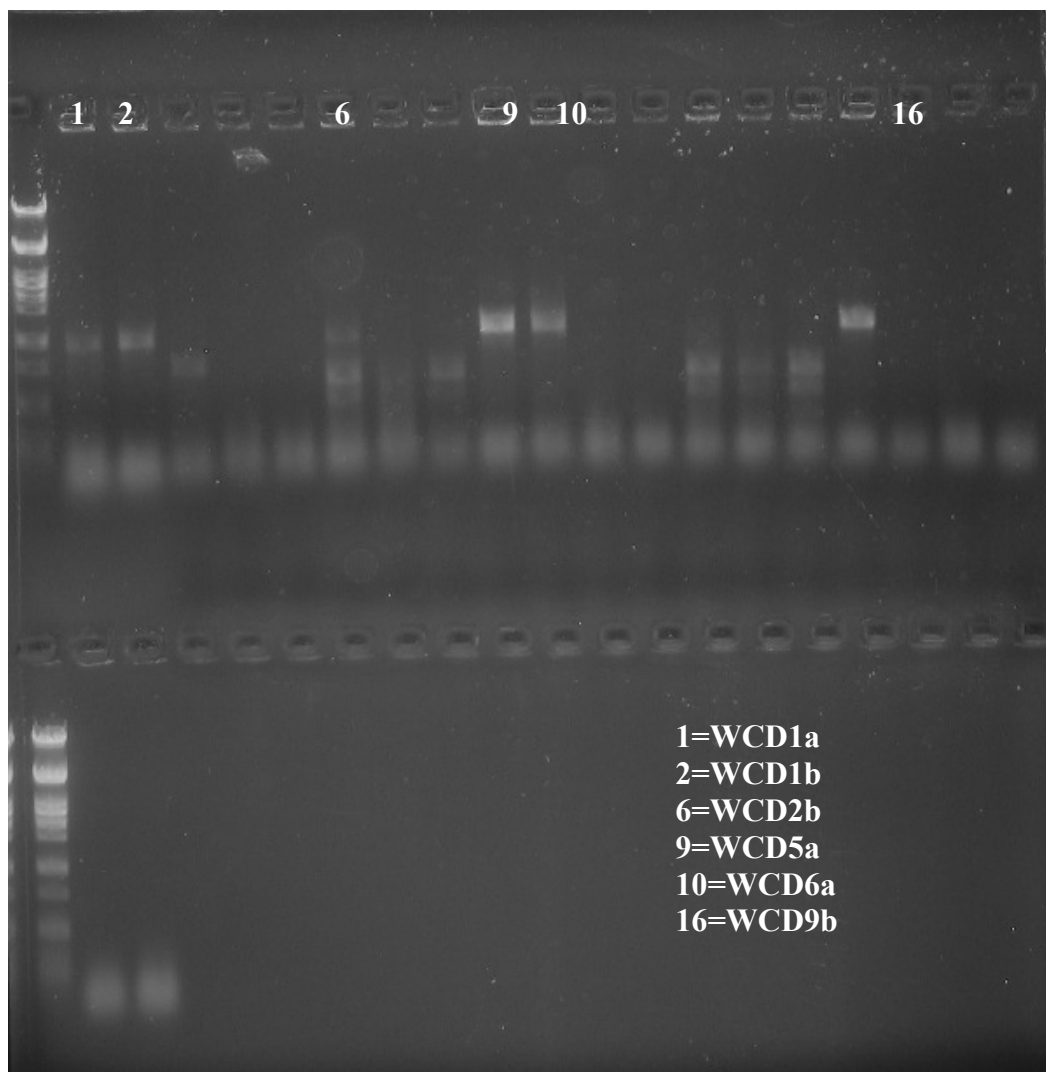


Φωτογραφία 1. Πρώτη σειρά αντιδράσεων



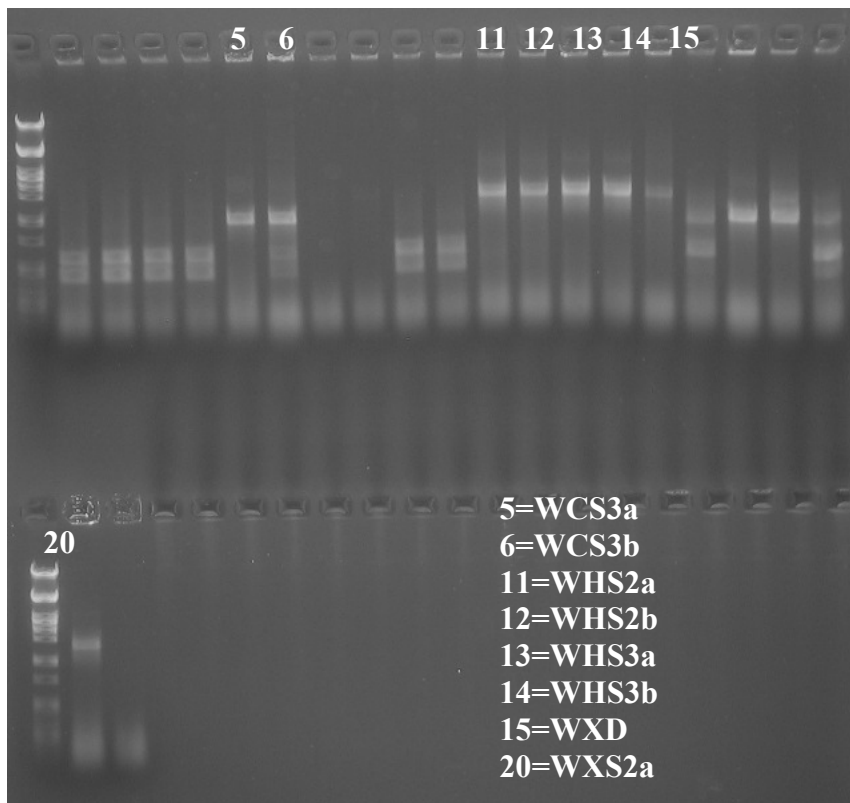
3=WHD2a
13=LAB1a
17=LAB3a
19=LAB5a
20=LAB5b

Φωτογραφία 2. Δεύτερη σειρά αντιδράσεων

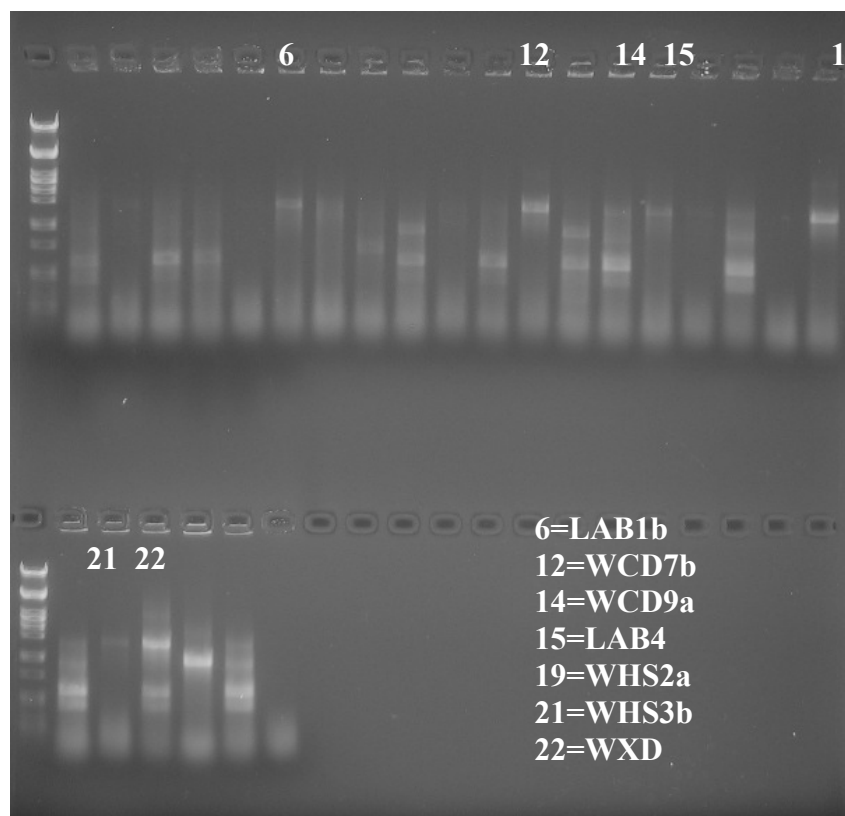


1=WCD1a
2=WCD1b
6=WCD2b
9=WCD5a
10=WCD6a
16=WCD9b

Φωτογραφία 3. Τρίτη σειρά αντιδράσεων



Φωτογραφία 4. Τέταρτη σειρά αντιδράσεων



Φωτογραφία 5. Πέμπτη σειρά αντιδράσεων

4.3γ Καθαρισμός προϊόντος PCR

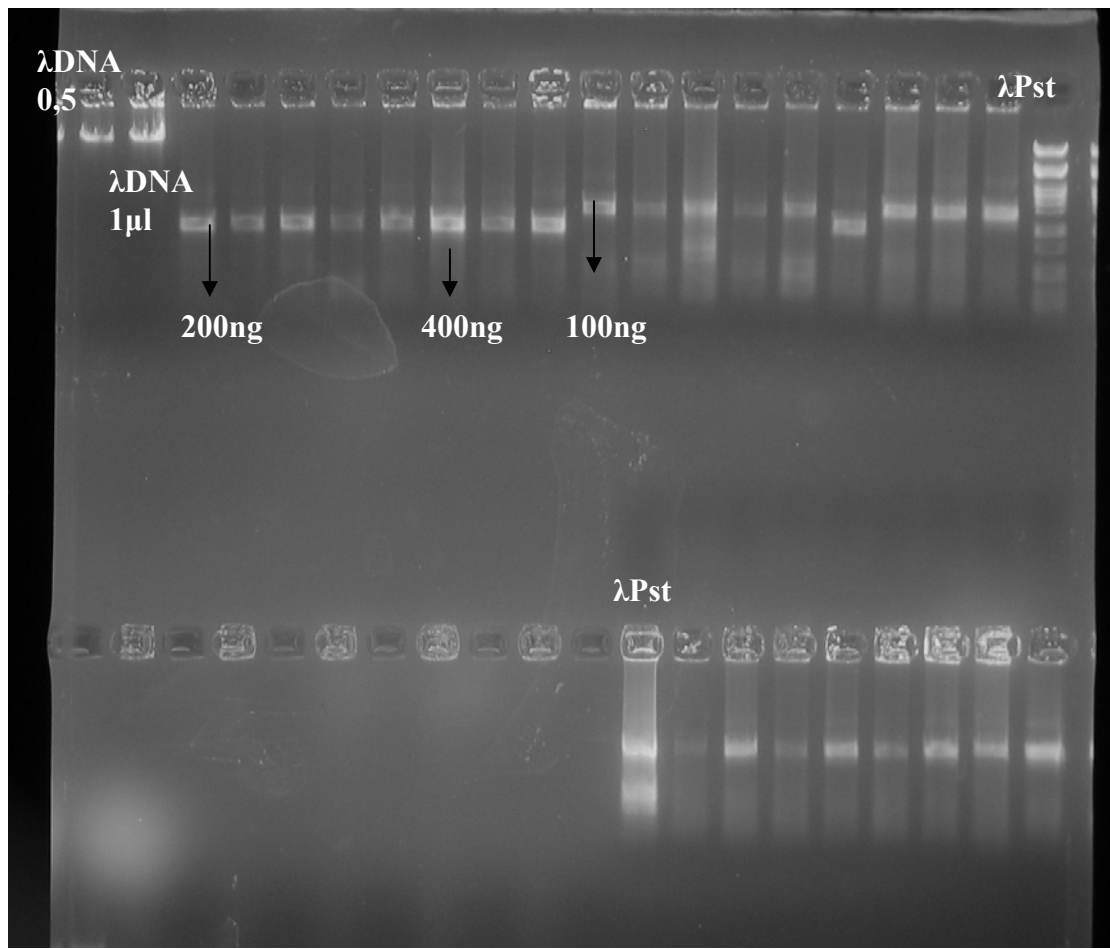
Από τις παραπάνω αντιδράσεις, μελετήθηκαν στη συνέχεια όσα δείγματα έδωσαν θετική αντίδραση (29 δείγματα) και ετοιμάστηκαν για καθαρισμό (PEG precipitation of PCR product) του προϊόντος της αντίδρασης της πολυμεράσης. Η διαδικασία είχε ως εξής :

Στα 90μl που έμειναν από την κάθε αντίδραση προστίθενται 90μl PEG 20% NaCl 2,5M (αναλογία 1:1) και τα δείγματα αφήνονται στο υδατόλουτρο στους 37°C για 15 λεπτά. Στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται για 15 λεπτά στις 16100rpm στους 25 °C. Κατόπιν με μια πιπέττα 200μl αφαιρείται το υπερκείμενο προσεκτικά (η παλέτα παραμένει στο κάτω μέρος). Προστίθενται σ' αυτά 150μl αιθανόλη (Et-OH 80%) αφού προηγουμένως έχει αφεθεί στον πάγο και φυγοκεντρώνονται εκ νέου στις 16100rpm για 2 λεπτά. Αφαιρείται ξανά το υπερκείμενο και επαναλαμβάνεται η διαδικασία. Τα δείγματα αφήνονται να στεγνώσουν, προστίθενται σε αυτά 20μl νερό (SDW) και διατηρούνται στους -20 °C.

4.3δ Ποσοτικοποίηση καθαρισμένου προϊόντος PCR

Μετά τον καθαρισμό των προϊόντων επόμενο βήμα στην όλη διαδικασία μέχρι τα δείγματα να είναι έτοιμα για αλληλούχιση του γονιδιώματός τους, είναι η ποσοτικοποίηση του προϊόντος που καθαρίστηκε.

Από τα καθαρισμένα προϊόντα των αντιδράσεων PCR, σε 2μl από το κάθε δείγμα, προστίθενται 5μl χρωστικής orange και ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% μαζί με ένα δείκτη γνωστής ποσότητας (λ DNA 0,5μl και 1μl). Μετά την ηλεκτροφόρηση συγκρίνονται οι μπάντες των δειγμάτων (με βάση τη φωτεινότητα που εμφανίζουν οι ζώνες τους στο gel) με αυτές του δείκτη και υπολογίζεται στο περίπου η ποσότητα του DNA που υπάρχει στο κάθε δείγμα (η απαιτούμενη ποσότητα για αλληλούχιση είναι 1μg), όπως φαίνεται και στην παρακάτω φωτογραφία (Φ.6), σύμφωνα με την οποία η ποσότητα DNA που απομονώθηκε από το κάθε δείγμα ήταν αρκετή ώστε τα δείγματα που καθαρίστηκαν να είναι έτοιμα για αλληλούχιση (sequencing).



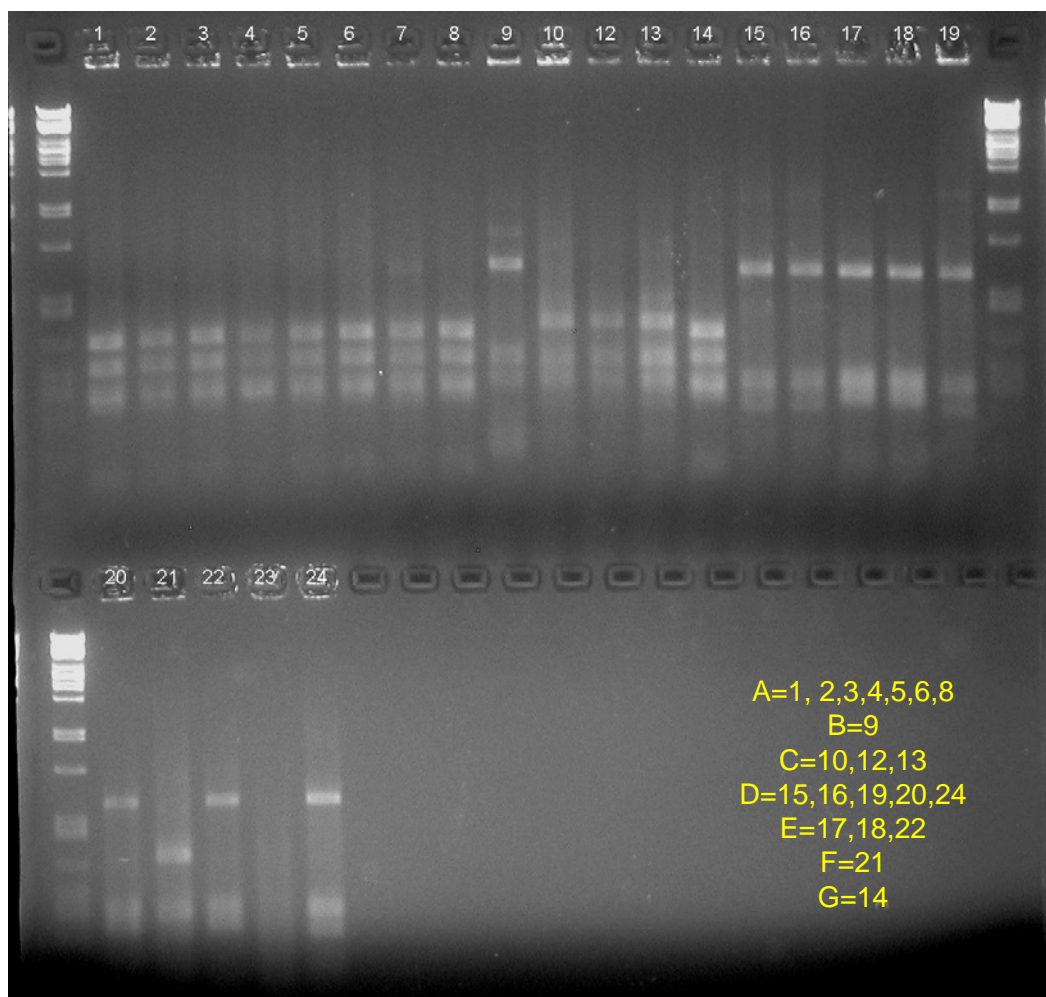
Φωτογραφία 6. Η ποσότητα DNA που υπάρχει σε 2μl δείγματος (υπολογισμένη κατά προσέγγιση).

4.3ε RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Η τυχαία ποικιλομορφία της DNA αλληλουχίας μιας περιοχής (>1 διαφορά ανά 1000bp συγκρίνοντας δυο διαφορετικά αλληλόμορφα της ίδιας αλληλουχίας) η οποία στις περισσότερες περιπτώσεις είναι χωρίς φαινοτυπικό αποτέλεσμα, είναι το αίτιο ενός φαινομένου που ονομάζεται πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικού τμήματος (RFLP) (Suzuki *et al.* 2000). Με τη χρήση αυτών λοιπόν είναι δυνατόν να αποδειχτεί ποια από τα 24 δείγματα που ετοιμάστηκαν είναι πιθανά ίδια μεταξύ τους και ποια όχι.

Ετοιμάζονται λοιπόν τα δείγματά παίρνοντας το 75% της ποσότητας που απαιτείται για την αλληλούχιση (έτσι ώστε να μείνει και αρκετή ποσότητα για το sequencing) και ετοιμάζονται νέα διαλύματα με το κύριο διάλυμα να αποτελείται από

τα εξής: (για 10μl διαλύματος) 2μl buffer, 0,75μl Alu I και 7,25μl SDW. Για κάθε δείγμα χρησιμοποιείται η ποσότητα DNA που αναφέρθηκε παραπάνω, 10μl από το κύριο διάλυμα και το διάλυμα συμπληρώνεται με SDW μέχρι τελικό όγκο 20μl. Τα δείγματα αφήνονται στους 37 °C για 12 ώρες και μετά ηλεκτροφορούνται σε gel αγαρόζης 2%, προσθέτοντας 5μl χρωστικής orange, με δείκτη (marker) τον λPstI. Από την ηλεκτροφόρηση εμφανίζεται η παρακάτω φωτογραφία (Φ.7), όπου και βγαίνει το συμπέρασμα ότι οι 24 αρχικά βακτηριακές απομονώσεις που μελετήθηκαν, πιθανόν να ανήκουν σε επτά διαφορετικά βακτήρια (τουλάχιστον από ότι μπορούμε να διακρίνουμε σε αυτό το επίπεδο). Δείγματα από τα επτά αυτά ευδιάκριτα δείγματα στάλησαν για αλληλούχιση (sequencing) του γονιδίου 16S rRNA.



Φωτογραφία 7. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης όπου φαίνεται πως ομαδοποιούνται τα γονιδιώματα που απομονώθηκαν σε 7 διαφορετικά στελέχη.

4.3στ Sequencing

Η αλληλούχιση (sequencing) είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας ενός τμήματος DNA. Η ενζυμική μέθοδος Sanger που χρησιμοποιείται πλέον (έναντι της χημικής Maxam and Gilbert) απαιτεί μονόκλωνο DNA, που χρησιμοποιείται σαν μήτρα για τη σύνθεση ραδιοσημασμένης συμπληρωματικής αλυσίδας *in vitro*. Η αντίδραση αυτή επιτυγχάνεται με την DNA πολυμεράση της *E.coli* στην παρουσία των τεσσάρων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), ένα από τα οποία είναι ραδιοσημασμένο) και ενός συνθετικού ολιγονουκλεοτιδίου που είναι συμπληρωματικό στη DNA μήτρα και χρησιμεύει ως εκκινητής. Τέσσερις κατά τα άλλα όμοιες αντιδράσεις σύνθεσης αναμειγνύονται με προσθήκη στην κάθε μία μικρής ποσότητας ενός διαφορετικού 2',3'- διδεοξηνουκλεοτιδίου (ddATP, ddTTP κτλ). Η ενσωμάτωση ενός ddNMP στο 3' άκρο μιας αντιγραφόμενης αλυσίδας σταματάει την περαιτέρω σύνθεση, γιατί δεν υπάρχει πια 3'-OH για προέκταση αλυσίδας. Ο λόγος της π.χ. ddATP προς την dATP είναι ρυθμισμένος έτσι ώστε να μην γίνεται περάτωση της σύνθεσης σε κάθε σημείο που συναντάται A. Έτσι κάθε αντίδραση καταλήγει να περιέχει μίγμα περατωμένων αλυσίδων, όλες σε διαφορετική περίσταση που συναντάται A, G, C ή T, ανάλογα με το ddNTP που συμπεριλήφθηκε. Μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και αυτοραδιογραφία η αλληλουχία του DNA μπορεί να διαβαστεί (Suzuki *et al.* 2000).

4.3ζ Glycerol stock

Σαν τελικό στάδιο στην επεξεργασία του απομονωμένου από τα βακτηριακά στελέχη γενετικού υλικού, εμφανίζεται η «αποθήκευση» των αποικιών σε γλυκερόλη, έτσι ώστε να υπάρχει ανά πάσα στιγμή μια «πηγή» από κύτταρα των βακτηρίων που μελετήθηκαν. Η διαδικασία έχει ως εξής :

Σε 10ml υγρό θρεπτικό L.B. (με τη συνταγή που αναφέρεται παραπάνω), το οποίο έχει μοιραστεί σε γυάλινα μπουκάλια, ρίχνεται μια μικρή ποσότητα από τις αποικίες, από τα τρυβλία που είχαν φτιαχτεί κατά την διάρκεια του απλώματος των αποικιών (τρυβλία τα οποία περιέχουν τις αποικίες μαζεμένες και διατηρούνται σε χαμηλή θερμοκρασία έτσι ώστε να μην αναπτυχθούν αρκετά) και επωάζονται με ταυτόχρονη ανάδευση για να αναπτυχθούν οι αποικίες σε υγρή καλλιέργεια.

Μερικές μέρες μετά (2-3 ημέρες) το υγρό θρεπτικό έχει θολώσει, γεγονός που δηλώνει ότι οι αποικίες έχουν μεγαλώσει. Τότε σε μικρά φιαλίδια προστίθενται 700μl υγρής καλλιέργειας και 700μl γλυκερόλης 40%, αυτά ανακατεύονται καλά και τοποθετούνται αμέσως σε υγρό άζωτο για να παγώσουν. Στη συνέχεια διατηρούνται για πολύ καιρό στους -80 °C και αποτελούν μια πηγή των υπό μελέτη βακτηριακών κυττάρων για κάθε χρήση.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα πρώτα αποτελέσματα για τις πιθανές διαφορές στη μικροχλωρίδα μεταξύ των υπό μελέτη στελεχών του δάκου της ελιάς εμφανίστηκαν από τις πρωτογενείς κιάλας καλλιέργειας των βακτηρίων των διαφόρων στελεχών, πριν αρχίσει η διαδικασία απομόνωσης και μοριακής ταυτοποίησης των βακτηριακών στελεχών.

Παρατηρώντας τις πρωτογενείς καλλιέργειες των βακτηρίων όλων των στελεχών του δάκου παρατηρείται έντονη διαφορά στο μοτίβο ανάπτυξης των βακτηρίων μεταξύ των εργαστηριακών και των άγριων πληθυσμών. Η μακροσκοπική ανάλυση που έγινε έδειξε και διαφορά στον αριθμό των βακτηριακών στελεχών μεταξύ άγριων και εργαστηριακών πληθυσμών, με τα εργαστηριακά να εμφανίζονται να έχουν μειωμένη καλλιεργούμενη, στις συγκεκριμένες συνθήκες, μικροχλωρίδα (πέντε βακτηριακά στελέχη) συγκριτικά με τα άγρια, στα οποία ο αριθμός των πιθανών στελεχών των βακτηρίων σε μερικά στελέχη του εντόμου (WHD, WCD) φτάνει τα επτά (7) ή και τα εννιά (9). Πολλά από αυτά βέβαια πιθανόν να αποτελούν το ίδιο βακτήριο, αφού όπως αναφέρθηκε, κατά την απομόνωση των βακτηρίων επιλέχθηκαν όλα τα διαφορετικά πιθανά στελέχη που παρατηρήθηκαν με τη χρήση στερεοσκοπίου, με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά και μόνο (Εικόνες 17,18,19).

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθούν δύο γεγονότα που παρατηρήθηκαν. Το γενετικά τροποποιημένο στέλεχος EGFP δεν εμφάνισε ανάπτυξη βακτηριακών αποικιών στις πρωτογενείς καλλιέργειες, παρά μόνο ανάπτυξη ζαχαρομύκητα. Ο ίδιος ζαχαρομύκητας εμφανιζόταν και στις καλλιέργειες των εργαστηριακών στελεχών, αλλά όχι στις καλλιέργειες των αγρίων πληθυσμών.

Μεταξύ τώρα των άγριων στελεχών παρατηρείται διαφορά και μάλιστα έντονη στο μοτίβο που εμφανίζονται να έχουν οι αποικίες οι προερχόμενες από

έντομα που τράφηκαν από καρπούς διαφορετικής ποικιλίας (κορωνέικης και χονδρολιάς). Δεν παρατηρούνται σε αυτό το σημείο διαφορές μεταξύ των άγριων στελεχών που προέρχονται από διαφορετικές περιοχές (Ηράκλειο και Χανιά), ή μεταξύ των στελεχών διαφορετικών γενεών, δηλαδή διαφορετικών χρονικών περιόδων του έτους, Σεπτέμβριος και Δεκέμβριος.

Τα αποτελέσματα αυτά, που βασίστηκαν στην απλή παρατήρηση των αποικιών με τη βοήθεια του στερεοσκοπίου, έρχεται να επιβεβαιώσει κατά κάποιο τρόπο η μοριακή ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών. Η ταυτοποίηση έγινε με την απομόνωση των βακτηρίων και τη δημιουργία μονοκαλλιεργειών (όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι) και στη συνέχεια απομονώθηκε γενετικό υλικό από τα βακτήρια, επεξεργάστηκε και αφού ετοιμάστηκε, οδηγήθηκε για αλληλούχιση (sequencing).

Τα αποτελέσματα που έδωσε η αλληλούχιση ύστερα από επεξεργασία με τη χρήση προγράμματος BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) και τη βάση δεδομένων GenBank, οδήγησαν στην ταυτοποίηση διαφόρων βακτηριακών στελεχών που κατανέμονται στα διαφορετικά στελέχη του εντόμου όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Π.5).

ISOLATE	LAB	WHS	WHD	WCS	WCD	WXS	WXD	EGFP
<i>Providencia sp</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Providencia alcafaciens</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Providencia stuartii</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Providencia rettgeri</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Pseusomonas sp</i>	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>Bacillus sp.</i>	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Bacillus megaterium</i>	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	+	-	-	+	-	-	-
<i>Bacillus thuringiensis</i>	-	+	-	-	+	-	-	-
<i>Saccharomyces</i>	+	-	-	-	-	-	-	+

Πίνακας 5. Βακτηριακά στελέχη που ταυτοποιήθηκαν.



Εικόνα 17. Πρωτογενείς καλλιέργειες εργαστηριακών και άγριων στελεχών διαφορετικών εποχών (από ποικιλία Κορωνέικη, στην περιοχή του Ηρακλείου, τους μήνες Σεπτέμβριο και Δεκέμβριο).



Εικόνα 18. Πρωτογενείς καλλιέργειες εργαστηριακών και άγριων στελεχών διαφορετικών περιοχών (από ποικιλία Κορωνέικη, στις περιοχές Ηρακλείου και Χανίων, τον μήνα Σεπτέμβριο).



Εικόνα 19. Πρωτογενείς καλλιέργειες εργαστηριακών και άγριων στελεχών διαφορετικών ποικιλιών (από ποικιλίες Χονδρολιά και Κορωνέικη, στην περιοχή του Ηρακλείου, το μήνα Σεπτέμβριο).

Πιο συγκεκριμένα από τις 4 αλληλουχίες που τελικά έδωσαν αποτελέσματα βρέθηκαν :

Η πρώτη αλληλουχία πιθανόν να ανήκει στους παρακάτω οργανισμούς (Enterobacteria), και βρέθηκε σε στελέχη LAB, WHS, WHD, (ίσως και σε WCS)

A) *Providencia sp.* (ομοιότητα αλληλουχίας 97%)

B) *Providencia alcalafaciens*¹ (ομοιότητα αλληλουχίας 97%)

Γ) *Providencia stuartii*² (ομοιότητα αλληλουχίας 97%)

Δ) *Providencia rettgeri* (ομοιότητα αλληλουχίας 98%)

1) Βρέθηκε και από τους Fitt and O'Brian 1985, σε άγρια έντομα.

- 2) Βρέθηκε και από τον Tsiropoulos 1983, και σε εργαστηριακά και σε άγρια έντομα.

Η δεύτερη αλληλουχία ανήκει σε *Pseudomonas* και βρέθηκε σε στελέχη WHD, WHS, WXD, WXS και πρόκειται για :

A) *Pseudomonas sp.*¹ (ομοιότητα αλληλουχίας 98%)

B) *Pseudomonas fluorescens*² (ομοιότητα αλληλουχίας 98%)

1) Βρέθηκε και από τον Tsiropoulos 1983, σε άγρια έντομα.

2) Βρέθηκε και από τους Fitt and O'Brian 1985, και σε εργαστηριακά και σε άγρια έντομα και από τον Tsiropoulos 1983, σε άγρια έντομα, ενώ από τους Sacchetti *et al.* 2006 μόνο σε εργαστηριακά.

Η τρίτη αλληλουχία ανήκει σε κάποιο βάκιλο (για τον οποίο υπάρχει μια πιθανότητα να πρόκειται για νέο είδος). Σε διαφορετικό σενάριο, πιο κοντινή αλληλουχία εμφανίζει με τους ακόλουθους οργανισμούς και βρέθηκε σε στελέχη WHD και WCD.

A) *Bacillus sp.* (ομοιότητα αλληλουχίας 93%)

B) *Bacillus subtilis*¹ (ομοιότητα αλληλουχίας 93%)

Γ) *Bacillus megaterium*² (ομοιότητα αλληλουχίας 93%)

1) Βρέθηκε και από τον Tsiropoulos 1983, σε άγρια έντομα και από την Konstantopoulou *et al.* 2005, και σε εργαστηριακά και σε άγρια έντομα.

2) Βρέθηκε και από τον Tsiropoulos 1983, σε άγρια έντομα.

Η τελευταία αλληλουχία που ανήκει επίσης σε βάκιλο, βρέθηκε σε στελέχη WCD και WHS.

A) *Bacillus cereus*¹ (ομοιότητα αλληλουχίας 98%)

B) *Bacillus thuringiensis* (ομοιότητα αλληλουχίας 98%)

1) Βρέθηκε από τους Haniotakis and Avtzis, 1977, σε εργαστηριακά άτομα.

2)

Ο ζαχαρομύκητας, που βρέθηκε, ταυτοποιήθηκε χωρίς τη χρήση μοριακών τεχνικών.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αρκετοί επιστήμονες προσπάθησαν ανά καιρούς να προσδιορίσουν με ακρίβεια και σαφήνεια τη μικροχλωρίδα του συγκεκριμένου εντόμου, δημοσιεύοντας εργασίες με διαφορετικά αποτελέσματα ο καθένας και δίνοντας διαφορετική κάθε

φορά ερμηνεία, τόσο για τη σύσταση της μικροχλωρίδας όσο και για τον ρόλο του οποίου αυτή τελικά παίζει. Μια τέτοια προσπάθεια γίνεται και στην παρούσα μελέτη.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης που φαίνονται στον παραπάνω πίνακα (Π.5) δίνουν μια εικόνα για τα πιθανά βακτηριακά στελέχη που βρέθηκαν στα διαφορετικά στελέχη του δάκου που μελετήθηκαν, με τη συγκεκριμένη μέθοδο, με τη χρήση των συγκριμένων τεχνικών, των συγκεκριμένων θρεπτικών υποστρωμάτων και πρόκειται για βακτήρια τα οποία σε τελική ανάλυση είναι πρώτον καλλιεργήσιμα και δεύτερον καλλιεργήσιμα στις συνθήκες και στα θρεπτικά που τους δόθηκαν.

Η συγκεκριμένη μικροχλωρίδα (όχι αυτούσια) έχει αναφερθεί και σε παλιότερες μελέτες που ασχολήθηκαν με το συγκεκριμένο ή παρόμοιο θέμα (μερικές από τις οποίες αναφέρθηκαν και παραπάνω), εκτός από τον *Bacillus sp.*, που πιθανόν να πρόκειται για ένα νέο είδος, αλλά αυτό θα χρειαστεί λεπτομερή χαρακτηρισμό και περαιτέρω ανάλυση, σε κάποιο άλλο επίπεδο. Όσον αφορά στα υπόλοιπα, ταυτοποιήθηκαν στελέχη *Providencia* (πρόκειται για *Enterobacteria*), *Pseudomonas*, ένας ακόμη βάκιλος και ένας ζαχαρομύκητας.

Αυτό λοιπόν που αρχικά παρατηρήθηκε είναι οι αναμενόμενες διαφορές στη σύσταση της μικροχλωρίδας μεταξύ εργαστηριακών και άγριων στελεχών. Τα εργαστηριακά άτομα εμφανίζονται να έχουν μειωμένη μικροχλωρίδα, πιθανόν λόγω της χορήγησης αντιβιοτικών στη διαίτά τους (στη διαίτα των ενηλίκων, στρεπτομυκίνη) αλλά και λόγω των συντηρητικών (νιπαγίνη και σορβικό κάλι) που τοποθετούνται στη τροφή των προνυμφών αλλά και του χαμηλού pH (HCl 2N, pH=3-4) που αυτή έχει. Η διαφορά στη μικροχλωρίδα μεταξύ των δύο στελεχών μπορεί επομένως να αποδοθεί τόσο στις διαφορετικές διατροφικές συνήθειες των εντόμων όσο και στη χορήγηση αντιβιοτικών στα εργαστηριακά, που πολύ πιθανόν να σκοτώνουν μέρος της μικροχλωρίδας ή να μη αφήνουν άλλα βακτηριακά στελέχη να αναπτυχθούν στο έντομο. Από την άλλη, η προνυμφική διαίτα στην οποία υπόκεινται τα έντομα στο εργαστήριο είναι αρκετά πιο πλούσια, με έναν μεγάλο αριθμό θρεπτικών ουσιών και πηγών πρωτεϊνών, συγκριτικά με τον ελαιόκαρπο από τον οποίο οι προνύμφες τρέφονται στη φύση αποκλειστικά. Έτσι ίσως χρειάζονται τα έντομα στη φύση περισσότερα βακτήρια για να συνθέσουν πρωτεΐνες που πιθανόν να λείπουν από τον καρπό.

Αξιοσημείωτο εμφανίζεται να είναι το γεγονός ότι στο γενετικά τροποποιημένο στέλεχος EGFP (χρησιμοποιήθηκε στους τελευταίους μόνο χειρισμούς των πειραμάτων, λόγω μη σταθερού ακόμη στελέχους) δε βρέθηκαν

βακτηριακές αποικίες κατά την καλλιέργεια του εσωτερικού των νυμφών, παρά μόνο αποικίες ζαχαρομύκητα. Αυτό το κάνει να διαφέρει από το εργαστηριακό στέλεχος, αλλά ίσως να οφείλεται σε τυχαίο γεγονός. Το στέλεχος αυτό προέρχεται από το υπό μελέτη εργαστηριακό οπότε και οι συνθήκες εκτροφής είναι οι ίδιες. Επιπλέον είναι πολύ πρόσφατα (πριν από δύο χρόνια περίπου) τροποποιημένο για να αλλάξει η σύσταση της μικροχλωρίδας του, εκτρεφόμενο κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Εδώ θα χρειαστεί να αναφερθεί ότι ο Tsiropoulos 1983 μελέτησε τη μικροχλωρίδα εργαστηριακών αποικιών οι οποίες απείχαν μεταξύ τους 140 γενεές (F10 και F150) και βρήκε ότι μόλις 1 από τα 7 διαφορετικά βακτηριακά στελέχη που είχε η πρώτη γενεά έλειπε από τη δεύτερη. Επομένως θα μπορούσε να αποδοθεί η απουσία βακτηρίων από τις καλλιέργειες του EGFP σε τυχαίο γεγονός ή σε λάθη (κακή αποστείρωση της νύμφης) σε κάποιον από τους επιμέρους χειρισμούς.

Μεταξύ των άγριων τώρα στελεχών η πιο σημαντική και ουσιαστική διαφορά στη σύσταση της μικροχλωρίδας εμφανίζεται να είναι η διαφορά που απαντάται μεταξύ των δύο στελεχών του δάκου που προέρχονται από δύο διαφορετικές ποικιλίες ελιάς. Από τη μία εμφανίζεται η κορωνέικη με έναν μεγάλο αριθμό βακτηρίων και από την άλλη η χονδρολιά με μόλις μια ψευδομονάδα. Το γεγονός αυτό παραπέμπει και ίσως επιβεβαιώνει κατά κάποιον τρόπο τα παραπάνω. Ότι δηλαδή η μικροχλωρίδα του εντόμου επηρεάζεται από την διαίτα στην οποία υποβάλλεται η προνύμφη του εντόμου. Η διαφορετική χημική σύσταση των δύο ποικιλιών ελαιοκάρπου ίσως είναι η αιτία που οδήγησε στην διαφορετική αυτή σύσταση της μικροχλωρίδας του. Οι καρποί των δύο αυτών ποικιλιών, εκτός από τις μορφολογικές τους διαφορές (κορωνέικη: σχήμα κυλινδροκωνικό με τη μια πλευρά κυρτωμένη, μέσο βάρος καρπού 1,3γρ, φέρει πολύ μικρή θηλή και δίνει λάδι που φτάνει το 27% του βάρους της - χονδρολιά: κυλινδροκωνικό σχήμα καρπού, μέσο βάρος καρπού 3,3γρ, φέρει θηλή και η περιεκτικότητα του καρπού σε λάδι αγγίζει το 30%)(Ποντίκης 1992), έχουν και διαφορές στην ποιότητα και τη ποσότητα λαδιού που περιέχουν, μέγεθος και τη σύσταση του μεσοκαρπίου (η χονδρολιά εμφανίζεται να έχει πιο σαρκώδη καρπό) κτλ. Επίσης δέντρα της ποικιλίας κορωνέικης θεωρούνται πιο ευαίσθητα σε ασθένειες, όπως η φυματίωση (Ποντίκης 1992).

Στο γεγονός αυτό έρχεται να προστεθεί και η διαφορά των δύο αυτών στελεχών με τα εργαστηριακά στελέχη. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι διαφορές μεταξύ των τριών αυτών στελεχών (Πίνακας 6).

ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΝΤΟΜΑ	ΑΓΡΙΑ ΑΠΟ ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΚΟΡΩΝΕΪΚΗ	ΑΓΡΙΑ ΑΠΟ ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΧΟΝΔΡΟΛΙΑ
<i>Providencia</i> sp.	+	+	-
<i>Providencia alcalafaciens</i>	+	+	-
<i>Providencia stuartii</i>	+	+	-
<i>Providencia rettgeri</i>	+	+	-
<i>Pseusomonas</i> sp.	-	+	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	+	+
<i>Bacillus</i> sp.	-	+	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	+	-
<i>Bacillus megaterium</i>	-	+	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	+	-
<i>Bacillus thuringiensis</i>	-	+	-
<i>Saccharomyces</i> sp.	+	-	-

Πίνακας 6. Μικροχλωρίδα στελεχών με διαφορετική διαίτα.

Τα τρία παραπάνω στελέχη εμφανίζουν σημαντικές διαφορές στη σύσταση της μικροχλωρίδας τους. Γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η διαφορετική σύσταση της διαίτας στην οποία υποβάλλεται το έντομο, μεταβάλλει και τη σύσταση των βακτηρίων που αυτό φέρει, τα οποία ίσως τελικά να μην είναι μόνο ένα όπως αρχικά διατυπώθηκε από τον Petri το 1910 ή πρόσφατα από τους Capuzzo *et al.* το 2005, οι οποίοι υποστήριξαν ότι πρόκειται για ένα και μοναδικό βακτήριο, το *Candidatus Erwinia dacicola*.

Μεταξύ των άλλων αγρίων στελεχών, δηλαδή των προερχόμενων από διαφορετικές περιοχές και των συλλεγμένων σε διαφορετικές χρονικές περιόδους, δεν παρατηρούνται διαφορές οι οποίες θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν σημαντικές ή να οδηγήσουν την έρευνα σε περαιτέρω επίπεδα.

Οι διαφορές που βρέθηκαν στη σύσταση της μικροχλωρίδας μεταξύ εργαστηριακών και αγρίων στελεχών προσθέτουν ένα ακόμη στοιχείο, ίσως αρκετά σημαντικό στην έρευνα και στα πειράματα που γίνονται σήμερα για την επιτυχή εφαρμογή της μεθόδου SIT στο δάκο της ελιάς. Τα στείρα εργαστηριακά έντομα που εξαπολύονται στο ύπαιθρο μειονεκτούν σε διάφορα χαρακτηριστικά τους σε σχέση με τα άγρια, όπως η ικανότητα πτήσης, η όραση, η ώρα σύζευξης κ.α. Αυτό που πρέπει να γίνεται στα εργαστήρια εκτροφής του εντόμου είναι η παραγωγή όσο το δυνατόν πιο ανταγωνιστικών εντόμων, σε σχέση με αυτά των αγρίων πληθυσμών. Πρέπει τα

έντομα που παράγονται να είναι μακρόβια και αποδοτικά, για να μπορούν να ανταπεξέλθουν τόσο στις δυσμενείς για αυτά συνθήκες του περιβάλλοντος, όσο και στον σεξουαλικό ανταγωνισμό με τα άγρια αρσενικά. Τα εργαστηριακά έντομα θα πρέπει να είναι μεν ικανά να βρουν τροφή στο περιβάλλον, αλλά να μπορούν να τραφούν και από αυτήν, δηλαδή να μπορούν να την πέψουν και να την μεταβολίσουν. Η πλούσια και εύπεπτη διαίτα στην οποία υπόκεινται τα εργαστηριακά έντομα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, καθώς και η χρήση αντιβιοτικών έχει μειώσει τον πλούτο της μικροχλωρίδας του εντόμου στο εργαστήριο. Πρέπει λοιπόν τα έντομα που θα αφεθούν στο ύπαιθρο να καταφέρουν να επιζήσουν με την «εργαστηριακή» μικροχλωρίδα που φέρουν και να ανταγωνιστούν τα εύκολα τρεφόμενα στη φύση άγρια άτομα. Επιπλέον, ίσως θα πρέπει να δοθεί προσοχή στο γεγονός ότι η μικροχλωρίδα των εντόμων, όπως έχει βρεθεί πρόσφατα επηρεάζει την ωογένεση και τη φυσιολογική λειτουργία της γονιμότητας (Dale & Welburn 2001, Zchori-Fein *et al.* 2006). Αυτό που ίσως θα πρέπει να γίνει είναι η μελέτη σε κάθε γενεά (σε περιπτώσεις μαζικής εκτροφής) της μικροχλωρίδας των εργαστηριακών εντόμων, και η καταγραφή των όποιων διαφορών μεταξύ των γενεών, καθώς και η σύγκριση τους με την άγρια. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε περιπτώσεις μαζικής εκτροφής του δάκου της ελιάς, το έντομο είναι πιο ευαίσθητο και πιο ευπαθές στην ανάπτυξη βακτηρίων.

Το κεφάλαιο αυτό της σύστασης της μικροχλωρίδας του δάκου της ελιάς και οι διαφορές μεταξύ των διαφόρων στελεχών του εντόμου, είναι ένας τομέας που χρειάζεται πολύ προσοχή και πολύ περισσότερη μελέτη και έρευνα. Πολλοί ερευνητές στις μέρες μας προσπαθούν να δώσουν μια σαφή απάντηση, μια καθαρή εικόνα για το τι πραγματικά συμβαίνει στο εσωτερικό του εντόμου. Ίσως πρόκειται για ένα δυναμικό σύστημα, που είτε αλλάζει «οπορτουνιστικά», ανάλογα με τις διατροφικές του συνήθειες και συνθήκες. Περισσότερη λοιπόν έρευνα κρίνεται απαραίτητη, και ένα μέρος της παρουσιάστηκε παραπάνω.

7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ- ABSTRACT

«Η μικροχλωρίδα σε διαφορετικά στελέχη του δάκου της ελιάς (*Bactrocera (Dacus) oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae))»

A.A. Χρυσσαργύρης¹, Κ. Μπούρτζης² και Α.Π. Οικονομόπουλος¹

¹Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας, Εργαστήριο Εφαρμοσμένης Εντομολογίας, Τ.Θ. 2208, Ηράκλειο Κρήτης

²Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Σεφέρη 2, 30100, Αγρίνιο

Περίληψη

Αντικείμενο της έρευνας ήταν η μελέτη και εντοπισμός τυχόν διαφορών στην μικροχλωρίδα σε διαφορετικά στελέχη του δάκου της ελιάς: εργαστηριακής αποικίας, διαγονιδιακού, φυσικοί πληθυσμοί διαφόρων οικοτόπων, ποικιλιών ελιάς, εποχών έτους. Στόχος ο εντοπισμός τυχόν δραστικών αλλαγών στη μικροχλωρίδα του εντόμου. Από τα παραπάνω στελέχη απομονώθηκαν βακτήρια, τα οποία αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο L.B. (Luria- Broth). Στη συνέχεια έγινε επανακαλλιέργεια των αποικιών στο ίδιο θρεπτικό έτσι ώστε να έχουμε μοναδικές αποικίες από το κάθε στέλεχος για κάθε διαφορετική αποικία που μπορούσαμε να διακρίνουμε τουλάχιστον μακροσκοπικά (2-4 σε κάθε στέλεχος), και ταυτόχρονα έγινε παρατήρηση και περιγραφή των αποικιών και η stock καλλιέργεια τους σε υγρό θρεπτικό με τη χρήση γλυκερόλης. Στη συνέχεια με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR- PCR colony) στην οποία χρησιμοποιήσαμε σπασμένα κύτταρα βακτηρίων, πολλαπλασιάσαμε το DNA των βακτηρίων που είχαμε απομονώσει, με τη χρήση εκκινητών (primers) και ενζύμων κατάλληλων για τον πολλαπλασιασμό βακτηριακού DNA. Μετά από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της παραπάνω αντίδρασης σε gel αγαρόζης για να διαχωρίσουμε τα μόρια DNA με βάση το μήκος τους, καθάρισαμε το προϊόν της αντίδρασης (PEG precipitation of PCR product) και κάναμε την ποσοτικοποίησή του και τα δείγματά ήταν έτοιμα για αλληλούχιση (sequencing) του DNA τους.

“Microflora in different strain of olive fruit fly (*Bactrocera (Dacus) oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae))”

A.A. Chrysargyris¹, K. Bourtzis² and A.P. Economopoulos³

¹University of Crete, Department of Biology, Laboratory of Applied Entomology, P.O. Box 2208, Heraklion, Crete

²University of Ioannina, Department of Environmental and Natural Resources Management, 2 Seferi Street, P.O. Box 30100 Agrinio

Abstract

The microorganisms associated with different strains of the olive fruit fly were examined, in case to find differences of the microflora among wild and laboratory populations. Bacteria were isolated from pupae of different climatic locations, olive fruit cultivars, and seasons of the year, as well as that of laboratory strains. Pupae were homogenized and cultivated in Luria-Broth medium, after external sterilization. Single bacterial colonies were examined macroscopically and different patterns were obtained from each strain. The molecular analysis (DNA extraction and 16S rRNA gene amplification) shown that several different bacterial species and fungi were isolated and differences appeared to exist, among others, between laboratory and wild strains from different olive cultivars and seasons of the year.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Belcari, A., P. Sacchetti, G. Marchi and G. Surico. 2003. La mosca delle olive e la simbiosi batterica. *Informatore Fitopatologico*, Anno LIII, n.9.

Boller, E. 1972. Behavioral aspects of mass-rearing of insects. *Entomophaga* 17:9-25.

Boller, E.F. and R.J. Prokopy. 1976. Bionomics and Management of *Rhagoletis*. *Ann. Rev. Ins. Phys.*: 223-246.

Boller, E. and D.L. Chambers. 1977a. Quality control. An Idea Book for Fruit Fly Workers. *Int. Org. Biol. Contr./ West Pal. Reg. Sect.Bull.* 1977/5.

Boller, E. and D.L. Chambers. 1977b. Concepts and approaches. In: Quality control. An Idea Book for Fruit Fly Workers. *IOBC/ W.P.R.S., Bull.* 1977/5, p. 4-13.

Boush, G.M. and F. Matsumura. 1967. Insecticidal degradation by *Pseudomonas melophthora*, the bacterial symbiote of the apple maggot. *J. Econ. Entomol.* 60 : 918-920.

Bush, G.L and G.B. Kitto. 1979. Research on the genetic structure of wild and laboratory strains of olive fly. Report to the Government of Greece, UNDP and FAO, Program GRE69/525, pp. 26.

Capuzzo, C., G. Firrao, L. Mazzon, A. Squartini and V. Girolami. 2005. “*Candidatus Erwinia Dacicola*”, a coevolved symbiotic bacterium of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Gmelin). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55: 1641-1647.

Chambers, D.L. 1977. Quality control in mass rearing. *Annu. Rev. Entomol.* 22:289-308.

Chambers, D.L. 1980. Review: SIRM with special reference to quality control. Proc. Symp. "Fruit Fly Problems", Kyoto and Naha, p. 1-5.

Christenson, L.D. and R.H. Foote. 1960. Biology of fruit flies. Ann. Rev. Entomol. 5: 171-192.

Cogan, B.H. and J.D. Munro. 1980. Family Tephritidae. In : Catalogue of the Diptera of the Afrotropical Region. London, British Museum (Natural History). (Ed. R.W. Crosskey) : 518-554.

Dale, C. and S.C. Welburn. 2001. The Endosymbionts of Tsetse Flies: Manipulating Host-Parasite Interactions. *International Journal of Parasitology*. 31. 628-631.

Dillon, R. J., V. M. Dillon. 2004. The gut bacteria of insects : nonpathogenic interactions. Annual Review of Entomology 49 : 71-92.

Drew, R.I. 1989. The taxonomy and distribution of the Tropical and Subtropical Dacinae (Diptera : Tephritidae). In : World Crop Pests. Fruit flies: Their biology, natural enemies and control. (Eds. A.S. Robinson and G. Hooper), Elsevier, vol. 3A : 9-14.

Economopoulos, A.P. 1972. Sexual competitiveness of γ -ray sterilized males of *Dacus oleae*. Mating frequency of artificially reared and wild females. Env. Entomol. 1:490-497.

Economopoulos, A.P. 1977a. Controlling *Dacus oleae* by fluorescent yellowtraps. Entomol. Exp. Appl. 22: 183-190.

Economopoulos, A.P. 1977b. Gamma-ray sterilization of *Dacus oleae* (Gmelin). Effect of nitrogen on the competitiveness of irradiated males. Z. Ang. Entomol. 83:86-95.

Economopoulos, A.P. 1979. Application of color traps for *Dacus oleae* control: olive groves with different degrees of isolation, tree-size and canopy density. International Symposium on Integrated Control in Agriculture and Forestry, October 8-12, 1979, Vienna, Austria. Bundesanstalt für Pflanzenschutz, Vienna. IOBC/WPRS Bulletin. 2/1: 42-49.

Ercolani, G.L. 1978. *Pseudomonas savastanoi* and other bacteria colonizing the surface of the olive leaves in the field. J. Gen. Microb. 109: 245-257.

FAOSTAT Agricultural Data, <http://faostat.fao.org>. (2003)

Fiestas, R.D.U., J.A. Constante, R.M. Duran and A.V. Roncero. 1972. Etude d'un attractif naturel pour *Dacus oleae*. Annals of the Entomological Society of France, **8**: 179-188.

Fitt, G.P. and R.G. O'Brien. 1985. Bacteria associated with four species of *Dacus* (Diptera: Tephritidae) and their role in the nutrition of larvae. Oecologia, **67**: 447-454.

Foote, R.H. 1984. Tephritidae (Trypetidae). In : A catalogue of Palearctic Diptera 9. (Eds. A. Soos and L.Papp.) Budapest, Akademiai Kiad. **6** : 66-149.

Fytizas, E. and M.E. Tzanakakis. 1966a. Some effects of streptomycin, when added to the adult food, on the adults of *Dacus oleae*: Fecundity as affected by mating, adult diet and artificial rearing. Ann. Entomol. Soc. Am. **69** 725-729.

Fytizas, E. and M.E. Tzanakakis. 1966b. Development des larves de *Dacus oleae* dans des olives lorsque leur parent a reçu la streptomycine, incorporée à leur nourriture. Annales des Epiphyties **17**: 53-69.

Girolami, V. 1982. Fruit fly symbiosis and adult survival: General aspects. In: Fruit Flies of Economic Importance. CEC/IOBC Symposium Athens/ Nov. 1982. (Ed. R. Cavalloro): 74-77.

Girolami, V., A. Strapazzon and P.F. De Gerloni. 1983. In: Fruit flies of Economic Importance. Proceedings of CEC/IOBC International Symposium, November 1982, Athens, p. 258-267. Cavalloro R. edition.

Gmelin, J. F. 1790. Caroli a Linne, Systema naturae, per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Ed. 13, 1 Regnum Animale, (5) : 2225-3020.

Hagen, K.S., L. Santas and A. Tsekouras. 1963. A technique of culturing the olive fly, *Dacus oleae* Gmel., on synthetic media under xenic conditions. In: Radiation and Radioisotopes Applied to Insects of Agricultural Importance. Proceedings Symposium, Athens 22-26 April 1963, International Atomic Energy Agency, Vienna, STI/PUB/74:333-356.

Hagen, K.S. 1966. Dependence of the olive fly *Dacus oleae* larvae on symbiosis with *Pseudomonas savastanoi* for the utilization of olive. Nature (London) 209:423-424.

Haniotakis, G.E. and N. Avtzis. 1977. Mortality in *Dacus oleae* through infection with *Pseudomonas putida*. Ann.Zool.Ecol.Anim.9:299-311.

Haniotakis, G.E. 1979. Pheromone studies of the olive fruit fly, *Dacus oleae*. Final report to NATO, Res. Grant No. 1352, pp. 69.

Hardy, D.E. 1951. The Krauss collection of Australian fruit flies (Tephritidae – Diptera). Pacific Science 5 : 115-189.

Hardy, D.E. 1977. Tephritidae (Trypetidae, Trypaneidae). In : A catalogue of the Diptera of the Oriental Region, 3. Honolulu, Bishop Museum. (Eds Definlando M.D. and Hardy D.E).

- Hellmuth, J. 1956.** Untersuchungen zur Bakteriensymbiose der Trypetiden. Z. Morphol. Okol. Tiere. 4.
- Howard, D.J., G.L. Bush and J.A. Breznak. 1985.** The evolutionary significance of bacteria associated with *Rhagoletis*. Evolution 39: 405-417.
- Howard, D.J. 1987.** The symbionts of *Rhagoletis*. In “Fruit flies their biology, natural enemies and control”, Vol.3A. (Eds.Robinson A.S. Hooper G.) Elsevier.
- Huettel, M.D. 1977.** Measuring overall performance. In: Quality control. An Idea Book for Fruit Fly Workers. Eds. E. Boller and D.L. Chambers, IOBC/ W.P.R.S., Bull. 1977/5, p. 14-16.
- Konstantopoulou, M. A., D. G. Raptopoulos, N. G. Stavrakis and B. E. Mazomenos. 2005.** Microflora species and their volatile compounds affecting the development of an alcohol dehydrogenase homozygous strain (*Adh-I*) of *Bactrocera (Dacus) oleae* (Diptera: Tephritidae). Journal of Economic Entomology. Ecotoxicology. Volume 98, Number 6, pp. 1943-1949.
- Koukidou, M., A. Klinakis, C. Reboulakis, L. Zagoraiou, N. Tavernarakis, I. Livadaras, A. Economopoulos and C. Savakis. 2006.** Germ line transformation of the olive fly *Bactrocera oleae* using a versatile transgenesis marker. Insect Molecular Biology 15 (1), 95–103.
- Krimbas, C.B. 1963.** A contribution to the cytogenetics of *Dacus oleae* (Gmel) (Diptera: Tephritidae): the salivary gland and mitotic chromosomes. Caryologia, 16: 371-376.
- Κωνσταντοπούλου, Α. Μ. 1997.** Διδακτορική διατριβή “Τεχνητή εκτροφή και βιοχημικές αλλαγές στο δάκο της ελιάς *Bactrocera (Dacus) oleae* (Gmel.) στελέχη *Adh* : ποιότητα , διατροφή” . Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας. Αθήνα.

Lawyer FC, S. Stoffel, R.K. Saiki , S.Y. Chang, P.A. Landre, R.D. Abramson and D.H Gelfand. 1993. "High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity". *PCR Methods Appl.* 2: 275-287.

Loukas, M. 1989. Population genetics studies of fruit flies of economic importance, especially med fly and olive fruit fly, using electrophoretic methods. pp. 69-102. In H.D. Loxdale and J. den Hollander [eds.], *Electrophoretic studies on agricultural pests*, vol.39. Clarendon, Oxford, UK.

Luethy, P., D. Studer, F. Jaquet and C. Yamvrias. 1983. Morphology and in vitro cultivation of the bacterial symbiote of *Dacus oleae*. *Mitt. Schweiz. Entomol. Gesellschaft* 56:67-72.

Mackauer, M. 1972. Genetic aspects of insect production. *Entomophaga* 17:27-48.

Mackauer, M. 1976. Genetic problems in the production of biological control agents. *Ann. Rev. Entomol.* 21:369-385.

Manoukas, A.G. and B. Mazomenos. 1977. Effect of antimicrobials upon eggs and larvae of *Dacus oleae* (Diptera, *Tephritidae*) and use of propionates as larval diet preservatives. *Ann. Zool. Anim.* 9(2): 277-285.

Manoukas, A.G. 1975. Low cost larval diets for mass production of the olive fruit fly. *J. Econ. Entomol.* 68:22-24.

Manousis, T. and D.J. Ellar. 1988. *Dacus oleae* microbial symbiots. *Microbiol. Sci.* 5:149-152.

Mavragani-Tsipidou, P., G. Karamanlidou, A. Zacharopoulou, S. Koliais and C.D. Kastritsis. 1992. Mitotic and polytene chromosome analysis in *Dacus oleae* (Diptera: *Tephritidae*). *Genome*, 35: 373-378.

- Mavragani-Tsipidou, P. 2002.** Genetic and cytogenetic analysis of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *Genetica*, 116: 45-57.
- Mazzini, M. and G. Vita. 1981.** Identificazione submicroscopica del meccanismo di trasmissione del batterio simbiote in *Dacus oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae). *Redia* 64: 277-301.
- Miyazaki, S., G.M. Boush and R.J. Baerwald. 1968.** Amino acid synthesis by *Pseudomonas melophthora*, the bacterial symbiote of *Rhagoletis pomonella*. *J. Insect Physiol.* 14 : 513-518.
- Narasaki, T. and K. Katakura. 1954.** Fundamental studies on the utilization of olive fruits. II. Identification of the amino acids in the protein hydrolyzate of ripe olive fresh by paper chromatography. *Technical Bulletin of the Kagawa Agriculture College* 6: 194-198.
- Petri, L. 1910.** Untersuchung uber die Darmbakterien der Olivenfliege. *Zentralblatt fuer Bakteriologie. Parasitenkunde. Infektionskrankheiten und Hygiene* 26: 357-367.
- Ποντίκης, Κ. 1992.** Ελαιοκομία. Εκδόσεις Σταμούλης, Πειραιάς.
- Prokory, R.J., A.P. Economopoulos and M.W. MacFadden. 1975a.** Attraction of wild and laboratory-cultured *Dacus oleae* flies to small rectangles of different hues, shades and tints. *Ent. Exp. & Appl.* 18: 141-152.
- Prokory, R.J., G.E. Haniotakis and A.P. Economopoulos. 1975b.** Comparative behavior of lab-cultured and wild-type *Dacus oleae* flies in the field. In: *Controlling Fruit Flies by Sterile Insect Technique*, IAEA, Vienna, STI/PUB/392, p. 101-108.
- Prota, R. 1979.** *IOBC/WPRS Bulletin.* 2/1: 5-15.

Ratner, S.S. and J.G. Stoffolano. 1982. Development of the oesophageal bulb of the apple maggot *Rhagoletis pomonella* (Diptera : Tephritidae): morphological histological and histochemical study. *Ann. of the Entom. Soc. of America* 75(5): 555-562.

Ratner, S.S. and J.G. Stoffolano. 1984. Ultrastructural changes of the oesophageal bulb of the adult female apple maggot *Rhagoletis pomonella*. *J. Insect Morphol. Embryol.* 13(3): 191-208.

Remund, V., E.F. Boller, A.P. Economopoulos and J.A. Tsitsipis. 1977. Flight performance of *Dacus oleae* reared on olives and artificial diet. *Z. Ang. Entomol.* 82: 330-339.

Rossiter, M. C., D. J. Howard and G. L. Bush. 1982. Symbiotic bacteria of *Rhagoletis pomonella*. pp. 77-84. In *Fruit flies of economic importance. Proceedings, CEC/IOBC Symposium Athens, November 1982.* A.A Balkema, Rotterdam.

Sacchetti, P., A. Granchietti, S. Landini, A. Camèra, M.C. Rosi and A. Belcari. 2006. The olive fly : studies of the role of associated bacteria on its biology, rearing and behaviour. (in press).

Savva-Dimopoulou C. and E. Fytizas 1967. Accumulation des anides libres dans le mesocarpe de l' olive apres conservation a basse temperature. *Canadian Journal of Biochemistry*, 45: 1965-1971.

Stammer, H.J. 1929. Die Bakteriensymbiote der Trypetiden (Diptera). *Z. Morphol. Okol. Tiere* 15:481- 523.

Stasinakis, P., V. Katsares and P. Mavragani-Tsipidou. 2001. Organophosphate resistance and allelic frequencies of esterases in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *Journal of agricultural and urban entomology*, 18: 157-168.

Suzuki, D.T., A.J.F. Griffiths, J.H. Miller, R.C. Lewontin and W.M. Gelbart. 2000. An introduction to genetic analysis. W. H. Freeman and Company, New York.

Tsiropoulos, G.I. 1983. Microflora associated with wild and laboratory reared olive fruit flies, *Dacus oleae* (Gmel.). *Z. Ang. Entom.* 96: 337-340.

Tsiropoulos, G.J. 1992. Feeding and Dietary Requirements of the Tephritid Fruit Flies. In: *Advances in Insect Rearing for Research and Pest Management*. Westview Press Inc. 7: 93-118.

Τσιτσιπής Ι. 1981. Η επίδραση των παραγόντων του περιβάλλοντος θερμοκρασία, υγρασία, φως, στο δάκο της ελιάς, *Dacus oleae* (Gmelin), και η βελτίωση της τεχνητής εκτροφής του. Διατριβή επί υφηγεσία. Σελ. 68-69.

Tsitsipis, J.A. and A. Kontos. 1983. Improved solid adult diet for the olive fruit fly *Dacus oleae*. *Entomologia Hellenica* 1: 24-29.

Τζανακάκης, Μ.Ε. και Β.Ι. Κατσόγιαννος. 1998. Έντομα καρποφόρων δέντρων και αμπέλου. Αθήνα. Εκδόσεις Αγρότυπο, σελ. 265-273.

Τζανακάκης, Μ.Ε. 1980. Μαθήματα Εφαρμοσμένης Εντομολογίας. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Τζανακάκης, Μ.Ε. 1995. Εντομολογία. University Studio Press.

Tzanakakis, M.E. and A.S. Stavrinidis. 1973. Inhibition of development of larvae of the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae), in olives treated with streptomycin. *Entomol. Exp. Appl.* 16: 39-47.

Tzanakakis, M.E., A.P. Economopoulos and J.A. Tsitsipis. 1970. Rearing and nutrition of the olive fruit fly. I. Improved larval diet and simple containers. *J. Econ. Entomol.* 63:317-318.

USDA, FAO, IAEA. 1998. Product quality control, irradiation and shipping procedures for mass-reared Tephritid fruit flies for sterile insect release programs. IAEA (Insect and Pest Control Section), Vienna, Austria.

Vakirtzi-Lemonias, C., C. Karachalios and M.E. Tzanakakis. 1969. Lipids of the adult olive fruit fly. Total lipids and major lipid fractions. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 62: 1290-1293.

Vontas, J.G., N. Cosmidis, M. Loukas, S. Tsakas, M.J. Hejazi, A. Ayoutanti and J. Hemingway. 2001. Altered acetylcholinesterase confers organophosphate resistance in *Bactrocera oleae*. *Pestic. biochemical physiology*, 71: 124-132.

Vontas, J.G., M.J. Hejazi, N.J. Hawkes, N. Cosmidis, M. Loukas and J. Hemingway. 2002. Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase, in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Insect Molecular Biology* 11: 329-336.

Weisburg, W. G., S.M. Barns, D.A. Pelletier and D.J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697-703.

White, I.M. and M. Elson Harris. 1992. Fruit flies of economic significance: Their identification and bionomics. (Eds. CAB), U.K.

White, I.M. and X.J. Wang. 1992. Taxonomic notes on some dacine (Diptera: Tephritidae) fruit flies associated with citrus, olives and cucurbis. *Bulletin of Entomological Research* 82 : 275-279.

Wood, R.J., L.C. Marchini, E. Bush-Peterson and D.J. Harris. 1980. Genetic studies of Tephritid flies in relation to their control. *Proc. Symp. "Fruit Fly Problems"*, Kyoto and Naha, p. 47-54.

Yamvrias, C., C.G. Panagopoulos and P.G. Psallidas. 1970. Preliminary study of the internal bacterial flora of the olive fruit fly (*Dacus oleae*, Gmelin). Ann. Ins. Phyt. Benaki 9: 201-206.

Zambetaki, A., K. Kleanthous and P. Mavragani-Tsipidou. 1995. Cytogenetic analysis of Malpighian tubule and salivary gland polytene chromosomes of *Bactrocera oleae* (*Dacus oleae*) (Diptera: Tephritidae). Genome, 38: 1070-1081.

Zchori-Fein, E., B. Chandresh and A.R. Harari. 2006. Oogenesis in the date stone beetle, *Coccotrypes dactyliperda*, depends on symbiotic bacteria. Physiological Entomology 31: 164-169.

Zouros, E., M. Loukas, A.P. Economopoulos and B. Mazomenos. 1982. Selection at the alcohol dehydrogenase locus of the olive fruit fly *Dacus oleae* under artificial rearing. Heredity 43(2): 169-185.

ΣΥΝΟΛΕΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ