Πανεπιστήμιο Κρήτης
Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών

Τμήμα Βιολογίας

Βελτίωση χρήσης του αρπακτικού *Amblyseius swirskii* (Phytoseiidae) ως παράγοντα βιολογικού ελέγχου

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
Μοριακή και Εφαρμοσμένη Βιολογία Φυτών
- Πράσινη Βιοτεχνολογία

ΚΑΡΑΚΩΣΤΑ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

Ηράκλειο 2022

Επιβλέπων καθηγητής: Βόντας Ιωάννης, ερευνητής ΙΤΕ – ΙΜΒΒ
2ος εξεταστής: Καλαντίδης Κρίτων, Καθηγητής – ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
3ος εξεταστής: Τσαγκαράκου Αναστασία, ερευνήτρια Α' ΕΛΓΟ – ΔΗΜΗΤΡΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρώτα απ’ όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα, τον καθηγητή μου κ. Βόντα για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετέχω στην ομάδα του. Είμαι ευγνώμων για την γνωριμία μας αλλά και τη βοήθεια που μου προσέφερε σε αυτό το κομμάτι της εκπαιδευτικής μου πορείας καθώς και της επαγγελματικής μου και προσωπικής μου ανάπτυξης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Τσαγκαράκου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε συμπεριλαμβάνοντάς με στην εργαστηριακή της ομάδα, για τη συμμετοχή της στην εκπόνηση της μεταπτυχιακή εργασία αλλά και τη δυνατότητα που μου έδωσε να εργαστώ στο εργαστήριο της. Τις γνώσεις που απέκτησα από την ίδια και η καθοδήγηση που μου προσέφερε σε κάθε μου βήμα, θα τα κουβαλάω μαζί μου σε όλη μου τη ζωή.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Καλαντίδη ως μέλος της επιτροπής, αλλά και ως καθηγητή μου. Η συνεισφορά του ήταν σημαντική, τόσο στο πρόγραμμα σπουδών του Μεταπτυχιακού Προγράμματος αλλα και σε εμένα για τις γνώσεις και για τον τρόπο με τον οποίο μου έμαθε να προσεγγίζω την γνώση και την έρευνα.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα παιδια του εργαστηρίου. Ιδιαίτερα την Αγγελική, για τη βοήθεια και τις γνώσεις που μου προσέφερε όλο αυτό το διάστημα, καθώς και για την υπομονή της, κατά τη συγγραφή της εργασίας μου. Ευχαριστώ τον Άρη για τις πολύτιμες συμβουλές του, τις οποίες προσδοκώ και στο μέλλον, γιατί δεν θα τη γλιτώσει. Για το φίλο, αδερφό και συνάδελφο Μιχάλη, οτι και να πω, θα είναι λίγο, και ελπίζω σύντομα να ξανά συνεργαστούμε, αλλα και να μην γίνει θα είναι για καλό, ευχαριστώ για όλα. Ευχαριστώ την μαμά Στέλλα για τη φροντίδα της. Ήσασταν όλοι εδώ για εμένα, οτιδήποτε και αν χρειαζόμουν, είμαι πολύ χαρούμενη και ευγνώμων που σας γνώρισα. Ευχαριστίες στον κ. Νεκτάριο Καβρουλάκη, ερευνητή ΙΕΛΥΑ, ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ, που μας διέθεσε τα φυτά τομάτας με το *Fusarium Solani* - K (FSK).

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους φίλους μου, για την μεγάλη υπομονή που έδειξαν όλο αυτό τον καιρό, από την αρχή του μεταπτυχιακού προγράμματος ως το τέλος. Τις συμφοιτήτριες μου, τα κοριτσια (hey the girls), για τις όμορφες στιγμές που περάσαμε μαζί, από την πρώτη μέρα των μαθημάτων που γνωριστήκαμε. Ιδιαίτερα την αδελφή ψυχή μου, Μαρία, για όλες τις στιγμές που περάσαμε μαζί τον τελευταίο χρόνο, νιώθω ευγνώμων που την έχω στη ζωή μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ένα μεγάλο κομμάτι της καρδιάς μου, τον Άκη και τον Sherlock για την συμπαράσταση και την υπομονή τους περιμένοντας να με δούνε έστω λίγες ώρες. Ευχαριστώ τους γονείς μου και τις αδερφές μου, για τη στήριξη τους, αν και τόσο μακριά, τους ένιωθα δίπλα μου. Ευχαριστώ που με στηρίζατε σε κάθε μου βήμα.

Περίληψη

Σε μια γεωργία που ακόμη χαρακτηρίζεται από τη χρήση φυτοφαρμάκων, η βιολογική καταπολέμηση έχει καταφέρει να βρει τη θέση της, κυρίως υπό τη μορφή απελευθέρωσης φυσικών εχθρών. Η ολοκληρωμένη διαχείριση επιβλαβών γεωργικών εχθρών στηρίζεται στην εφαρμογή ωφέλιμων οργανισμών σε συνδυασμό με τη χημική καταπολέμηση, γεγονός που προϋποθέτει τη συμβατότητα τους. Αρπακτικά ακάρεα της οικογένειας Phytoseiidae είναι εμπορικά διαθέσιμα και τα τελευταία χρόνια έχουν καθιερωθεί ως βιολογικοί παράγοντες ελέγχου. Το *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae) είναι ένας από τους θηρευτές που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των αλευρωδών και του θρίπα σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες, εκτός της τομάτας στην οποία δεν μπορεί να αναπτυχθεί. Σκοπός αυτής της μελέτης είναι η μελέτη του αρπακτικού *Amblyseius swirskii* για την βελτίωση της χρήσης του ως παράγοντα βιολογικού ελέγχου και η εξέταση διαφόρων χαρακτηριστικών φυτών τομάτας που το επηρεάζουν.

Πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της τοξικότητας δύο εντομοκτόνων, spinosad και abamectin έναντι δύο πληθυσμών *A. swirskii* (ενός εμπορικού και ενός άγριου) και διερευνήθηκε η παρουσία πιθανών μεταλλαγών που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στην abamectin. Επίσης συγκρίθηκαν οι ρυθμοί θήρευσης και ωοτοκίας των δύο πληθυσμών, χορηγώντας ως λεία, αυγά *Bemisia tabaci*. Επιπρόσθετα μελετήθηκε η γενετική ποικιλομορφία των δύο πληθυσμών, χρησιμοποιώντας το μιτοχονδριακό δείκτη COI ενώ διερευνήθηκε και η αναπαραγωγική συμβατότητα μεταξύ των δύο πληθυσμών καθώς και η παρουσία σε αυτούς των ενδοσυμβιωτικών βακτηρίων *Wolbachia, Rickettsia, Cardinium, Spiroplasma, Hamiltonella, Arsenophonus*.

Στον άγριο πληθυσμό εντοπίστηκε υψηλότερη ανθεκτικότητα στις δύο δραστικές ουσίες, σε σύγκριση με τον εμπορικό πληθυσμό. Επιπλέον, στον άγριο πληθυσμό δεν βρέθηκαν γνωστές μεταλλαγές στην αλληλουχία του καναλιού χλωρίου (Glutamate-gated chloride channel, GluCl). Παρατηρήθηκε υψηλότερος ρυθμός θήρευσης στον άγριο πληθυσμό. Ο μιτοχνδριακός δείκτης έδειξε χαμηλή γενετική ποικιλομορφία στους δύο πληθυσμούς. Ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς εντοπίστηκε αναπαραγωγική συμβατότητα και απουσία των παραπάνω ενδοσυμβιωτικών βακτηρίων.

Επιπλέον σκοπός της έρευνας είναι η διερεύνηση της εγκατάστασης του αρπακτικού *A. swirskii* σε φυτά τομάτας. Για το λόγο αυτό, ελέγχθηκε αρχικά η διασπορά και απόσταση που διανύει το άκαρι στο στέλεχος του φυτού, σε δύο εμπορικές ποικιλίες τομάτας, παρουσία και απουσία του ωφέλιμου ενδόφυτου στελέχους *Fusarium Solani* - K (FSK) και δεύτερον εκτιμήθηκε η πυκνότητα των τριχιδίων τύπου I, III και τύπου VI.

Η διασπορά και απόσταση που διανύει το άκαρι επηρεάζεται από τη ποικιλία τομάτας, αλλά όχι από το ωφέλιμο ενδόφυτο στέλεχος *Fusarium Solani* - K (FSK). Τέλος, βρέθηκε ότι η πυκνότητα από τα αδενώδη τριχίδια τύπου VI επηρεάζει την διασπορά του ακάρεως *A. swirskii*.

Εν κατακλείδι, προτείνεται περαιτέρω βελτίωση της αποτελεσματικότητας του εμπορικού πληθυσμού *A. swirskii* ως προς την ανθεκτικότητα και το ρυθμό θήρευσης μέσω εμπλουτισμού της γενετικής ποικιλότητας με άγριους πληθυσμούς που έχουν επιθυμητά χαρακτηριστικά. Επιπλέον μπορούν να διερευνηθούν ποικιλίες τομάτας ως προς την πυκνότητα των αδενωδών τριχιδίων τους, ώστε να εντοπιστούν ποικιλίες πιο ευνοϊκές για τα αρπακτικά Phytoseiidae.

Λέξεις-κλειδιά: Phytoseiidae, *Amblyseius swirskii*, βιολογικός παράγοντας ελέγχου, abamectin, spinosad, ανθεκτικότητα, τομάτα, *Fusarium Solani* – K, τριχίδια

Abstract

In a period, which the agriculture is still characterized by the use of pesticides, biological control has established, in the form of the release of natural enemies. The integrated pest management is the use of beneficial organisms in combination with chemical control and their between compatibility is required. The predatory mites of Phytoseiidae family are commercially available and recently established as biological control agents. *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae) is one of the predators used for biological control of whiteflies and thrips in greenhouse and cover crops, except for the tomato crop on which it cannot establish. The purpose of this study is to investigate the predator characterisitcs of *Amblyseius swirskii* to improve its use as a biological control agent and to investigate the tomato plant characteristics which affect it.

The resistance of a commercial population and a wild population to two active insecticides, spinosad and abamectin, was assessed. Then the presence of potential mutations associated with resistance of abamectin was investigated. Moreover, we compared the predation rate and the oviposition rate of the two populations, providing as prey, eggs of *Bemisia tabaci*. Furthermore, the genetic diversity of the two populations was studied, using a mitochondrial marker COI. Additionally, reproductive compatibility between the two populations was investigated by cross-breeding and the presence of endosymbiotic bacteria *Wolbachia*, *Rickettsia*, *Cardinium*, *Spiroplasma*, *Hamiltonella*, *Arsenophonus*.

The wild population was detected to be more resistant to the two active substances, compared to the commercial population. In addition, none of the known mutations in the GluCl gene sequence were found in the wild population. A higher rate of predation was observed in the wild population. The mitochondrial marker COI showed low genetic variability in the two populations. Reproductive compatibility and absence of endosymbiotic bacteria were identified between the two populations.

An additional purpose of this research is to investigate the installation of *A. swirskii* predator on tomato plants. For this reason, the dispersal and the distance that the mite traversed on the stem of the plant were checked in two commercial varieties of tomato, in the presence and absence of the beneficial endophytic strain Fusarium Solani - K (FSK). Secondly, the density of type I, III and type VI hairs was estimated. It was found that the dispersal and the distance traversed by the mite, is affected by the tomato variety, but not by the beneficial endophytic strain Fusarium Solani - K (FSK). Moreover, it was found that the density of type VI glandular hairs differs between the tomato varieties and affects the dispersal of *A. swirskii* mite.

In conclusion, to further improve the efficiency of the commercial population *Amblyseius swirskii* in terms of resistance and predation rate, it is proposed the genetic enrichment of the commercial population with wild populations which have desirable characteristics. Furthermore, tomato varieties can be investigated for the density of their glandular hairs, for the detection of varieties with favorable characteristics for the phytoseiid predators.

Key words: Phytoseiidae, *Amblyseius swirskii*, biological control agent, abamectin, spinosad, resistant, tomato, *Fusarium Solani* – K, trichomes

Πίνακας περιεχομένων

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ 3
Περίληψη 4
Abstract 5
Εισαγωγή 9
1. Χημική καταπολέμηση - Ανθεκτικότητα 9
2. Βιολογικός έλεγχος (Biocontrol) 10
3. Phytoseiidae 11
3.1 Ανθεκτικότητα Phytoseiidae σε εντομοκτόνα 12
3.2 Ενδοσυμβιώτες των Phytoseiidae 12
4. Τομάτα 13
4.1 Τριχίδια 14
4.2 Ενδόφυτο Fusarium solani – στέλεχος K (FSK) 15
4.3 Τα Phytoseiidae στη τομάτα 16
5. *Amblyseius swirskii* (Phytoseiidae) 17
Σκοπός και αντικείμενο 18
Κεφάλαιο 1: Διερεύνηση σημαντικών βιολογικών παραμέτρων του *Amblyseius swirskii* για βιολογικό έλεγχο 20
1.1 Μέθοδοι και υλικά 20
1.1.1 Πληθυσμοί *Amblyseius swirskii* 20
1.1.2 Χημικός έλεγχος με κλασσικά εντομοκτόνα 21
1.1.3 Έλεγχος για ανθεκτικότητα στόχου των καναλιών χλωρίου 22
1.1.4 Ρυθμός θήρευσης του *A. swirskii* 24
1.1.5 Γενετική ποικιλομορφία 26
1.1.4.1 Ανάλυση του γονιδίου *COI* 26
1.1.6 Διασταυρώσεις 28
1.1.7 Έλεγχος ενδοσυμβιωτικών βακτηρίων 29
1.2 Αποτελέσματα 30
1.2.1 Εκτίμηση ανθεκτικότητας σε κλασσικά εντομοκτόνα 30
1.2.2 Έλεγχος των καναλιών χλωρίου για μεταλλάξεις 32
1.2.3 Ρυθμός θήρευσης και ωοτοκίας του *A. swirskii* 32
1.2.4 Γενετική ποικιλομορφία 33
1.2.5 Διασταυρώσεις 35
1.2.6 Ενδοσυμβιώτες 35

1.3 Συζήτηση 36
Κεφάλαιο 2: Διερεύνηση φυτών τομάτας για βελτίωση της εγκατάστασης του *Amblyseius swirskii* 40
2.1 Υλικά και Μέθοδοι 40
2.1.1 Ποικιλίες τομάτας 40
2.1.2 Εξαπόλυση *A. swirskii* σε τομάτες 40
2.1.3 Τριχίδια στελέχους τομάτας 40
2.1.4 Στατιστική ανάλυση 41
2.2 Αποτελέσματα 41
2.2.1 Διασπορά και απόσταση των *A. swirskii* σε τομάτα 41
2.2.2 Τριχίδια στελέχους τομάτας 43
2.3 Συζήτηση 43
Σύνοψη 44
Βιβλιογραφία 45

Εισαγωγή

1. Χημική καταπολέμηση - Ανθεκτικότητα

Οι γεωργικές καλλιέργειες είναι ευάλωτες σε εχθρούς και σε περιπτώσεις προσβολής τους, υπάρχει απώλεια στην παραγωγή ή μείωση της ποιότητας των προϊόντων. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η ανθρώπινη παρέμβαση με σκοπό την καταπολέμηση των επιβλαβών για την γεωργία φυτοπαρασίτων. Η καταπολέμηση των επιβλαβών εντόμων και ακάρεων στην γεωργία με την χρήση εντομοκτόνων και ακαρεοκτόνων ονομάζεται χημική καταπολέμηση. Τα εντομοκτόνα και ακαρεοκτόνα μπορούν να ταξινομηθούν με διάφορους τρόπους, αλλά η πιο χρήσιμη ίσως μέθοδος ταξινόμησης γίνεται ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους, δηλαδή με ποιον τρόπο σκοτώνεται ή απωθείται το έντομο, όπως ορίζει η επιτροπή IRAC (Insecticide Resistance Action Committee) (IRAC, 2012). Τα φάρμακα αυτά κατατάσσονται σε κατηγορίες από λιγότερο ή πιο επιβλαβή, βάση των επιπτώσεων που προκαλούν στον οργανισμό στόχο.

Η κακή χρήση φυτοπροστατευτικών ουσιών, όπως ο τρόπος και η συχνότητα εφαρμογής τους, αφενός μειώνει την αποτελεσματικότητα τους και επιβαρύνει το περιβάλλον, αφετέρου οδηγεί στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας των εχθρών στις ουσίες αυτές (Mahmood, 2007). Η ανθεκτικότητα κατά των φυτοφαρμάκων συχνά αναπτύσσεται μετά από πολλαπλές εφαρμογές παρασιτοκτόνου στην ίδια περιοχή. Τα φυτοφάγα αρθρόποδα εξελίσσουν σταδιακά την αντίσταση τους καθυστερώντας την απορρόφηση των φυτοφαρμάκων στο σώμα τους, αυξάνοντας την αποτοξίκοποίηση της τοξίνης ή την απώλεια της ευαισθησίας στο σημείο δράσης της χημικής ουσίας (Roush & Tabashnik, 1990).

Η ανθεκτικότητα των εντόμων είναι μια κληρονομούμενη ιδιότητα και ορίζεται ως η ικανότητα ενός πληθυσμού να επιβιώνει μετά από έκθεση σε δόσεις δραστικής ουσίας που κανονικά θα ήταν θανατηφόρες. Η ανθεκτικότητα των εντόμων στα εντομοκτόνα οφείλεται στη φυσική γενετική παραλλακτικότητα του κάθε πληθυσμού. Με την πάροδο των γενεών, ένας πληθυσμός από ευπαθής, γίνεται ανθεκτικός με επιλογή των γονιδίων που προσδίδουν ανθεκτικότητα κατά του εντομοκτόνου και που ήδη υπάρχουν στον πληθυσμό. Παράγοντας επιλογής είναι το εντομοκτόνο, που επιλέγει τα γονίδια ανθεκτικότητας, θανατώνοντας τα ευπαθή άτομα.

Η εφαρμογή φυτοπροστατευτικών σκοτώνει επίσης ένα ευρύ φάσμα φυσικών εχθρών και μπορεί να οδηγήσει σε αναζωπύρωση του πληθυσμού των φυτοφάγων, εάν καταστραφεί ένα μεγάλο ποσοστό φυσικών εχθρών (Johnson & Tabashnik, 1999). Γι’ αυτό απαιτείται περαιτέρω ανάπτυξη στρατηγικών για τη μείωση των επιπτώσεων των φυτοπροστατευτικών ουσιών στους φυσικούς εχθρούς, όταν απαιτείται συνδυασμός χημικής και βιολογικής καταπολέμησης. Σκοπός είναι η εύρεση χημικών σκευασμάτων που δεν προκαλούν θνησιμότητα στους φυσικούς εχθρούς των φυτοφάγων και η επιλογή φυσικών εχθρών, ανθεκτικών κατά των εντομοκτόνων.

Σημαντική απόφαση είναι η επιλογή εντομοκτόνου με ελάχιστες επιδράσεις μη στόχου, με σκοπό τη διατήρηση φυσικών εχθρών των φυτοπαρασίτων καθώς αποτελούν κρίσιμο στοιχείο στα αγροικοσυστήματα. Η μελέτη αυτών των εντομοκτόνων μη στόχου αποτελεί επίσης και βασικό στοιχείο του επιτυχημένου βιολογικού ελέγχου. Ωστόσο, συνεχώς αναπτύσσονται νέα εντομοκτόνα, δημιουργώντας την ανάγκη να εξεταστούν οι επιπτώσεις τους σε βασικούς φυσικούς εχθρούς για τη διατήρηση προγραμμάτων ολοκληρωμένης διαχείρισης καταπολέμησης φυτοπαρασίτων. Η πιο καλά μελετημένοι φυσικοί εχθροί στην

έρευνα της επιλεκτικότητας εντομοκτόνων μη-στόχου είναι τα Phytoseiids, καθώς και η πιο σημαντική οικογένεια βιολογικών παραγόντων (Gerson et al., 2003).

2. Βιολογικός έλεγχος (Biocontrol)

Οι εχθροί των καλλιεργειών έχουν εξελιχθεί σε πολύ σοβαρό πρόβλημα τα τελευταία χρόνια εξαιτίας της μη αποτελεσματικής χρήσης των φυτοπροστατευτικών (εντομοκτόνων). Αρχικά τα χημικά εντομοκτόνα ήταν φθηνά και αποτελεσματικά, με αποτέλεσμα η χρήση τους να γίνει ανεξέλεγκτη. Συνειδητοποιώντας έπειτα ότι προκαλούσαν πολλά προβλήματα, συμπεριλαμβανομένων της μόλυνσης του νερού και του εδάφους, των επιπτώσεων στην ανθρώπινη υγεία, και στους οργανισμούς μη-στόχους, μειώνοντας τη βιοποικιλότητα. Ένα από τα σημαντικότερα οικολογικά προβλήματα των πολλαπλών εφαρμογών εντομοκτόνων, πέρα από τα περιβαλλοντικά, είναι ότι οι εχθροί ανέπτυξαν μεγάλης κλίμακας ανθεκτικότητα και συνεπώς η αποτελεσματικότητά των δραστικών ουσιών τους μειώθηκε. Συνεπώς ήταν αναγκαίο να βρεθεί μια εναλλακτική λύση για την αντιμετώπιση των επιβλαβών εντόμων των καλλιεργειών.

Το κλειδί για την καταπολέμηση επιβλαβών για τα φυτά οργανισμών είναι η χρήση βιώσιμων μεθόδων ελέγχου. Η καταστολή ενός πληθυσμού φυτοφάγων εχθρών, με τη χρήση άλλων οργανισμών που αποτελούν φυσικούς εχθρούς του επιβλαβούς οργανισμού, ονομάζεται βιολογικός έλεγχος (De Bach, 1964). Οι φυσικοί εχθροί, γνωστοί ως παράγοντες βιολογικού ελέγχου (biological control agents - BCAs), μπορεί να είναι αυτόχθονα ή μη παρασιτοειδή είδη, αρπακτικά και παθογόνα, τα οποία έχουν την ικανότητα να μειώνουν τους πληθυσμούς των επιβλαβών οργανισμών των καλλιεργειών. Η βιολογική καταπολέμηση των επιβλαβών για την γεωργία φυτοπαρασίτων βρίσκει ευρεία εφαρμογή τα τελευταία χρόνια (Arnó et al., 2010). Στόχος της εφαρμογής του βιολογικού ελέγχου είναι η καταστολή ενός επιβλαβή οργανισμού σε ένα επίπεδο που δεν αποτελεί πλέον οικονομική ζημιά, και ορισμένες φορές στοχεύει ακόμη στην εξάλειψή του από μια περιοχή (Eilenberg, 2006).

Η πρακτική της απελευθέρωσης των φυσικών εχθρών πέτυχε σε πολλές καλλιέργειες, ειδικά σε αυτές που καλλιεργούνται υπό συνθήκες θερμοκηπίου, και φάνηκε ότι μπορεί να μειώσει αισθητά τους πληθυσμούς των επιβλαβών οργανισμών (Javier Calvo et al., 2012). Παρόλα αυτά ο βιολογικός έλεγχος με ωφέλιμα αρπακτικά δεν μπορεί εξ ολοκλήρου να αντιμετωπίσει αποτελεσματικά τους εχθρούς, γι’ αυτό πραγματοποιούνται συνδυαστικοί μέθοδοι αντιμετώπισης με χημικές μεθόδους, όπως εντομοκτόνα συμβατικής ή βιολογικής προέλευσης.

Ως ολοκληρωμένη διαχείριση επιβλαβών οργανισμών (Integrated Pest Management- IPM), ορίζεται η αναστολή της ανάπτυξης των πληθυσμών αυτών της καλλιέργεια (FAO, 2021). Η IPM προωθεί την ανάπτυξη υγειών καλλιεργειών με την ελάχιστη δυνατή διαταραχή των αγροσυστημάτων και ενθαρρύνει τους φυσικούς μηχανισμούς ελέγχου κατά των επιβλαβών οργανισμών (Stenberg, 2017). Η διαχείριση αυτή είναι μια προσέγγιση πολλαπλών στρατηγικών για την καταπολέμηση εχθρών, με την προϋπόθεση ανάπτυξης πιο αποτελεσματικών συστημάτων και σκοπό την αύξηση της βιωσιμότητας των συστημάτων διατροφής και την αντιμετώπιση των βασικών παραγόντων για την αποφυγή μείωσης της βιοποικιλότητας. Η τάση είναι ο συνδυασμός της χρήσης βιολογικών, χημικών και φυσικών στρατηγικών, όπως βιολογικοί παράγοντες, παγίδες με φερορμόνες, επιλεγμένα χημικά παρασιτοκτόνα, καλλιεργητικά και μηχανικά μέσα.

Κατά την IPM γίνεται προσεκτική εξέταση όλων των διαθέσιμων επιλογών για τον έλεγχο των εχθρών των καλλιεργειών και επακόλουθη ενσωμάτωση των κατάλληλων μέτρων που εμποδίζουν την ανάπτυξη πληθυσμών από επιβλαβείς οργανισμούς. Η προσέγγιση αυτή της ολοκληρωμένης διαχείρισης, έχει μικρότερη εστίαση στη χρήση εντομοκτόνων και τελευταία έχει στραφεί στη βελτίωση των συστημάτων με τη συνδυαστική χρήση φυσικών εχθρών για καλύτερη καταστολή των φυτικών παρασίτων (Vafaie et al., 2021).

3. Phytoseiidae

Οι πιο γνωστοί φυσικοί εχθροί που χρησιμοποιούνται σε ευρεία κλίμακα σε προγράμματα ολοκληρωμένης διαχείρισης σε θερμοκήπια είναι τα ακάρεα Phytoseiidae της υποκατηγορίας Acari. Η οικογένεια των Phytoseiidae αρπακτικών ακάρεων (Acari: Phytoseiidae) έχει παγκόσμια κατανομή και περιλαμβάνει 67 διαφορετικά γένη και περισσότερα από 2.000 είδη. Οι McMurtry και η Croft (1997) κατηγοριοποίησαν την ποικιλομορφία των μορφών ζωής των Phytoseiidae, κυρίως με βάση τις διατροφικές τους συνήθειες. Ο τύπος I περιλαμβάνει εξειδικευμένους θηρευτές , όπως είναι το γένος *Phytoseiulus sp*. Ο τύπος II περιλαμβάνει θηρευτές εκλεκτικά εξειδικευμένους σε ακάρεα Tetranychidae, που αντιπροσωπεύονται από το *Galendromus sp*. και ορισμένα είδη του γένους *Neoseiulus sp*. Οι θηρευτές τύπου III είναι είναι μια τεράστια και ποικιλόμορφη ομάδα γενικευμένων θηρευτών, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται τα γένη *Typhlodromus spp*. και Amblyseius spp. Τέλος ο τύπος IV, είναι τα γενικευμένα αρπακτικά και εξειδικευμένα στη γύρη, που αντιπροσωπεύονται από τον *Euseius spp*.

Τα αρπακτικά ακάρεα της οικογένειας Phytoseiidae (Acari) παίζουν τον πρωταγωνιστικό ρόλο μεταξύ των χρησιμοποιούμενων παραγόντων βιολογικού ελέγχου. Τα είδη Phytoseiidae είναι μακράν η πιο σημαντική ομάδα εμπορικά διαθέσιμων αρθρόποδων, βιολογικών παραγόντων, με περίπου 20 είδη να προσφέρονται παγκοσμίως. Κάποια από τα πιο σημαντικά και συχνά χρησιμοποιούμενα είναι τα *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae), *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henroit (Acari: Phytoseiidae), *Neoseiulus cucumeris* Oudemans (Acari: Phytoseiidae) and *Neoseiulus californicus* McGregor (Acari: Phytoseiidae), και καλύπτουν μαζί περίπου τα δύο τρίτα ολόκληρης της αγοράς των αρθρόποδων ως βιολογικοί παράγοντες. Χρησιμοποιούνται κυρίως σε κλειστά συστήματα καλλιέργειας, θερμοκήπια, για τον έλεγχο φυτοφάγων ακάρεων, θριπών και αλευρωδών. Η χρήση σε συστήματα ανοιχτού πεδίου και στην κτηνοτροφία εξακολουθεί να είναι περιορισμένη. Έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε προγράμματα βιολογικού ελέγχου (Gerson et al., 2003; McMurtry & Croft, 1997).

Τα πολυφαγικά Phytoseiidae είδη έχουν χρησιμοποιηθεί σε διαφορετικές καλλιέργειες ως βιολογικοί παράγοντες ελέγχου των τετρανύχων (Gerson & Weintraub, 2007; McMurtry et al., 1970; Raworth, 2001), του αλευρώδη (Nomikou et al., 2002) καθώς και άλλων ειδών φυτοπαρασίτων, όπως θρίπες και αφίδες (McMurtry & Croft, 1997; Messelink et al., 2006) με ικανοποιητικά αποτελέσματα (van Lenteren, 2012). Είναι δημοφιλείς θηρευτές επειδή μπορούν εύκολα να εκτρέφονται μαζικά (Bjørnson, 2008), να απελευθερώνονται με μηχανικά μέσα, να μην εξαπλώνονται σε μεγάλες αποστάσεις και να ελέγχουν διάφορα είδη παρασίτων (Calvo et al., 2009).

3.1 Ανθεκτικότητα Phytoseiidae σε εντομοκτόνα

Παρά την ικανότητα των ωφέλιμων αρπακτικών να ελέγξουν διάφορα φυτοφάγα των καλλιεργειών, ορισμένες φορές απαιτούνται χημικές επεμβάσεις για τη διατήρηση των πληθυσμών αυτών σε κατώτατα όρια. Σχεδόν όλα τα θερμοκήπια ακολουθούν τα προγράμματα IPM που βασίζονται κυρίως σε βιολογικές στρατηγικές υποστηριζόμενες περιστασιακά με επιλεκτικές χημικές θεραπείες (Glass & González, 2012). Στις στρατηγικές ελέγχου απαιτείται ο συνδυασμός των μεθόδων, καθώς στη περίπτωση που χρησιμοποιείται μόνο χημικός έλεγχος, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα αποτυχίας, όταν οι πληθυσμοί των επιβλαβών οργανισμών αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα. Ωστόσο, η ανάπτυξη της ανθεκτικότητας των αρπακτικών στα εντομοκτόνα είναι επιθυμητή γιατί τους επιτρέπει να επιβιώσουν καλύτερα όταν χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με χημικό έλεγχο, και είναι ζωτικής σημασίας για τον βιώσιμο έλεγχο παρασίτων (Ghazy et al., 2016).

Η επιτυχής ολοκληρωμένη διαχείριση επιβλαβών οργανισμών των καλλιεργειών βασίζεται στην εφαρμογή επιλεκτικών φυτοφαρμάκων ώστε να μην εμποδίζουν το βιολογικό έλεγχο και καθορίζεται από τις επιπτώσεις τους στους φυσικούς εχθρούς. Συνεπώς, απαιτείται αξιολόγηση της συμβατότητας των εντομοκτόνων με τους φυσικούς εχθρούς. Τα Phytoseiidae ακάρεα αντιπροσωπεύουν σημαντικούς παράγοντες βιολογικού ελέγχου και σε κάποιες περιπτώσεις επηρεάζονται λιγότερο από τα φάρμακα σε σχέση με τα θήραμά τους (Duso et al., 2020). Η ανθεκτικότητα τους σε ορισμένα εντομοκτόνα οφείλεται στη φυσική ανοχή ή την ανθεκτικότητα που έχουν αναπτύξει έναντι αυτών.

3.2 Ενδοσυμβιώτες των Phytoseiidae

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναφερθεί διάφοροι ενδοσυμβιωτικοί παράγοντες των ακάρεων Phytoseiidae, που μπορεί να μεταβάλουν την αναπαραγωγή και τη συμπεριφορά του ξενιστή τους και συνεπώς να επηρεάσουν την απόδοση ως παράγοντες βιολογικού ελέγχου. Οι βακτηριακοί ενδοσυμβιώτες που συναντώνται στα φυτοπαράσιτα αρθρόποδα και τους φυσικούς εχθρούς τους έχουν ποικιλομορφία και ανήκουν σε διάφορες οικογένειες.

Τα πιο συχνά βακτήρια ανήκουν στην οικογένεια Rickettsiaceae, τα οποία είναι υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά και πολλαπλασιάζονται σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Οι ενδοσυμβιώτες αυτής της οικογένειας που βρίσκονται στα αρθρόποδα, ανήκουν στο γένος *Rickettsia* και *Wolbachia*. Τα μέλη του γένους *Rickettsia* είναι συνήθως παθογόνα για κάποιους οργανισμούς, ενώ εκείνα του γένους *Wolbachia* είναι σπάνια παθογόνα (Hess & Hoy, 1982) και έχουν εξελιχθεί αναπτύσσοντας διάφορα μέσα για να χειριστούν τους ξενιστές τους προκειμένου να ενισχύσουν τη δική τους μετάδοση (Stouthamer et al., 1999).

Τα μέλη του γένους *Rickettsia* (Rickettsiaceae, class a-Proteobacteria, phylum Proteobacteria) (Skerman et al., 1980) μεταδίδονται με τη σίτιση ή μέσω τραυμάτων, και υποβάλλονται σε εκτεταμένο πολλαπλασιασμό στο λιπώδη ιστό (Cuerpo graso) μετά την κατάποση και τη διείσδυση στη διατροφική οδό (Schütte & Dicke, 2008). Η συμβίωση του γένους *Rickettsia* σε αρπακτικά μπορεί να προκαλέσει σημαντικές μεταβολές συμπεριφοράς στον ξενιστή, συμπεριλαμβανομένης της αλλαγής σε επίπεδο δραστηριότητας (Schütte & Dicke, 2008).

Το γένος *Wolbachia* (Rickettsiaceae, class a-Proteobacteria, phylum Proteobacteria) (Hertig, 1936) περιλαμβάνει ενδοκυτταρικά βακτήρια που πιθανότατα βρίσκονται σε διάφορους ιστούς, και η επιρροή τους ποικίλει ανάλογα με το στέλεχος *Wolbachia*, την τάξη των αρθρόποδων και το γεννητικό σύστημα αυτών (Johanowicz & Hoy, 1998). Κατά κύριο λόγο τα βακτήρια βρίσκονται στις γονάδες (γεννητικά όργανα) και επηρεάζουν την αναπαραγωγή

των αρθροπόδων ξενιστών τους. Μερικά από τα αποτελέσματα της συμβίωσης των βακτηρίων του γένους *Wolbachia* είναι οι αναπαραγωγικές ασυμβατότητες, η επικράτηση μη αναμενόμενης αναλογίας φύλου (sex ratio bias) μέσω επαγωγής θηλεοτοκίας όπως αναφέρουν οι Johanowicz & Hoy (1998).

Άλλα βακτήρια με υψηλή συχνότητα μόλυνσης και υψηλή επικράτηση στα έντομα, ανήκουν στο γένος Hamiltonella (Enterobacteriacea, class γ-Proteobacteria, phylum Proteobacteria) και επηρεάζουν σημαντικά τη βιολογία και την οικολογία των ξενιστών τους. Η συμβίωση αυτού του βακτηριακού γένους προσφέρει οφέλη στον ξενιστή, επειδή του προσδίδει αντίσταση έναντι των φυσικών εχθρών του (Dykstra et al., 2014; Guay et al., 2009) και επιπλέον βελτιώνει τις παραμέτρους επιβίωσης (Su et al., 2014).

Επίσης, κύριος ενδοσυμβιώτης των εντόμων είναι το βακτηριακό γένος Arsenophonus (Morganellacea, class γ-proteobacteria, phylum Proteobacteria) (Gherna et al., 1991), το οποίο έχει αναφερθεί και σε ακάρεα (Grindle et al., 2003). Το γένος αυτό έχει ασυνήθιστο συνδυασμό παθογόνων και συμβιωτικών χαρακτηριστικών, και επάγει το φαινότυπο θανάτωσης των αρσενικών ατόμων (Bohacsova et al., 2016).

Επιπλέον σε ορισμένα αρθρόποδα έχει βρεθεί το γένος Cardinium (Flexibacteraceae, class Sphingobacteria, phylum Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides CFB), που προκαλεί αναπαραγωγική ασυμβατότητα, παρθενογένεση ή θηλυκοποίηση είτε ακόμη και αυξημένη γονιμότητα (Chaisiri et al., 2015; Chigira & Miura, 2005; Gotoh et al., 2006; Hunter et al., 2003; Weeks & Stouthamer, 2004a; Zchori-Fein et al., 2004).

Ένα ακόμη σημαντικό ενδοσυμβιωτικό βακτήριο για την οικολογία διαφόρων εντόμων είναι το Spiroplasma (Spiroplasmataceae, class Mollicutes, phylum Tenericutes). Αρχικά περιγράφηκε ως οργανισμός που καθορίζει την αναλογία φύλου (sex-ratio organism), ο οποίος αποδείχθηκε ότι οδηγεί σε θανάτωση αρσενικών ατόμων (Hurst et al., 1999; Nakamura et al., 2013).

4. Τομάτα

Η καλλιεργούμενη τομάτα (Solanum lycopersicon, Solanaceae) είναι το κηπευτικό με τη μεγαλύτερη οικονομική σημασία παγκοσμίως. Οι καλλιεργητικές στρατηγικές της ορθής πρόληψης και αντιμετώπισης των φυτοφάγων παρασίτων της τομάτας έχουν σαν στόχο την αποφυγή της μείωσης της απόδοσης των καλλιεργειών. Ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή που καλλιεργείται, ποικίλλει και ο αριθμός των φυτοφάγων αρθροπόδων που συνδέονται με αυτή τη καλλιέργεια. Υπάρχουν περίπου 150 αρθρόποδα που σχετίζονται με τη τομάτα και έχει αναφερθεί ότι τα 19 από αυτά προκαλούν σοβαρές απώλειες απόδοσης στις τέσσερις πιο σημαντικές χώρες παραγωγής τομάτας στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Ισπανία, Γαλλία, Ιταλία και Κάτω Χώρες) (Pérez-Hedo et al., 2017).

Κάποια από τα πιο συχνά φυτοφάγα είδη της τομάτας είναι τα ακόλουθα: το λεπιδόπτερο *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae), ο αλευρώδης (Hemiptera: Aleyrodidae) *Trialeurodes vaporariorum* Westwood και *Bemisia tabaci* Gennadius, που μεταδίδουν πολλούς ιούς, όπως ο ιός του κίτρινου καρουλιάσματος των φύλλων τομάτας (TYLCV), τα ακάρεα *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) και *Aculops lycopersici* Masse (Acari: Eriophydae). Λιγότερο συχνά αναφέρονται σημαντικές προσβολές σε καλλιέργειες τομάτας, από τον φυλλορίκτη του γένους *Liriomyza L. trifolii* Burgess (Diptera: Agromyzidae), τονο θρίπα *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae) που είναι φορέας του ιού του κηλιδωτού

μαρασμού της τομάτας (TSWV) και την αφίδα *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae).

Οι παραπάνω εχθροί της τομάτας προκαλούν ζημιές στα φυτά και μειώνουν την παραγωγή και την ελκυστικότητα των καρπών. Επιπλέον είναι φορείς πολλών ασθενειών της τομάτας. Οι κίνδυνοι αυτοί οδηγούν στην εφαρμογή χημικών επεμβάσεων στις κηπευτικές καλλιέργειες για τον περιορισμό των παρασίτων (Pérez-Hedo et al., 2017). Ωστόσο, η εμφάνιση του ζημιογόνου παρασίτου *T. absoluta* το 2006 στην Ευρώπη, ώθησε την ανάπτυξη νέων στρατηγικών που βασίζονται σε θηρευτές Miridae (Urbaneja et al., 2012). Η χρήση φυτοφαρμάκων για την καταπολέμηση του εχθρού αυτού μειώθηκε σταδιακά, αφού η αντιμετώπιση με χημικά σκευάσματα ήταν δαπανηρή και μη αποτελεσματική (λόγω της αντίστασης σε εντομοκτόνα).

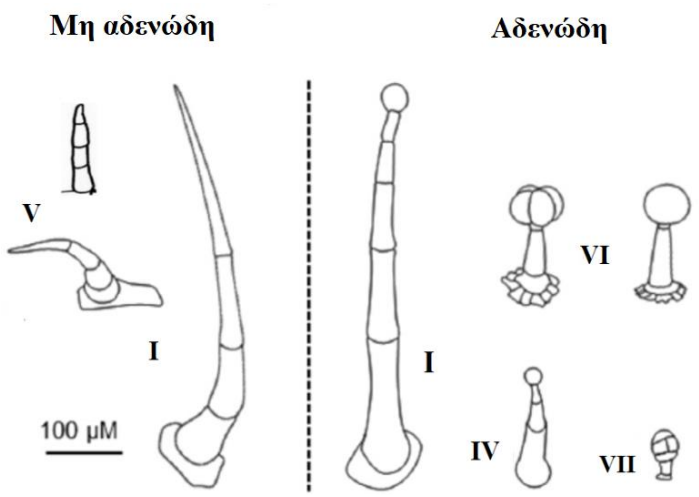
Σήμερα στην Ευρώπη, η αποτελεσματική διαχείριση των εχθρών σε καλλιέργειες τομάτας βασίζεται σε προγράμματα IPM, με τη χρήση βιολογικών παραγόντων, και κυρίως αρπακτικών miridae, όπως *Nesidiocoris tenuis* και Macrolophus Pygmaeus (Hemiptera: Miridae) (J. F. Calvo et al., 2015; Sanchez et al., 2014). Άλλοι φυσικοί εχθροί που χρησιμοποιούνται στις στρατηγικές IPM εναντίον των εχθρών τομάτας είναι τα παρασιτοειδή, και οι εντομοπαθογόνοι μικροοργανισμοί (González-Cabrera et al., 2011; Gözel & Kasap, 2015). Ωστόσο μέχρι σήμερα δεν είναι γνωστοί παράγοντες βιολογικού ελέγχου που να είναι αποτελεσματικοί εναντίον των ακάρεων που προσβάλλουν την τομάτα, *A. lycopersici* και των τετρανύχων *T. evansi* και *T. urticae*, λόγω της αρνητικής επίδρασης των τριχιδίων της τομάτας στους φυσικούς εχθρούς τους, τα αρπακτικά ακάρεα (van Haren et al. 1987; Cedola et al. 2001; Trottin-Caudal et al. 2003; van Houten et al. 2013). Γι' αυτό το λόγο, εξετάζονται νέες προοπτικές για στρατηγικές απελευθέρωσης αρπακτικών ακάρεων σε φυτά τομάτας για τον έλεγχο των φυτοφάγων ακάρεων (Drukker et al., 1997; van Houten et al., 2013).

4.1 Τριχίδια

Η τομάτα (*Solanum Lycopersicum*) ανήκει στην οικογένεια Solanaceae, η οποία περιέχει είδη πλούσια σε τριχίδια. Τα φύλλα της τομάτας, οι μίσχοι, τα στελέχη και τα άνθη της καλύπτονται με τριχίδια που προστατεύουν το φυτό από φυτοφάγα έντομα και αρθρόποδα. Υπάρχουν διαφορετικοί τύποι τριχιδίων, συμπεριλαμβανομένων των αδενωδών και μη αδενωδών τύπων. Τα τριχίδια του *S. Lycopersicum* ταξινομήθηκαν για πρώτη φορά από την Luckwill (1943) από τη μορφολογία τους ως αδενώδη και μη αδενώδη.

Συχνότεροι τύποι τριχιδίων που εμφανίζονται στη τομάτα ως αδενώδεις είναι οι τύποι I, IV, VI και VII και μη αδενώδη οι τύποι III και V (Luckwill, 1943) (Εικόνα 1). Ο τύπος I και ο τύπος IV είναι αδενώδη τριχίδια με λίγα ή ένα μόνο αδενικό κύτταρο στην άκρη. Ο τύπος I έχει εξαιρετικά μακρά τριχίδια που μπορούν εύκολα να παρατηρηθούν με γυμνό μάτι, ενώ τα τριχίδια τύπου IV είναι μικρότερα. Τριχίδια τύπου VI έχουν τέσσερα αδενώδη κύτταρα που σχηματίζουν μια «κεφαλή» με ένα σύντομο πολυκυτταρικό μίσχο και μια μονοκυτταρική βάση. Υπάρχουν τόσο στο S*olanum* lycopersicum (Solanaceae) όσο και στους άγριους τύπους τομάτας όπως στο *Solanum habrochaites* (Solanaceae), αλλά παρουσιάζουν ξεχωριστές μορφολογίες σε κάθε είδος. Προκαλούν την παγίδευση εντόμων και άλλων μικρών αρθρόποδων αφού περιέχουν διάφορα σάκχαρα και φαινόλες τα οποία συμβάλλουν στη φυτική άμυνα (Kennedy, 2003; Paspati et al., 2021). Στο *S. lycopersicum*, ο τύπος VI έχει τέσσερα εκκριτικά κύτταρα στη κεφαλή που είναι ευδιάκριτα ορατά, σχηματίζοντας ένα τετράφυλλο σχήμα όταν προβάλλονται από ψηλά. Ο τύπος VII είναι μικρά αδενώδη τριχίδια

με ένα μονοκύτταρο μίσχο και μια αδενική κεφαλή που αποτελείται από 7-10 κύτταρα (Tissier, 2012).



Εικόνα 1. Μορφολογία και τύποι μη αδενωδών και αδενωδών τριχιδίων του *S. lycopersicum*.

Τα τριχίδια τομάτας έχουν προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω του ρόλου τους στις βιοτικές αλληλεπιδράσεις, ιδίως με τα αρθρόποδα. Επηρεάζουν την κίνηση, την ανάπτυξη, την ωοτοκία και το δυναμικό τους (Tian et al., n.d.). Τα αδενώδη τριχίδια της τομάτας απελευθερώνουν κολλώδη και/ή τοξικά εξιδρώματα, που απωθούν ή και όταν έρθουν σε επαφή με αρθρόποδα, φυτοφάγους είτε φυσικούς εχθρούς, τους παγιδεύουν και ενδεχομένως προκαλούν τον θάνατό τους (Paspati et al., 2021; Riddick & Simmons, 2014). Τα μη αδενώδη τριχίδια λειτουργούν ως φυσικοί φραγμοί στη διασπορά αρθροπόδων, εμποδίζοντας τη πρόσβαση τους στη σίτιση (Simmons & Gurr, 2005).

Υπάρχουν πολλές αναφορές σχετικά με το ρόλο των εκκρίσεων, των αδενωδών τριχιδίων, στην αντίσταση των φυτοφάγων εντόμων ή αρθροπόδων καθώς και των ωφέλιμων αρθρόποδων (Kennedy, 2003; Paspati et al., 2021). Τα άγρια είδη, όπως οι *S. habrochaites* (Solanaceae) και *Solanum pennellii* (Solanaceae) διαθέτουν πιο ισχυρούς μηχανισμούς αντίστασης κατά των φυτοφάγων εντόμων (Álvarez, 2015). Ωστόσο, η παρουσία των αδενωδών τριχιδίων δεν θεωρείται κατάλληλη σε καλλιέργειες τομάτας που χρησιμοποιείται φυσικός εχθρός, επειδή τα αδενώδη τριχίδια παγιδεύουν το βιολογικό παράγοντα (Kennedy, 2003).

4.2 Ενδόφυτο Fusarium solani – στέλεχος K (FSK)

Το ενδόφυτο *Fusarium Solani* στέλεχος K είναι ένας μη παθογόνος μικροοργανισμός που αποικεί τους ιστούς της ρίζας, συμπεριλαμβανομένων των αγγειακών ιστών, αλλά η είσοδος σταματά στην περιοχή της ρίζας και η μυκητιακή ανάπτυξη δεν ανιχνεύεται στους ιστούς της τομάτας (Kavroulakis et al., 2007). Η παρουσία του προστατεύει τα φυτά έναντι του *Fusarium oxysporum f.sp. radices - lycopersici* (FORL). Το ενδόφυτο FSK προσδίδει αντίσταση στο φυτό κατά των παθογόνων της τομάτας, όπως για παράδειγμα το παθογόνο *Septoria Lycopersici* Speg (Mycosphaerellaceae), προκαλώντας επαγόμενη συστημική αντίσταση (Kavroulakis et al., 2007). Αυτός ο ωφέλιμος μύκητας εδάφους είναι σε θέση να επηρεάσει την έμμεση φυτική άμυνα με την ενεργοποίηση της έκφρασης των φυτικών χαρακτηριστικών, που επηρεάζουν τους φυσικούς εχθρούς (Rasmann et al., 2017). Η πτητική

εκπομπή ουσιών είναι ένα τέτοιο φυτικό χαρακτηριστικό το οποίο επηρεάζεται άμεσα από τα μικρόβια του εδάφους, που επιδρούν στους μεταβολίτες των φυτών (Pappas et al., 2018).

Ο βιολογικός παράγοντας FSK επηρεάζει άμεσα και έμμεσα την άμυνα των φυτών τομάτας, όχι μόνο των παθογόνων της ρίζας όπου και βρίσκεται, αλλά προκαλεί αντίσταση έναντι των φυτοφάγων σε όλο το φυτό. Λόγω της παρουσίας του FSK έχει παρατηρηθεί ανθεκτικότητα κατά του ζωοφυτοφάγου θηρευτή *N. tenuis* που προκαλεί ζημιές στο φυτό τομάτας κατά τη διατροφή του (Garantonakis et al., 2018). Συνεπώς, η επαγωγή πτητικών ουσιών από το στέλεχος FSK συμβάλλει επίσης στην έμμεση άμυνα της τομάτας.

Βρέθηκε επίσης ότι η παρουσία FSK επάγει και ρυθμίζει πολλά γονίδια που σχετίζονται με την άμυνα του φυτού, συνεπώς προωθεί την ανάπτυξη του (Pappas et al., 2018). Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αντίσταση έναντι φυτοφάγων ακάρεων, αποδείχθηκε ότι σχετίζονται με την επαγωγή άμυνας και την προώθηση της ανάπτυξης των φυτών τομάτας από το *FSK* (Pappas et al., 2018). Γενικά τα ενδόφυτα έχουν αποδειχθεί ότι προάγουν την ανάπτυξη των φυτών και επηρεάζουν μηχανισμούς με τέτοιο τρόπο που ενισχύουν την ικανότητα του φυτού-ξενιστή να αντισταθμίζει την βλάβη από φυτοφάγα (Dupont et al., 2015; Pappas et al., 2018).

Οι επιδράσεις αυτών των αποτελεσμάτων είναι ιδιαίτερα συναφείς με τον βιολογικό έλεγχο, επειδή η συσχέτιση τομάτας με FSK αποδεικνύεται ότι παρέχει σημαντικά οφέλη στο φυτό με ενίσχυση της αντίστασης όχι μόνο σε παθογόνους μικροοργανισμούς αλλά και εναντίον αρθρόποδων. Ο ρόλος αυτός μπορεί να προσφέρει την ευκαιρία για την ανάπτυξη ενός νέου εργαλείου που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως παράγοντας συστήματος βιολογικής διαχείρισης για τον έλεγχο ακάρεων (Pappas et al., 2018).

4.3 Τα Phytoseiidae στη τομάτα

Είναι γνωστό ότι πολλές καλλιέργειες προστατεύονται αποτελεσματικά από τα αρπακτικά ακάρεα είτε ως αποτέλεσμα της παρουσίας αυτόχθων ειδών ή μέσω εισαγωγής αυτών. Τα ακάρεα Phytoseiids έχουν μεγάλο εύρος θηραμάτων με τα οποία μπορούν να διατραφούν και χρησιμοποιούνται σε πολλές καλλιέργειες, γι’ αυτό αρκετά είδη της οικογένειας αυτής είναι εμπορικά διαθέσιμα (McMurtry et al., 2013). Η παρουσία μεγάλου πληθυσμού ωφέλιμων μπορεί να είναι η λύση για την αποτελεσματική προστασία των καλλιεργειών. Ωστόσο, για μερικές καλλιέργειες όπως η τομάτα, δεν υπάρχουν αποτελεσματικοί phytoseiid παράγοντες βιολογικού ελέγχου της οικογένειας Phytoseiidae.

Έχει αναφερθεί ότι στην τομάτα παρεμποδίζεται η κίνηση και η ανάπτυξη των Phytoseiidae από τους φυσικούς φραγμούς του φυτού (Tixier et al., 2020). Αυτές οι δυσμενείς επιδράσεις οφείλονται στα τριχιδία, και κυρίως στην πυκνότητά τους και στις χημικές ουσίες που απελευθερώνουν, μετά από επαφή με τα ακάρεα(Kennedy, 2003; Simmons και Gurr, 2005).

Συνεπώς, τα φυσικά αμυντικά χαρακτηριστικά των φυτών έναντι των εχθρών, μπορούν να είναι επιβλαβή και για τους φυσικούς εχθρούς. Για παράδειγμα ένα μεγάλο πρόβλημα παρατηρείται στην καταπολέμηση του ακάρεος τομάτας (tomato russet mite) *A. lycopersici*, η οποία επιτυγχάνεται μόνο με εφαρμογές ακαρεοκτόνου, λόγω των αρνητικών επιπτώσεων των τριχιδίων ντομάτας στους φυσικούς εχθρούς του (van Houten et al., 2013). Το γεγονός αυτό είναι μεγάλης σημασίας για τον σχεδιασμό πιο αποτελεσματικών στρατηγικών IPM.

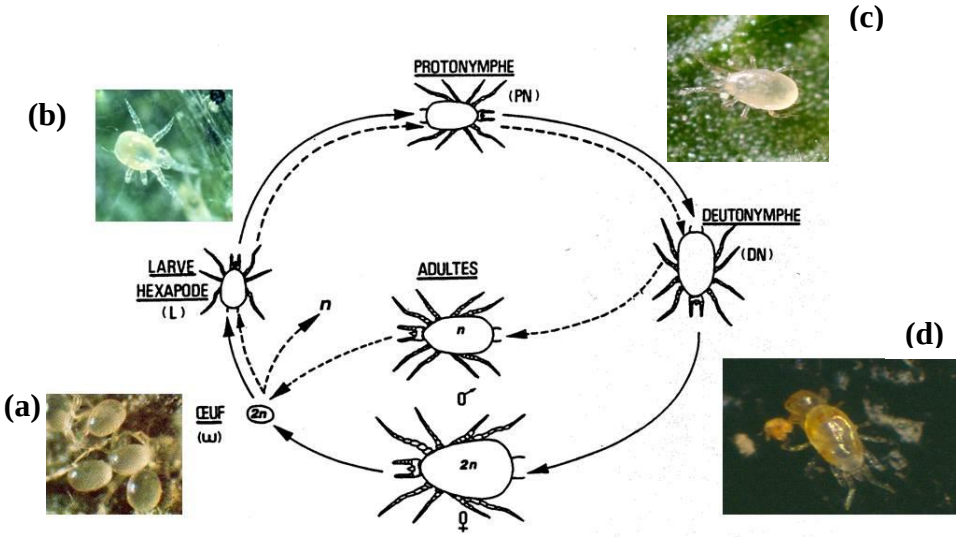
5. *Amblyseius swirskii* (Phytoseiidae)

Το *Amblyseius swirskii* είναι ένα αρπακτικό άκαρι που αναγνωρίστηκε αρχικά στο Ισραήλ και έπειτα βρέθηκε σε όλη την περιοχή της ανατολικής Μεσογείου (Athias-Henriot, 1962). Είναι σημαντικός βιολογικός παράγοντας και σήμερα χρησιμοποιείται ευρέως για τον έλεγχο φυτοπαρασίτων (Calvo et al., 2015).

Μορφολογία και βιολογικός κύκλος του *A. swirskii*

Όπως και τα άλλα άκαρι, το *A. swirskii* έχει πέντε στάδια ζωής που ξεκινά από το αυγό που εκκολάπτεται η προνύμφη, έπειτα δύο ενδιάμεσα στάδια ανάπτυξης πρωτονύμφη (protonymph) και δευτερονύμφη (deutonymph) και τελικά το ενήλικο άκαρι. Τα αυγά του *A. swirskii* είναι στρογγυλά χρώματος ανοιχτό λευκό και έχουν διάμετρο περίπου 0,15 mm (Εικόνα 2a). Οι προνύμφες είναι ανοιχτόχρωμες έως σχεδόν διαφανείς στο χρώμα, σε σχήμα σταγονιδίων και έχουν μόνο τρία μικρά ζεύγη ποδιών (Εικόνα 2b). Οι πρωτονύμφες και δευτερονύμφες έχουν τέσσερα ζεύγη ποδιών, λευκού χρώματος και είναι ελαφρώς πιο σκούρες από τις προνύμφες (Εικόνα 2c). Τα ενήλικα *A. swirskii* έχουν σώμα σε σχήμα αχλαδιού χωρίς μεταμερή, μήκους περίπου 0,5 mm, και τέσσερα ζεύγη μακριών ποδιών, ενώ τα θηλυκά είναι ελαφρώς μεγαλύτερα από τα αρσενικά (Εικόνα 2d).

Τα *A. swirskii* έχουν απλο-διπλοειδές γενετικό σύστημα, σύμφωνα με το οποίο τα αρσενικά είναι απλοειδή και προέρχονται από αγονιμοποίητα αυγά, ενώ τα θηλυκά είναι διπλοειδή και παράγονται από γονιμοποιημένα αυγά. Τα αγονιμοποίητα θηλυκά παράγουν αρσενικά άτομα, ενώ τα γονιμοποιημένα μπορούν να δώσουν θηλυκούς και αρσενικούς απογόνους. Ο λόγος θηλυκών προς αρσενικά είναι 3:1 (Dyer & Swift, 1979).



Εικόνα 2. Μορφολογία και βιολογικός κύκλος του *A. swirskii*. (a) αυγά, (b) λάρβα, (c) νύμφη (d) ενήλικο.

Τα θηλυκά εναποθέτουν τα αυγά τους στις τρίχες των φύλλων ή κατά μήκος των κύριων νεύρων στην κάτω πλευρά των φύλλων. Προτιμούν να βάζουν τα αυγά στις τρίχες στην εσωτερική επιφάνεια των φύλλων, ίσως ως προσαρμογή για την προστασία των αυγών από τους θηρευτές. Τα θηλυκά ακάρεα μπορούν να γεννήσουν έως και 2 αυγά την ημέρα, συνεπώς είναι εύκολος ο πολλαπλασιασμός του πληθυσμού.

Το αρπακτικό *A. swirskii* είναι γενικευμένος θηρευτής χωρίς διατροφική εξειδίκευση, τρέφεται με διάφορα θηράματα. Επιπλέον τρέφεται και με γύρη, που του επιτρέπει να

επιβιώσει και να πολλαπλασιαστεί ακόμα και απουσία θηράματος. Καταναλώνει κυρίως τα ανώριμα στάδια των θηραμάτων, αν και τρέφεται επίσης με τα ενήλικα στάδια φυτοφάγων ακάρεων (Messelink et al., 2006; Nomikou et al., 2001). Ο κύκλος ζωής των *A. swirskii* μπορεί να ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με τη διαθεσιμότητα της τροφής και τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Lee & Gillespie, 2011).

Βιολογικός παράγοντας ως ξενιστής της τομάτας

Αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει ότι το *A. swirskii* έχει τη δυνατότητα να ελέγξει αποτελεσματικά σημαντικούς φυτοφάγους εχθρούς του θερμοκηπίου, σε διάφορες καλλιέργεια, όπως αγγούρι και πιπεριά (Calvo et al., 2011; Messelink et al., 2006; Nomikou et al., 2001). Ωστόσο, τα φυτά με τριχίδια, όπως η τομάτα, δυσχεραίνουν την εγκαθίδρυση του *A. swirskii* και έπειτα την ικανότητα ελέγχου των φυτοπαρασίτων (Buitenhuis et al., 2014). Η ανεπιτυχής προσαρμογή του αρπακτικού στη τομάτα οφείλεται τόσο στους φυσικούς φραγμούς που δημιουργούν τα τριχίδια, όσο και στα τοξικά/κολλώδη εκκρίματα που απελευθερώνονται από ορισμένους τύπους αυτών (Simmons & Gurr, 2005; Paspati et al., 2021).

Σκοπός και αντικείμενο

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του αρπακτικού *Amblyseius swirskii* (Phytoseiidae) για την βελτίωση της χρήσης του ως παράγοντας βιολογικού ελέγχου. Η εργασία χωρίζεται σε δύο κεφάλαια. Στο πρώτο κεφάλαιο γίνεται διερεύνηση σε πληθυσμούς του *A. swirskii*, βιολογικών παραμέτρων που είναι σημαντικές για τον βιολογικό έλεγχο, ενώ στο δεύτερο κεφάλαιο γίνεται διερεύνηση στα φυτά της τομάτας με σκοπό την επίτευξη της εγκατάστασης του ακάρεος σε αυτά.

Προκειμένου να βελτιστοποιηθεί το άκαρι *A. swirskii* ως κατάλληλος θηρευτής, συγκρίθηκε ένας εμπορικός πληθυσμός, με έναν άγριο πληθυσμό για να γνωρίσουμε περισσότερα χαρακτηριστικά της φυσιολογίας των δύο πληθυσμών. Αρχικά ελέγχθηκε η συμβατότητα και η αντοχή των δύο πληθυσμών σε διάφορα εντομοκτόνα/ ακαρεοκτόνα με τα οποία πιθανόν να εφαρμοστεί συνδυαστικά σε ολοκληρωμένα προγράμματα.

Έπειτα διερευνήθηκε η παρουσία γνωστών μεταλλαγών στόχου, σε ένα κανάλι χλωρίου στον πληθυσμό *A. swirskii* άγριου τύπου, που σχετίζονται με τον φαινότυπο της ανθεκτικότητας στο εντομοκτόνο abamectin, όπως έχει βρεθεί στο *Tetranychus urticae*.

Επιπλέον, συγκρίναμε το ρυθμό κατανάλωσης θήρας και το ρυθμό ωοτοκίας των δύο πληθυσμών του αρπακτικού, χρησιμοποιώντας αυγά του αλευρώδη *Bemisia tabaci*, υπό εργαστηριακή δοκιμή.

Για τον περαιτερω χαρακτηρισμό του απρπκτικού ακάρεος διερευνήσαμε τη γενετική ποικιλομορφία του άγριου πληθυσμού *Amblyseius swirskii* με τη χρήση του γονιδίου της *υπομονάδας Ι της οξειδάσης του κυτοχρώματος C* (*cytochrome c oxidase subunit I - COI*) του μιτοχονδριακού DNA ως γενετικό δείκτη. Συγκρίθηκαν οι αλληλουχίες του άγριου πληθυσμού με αλληλουχίες από έναν εμπορικό πληθυσμό.

Στη συνέχεια ερευνήσαμε την αναπαραγωγική συμβατότητα μέσω της χιαστής διασταύρωσης των δύο πληθυσμών *A. swirskii* ούτως ώστε να γνωρίζουμε κατά πόσον θα ήταν εφικτή η μελλοντική πιθανή μελέτη της γενετικής της ανθεκτικότητας. Η συμβατότητα διασταύρωσης

των πληθυσμών αξιολογήθηκε τόσο από τον αριθμό όσο και την αναλογία φύλου των απογόνων. Επιπλέον έγινε έλεγχος στους δύο πληθυσμούς *A. swirskii*, άγριου και εμπορικού, για την παρουσία ενδοσυμβιωτικών βακτηρίων (endosymbionts), που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν την αναπαραγωγή ή την συμπεριφορά του ξενιστή τους.

Στη δεύτερη ενότητα, στόχος ήταν να διερευνηθεί η καταλληλότητα διαφορετικών ποικιλιών τομάτας για την εγκατάσταση του ακάρεος *A. swirskii*. Για το λόγο αυτό, μελετήθηκε η πυκνότητα των τριχιδίων σε δύο διαφορετικές ποικιλίες τομάτας, καθώς και σε σχέση με την παρουσία ενός ενδοφυτικού μύκητα (*Fusarium solani*- strain K) της τομάτας. Αξιολογήθηκε η ικανότητα διασποράς του *A. swirskii* στο στέλεχος του φυτού, σε σχέση με την επίδραση των παραπάνω παραμέτρων.

Κεφάλαιο 1: Διερεύνηση σημαντικών βιολογικών παραμέτρων του *Amblyseius swirskii* για βιολογικό έλεγχο

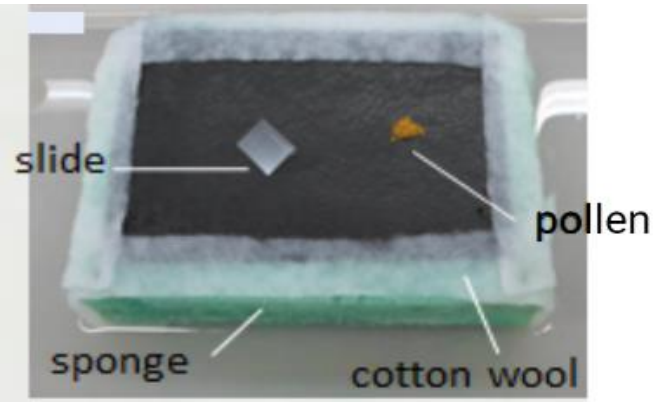
1.1 Μέθοδοι και υλικά

1.1.1 Πληθυσμοί *Amblyseius swirskii*

Χρησιμοποιήθηκαν δύο πληθυσμοί *Amblyseius swirskii*. Ο πρώτος πληθυσμός, εισήχθη στο εργαστήριο από εμπορικά σκευάσματα της Koppert Hellas Biological Systems (ευγενική προσφορά Βιοτόπιο-Σκλιβάκης αντιπρόσωπος νομού Ηρακλείου της Koppert Hellas) και εγκαταστάθηκε σε εκτροφή το Νοέμβρη του 2019. Ο εμπορικός αυτός πληθυσμός, Koppert, συσκευάζεται είτε σε μικρά χάρτινα φακελάκια 250 ατόμων είτε σε πλαστικό μπουκάλι μισού λίτρου με 50000 άτομα, διάφορων σταδίων, ενήλικα νυμφες και αυγά, αναμιγμένα με πίτυρο ή πριονίδι μαζί με όλα τα στάδια του ακάρεος *Carpoglyphus lactis L.* που χρησιμεύει ως θήραμα για το *A. swirskii*.

Ο δεύτερος πληθυσμός, Israel, είναι άγριος και συλλέχθηκε από περιοχή του Ισραήλ, από την Δρ. Marta Montserrat. Στάλθηκε από εκτροφή του εργαστηρίου «Laboratory of Applied Ecology» του «Institute for Mediterranean and Subtropical Horticulture "La Mayora" – CSIC». Εγκαταστάθηκε σε εκτροφές στο εργαστήριο τον Ιανουάριο του 2020.

Οι πληθυσμοί *Amblyseius swirskii* διατηρήθηκαν σε εκτροφή που αποτελούνταν από ένα κομμάτι σκληρού μαύρου πλαστικού τοποθετημένο σε ένα κορεσμένο με νερό σφουγγάρι (Nomikou et al., 2003). Περιμετρικά της πλαστικής επιφάνειας τοποθετήθηκαν λωρίδες βαμβακιού, σε επαφή με το νερό για να εξασφαλιστεί μια σταθερή παροχή νερού για τα ακάρεα και να αποφευχθεί η διαφυγή τους (Εικόνα 3). Σε κάθε αρένα παρέχονταν ίνες βαμβακιού, κάτω από ένα κομμάτι πλαστικού, που χρησίμευαν ως σημεία ωοτοκίας. Δύο φορές την εβδομάδα, παρέχονταν γύρη από το φυτό *Carpobrotus edulis* (*L*) (Caryophyllales: Aizoaceae) στις εκτροφες των αρπακτικών. Οι εκτροφές διατηρούνται σε θάλαμο ανάπτυξης με τις βέλτιστες συνθήκες, φωτοπερίοδο 16:8 (φως:σκοτάδι), θερμοκρασία 26±2 ºC και 70% σχετική υγρασία.

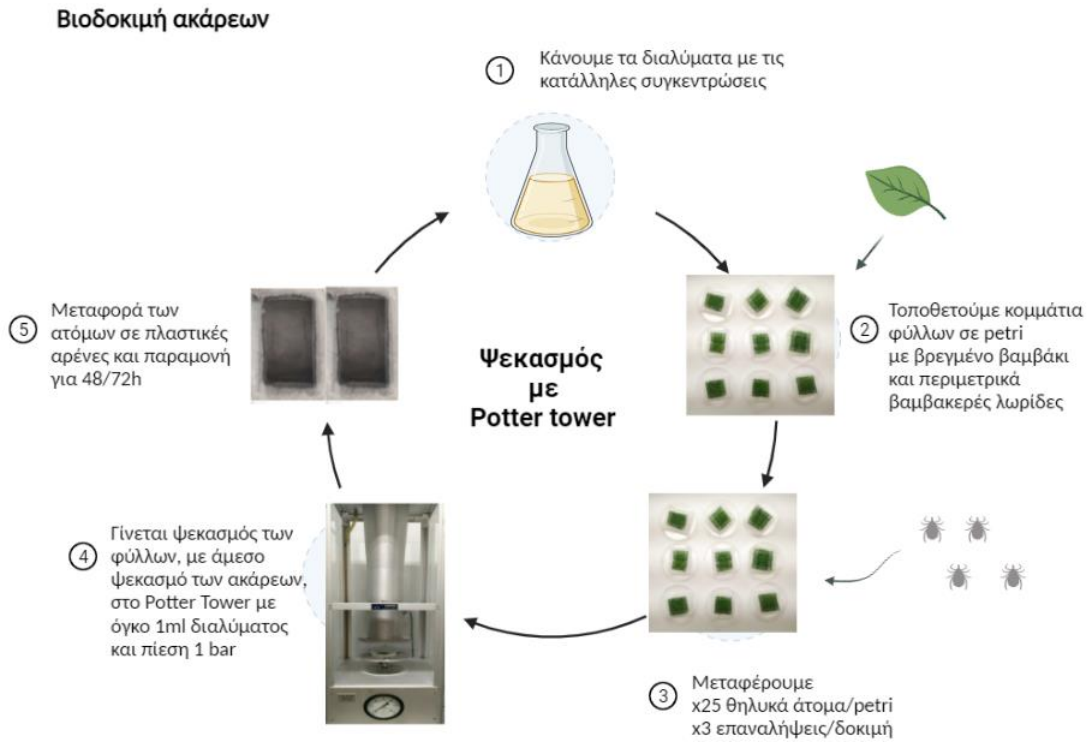


Εικόνα 3. Αρένα όπου διατηρούνται τα ακάρεα σε εκτροφή. Η αρένα αποτελείται από σφουγγάρι κορεσμένο με νερό, πάνω σε ένα κομμάτι σκληρού μαύρου πλαστικού και περιμετρικά λωρίδες βαμβακιού. Σε κάθε αρένα υπήρχε γύρη για τροφή και κομμάτι πλαστικού που σκέπαζε ίνες βαμβακιού, στις οποίες εναποθέτανε τα αυγά τους τα ακάρεα.

1.1.2 Χημικός έλεγχος με κλασσικά εντομοκτόνα

Στη παρούσα μελέτη, εξετάστηκαν τα επίπεδα ανθεκτικότητας των δύο πληθυσμών έναντι δύο σκευασμάτων εντομοκτόνων/ακαρεοκτόνων με κλασικές μεθόδους βιοδοκιμών. Οι δραστικές ουσίες των σκευασμάτων αυτών ήταν η Abamectin (DOBLE 1.8%) και η Spinosad (Laser 48%) αντίστοιχα. Πρωταρχικός τόπος δράσης της δραστικής ουσίας Abamectin είναι το νευρικό και μυϊκό σύστημα του αρθρόποδου και στόχος της το γλουταμινικό κανάλι χλωριδίου (Glutamate-gated chloride channel (GluCl) allosteric modulators). Το Spinosad δρα στο νευρικό σύστημα, με στόχο τον υποδοχέα νικοτινικής ακετυλοχολινεστεράσης (Nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) allosteric modulators – Site I).

Η βιοδοκιμή πραγματοποιήθηκε κατά το ενήλικο στάδιο ανάπτυξης του ακάρεος. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν κομμένα φύλλα βαμβακιού (3*3) που τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με βρεγμένο βαμβάκι και περιμετρικά βαμβακερές λωρίδες χαρτιού εμποτισμένες με νερό. Σε κάθε φύλλο μεταφέρθηκαν 25 ενήλικα θηλυκά άτομα. Ακολούθησε ο ψεκασμός με κατάλληλες συγκεντρώσεις των σκευασμάτων. Δοκιμάστηκαν 5 συγκεντρώσεις, η συνιστώμενη δόση (Recommended Dose - RD) της κάθε δραστικής (abamectine RD=18 ppm, spinosad RD=12 ppm) και 2 εκατέρωθεν αυτής και τουλάχιστον 3 επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ψεκασμός με απιονισμένο νερό. Διενεργήθηκε άμεσος ψεκασμός των ακάρεων στο Potter Tower με όγκο 1ml διαλύματος και πίεση 1 bar. Το Potter Tower είναι μια συσκευή ψεκασμού ακριβείας που προκαλεί ομοιόμορφη κατανομή του ψεκαστικού υγρού, σε μορφή μικροσταγονιδίων (Potter, 1952; Roychoudhury, 2016).



Εικόνα 4. Διαδικασία βιοδοκιμής ψεκασμού με Potter tower.

Έπειτα από τον ψεκασμό, τα άτομα μεταφέρθηκαν σε πλαστική αρένα όπου παρέμειναν εκεί μέχρι την καταμέτρηση της θνησιμότητας. Η καταμέτρηση για το abamectin και spinosad πραγματοποιείται μετά από 48 και 72 ώρες, αντίστοιχα (Εικόνα 4).

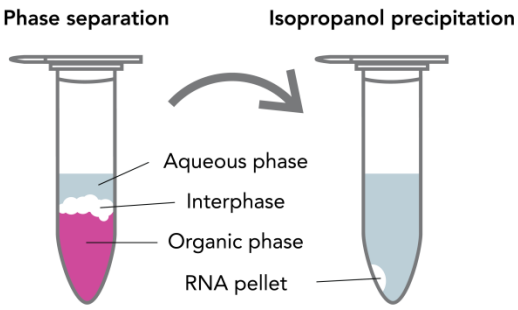
Τα δεδομένα τοξικότητας προσαρμόστηκαν σε μια συνάρτηση μοντέλου για τον υπολογισμό της καμπύλης απόκρισης δόσης (drm: Fitting dose-response models). Επίσης, οι θανατηφόρες συγκεντρώσεις 50% (LC50), 90% (LC90) καθώς και ενδιάμεσες, και το τυπικό σφάλμα (SE), προσαρμόστηκαν σε ένα γενικευμένο γραμμικό μοντέλο (glm: Fitting Generalized Linear Models) με διωνυμική κατανομή και διαστήματα εμπιστοσύνης (CI) Delta 95%. Οι παραπάνω αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το πακέτο drc του προγράμματος R (έκδοση 4.1.2).

1.1.3 Έλεγχος για ανθεκτικότητα στόχου των καναλιών χλωρίου

Μελετήθηκε η συμμετοχή της ανθεκτικότητας στόχου του καναλιού χλωρίου στον αρχικό άγριου τύπου πληθυσμό *A. swirskii*.

1. **Εκχύλιση RNA και Ποσοτικοποίηση**

Για την εκχύλιση του RNA από τα αρπακτικά *Amblyseius swirskii*, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Trizol. Αρχικά έγινε συλλογή 30 θηλυκών ατόμων από κάθε πληθυσμό και ομογενοποίηση με το pestle σε TRIZOL. Κατά τη διαδικασία χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο TRIZOL, χλωροφόρμιο, ισοπροπανόλη, αιθανόλη 75% και H_2O. Το RNA διατηρεί την ακεραιότητά του, καθώς διαχωρίζεται από το DNA και τις πρωτεΐνες (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Κατακρήμνιση RNA. Διαχωρισμός φάσης φαινόλης-χλωροφόρμιου που δείχνει τα τρία στρώματα. Η ανώτερη υδατική φάση περιέχει το RNA, και η ενδιάμεση και οργανική φάση περιέχουν το DNA και τις πρωτεΐνες. Στη συνέχεια, το RNA εξάγεται από την υδατική φάση με καθίζηση μέσω της ισοπροπανόλης. (https://www.zymoresearch.com/pages/what-is-trizol)

Τα δείγματα τοποθετούνται στο gel ηλετροφόρησης και γίνετε έλεγχος του μήκους της αλληλουχίας που αναμένουμε.

2. **Σύνθεση cDNA PCR**

Στην συνέχεια γίνεται σύνθεση cDNA με τη χρήση kit προσθέτοντας το RNA κάθε δείγματος καθώς και Oligo-dT20 και dNTPs και τέλος H_2O και προσθήκη στο θερμοκυκλωποιητή PCR σε κατάλληλες θερμοκρασίες (Πίνακας 1).

Step	Temperature	Duration	Cycles
cDNA incubation	94°C	5 min	1
cDNA conversion	50°C 70°C	50 min 15 min	1
Hold	4°C	∞	1

Πίνακας 1. Συνθήκες PCR

Έπειτα από cDNA-incubation, προστίθεται το Superscript mix (Buffer FSB 5M, DTT 0.1M, RNasin, Superscript III) και ακολουθεί cDNA-conversion.

3. PCR, Gel ηλεκτροφόρησης

Έπειτα με την PCR, στοχεύοντας το επιθυμητό γονίδιο στόχο, GluCl, με σχεδιασμένους ειδικούς εκκινητές (Πίνακας 2), για την ανάκτηση και ενίσχυση τμημάτων. Το πρωτόκολλο και οι συνθήκες PCR προσαρμόζονται σύμφωνα με τη KAPA Biosystems (KAPA Taq PCR kit).

Primer	Sequence	Tm (^oC)
AsGluClA_F	5′- CTGGGAGTGACGACATTGCT -3′	59.4^oC
AsGluClA _R	5′- ATGCTTCATCGCAGTGGTCA -3′	57.3 ^oC

Πίνακας 2. Το εξειδικευμένο ζεύγος εκκινητών.

Σε gel ηλεκτροφόρησης τοποθετήθηκαν όλα τα δείγματα και στη συνέχεια στη συσκευή ακτινοβολίας UV για να γίνει αποκοπή της επιθυμητής ζώνης DNA.

4. Καθαρισμός προϊόντος PCR από gel (clean-up gel)

Για να χρησιμοποιηθεί το προϊόν PCR σε περαιτέρω αναλύσεις, πρέπει πρώτα να καθαριστεί από όλα τα μη επιθυμητά υπολειμματικά συστατικά που μπορεί να παρεμποδίσουν τις επακόλουθες αντιδράσεις, στην προκειμένη, την αλληλούχιση. Αρχικά πραγματοποιήθηκε αποκοπή του θραύσματος DNA από το gel αγαρόζης, χρησιμοποιώντας NucleoSpin Extract II καθώς και τα ρυθμιστικά διαλύματα του Kit (Buffer NT, NT3, NE).

5. Αλληλούχιση

Αφού ποσοτικοποιήθηκε το καθαρό προϊόν της PCR με τη χρήση της συσκευής Nanodrop Q5000 (Quawell), στάλθηκε για αλληλούχιση (Macrogen Europe BV), η οποία πραγματοποιήθηκε με το ζεύγος εκκινητών (forward - reverse primers) που παρατίθεται παραπάνω. Η αλληλούχιση έγινε με τη μέθοδο του Sanger (Sanger et al., 1977; Sanger & Coulson, 1975). Διεξήχθη ηλεκτροφόρηση (πηκτής ή τριχοειδής) για τις προκύπτουσες αλληλουχίες προκειμένου να ταξινομηθούν κατά μέγεθος. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους. Πρώτον, εάν οι αντιδράσεις διεξάγονται ξεχωριστά για κάθε ένα από τα τέσσερα διαφορετικά ddNTPs, η ηλεκτροφόρηση θα διεξαχθεί μεμονομένα για τα τμήματα που προέκυψαν από κάθε ddNTP. Με αυτόν τον τρόπο, η ταυτοποίηση κάθε νουκλεοτιδίου που περιέχεται στην ακολουθία θα γίνει ξεχωριστά. Κατά τη δεύτερη περίπτωση, κάθε ddNTP επισημαίνεται με διαφορετική φθορίζουσα χρωστική. Έτσι, κάθε ddNTP χρησιμοποιείται σε μία μόνο αντίδραση εξαιτίας των διαφορετικών μηκών κύματος στους οποίους εκπέμπει κάθε χρωστική.

6. Επεξεργασία και ανάλυση δεδομένων αλληλούχισης

Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε με το ζεύγος εκκινητών (forward - reverse primers) που αναφέρονται παραπάνω 1.1.3.3, με τους οποίους παρήχθησαν οι αλληλουχίες μέσω PCR. Συνεπώς για κάθε δείγμα προέκυψαν δύο αλληλουχίες, οι οποίες επικαλύπτονταν σε μεγάλο κοινό τμήμα τους. Για το λόγο αυτό, αυτές οι δύο αλληλουχίες έπρεπε να ενωθούν για την απόκτηση όσο το δυνατόν μεγαλύτερου τμήματος του PCR προϊόντος που στάλθηκε για αλληλούχιση.

Το λογισμικό που διευκολύνει αυτό το είδος χειρισμού είναι το SeqTrace. Χρησιμοποιείται για τη προβολή και επεξεργασία των χρωματογραφημάτων αλληλούχησης DNA. Το Seqtrace μπορεί αυτόματα να αναγνωρίσει, ευθυγραμμίσει και υπολογίσει τις ενιαίες αλληλουχίες που προκύπτουν από το συνδυασμό των αλληλουχιών που προήλθαν από την αλληλούχιση από τον κάθε εκκινητή ξεχωριστά. Επιπλέον φιλτράρονται οι χαμηλής ποιότητας χαρακτηρισμοί βάσεων (base calls) και περικόπτονται (trimming) τα άκρα των τελικών ακολουθιών. Οι τελικές αλληλουχίες DNA μπορούν στη συνέχεια να εξαχθούν σε μορφές αρχείων όπως FASTA. Επίσης με τη χρήση του SepTrace έγινε χειροκίνητος έλεγχος και επιλεγμένες τροποποιήσεις στις αλληλουχίες με βάση την ποιότητα του χρωματογραφήματος.

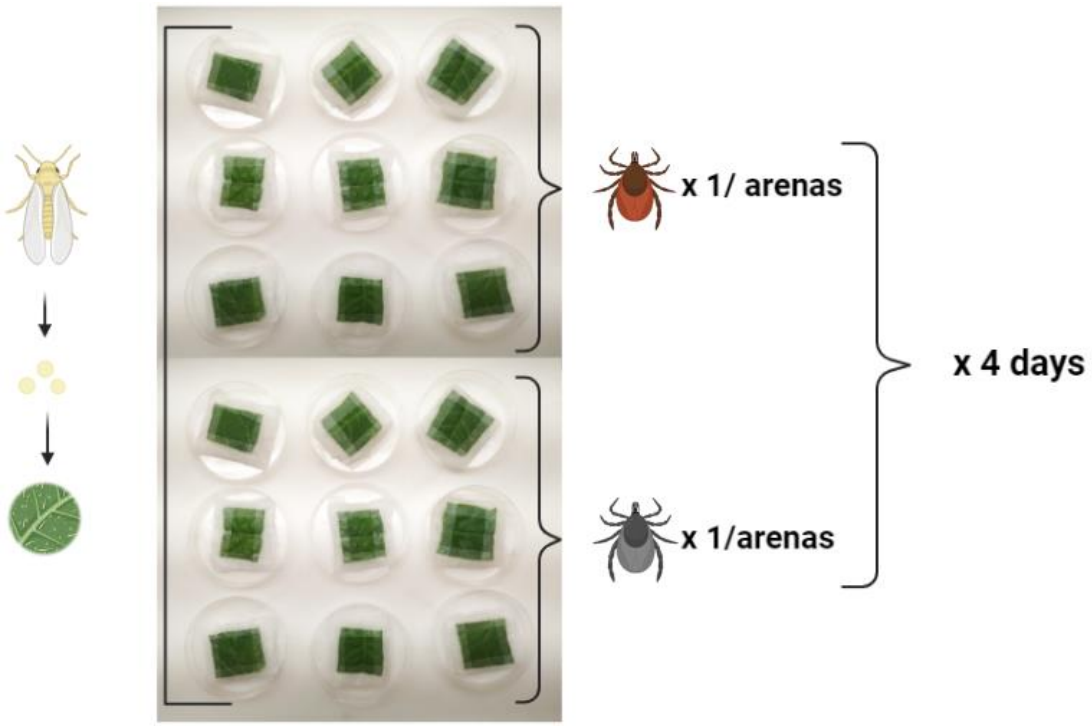
Στη συνέχεια με ένα πακέτο λογισμικού, το MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) το οποίο χρησιμοποιήθηκε αρχικά για την προβολή και ευθυγράμμιση των δύο (2) αλληλουχιών που αποκτήθηκαν και έπειτα τη μετατροπή αυτών από νουκλεοτιδική σε αλληλουχία αμινοξέων. Μετά προστέθηκε και η αντίστοιχη αλληλουχία αμινοξέων του *T. urticae*, με την οποία συγκρίθηκαν, για την εύρεση γνωστών μεταλλαγών που σχετίζονται με το φαινότυπο ανθεκτικότητας στην abamectin.

1.1.4 Ρυθμός θήρευσης του *A. swirskii*

Η διαδικασία που πραγματοποιήθηκε στοχεύει στην παρατήρηση του ρυθμού θήρευσης του *Amblyseius swirskii*, κυρίως σε αυγά και νύμφες 1^{ου} σταδίου αλευρώδη, ώστε να προσδιοριστεί ποιος πληθυσμός αρπακτικών ακάρεων από τους δύο, άγριου και εμπορικού, είναι αποτελεσματικότερος θηρευτής κατά *του B. tabaci*.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τοποθετήθηκαν 30 θηλυκά άτομα *A.swirskii* από κάθε πληθυσμό, πιθανώς ζευγαρωμένα σε πλαστικές αρένες εκτροφής, με ίνες βαμβακιού για την ωοθεσία και γύρη ως τροφή. Στις 24 ώρες αφαιρέθηκαν τα θηλυκά άτομα και παρέμειναν στις αρένες οι ίνες βαμβακιού μαζί με τα αυγά 1-2 ημερών *A.swirkii*. Έτσι, πραγματοποιήθηκαν συγχρονισμένες γέννες, για τη δημιουργία ατόμων ίδιας ηλικίας. Έπειτα από 15 ημέρες που έχουν ολοκληρωθεί τα πρώτα στάδια ανάπτυξης, τα ενήλικα άτομα έχουν ζευγαρώσει και ο διαχωρισμός του φύλου είναι ευδιάκριτος , απομονώνονται τα θηλυκά άτομα *A. swirskii*. Το καθένα θηλυκό άτομο τοποθετείται σε ατομική αρένα που έχει δημιουργηθεί με προσβεβλημένο φύλλο από *Bemisia tabaci* με την ακόλουθη μέθοδο.

Σε φύλλα βαμβακιού τοποθετούνται μικρά πλαστικά κλουβιά (clip–cages) στα οποία έχουν ανοιχθεί οπές καλυμμένες με τούλι για αερισμό στη βάση και για την είσοδο των ατόμων στο πλάι. Αρχικά γίνεται λήψη 60 περίπου ενήλικων ατόμων *Bemisia tabaci*, ακαθόριστου φύλου (mixed sex) από εκτροφή του εργαστηρίου και στη συνέχεια τοποθετούνται στα clip-cages για ωοθεσία. Μετά το πέρας 48 ωρών, τα clip-cages αφαιρούνται και τα ενήλικα άτομα απομακρύνονται από το φύλλο, ενώ ταυτόχρονα μαρκάρεται το σημείο ωοθεσίας (Roditakis et al., 2014). Έπειτα τα κομμάτια των φύλλων, με το μαρκαρισμένο σημείο ωοθεσίας, στο οποίο υπάρχουν αυγά και προνύμφες *B.tabaci*, καταμετρούνται και τοποθετούνται σε petri με βαμβάκι εμποτισμένο σε νερό και βρεγμένες βαμβακερές λωρίδες βαμβακιού (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Φύλλα βαμβακιού προσβεβλημένα από *B.tabaci* που έχουν εναποθέσει αυγά, τοποθετούνται σε petri. Έπειτα τοποθετούνται ενήλικα θηλυκά άτομα *A. swirskii*, 1/ petri, για τραφούν με αυγά και νεαρά στάδια *B. tabaci* για διάρκεια 4 ημερών.

Ρυθμός θήρευσης του *A. swirskii*

Από την ημέρα εισαγωγής των ατόμων *A.swirskii* στα προσβεβλημένα φύλλα από *B.tabaci*, που ορίζεται ως ημέρα 0, ξεκινούν τα άτομα *A.swirskii* να τρέφονται με ατελή στάδια του αλευρώδη (Εικόνα 6). Κάθε 24 ώρες και για 4 ημέρες πραγματοποιούνταν μετρήσεις των ζωντανών ατελών σταδίων *B.tabaci* ώστε να υπολογιστεί ο αριθμός αυτών που καταναλώθηκαν. Οι εκτροφές και τα φυτά διατηρούνται σε θάλαμο ανάπτυξης με τις βέλτιστες συνθήκες, φωτοπεριόδο 16:8 (Φως : Σκοτάδι), θερμοκρασία 26 ± 2 ºC και 65 ± 5% σχετική υγρασία.

Ρυθμός ωοτοκίας του *A. swirskii*

Η διαδικασία αυτή στοχεύει στην παρατήρηση του ρυθμού ωοτοκίας των αρπακτικών ακάρεων κατά τη διάρκεια θήρευσης του αλευρώδη και πραγματοποιήθηκε παράλληλα της προηγούμενης δοκιμής, στην οποία μετρήθηκε ο ρυθμός θήρευσης. Σκοπός είναι να εκτιμηθεί η επίδραση της ποιότητας της λείας για να προσδιοριστεί ο ρυθμός ωοτοκίας των αρπακτικών.

Κατά τη διάρκεια των προηγούμενων παρατηρήσεων, κάθε 24 ώρες από την ημέρα 0 έως 4, πραγματοποιούνταν επίσης και μετρήσεις των αυγών που εναπόθεταν τα *A.swirskii* κατά τη διάρκεια της διατροφής τους με αλευρώδη. Τα αποτελέσματα των καταμετρήσεων ωοτοκίας των δύο πληθυσμών αρπακτικών αναλύθηκαν με την μέθοδο T-test και υπολογίσθηκαν ή μέση τιμή θήρευσης και το τυπικό σφάλμα.

Στατιστική ανάλυση

Τα αποτέλεσματα των καταμετρήσεων αναλύθηκαν με την μέθοδο T-test. Ο ρυθμός θήρευσης και ωοτοκίας των δύο πληθυσμών, έγινε με τον υπολογισμό του μέσου όρου των αυγών που καταναλώθηκαν και ωοθετήθηκαν, αντίστοιχα, από κάθε θηλυκό άκαρι στη

διάρκεια μίας ημέρας. Έπειτα συγκρίθηκαν αυτές οι μέσες τιμές των δύο πληθυσμών και το τυπικό τους σφάλμα, κάνοντας στατιστικό έλεγχο με τη χρήση της τιμής σημαντικότητας (p value) και τους βαθμούς ελευθερίας (degrees of freedom - DF).

1.1.5 Γενετική ποικιλομορφία

Οι γενετικές μελέτες της βιοποικιλότητας βασίζονται στη χρήση γενετικών δεικτών για τον προσδιορισμό της γενετικής ποικιλομορφία των διαφόρων ειδών. Ένας ευρέως διαδεδομένος δείκτης για την ταξινόμηση των εντόμων είναι το γονίδιο της *υπομονάδας Ι της οξειδάσης του κυτοχρώματος C* (*cytochrome c oxidase subunit I - COI*) του μιτοχονδριακού DNA. Οι μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι ιδιαίτερα κατάλληλο για τη χρήση γενετικών δεικτών διότι διαθέτει γενετικούς τόπους με επιθυμητά χαρακτηριστικά όπως υψηλό ρυθμό μεταλλαξιγένεσης, υψηλά διατήρηση, μεγάλο αριθμό αντιγράφων, μητρική κληρονομικότητα, έλλειψη ιντρονίων, χαμηλό αριθμό μεταλλάξεων προσθηκών - ελλείψεων (insertion – deletion / Indel), και ελάχιστο έως μηδαμινό γονιδιακό ανασυνδυασμό (Phillips et al., 2019).

1.1.4.1 Ανάλυση του γονιδίου *COI*

Για την ανάλυση της γενετικής ποικιλομορφίας, απομονώθηκε τμήμα του γονιδίου *COI* από άτομα του *A. swirskii*, με σκοπό οι αλληλουχίες που αποκτήθηκαν να συγκριθούν με αντίστοιχες που υπάρχουν διαθέσιμες στη βάση δεδομένων NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Sayers et al., 2019). Τα άτομα που χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση προέρχονται από τον άγριο πληθυσμό Israel. Τα βήματα για την αλληλούχιση και την ανάλυση του *COI* είναι τα εξής:

1. **DNA extraction**

Έγινε εκχύλιση ολόκληρου του γονιδιωματικού DNA (gDNA) από τα αρπακτικά άκαρι *Amblyseius swirskii*, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο CTAB (Navajas et al., 1999). Αρχικά, για την εξαγωγή DNA, πρέπει να αποκτηθούν τα κύτταρα από τα οποία θα πραγματοποιηθεί η απομόνωση DNA. Αυτό πραγματοποιείται με το πρωτόκολλο CTAB (Cetrimonium bromide).

2. **Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Με την PCR στοχεύεται ένα συγκεκριμένο θραύσμα DNA, χρησιμοποιώντας εκκινητές, που είναι ειδικά σχεδιασμένοι για τη στόχευση του επιθυμητού γονιδίου. Ξεκινώντας με μόνο μια μικρή ποσότητα αρχικών ακολουθιών DNA, μετά από κάθε γύρο συντίθενται νέες ακολουθίες και χρησιμεύουν ως πρότυπα για την ενίσχυση του επόμενου γύρου. Με αυτόν τον τρόπο, επιτυγχάνεται εύκολα και γρήγορα η απαιτούμενη ποσότητα δείγματος, και συγκεκριμένα οι επιθυμητές ακολουθίες προς μελέτη.

Έγινε χρήση του PCR kit της KAPA Biosystems (KAPA Taq PCR kit) και ακολουθήθηκαν οι προβλεπόμενες από τους κατασκευαστές συνθήκες. Έπειτα εισαγωγή των δειγμάτων στον θερμοκυκλωποιητή PCR. Οι συνθήκες προσαρμόστηκαν όπως φαίνεται παρακάτω (Πίνακας 3).

Step	Temperature	Duration	Cycles
Initial	95°C	3 min	1

denaturation			
Denaturation	95°C	30 sec	35
Annealing	Tm - 5°C	30 sec	
Extension	72°C	1 min/kb	
Final extension (optional)	72°C	1 min/kb	1
Hold	4-10°C	∞	1

Πίνακας 3. Συνθήκες PCR

Το συνολικό μήκος του μιτοχονδριακού γονιδίου που κωδικοποιεί την υπομονάδα I της οξειδάσης του κυτοχρώματος C (*COI*) είναι 1563 ζεύγη βάσεων (ζ.β.) σύμφωνα με την κατατεθειμένη αλληλουχία με accession number MW729377 στο NCBI. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε ζεύγος εκκινητών (Πίνακας 4) για τη στόχευση ενός τμήματος του γονιδίου μήκους ~700 ζ.β. (Morrison et al., 2017). Στη παρούσα έρευνα ως εκμαγεία στην PCR χρησιμοποιήθηκαν τα gDNA των τριών ατόμων *A.swirskii* που ανακτήθηκαν όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

Primer	Sequence	Tm (°C)
LCO - 1490	5′-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3′	50,5
HCO – 2198	5′-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3′	55,1

Πίνακας 4. Το εξειδικευμένο ζεύγος εκκινητών (Morrison et al., 2017)

3. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Σε αυτή τη μελέτη για τις ανάγκες της ηλεκτροφόρησης του DNA χρησιμοποιήσαμε πηκτή αγαρόζης (gel 1.5% με TAE 1X και 3.5% βρωμιούχο αιθίδιο-EtBr). Το DNA φορτώνεται στα πηγαδάκια του gel (1-5 μl δείγματος DNA, 1 μg DNA συνολικά), αναμειγμένο με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης το οποίο περιέχει μεταξύ άλλων, μια χρωστική (10x - loading dye, χρωστική φόρτωσης μέχρι να γίνει η συγκέντρωση της 1x). Στην πρώτη λωρίδα του gel, τοποθετείται ο δείκτης μοριακού βάρους (ladder). Το gel τρέχει στα 80 (για μικρά gels)- 150 V (για μεγάλα gels) για 1 – 1,5 ώρα (εξαρτάται από το gel).

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το DNA οπτικοποιείται με τη χρήση συσκευής με ακτινοβολία UV, η οποία διεγείρει τη χρωστική EtBr, που παρεμβάλλεται (intercalate) ανάμεσα στις βάσεις του DNA και αποκαλύπτει τη θέση του στο πήκτωμα.

4. Καθαρισμός PCR προϊόντος (PCR clean-up)

Για να χρησιμοποιηθεί το προϊόν PCR σε περαιτέρω αναλύσεις, πρέπει πρώτα να καθαριστεί από όλα τα μη επιθυμητά υπολειμματικά συστατικά που μπορεί να παρεμποδίσουν τις επακόλουθες αντιδράσεις, στην προκειμένη, την αλληλούχιση. Σε αυτά τα συστατικά περιλαμβάνονται ένζυμα, εκκινητές, διμερή εκκινητών, υπολειμματικά άλατα, νουκλεοτίδια, ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης, πρωτεΐνες, RNA κλπ. Διάφορες μέθοδοι χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό των προϊόντων PCR. Στη συγκεκριμένη περίπτωση,

χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο καθαρισμού Nucleospin® PCR από Macherey-Nagel και η διαδικασία διεξήχθη σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

5. Αλληλούχιση

Ποσοτικοποιήθηκε το καθαρό προϊόν της PCR με τη χρήση της συσκευής Nanodrop Q5000 (Quawell), στάλθηκε για αλληλούχιση (Macrogen Europe BV). Η αλληλούχιση έγινε με τη μέθοδο του Sanger (Sanger et al., 1977; Sanger & Coulson, 1975) και ακολουθήθηκε η μέθοδος όπως περιγράφεται στο 1.1.3.5).

6. Επεξεργασία και ανάλυση δεδομένων αλληλούχισης

Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε με το ζεύγος εκκινητών (forward - reverse primers) που παρατίθεται στο 1.1.4.2, με το οποίο παρήχθησαν οι αλληλουχίες μέσω PCR. Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία και ανάλυση των αλληλουχιών είναι το SeqTrace (όπως στο 1.1.3.6).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση, με τη χρήση του λογισμικού MEGA. Το λογισμικό αυτό χρησιμοποιήθηκε αρχικά για την προβολή και ευθυγράμμιση των τριών (3) αλληλουχιών που αποκτήσαμε και επιπλέον πέντε (5) αλληλουχιών *A. swirskii* από εμπορικό πληθυσμό Koppert (www.koppert.com, Copyright Koppert Biological Systems. All rights reserved), που ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων NCBI (MT827885.1, MT827886.1, MT827887.1, MT827888.1, MT827889.1). Οι αλληλουχίες επιλέχθηκαν ώστε να αντιστοιχούν με την αλληλουχία που μελετήσαμε και εφόσον υπήρχαν δεδομένα για τη δειγματοληψία τους μέχρι και τον Ιανουάριο του 2022.

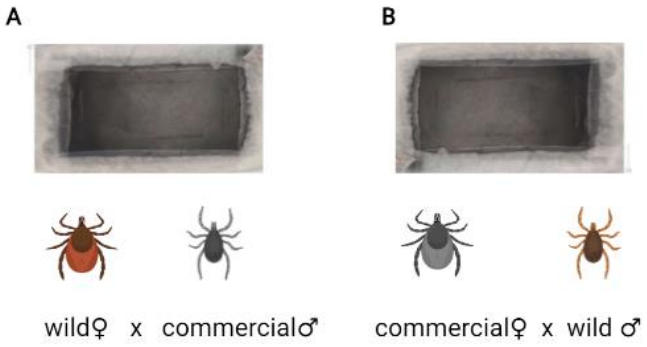
Για τη μελέτη της πολυμορφικότητας των αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε το DNASP6 (Rozas et al., 2017, Rozas & Rozas, 1995), το οποίο είναι ένα πρόγραμμα που παρέχει τη δυνατότητα ανάλυσης της γενετικής ποικιλότητας πληθυσμών. Με τη χρήση αυτού του προγράμματος, προσδιορίστηκαν οι πολυμορφικές θέσεις, υπολογίστηκαν διάφοροι δείκτες της γενετικής ποικιλότητας των αλληλουχιών και βρέθηκαν οι αλληλουχίες των απλοτύπων που προέκυψαν από το σύνολο των αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκαν.

Στη συνέχεια με τη χρήση του λογισμικού MEGA χρησιμοποιήθηκαν οι αλληλουχίες των απλοτύπων για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου με τη μέθοδο της Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood), αφού πρώτα ευθυγραμμίστηκαν και έγινε επιλογή του κατάλληλου εξελικτικού μοντέλου Tamura-Nei 1993 (TN93) με ομοιογενείς ρυθμούς (uniform rates). Ως εξωομάδα (outgroup) χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία MG415926.1. Παρατηρώντας την τοπολογία των κλάδων που προέκυψαν στο φυλογενετικό δέντρο, εξάχθηκαν συμπεράσματα όσον αφορά την γενετική συγγένεια των δειγμάτων που άνηκαν οι αλληλουχίες που αναλύθηκαν.

1.1.6 Διασταυρώσεις

Σε χιαστί διασταύρωση που έγινε μεταξύ των 2 πληθυσμών, στη μία περίπτωση το θηλυκό άτομο ήταν άγριου πληθυσμού με αρσενικό εμπορικού πληθυσμού και στην άλλη το αντίστροφο, θηλυκό εμπορικού πληθυσμού με αρσενικό άγριου πληθυσμού.

Αρχικά, σε πλαστικές αρένες εκτροφής (όπως αναφέρθηκε παραπάνω) διαφορετικές για κάθε πληθυσμό, τοποθετήθηκαν 30 θηλυκά άτομα *A.swrskii*, πιθανόν ζευγαρωμένα, με ίνες βαμβακιού για 48 ώρες, με σκοπό την ωοθεσία. Στις 24 ώρες αφαιρέθηκαν τα θηλυκά άτομα και παρέμειναν στην αρένα οι ίνες βαμβακιού μαζί με τα αυγά 1-2 ημερών. Στις 72 ώρες απομονώθηκαν τα άτομα μέχρι την ενηλικίωσή τους με σκοπό τα θηλυκά άτομα να παραμείνουν αγονιμοποίητα μέχρι τη στιγμή της διασταύρωσης. Μετά από 5 ημέρες, αφού ήταν ευδιάκριτο το φύλο των ατόμων, τοποθετήθηκαν, σε ατομικές αρένες, ζευγάρια θηλυκών ατόμων εμπορικού πληθυσμού με αρσενικά άγριου πληθυσμού (Israel), και το αντίστροφο με σκοπό να διασταυρωθούν (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Χιαστί διασταυρώσεις πληθυσμών. (A) θηλυκό άτομο άγριου πληθυσμού διασταυρώθηκε με αρσενικό άτομο εμπορικού. (B) θηλυκό άτομο εμπορικού διασταυρώθηκε με αρσενικό άτομο άγριου πληθυσμού.

Από την ημέρα που τοποθετήθηκαν σε ζευγάρια (ημέρα 0), εώς και την 5^{η} ημέρα, γινόταν καθημερινά συλλογή των αυγών (F1 γενιά) και τοποθέτηση τους σε μία κοινή αρένα από κάθε διασταύρωση. Κατά την ενηλικίωση των ατόμων της γενιάς F1 καταμετρήθηκε η αναλογία των θηλυκών από κάθε διασταύρωση. Τα άτομα αυτά παρέμειναν στις ίδιες αρένες και διασταυρώθηκαν μεταξύ τους (F1xF1). Έπειτα ελέγχθηκε η επόμενη γενιά F2 για την παρουσία θηλυκών ατόμων και τον αποκλεισμό αρρενοτοκίας.

1.1.7 Έλεγχος ενδοσυμβιωτικών βακτηρίων

Στη παρούσα μελέτη έγινε έλεγχος στους πληθυσμούς *Amblyseius swirskii*, άγριου και εμπορικού για την παρουσία ενδοσυμβιωτικών βακτηρίων (endosymbionts) που είναι γνωστό ότι προκαλούν αναπαραγωγικές διαταραχές. Τα βακτήρια που ελέγχθηκαν ήταν τα ακόλουθα: *Wolbachia* (Rickettsiaceae), *Rickettsia* (Rickettsiaceae), *Cardinium* (Flexibacteraceae) και *Spiroplasma* (Spiroplasmataceae), *Hamiltonella* (Enterobacteriacea) και *Arsenophonus* (Morganellacea).

Για την απομόνωση ολόκληρου του γονιδιωματικού DNA (gDNA) έγινε εκχύλιση από τα άκαρι *Amblyseius swirskii*, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο CTAB. Έπειτα με την PCR, στοχεύονται τα επιθυμητά προς μελέτη βακτηριακά γονίδια, με ειδικούς εκκινητές σχεδιασμένους για τη στόχευση του επιθυμητού γονιδίου σε άλλους μελετημένους οργανισμούς (πίνακας 5). Το πρωτόκολλο και οι συνθήκες PCR προσαρμόζονται σύμφωνα με τη KAPA Biosystems (KAPA Taq PCR kit).

	Primer	Sequence 5' to 3'	Tm (°C)
Wolbachia	Wosp81F	5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAC-3'	58°C
	Wosp691R	5'-AAAAATTAAACGCTACTCCA-3'	53.5°C
Cardinium	CFB-F	5'-GCGGTGTAAAATGAGCGTG-3'	60.6°C
	CFB-R	5'-ACCTMTTCTTAACrCAAGCCT-3'	52.4°C
Rickettsia	Rb_F	5'-GCTCAGAACGAACGCTATC-3'	60°C
	Rb_R	5'-GAAGGAAAGCATCTCTGC-3'	60°C
Hamiltonella	Ham_F	5'-TGAGTAAAGTCTGGAATCTGG-3'	60°C
	Ham_R	5'-AGTTCAAGACCGCAACCTC-3'	60°C
Arsenophonus	Ars23S-1	5'-CGTTTGATGAATTCATAGTCAAA-3'	59°C
	Ars23S-2	5'-GGTCCTCCAGTTAGTGTTACCCAAC-3'	59°C
Spiroplasma	SPIR_1	5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	53°C
	SPIR_2	5'-TAGCCGTGGCTTTCTGGTAA-3'	54°C

Πίνακας 5. Εκκινητές για τη στόχευση των επιθυμητών γονιδίων από άλλους μελετημένους οργανισμούς.

Σε gel ηλεκτροφόρησης τοποθετήθηκαν όλα τα δείγματα για να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή μη των βακτηρίων που εξετάστηκαν. Έπειτα στη συσκευή με ακτινοβολία UV απεικονίσθηκαν τα αποτελέσματα.

1.2 Αποτελέσματα

1.2.1 Εκτίμηση ανθεκτικότητας σε κλασσικά εντομοκτόνα

Μελετήθηκαν τα επίπεδα ανθεκτικότητας στους δύο πληθυσμούς ακάρεων *Ablyseius swirskii*, του εμπορικού και του άγριου τύπου, σε δύο δραστικές ουσίες εντομοκτόνων σκευασμάτων, abamectin και spinosad. Και στις δύο περιπτώσεις σκευασμάτων, εφαρμόστηκε από χαμηλότερη έως και υψηλότερη δόση εκατέρωθεν της συνιστώμενης συγκέντρωσης του εντομοκτόνου (Πίνακας 6). Η θνησιμότητα ελέγχου ήταν <10% σε όλες τις περιπτώσεις.

Active Ingredient		DOSES (ppm)				
abamectin	RD=18ppm	1	10	20	30	40
spinosad	RD=120ppm	30	100	300	1000	3000

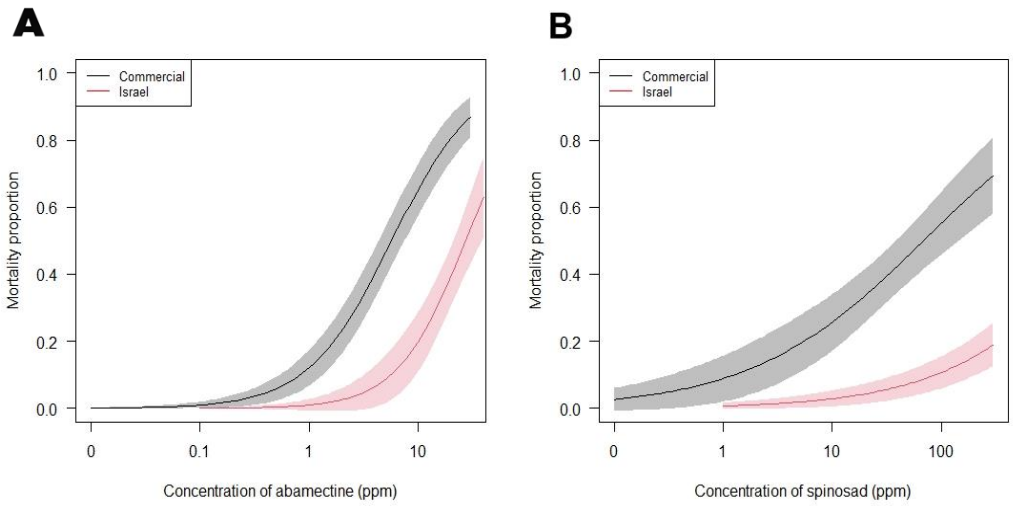
Πίνακας 6. Δραστικές ουσίες που εφαρμόστηκαν, και οι δόσεις αυτών.

Όπως φαίνεται και παραπάνω (Πίνακα 7), παρατηρήθηκαν χαμηλά επίπεδα θνησιμότητας στον άγριο πληθυσμό και στα δύο σκευάσματα που δοκιμάστηκαν (Γράφημα 1). Σχετικά με τη δραστική abamectin, η συγκέντρωση που θανατώνει το 50% (LC - lethal concentration) του άγριου πληθυσμού (LC50= 27.1 ppm) κυμάνθηκε πέντε φορές πάνω σε σχέση με του εμπορικού πληθυσμού (LC50= 5.7 ppm). Η συνιστώμενη συγκέντρωση της abamectin είναι 18 ppm. Σε αυτή τη συγκέντρωση θανατώνεται το 79% του εμπορικού πληθυσμού, ενώ στον άγριο πληθυσμό θανατώνεται περίπου το μισό (37%). Συνεπώς τα επίπεδα ανθεκτικότητας του άγριου πληθυσμού Israel στην abamectin είναι υψηλά, σε αντίθεση με το εμπορικό στέλεχος (Γράφημα 1).

ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ	LC37	± SE	LC50	± SE	LC79	± SE	LC90	± SE
ABAMECTIN (RD=18ppm)								
commercial	3.5	0.5	5.7	0.7	**18.2**	3.4	39.2	9.9
ISRAEL	**18.5**	2.5	27.1	3.9	70.5	20.0	132.0	53.3
	LC12	**± SE**	**LC50**	**± SE**	**LC58**	**± SE**	**LC90**	**± SE**
SPINOSAD (RD=120 ppm)								
commercial	1.8	1.2	68.5	21.6	**122.9**	45.4	3665.1	3414.9
ISRAEL	**123.3**	49.38	3257.6	1688.0	5536.1	3260.0	120409.2	120409.2

Πίνακας 7. Ποσοστό θνησιμότητα (%) των 2 πληθυσμών ωφέλιμων αρπακτικών σε δύο δραστικές ουσίες.

Επιπλέον, εντοπίστηκαν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας του άγριου πληθυσμού Israel και στο spinosad (Γράφημα 1). Η συγκέντρωση του spinosad που θανατώνει το 50% του άγριου πληθυσμού (LC50= 3257.6 ppm) είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με του εμπορικού (LC50= 68.5 ppm), υπολογίστηκε ότι είναι περίπου 50 φορές πάνω αντίστοιχα (Πίνακας 7). Καθώς η συνιστώμενη συγκέντρωση του spinosad είναι 120 ppm, σε αυτή τη συγκέντρωση θανατώνεται το 58% του εμπορικού πληθυσμού, αλλά μόνο το 37% του άγριου.



Γράφημα 1. Λογαριθμική συνάρτηση. Καμπύλη μέσης τιμής της θνησιμότητας και το εύρος η τυπική απόκλιση, των πληθυσμών, εμπορικού (γκρι) και άγριου (κόκκινο) σε σχέση με τις αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εντομοκτόνου Abamectin (A) και Spinosad (B).

1.2.2 Έλεγχος των καναλιών χλωρίου για μεταλλάξεις

Έγινε αλληλούχιση του καναλιού χλωρίου GluCl, προκειμένου να διερευνηθεί η παρουσία γνωστών μεταλλαγών στόχου, που σχετίζονται με τον φαινότυπο της ανθεκτικότητας στην abamectin στο άκαρι Tetranychus urticae (Dermauw et al., 2012). Η ανάλυση δεν υπέδειξε ύπαρξη των γνωστών ή/και νέων μεταλλαγών μεταξύ των δύο πληθυσμών που να μπορεί να σχετιστεί με την μειωμένη ευαισθησία του πληθυσμού Ισραήλ στο abamectin (Εικόνα 8).

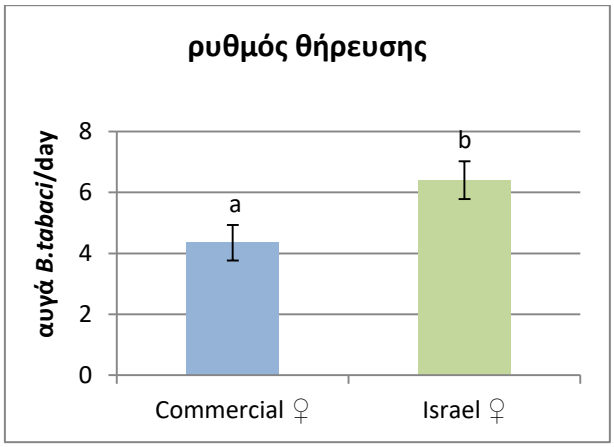
```
                                                G326E/G314D
                                              I321T
Moccidentalis GluCl   TSIPARVSLGVTTLLTMATQISGINASLPPVSYTKAIDVWTGVCLTFVFGALLEFALVNYASRSDQRRQNTHKQS
Koppert_GluCl_        --------LGVTTLLTMATQISGINASLPPVSYTKAIDVWTGVCLTFVFGALLEFALVNYASRSDRRGQNTHKQS
Israel_GluCl          --------LGVTTLLTMATQISGINASLPPVSYTKAIDVWTGVCLTFVFGALLEFALVNYASRSDRRGQNTHKQS
Turticae GluCl        NAIPARVSLGVTTLLTMATQISGINASLPPVSYIKAIDVWTGVCLFFVFGALLEFALVNYASRSDAHRAARKRRA

Moccidentalis GluCl   VPQATQQRQKWLLPASIAAAGLENNQSAIDHCDEAFAMPFQGNEX--
Koppert_GluCl_        VPQATQQRQKWLLPASIAAAGLENNQSAIDX----------------
Israel_GluCl          VPQATQQRQKWLLPASIAAAGLENNQSAIDHCDEX------------
Turticae GluCl        ENQQQQVQQ--VLGGGGSAFGFTGGGGGGGGGGGLGNMGNPGYGMTX
```

Εικόνα 8. Ευθυγράμμιση αλληλουχιών των αμινοξέων, ενός πληθυσμού *M. occidentalis*, του εμπορικού πληθυσμού (Koppert) και του άγριου (Israel) *A. swirskii*, καθώς και του στελέχους *Tetranychus urticae* που εμφάνισε τον φαινότυπο ανθεκτικότητας στην abamectin. Εντοπίστηκαν δύο πολυμορφικές θέσεις παρούσες και στους δύο πληθυσμούς, οι οποίες είναι συνώνυμες σημειακές μεταλλαγές και δεν οδηγούν σε αλλαγή της κωδικοποιούσας πρωτεινικης αλληλουχίας.

1.2.3 Ρυθμός θήρευσης και ωοτοκίας του *A. swirskii*

<u>Ρυθμός θήρευσης του *A. swirskii*</u>

Κατά την εκτροφή απομονωμένων θηλυκών ατόμων *A.swirskii* σε δίσκους φύλλων φασολιού με αυγά *B.tabaci*, γινόταν καταμέτρηση των αυγών *B.tabaci* κάθε 24 ώρες για κάθε θηλυκό άτομο *A.swirskii*, ώστε να υπολογιστεί ο αριθμός των αυγών που είχαν καταναλωθεί. Στο τέλος της παρατήρησης, μετά από 4 ημέρες συγκεντρώθηκαν τα αποτελέσματα και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των αυγών που θηρεύτηκε από κάθε άτομο ανά ημέρα.



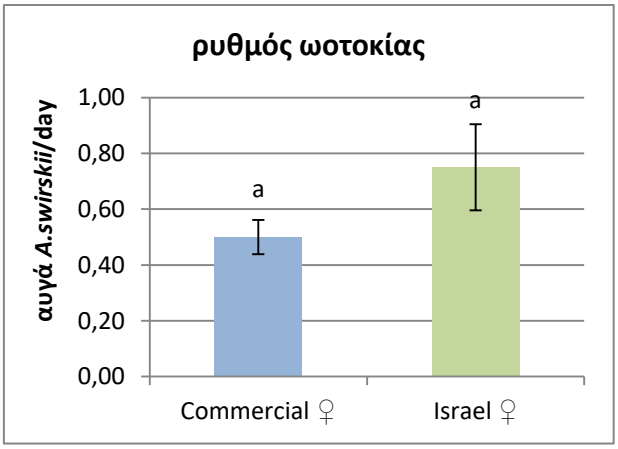
Γράφημα 2. Παρουσιάζεται ο ρυθμός θήρευσης, δηλ. ο μέσος αριθμός των καταναλωθέντων αυγών *B. tabaci* (± τυπικό σφάλμα) ανά θηλυκό *A. swirskii* για κάθε πληθυσμό, εμπορικό και άγριο (Israel) ανά ημέρα. *a,b = SE (DF==9, p value < 0.05, T-test)

Ο μέσος αριθμός των αυγών που καταναλώθηκε από τον εμπορικό πληθυσμό ήταν 4.35 ± 0.62 (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα) αυγά/θηλυκό/ημέρα ενώ από τον άγριο (Israel) 6.40 ±

0.58 αυγά/θηλυκό/ημέρα (Γράφημα 2). Ο ρυθμός θήρευσης των θηλυκών αρπακτικών *A. swirskii* στους δύο πληθυσμούς, παρατηρήθηκε ότι έχει σημαντική διαφορά, με τον ρυθμό του άγριου πληθυσμού να ξεπερνά του εμπορικού (DF=9, p value < 0.05, T-test) (Γράφημα 2).

Ρυθμός ωοτοκίας του *A. swirskii*

Παράλληλα, κατά την διάρκεια της δοκιμής, γινόταν καταμέτρηση και των αυγών *A. swirskii* από κάθε θηλυκό άκαρι, με σκοπό τον προσδιορισμό του ρυθμού ωοτοκίας από την επίδραση του *B. tabaci* που αποτελούσε τη λεία τους. Ο ρυθμός ωοτοκίας των *A. swirskii*, για τους δύο πληθυσμούς, υπολογίστηκε για τις πρώτες τέσσερις ημέρες, μετά την έναρξη της ωοτοκίας.



Γράφημα 3. Παρουσιάζεται ο ρυθμός ωοτοκίας, δηλ. ο μέσος αριθμός των ωοθετημένων αυγών ανά θηλυκό *A. swirskii* για κάθε πληθυσμό, εμπορικό και άγριο (Israel) ανά ημέρα, κατά την εκτροφή τους με αυγά *B. tabaci*. *a= SE (DF=9, p value > 0.05, T-test)

Ο εμπορικός πληθυσμός βρέθηκε να έχει ωοθετήσει 0.50 ± 0.06 (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα) αυγά/θηλυκό/ημέρα και ο άγριος πληθυσμός (Israel) 0.75 ± 0.15 (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα) αυγά/θηλυκό/ημέρα, κατά τη διατροφή τους με *B.tabaci* (DF=9, p value=0.08, T-test) (Γράφημα 3).

1.2.4 Γενετική ποικιλομορφία

Για την εκτίμηση της γενετικής ποικιλομορφίας των διαφορετικών πληθυσμών *Amblyseius swirskii* έγινε χρήση του mtDNA ως γενετικός δείκτης. Συνολικά αποκτήθηκαν τρεις (3) αλληλουχίες του γονιδίου *COI* από άτομα του πληθυσμού Israel (Isr1, Isr2, Isr3) και μελετήθηκαν μαζί με πέντε (5) αλληλουχίες από το NCBI, από έναν εμπορικό πληθυσμό, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση του πολυμορφισμού των αλληλουχιών και προέκυψαν τα παρακάτω δεδομένα ποικιλομορφίας (Πίνακας 8). Ο συνολικός αριθμός των αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση DNASP6 ήταν οκτώ (8), οι οποίες περιείχαν 648 νουκλεοτιδικές θέσεις εκ των οποίων οι 644 (99.4%) ήταν συντηρημένες και 4 (0.6%) ήταν πολυμορφικές.

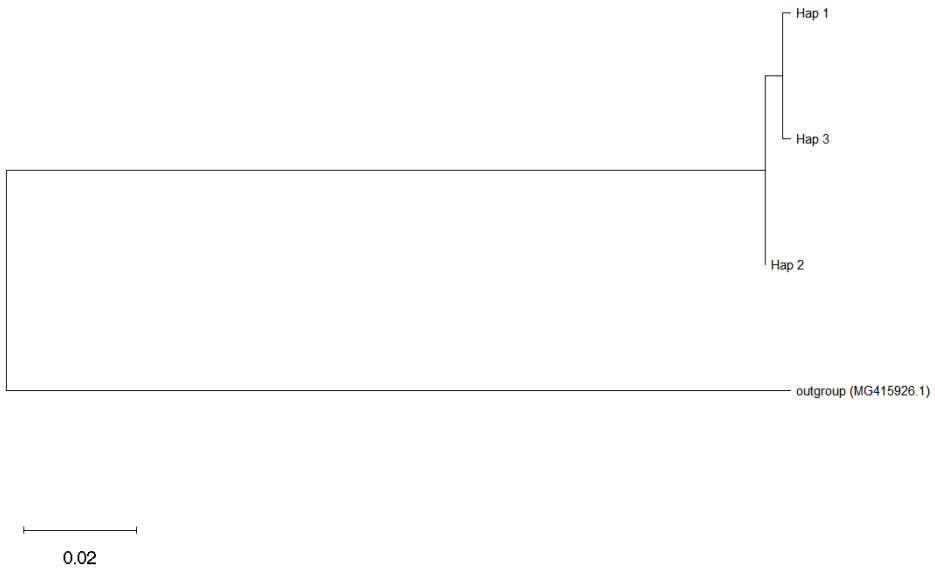
Δεδομένα ποικιλομορφίας των αλληλουχιών	N	sites
αριθμός αλληλουχιών	8	
συνολικό αριθμός θέσεων	648	
συντηρημένες (μονομορφικές) θέσεις	644	
μεταβλητές (πολυμορφικές) θέσεις	4	
singleton variable sites	3	331 - 526 - 562
parsimony informative sites	1	229
κενά (gaps)	0	
Συνολικός αριθμός μεταλλαγών	4	
Pi -Ποικιλομορφία νουκλεοτιδίων (ανά θέση)	0.00182	
G+C	0.31	

Πίνακας 8. Δεδομένα ποικιλομορφίας των οκτώ αλληλουχιών που αναλύθηκαν.

Επίσης βρέθηκαν και οι αλληλουχίες των απλοτύπων που προκύπτουν από το σύνολο των αλληλουχιών της ανάλυσής μας. Ο συνολικός αριθμός των απλοτύπων είναι τρεις (3). Ο Hap_1 περιέχει δύο (2) αλληλουχίες του πληθυσμού Israel (Isr2, Isr3) και τέσσερις (4) από τον εμπορικό πληθυσμό που συλλέξαμε από τη βάση δεδομένων NCBI. Ο Hap_2 έχει μία αλληλουχία από τον εμπορικό πληθυσμό και ο Hap_3 μία από τον Israel (Isr1) (Πίνακας 9).

Απλότυποι	N	αλληλουχίες
Hap_1	6	MT827889.1 - MT827888.1 - MT827886.1 - MT827886.1 - Isr2, Isr3
Hap_2	1	MT827885.1
Hap_3	1	Isr1

Πίνακας 9. Απλότυποι που δημιουργήθηκαν και οι αλληλουχίες που τις αποτελούν.



Εικόνα 9. Δέντρο τριών απλοτύπων. Οι απλότυποι πρόεκυψαν από τρεις αλληλουχίες άγριου πληθυσμού, Israel, και πέντε άλλες αλληλουχίες εμπορικού πληθυσμού που βρέθηκαν στη βάση δεδομένων.

Το δέντρο δημιουργήθηκε με τη χρήση των τριών απλοτύπων που προέκυψαν (Εικόνα 8). Παρατηρείται ότι δύο αλληλουχίες του άγριου πληθυσμού έχουν μεγαλύτερη συγγένεια με τέσσερις αλληλουχίες του εμπορικού πληθυσμού (Haplotype_1). Από τους υπόλοιπους απλοτύπους που παρουσιάζουν μια διαφοροποίηση, πιο συγγενικός στο Hap_1 είναι ο Hap_3 που ανήκει σε άγριο πληθυσμό. Την πιο μεγάλη διαφοροποίηση έχει ο Hap_2 που αντιστοιχεί μόνο σε εμπορικό πληθυσμό.

1.2.5 Διασταυρώσεις

Στόχος των διασταυρώσεων ήταν ο έλεγχος της γενετικής συμβατότητας των πληθυσμών, μέσω υπολογισμού των αυγών που προέκυψαν από τη χιαστή διασταύρωση των δύο πληθυσμών και του προσδιορισμού της αναλογίας των φύλων στην προκύπτουσα γενιά F1. Έπειτα, μετά από ενδο-γονιμοποίηση της F1, έγινε επιβεβαίωση της παρουσίας θηλυκών ατόμων και στη F2 γενιά.

Κατά την καταμέτρηση των αυγών της F1 γενιάς παρατηρήθηκε ότι τα θηλυκά άτομα Israel ωοθέτησαν συνολικά 21 αυγά όταν διασταυρώθηκαν με αρσενικά του εμπορικού πληθυσμού στην περίοδο των 5 ημερών, ενώ τα θηλυκά του εμπορικού πληθυσμού σε διασταύρωση με αρσενικά Israel ωοθέτησαν 26 αυγά στο ίδιο διάστημα, 3.5 και 2.6 αυγά/θηλυκό/ημέρα αντίστοιχα (Πίνακας 10).

	Parental ♀	eggs F1	F1♀ (%)	F2 ♀
Israel[1]	6	**21**	62	ναι
Commercial[2]	10	**26**	60	ναι

Πίνακας 10. . Καταγραφή αρχικών ατόμων *A.swirskii* (Parental) που συμμετείχαν στη διασταύρωση και ο αριθμός των αυγών του κάθε νέου υβριδικού πληθυσμού F1 (eggs F1). Ποσοστό θηλυκών ατόμων (%) στην F1 γενιά ανά πληθυσμό. Παρουσία θηλυκών ατόμων στην F2 γενιά. [1]Israel: διασταύρωση θηλυκού άτομου Israel με αρσενικό άτομο εμπορικού πληθυσμού, [2]commercial: διασταύρωση θηλυκού εμπορικού ατόμου με αρσενικό άτομο Israel.

Έπειτα έγινε αναγνώριση και καταμέτρηση των θηλυκών ατόμων της F1 γενιάς ώστε να διαπιστωθεί η αναλογία των φύλων σε αυτή τη γενιά. Στην F1 γενιά των διασταυρώσεων θηλυκών ατόμων Israel με αρσενικά του εμπορικού πληθυσμού το ποσοστό των θηλυκών ατόμων ήταν 62%, ενώ στις διασταυρώσεις θηλυκών εμπορικών ατόμων με αρσενικά Israel το ποσοστό των θηλυκών ήταν 60% αντίστοιχα (Πίνακας 10). Τέλος έγινε παρατήρηση της F2 γενιάς, για την παρουσία θηλυκών ατόμων και διαπιστώθηκε η παρουσία τους και στις δύο περιπτώσεις.

1.2.6 Ενδοσυμβιώτες

Στους δύο πληθυσμούς της παρούσας εργασίας έγινε έλεγχος από τα γένη Wolbachia, Rickettsia, Cardinium, Spiroplasma, Hamiltonella, Arsenophonus. Στα αποτελέσματά μας δεν υπήρχε ανίχνευση των ενδοσυμβιωτών σε κανένα από τους δύο πληθυσμούς *A. swirskii* που μελετήσαμε.

1.3 Συζήτηση

Στη σημερινή στρατηγική IPM, δίνεται έμφαση στον προληπτικό βιολογικό και φυσικό έλεγχο, με ελάχιστη χρήση χημικών εντομοκτόνων. Συχνά όμως ο βιολογικός και χημικός έλεγχος συνδυάζονται, συνεπώς οι εφαρμογές εντομοκτόνου δεν πρέπει να διαταράζουν τον βιολογικό έλεγχο, δηλαδή να μειώνουν τον πληθυσμό του φυσικού εχθρού. Η συμβατότητα των ωφέλιμων αρπακτικών με διάφορα χημικά, προσφέρει τη δυνατότητα να ενσωματωθούν τα αρπακτικα σε στρατηγικές εξάλειψης κατά διάφορων εχθρών για την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση.

Στη παρούσα μελέτη, μετά από μια προκαταρκτική φάση ελέγχου μερικών εντομοκτόνων/ακαρεοκτόνων στο αρπακτικό *Amblyseius swirskii* παρατηρήθηκαν κάποιες διαφορές μεταξύ των δύο πληθυσμών, εμπορικού και άγριου. Τα αποτελέσματα έδειξαν διαφορετική ανθεκτικότητα σε δύο ουσίες, την abamectin και το spinosad. Συγκεκριμένα, φάνηκαν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στον άγριο πληθυσμό και στις δύο δραστικές, abamectin και spinosad.

Έχει αποδειχθεί ότι ο *Tetranychus urticae Koch* (Acari: Tetranychidae), έχει αναπτύξει υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας σε διάφορα ακαρεοκτόνα, συνεπώς, καθίσταται επείγουσα η ανάγκη για εφαρμογή προγραμμάτων ολοκληρωμένης διαχείρισης για τον έλεγχο αυτού του φυτοφάγου αρθρόποδου (Díaz-Arias et al., 2019). Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση του ωφέλιμου αρπακτικού *A. swirskii* σε συνδυασμό με την abamectin. Στη παρούσα μελέτη εντοπίστηκαν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας του άγριου πληθυσμού στην abamectin, με τιμή LC50 (LC50=27ppm), που είναι υψηλότερη από τη συνιστάμενη δόση εφαρμογής (RD=18ppm). Συνεπώς σε καλλιέργεια όπου έχει γίνει εξαπόλυση του άγριου πληθυσμού *A. swirskii*, η εφαρμογή abamectin δεν οδηγεί στην εξάλειψη του ωφέλιμου και είναι συμβατή για τον έλεγχο φυτοφάγων. Αντίθετα ο εμπορικός πληθυσμός *A. swirskii* εμφάνισε χαμηλότερο επίπεδο LC50 (LC50=5.7ppm), από τη συνιστάμενη δόση (RD=18ppm). Το αποτέλεσμα για τον εμπορικό πληθυσμό συμφωνεί και με άλλη μελέτη στην οποία, η abamectin προκαλεί αρνητικά αποτελέσματα στο *A. swirskii*, τα οποία υποδηλώνουν ότι η abamectin θα πρέπει να χρησιμοποιείται με προσοχή (Audenaert et al., 2014; Kumar & Poehling, 2007). Συνεπώς ο άγριος πληθυσμός *A. swirskii* είναι συμβατός με τη δραστική της abamectin, σε αντίθεση με τον εμπορικό που εμφανίζει μερική συμβατότητα.

Επιπρόσθετα έχει αναφερθεί ότι κάποια Phytoseiidae (Acari) παρουσιάζουν μέτρια ανθεκτικότητα στην abamectin, όπως το *Neoseiulus californicus* McGregor (Han et al., 2010), *Euseius scutalis* Athias-Henriot (Döker & Kazak, 2020), *Typhlodromips montdorensis* Schicha (Cuthbertson et al., 2012), έως και χαμηλή ανθεκτικότητα, όπως τα *Phytoseiulus persimilis* και *Amblyseius fallacis* (Bostanian & Akalach, 2006), *Neoseiulus idaeus* Denmark & Mum (De Sousa Neto et al., 2020), *Neoseiulus cucumeris* Oudemans (Cuthbertson et al., 2012) και *Neoseiulus baraki* (Lima et al., 2016). Επομένως, απαιτείται προσοχή στις προσπάθειες ενσωμάτωσης της abamectin και των phytoseiids στις μεθόδους ελέγχου, επειδή είναι πιθανό να οδηγήσουν σε δυσμενείς συνέπειες. Αλλά αξίζει περαιτέρω μελέτη για δυνητική χρήση της συγκεκριμένης δραστικής στον βιολογικό έλεγχο.

Η έκθεση στο spinosad, στη συγκεκριμένη μελέτη, αναγνωρίστηκε ως επιζήμια για τα ακάρεα του εμπορικού πληθυσμού που εμφάνισαν θνησιμότητα LC50 σε χαμηλή συγκέντρωση δραστικής (LC50=68.5), σε σχέση με τη συνιστάμενη δόση (RD=120ppm) (LC50 < RD), σε αντίθεση με τον πληθυσμό άγριου τύπου που εμφάνισε πολύ μεγαλύτερη ανθεκτικότητα, και θνησιμότητα LC50 σε συγκέντρωση σχεδόν 30 φορές πάνω της συνιστώμενης

(RD=120ppm). Σε άλλη μελέτη βρέθηκε ότι τα LC50s του εμπορικού πληθυσμού *A. swirskii* στο spinosad ήταν σε παρόμοια επίπεδα (Cuthbertson et al., 2012). Συνεπώς, επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες ότι ο εμπορικός πληθυσμός *A. swirskii* εμφανίζει σχετικά υψηλή θνησιμότητα στην επίδραση του spinosad, και δεν προτείνεται για συνδυαστική χρήση με αυτή την δραστική ουσία (Audenaert et al., 2014; Cuthbertson, 2014).

Επιπρόσθετα έχει βρεθεί ότι το spinosad έχει χαμηλή τοξικότητα στο *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot (Yorulmaz Salman et al., 2015), *Amblyseius cucumeris* Oudeman (Jones et al., 2005) και το *Galendromus occidentalis* (Beers & Schmidt-Jeffris, 2015). Αλλά το *Neoseiulus fallacis* παρουσιάζει υψηλή θνησιμότητα στη δραστική αυτή (Villanueva & Walgenbach, 2005). Συνεπώς τα πρώτα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικοί παράγοντες σε συνδυασμό με το spinosad σε μια στρατηγική διαχείρισης, αφού είναι συμβατά μεταξύ τους, ενώ το τελευταίο όχι.

Μειωμένη τοξικότητα του spinosad έχει αναφερθεί για τα φυτοφάγα Acari, και συγκεκριμένα για τον τετράνυχο (Van Leeuwen et al., 2005). Επιπλέον, η *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) είναι ένα μεγάλο πρόβλημα για τις καλλιέργειες τομάτας και χαρακτηρίζεται από ανθεκτικότητα στο spinosad (Campos et al., 2014). Επιπλέον ίδιο πρόβλημα έχει παρατηρηθεί και με το *Frankliniella occidentalis* Pergan (Thysanoptera: Tripidae) (Bielza et al., 2007). Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι το spinosad δεν είναι τόσο άμεσα αποτελεσματικό στον αλευρώδη.

Στα παραπάνω πειράματα, της παρούσας μελέτης, παρατηρήθηκε υψηλή ανθεκτικότητα του άγριου πληθυσμού στην abamectin, σε αντίθεση με τον εμπορικό. Αυτό μας ώθησε στη διερεύνηση παρουσίας γνωστών μεταλλαγών στόχου, που σχετίζονται με τον φαινότυπο της ανθεκτικότητας στην abamectin στο άκαρα *Tetranychus urticae*. Ωστόσο, δεν εντοπίστηκαν οι γνωστές μεταλλαγές στην αλληλουχία του γονιδίου *GluCl* στον άγριο πληθυσμό. Είναι πιθανή η ύπαρξη μεταλλαγής/μεταλλαγών σε τμήμα του γονιδίου που δεν έχει ελεγχθεί ή και να εμπλέκεται άλλος μηχανισμός στον φαινότυπο της ανθεκτικότητας, όπως για παράδειγμα ο μεταβολισμός του abamectin από την P450 Cyp392A16 στον τετράνυχο (Riga et al., 2014).

Το περιβάλλον του πεδίου που αναπτύσσεται ο άγριος πληθυσμός διαφέρει πολύ σε σχέση με το περιβάλλον εκτροφής που αναπτύσσονται μαζικά οι βιολογικοί παράγοντες. Η προσαρμογή του πληθυσμού στο νέο περιβάλλον εκτροφής έχει αρνητικό αντίκτυπο και ωθεί σε μειωμένη ποικιλομορφία του πληθυσμού (Sørensen et al., 2012). Η μειωμένη γενετική ποκιλομορφία των πληθυσμών που εκτρέφονται εμπορικά μπορεί να επηρεάσει τα χαρακτηριστικά που είναι σημαντικά στην απόδοσή τους ως παράγοντες βιολογικού ελέγχου, όπως οι αναπαραγωγικές παράμετροι, η προτίμηση της θήρας ή ο ρυθμός θήρευσης (Paspati et al., 2019).

Προκειμένου να καθοριστεί η καταλληλότητα του *A. swirskii* για τον έλεγχο εχθρών, σε αυτή τη μελέτη εξετάστηκε ο ρυθμός θήρευσης και ωοτοκίας των δύο πληθυσμών αρπακτικών ακάρεων *A. swirskii*, εμπορικού και άγριου, κατά τη διατροφή τους με αυγά *B. tabaci*. Ο ρυθμός θήρευσης των αρπακτικών ήταν μεγαλύτερος για τον άγριο πληθυσμό (6.4 ± 0.58 αυγά/θηλυκό/ημέρα) σε αντίθεση με τον εμπορικό (4.35 ± 0.62 αυγά/θηλυκό/ημέρα). Ο ρυθμός θήρευσης του εμπορικού πληθυσμού *A. swirskii* στη παρούσα εργασία συμφωνεί με άλλη μελέτη, στην οποία κάθε θηλυκό *A. swirskii*, το οποίο συλλέχθηκε από πειραματικό σταθμό στη Σαουδική Αραβία, καταναλώνει περίπου τον ίδιο αριθμό αυγών *B.tabaci* την ημέρα (3.8 ± 0.22 αυγά/θηλυκό/ημέρα) (Fouly et al., 2010).

Ταυτόχρονα στους δύο πληθυσμούς, άγριο και εμπορικό, ο ρυθμός ωοτοκίας δεν διέφερε μεταξύ τους (0.75 ± 0.15 και 0.50 ± 0.06 αυγά/θηλυκό/ημέρα αντίστοιχα) κάτω από τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και σε άλλες μελέτες, στις οποίες τα ακάρεα *A. swirskii* από πληθυσμούς που συλλέχτηκαν από το πεδίο στο Ισραήλ, είχαν ίδιο ρυθμό ωοτοκίας κατά τη διατροφή τους με αυγά *B. tabaci* (0.91 και 0.73 αυγά/θηλυκό/ημέρα), ενώ βρέθηκε και μεγαλύτερος ρυθμός ωοτοκίας σε άλλο πληθυσμό *A. swirskii* που συλλέχθηκε από το Ισραήλ κατά τη διατροφή του με *B. tabaci* (1.6-1.7 αυγά/θηλυκό/ημέρα) (Nomikou et. al, 2001). Ωστόσο έχει βρεθεί ότι ο ρυθμός θήρευσης και ωοτοκίας επηρεάζεται από τις συνθήκες διαβίωσης, θερμοκρασία, υγρασία, το τύπο τροφής, καθώς και την ηλικία του ακάρεος (Nomikou et al., 2001; van Maanen et al., 2010; Cavalcante et al., 2015; Al-Azzazy & Alhewairini, 2020) .

Χρησιμοποιήσαμε το μιτοχονδριακό γονίδιο της *υπομονάδας I της οξειδάσης του κυτοχρώματος c* (*COI*) για την εκτίμηση της γενετικής ποικιλομορφίας των δύο πληθυσμών. Οι πολυμορφικές θέσεις ήταν λίγες και παρά το γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικοί πληθυσμοί, απομονωμένοι για πολλές δεκαετίες, δεν υπήρχε ξεκάθαρος διαχωρισμός μεταξύ τους. Σε κάποιες περιπτώσεις υπήρξε στενότερη συγγένεια μεταξύ ατόμων του άγριου πληθυσμού με του εμπορικού, παρά μεταξύ των ατόμων των αντίστοιχων πληθυσμών μεταξύ τους. Η χαμηλή διαφοροποίηση ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς μπορεί οφείλεται στους εξής λόγους. Ο πληθυσμός που συλλέχθηκε από το πεδίο στο Ισραήλ μπορεί να προέρχεται από εξαπόλυση εμπορικού πληθυσμού. Ωστόσο αυτό το σενάριο δεν στηρίζεται από τα ευρήματα της παρούσας μελέτης για τις διαφορές ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς, στην ανθεκτικότητα και στον ρυθμό θήρευσης. Ο δεύτερος λόγος μπορεί να είναι ο μικρός αριθμός ατόμων του άγριου πληθυσμού που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση. Σε αυτό το μικρό δείγμα, το γονίδιο *COI* παρουσιάζει πολύ χαμηλή ενδοειδική παραλλακτικότητα (0.6%), όπως έχει βρεθεί και σε άλλα είδη Phytoseiidae, όπως το *Neoseiulus californicus* (0-0.4%) (Tixier et al., 2010). Η χαμηλή ενδοειδική παραλλακτικότητα του *COI* στα Phytoseiidae είναι ένδειξη ότι δεν είναι κατάλληλος δείκτης για μελέτη της ενδοειδικής διαφοροποίησης πληθυσμών Phytoseiidae. Επίσης και σε άλλες μελέτες με Phytoseiidae παρουσιάστηκε χαμηλή ενδοειδικη γενετική ανομοιογένεια των εξεταζόμενων πληθυσμών, όπως στα είδη *Kampimodromus aberrans*, *Euseius Wainstein*, *Typhlodromus pyri*, *Neoseiulus paspalivorus* (Tixier et al. 2008; Okassa et al. 2009; Tixier, 2012; Sourassou et al., 2014). Παρόλα αυτά το μιτοχονδριακό γονίδιο *COI* είναι κατάλληλο για την ταυτοποίηση ειδών ακάρεων, και έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε φυλογενετικές μελέτες της οικογένειας *Tetranychidae* και *Phytoseiidae* (e.g., Tixier et al., 2010; Famah Sourassou et al., 2014, Navajas et al., 1994).

Επιπλέον τα Phytoseiidae έχει βρεθεί ότι συχνά συσχετίζονται με βακτήρια ενδοσυμβιώτες που μπορούν να επηρεάσουν την αναπαραγωγή τους. Έτσι, διερευνήσαμε την αναπαραγωγική συμβατότητα ανάμεσα στον άγριο και τον εμπορικό πληθυσμό *A. swirskii*. Μετά από έλεγχο των χιαστί διασταυρώσεων μεταξύ των δύο πληθυσμών παρατηρήθηκε ότι δεν υπάρχει γενετική ασυμβατότητα. Οι δυο πληθυσμοί, άγριος και εμπορικός, είναι αναπαραγωγικά συμβατοί και προκύπτουν απόγονοι και των δυο φύλων από την διασταύρωση τους, καθώς δεν παρατηρήθηκε αυξημένη αρρενοτοκία στην προκύπτουσα F1 γενιά αλλά ούτε στην F2. Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν και με την απουσία ενδοσυμβιωτών στους πληθυσμούς αυτούς, οι οποίοι είναι σημαντικοί παράγοντες αναπαραγωγικής ασυμβατότητας.

Πράγματι στη παρούσα εργασία, δεν εντοπίστηκε κανένα από τα ακόλουθα γένη ενδοσυμβιωτικών βακτηρίων, *Wolbachia, Rickettsia, Cardinium, Spiroplasma, Arsenophonus* και *Hamiltonella*. Ωστόσο, η παρουσία ενδοσυμβιωτών είναι συχνή σε διάφορα Acari (Enigl & Schausberger, 2007; Schütte & Dicke, 2008). Συγκεκριμένα έχει βρεθεί ασυμβατότητα μεταξύ πληθυσμών. *urticae* λόγω της παρουσίας ενδοσυμβιωτών (Fytrou & Tsagkarakou, 2017; Tsagkarakou et al., 1996). Επιπλέον, σε Phytoseiidae έχουν μελετηθεί τα γένη *Wolbachia, Rickettsia, Cardinium,* and *Spiroplasma*, αλλά δεν έχει γίνει αναφορά για τα γένη *Arsenophonus* και *Hamiltonella* εώς σήμερα. Το γένος *Wolbachia* φαίνεται να είναι ευρέως διαδεδομένο μεταξύ των ακάρεων phytoseiid, καθώς βρέθηκε σε πολλούς πληθυσμούς phytoseiid ειδών (Schütte & Dicke, 2008). Σύμφωνα με τους Johanowicz & Hoy (1998), το γένος *Wolbachia,* προκαλεί στο *Metaseiulus occidentalis* αναπαραγωγική ασυμβατότητα, μειωμένο αριθμό αυγών, συρρικνωμένα αυγά και αναλογία φύλου με τάση επικράτησης των αρσενικών. Οι επιπτώσεις αυτές πιθανόν να σχετίζονται με το απλο-διπλοειδές γεννητικό σύστημα των ακάρεων, που τελικά οδηγούν στην αδυναμία ανάπτυξης του πληθυσμού (Hoy & Jeyaprakash, 2005; Johanowicz & Hoy, 1998). Σε άλλη μελέτη έχουν βρεθεί διαφορετικά στελέχη *Wolbachia* στο είδος *Neoseiulus paspalivorus* De Leon (Acari: Phytoseiidae), που προκάλεσαν είτε μη εκκόλαψη των αυγών, είτε σημαντική μείωση της παραγωγής αυγών και μειωμένο ποσοστό θηλυκών (Famah Sourassou et al., 2014). Τέλος, στο *Phytoseiulus persimilis* βρέθηκε επίσης το γένος Wolbachia, το οποίο επηρέασε τη γονιμότητα του ακάρεως (Susan Bjørnson, 2008; Schütte & Dicke, 2008)

Το γένος *Rickettsia* έχει ανιχνευθεί στο είδος *M. occidentalis* που εκτρεφόταν με *T. urticae* (Hess και Hoy 1982; Hoy and Jeyaprakash 2005). Οι επιπτώσεις που προκλήθηκαν από τον ενδοσυμβιώτη επηρέασαν τα ενήλικα θηλυκά άτομα τα οποία είχαν χαμηλότερη παραγωγή αυγών, μειωμένη μακροζωίακαι ξαφνικό θάνατο (Poinar & Poinar, 1998). Επίσης βρέθηκε και σε ενήλικα του είδους *P. persimilis* (Sutáková & Rüttge, 1978; Poinar & Poinar, 1998; Schütte & Dicke, 2008). Ωστόσο γένος *Rickettsia* χρειάζεται παραπάνω μελέτη στην οικογένεια Phytoseiidae.

Σύμφωνα με μελέτη των Wu & Hoy (2012), αποδείχθηκε ότι το βακτήριο *Cardinium* σχετίζεται με αναπαραγωγική ασυμβατότητα στο *Metaseiulus occidentalis*. Οι αναπαραγωγικές επιδράσεις που έχει σε αυτό το αρπακτικό είναι μειωμένο ποσοστό επιβίωσης απογόνων και μειωμένος αριθμός θηλυκών απογόνων (Wu & Hoy, 2012). Ωστόσο άλλη μελέτη για το ίδιο είδος έδειξε ότι επηρεάζεται θετικά η γονιμότητα του ακάρεος από το Cardinium (Weeks & Stouthamer, 2004). Τέλος, έχει βρεθεί επίσης σε πληθυσμό του είδους *N. paspalivorus* (Famah Sourassou et al., 2014) και του *Euseius Finlandicus* Oudemans (Acari: Phytoseiidae) (Enigl & Schausberger, 2007; Schütte & Dicke, 2008). Τέλος, το Spiroplasma ανιχνεύθηκε στο αρπακτικό άκαρι *Neoseiulus californicus* (Acari:Phytoseiidae) (Enigl & Schausberger, 2007; Schütte & Dicke, 2008).

Κεφάλαιο 2: Διερεύνηση φυτών τομάτας για βελτίωση της εγκατάστασης του *Amblyseius swirskii*

2.1 Υλικά και Μέθοδοι

2.1.1 Ποικιλίες τομάτας

Οι ποικιλίες τομάτας που εξετάστηκαν ήταν η 'ΕΛΠΙΔΑ' και η 'MARMADE'. Οι κατηγορίες φυτών που εξετάστηκαν ήταν οι δύο μάρτυρες των ποικιλιών και η κάθε ποικιλία αποικισμένη με το στέλεχος FSK, δηλ. Ελπίδα FSK^- (μάρτυρας), Ελπίδα FSK^+, Marmade FSK^- (μάρτυρας), Marmade FSK^+.

Τα φυτά διατέθηκαν από τον κ. Καβρουλάκη (ερευνητής ΙΕΛΥΑ, ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ). Για την αξιολόγηση της επίδρασης του ενδοφυτικού μικροοργανισμού FS-K, ακολουθήθηκε η εξής μέθοδος όπως περιγράφεται στο Kavroulakis et al. (2007): Αρχικά έγινε εμβολιασμός των φυτών τομάτας με το στέλεχος FS-K, με 104 conidia/cm^3 του μίγματος φύτευσης με διαβροχή νερού, μία εβδομάδα μετά τη σπορά. Ο αποικισμός από το στέλεχος FS-K των δύο γονοτύπων τομάτας ('MARMADE', 'ΕΛΠΙΔΑ') που χρησιμοποιήθηκαν, αξιολογήθηκαν με επιφανειακή αποστείρωση, διατομή φυτικων ιστών (πρωτογενής και πλευρικές ρίζες, κορυφή ιστού, χαμηλότερο, μεσαίο και ανώτερο στέλεχος και φύλλα) και καλλιεργεια (plating) σε PDA, που περιέχει 60 μg cm^{-3} χλωροτετρακυκλίνη, 30 μg cm^{-3} στρεπτομυκίνη και 30 U πενικιλίνη G, προκειμένου να αποφευχθεί η βακτηριακή ανάπτυξη, μέσα σε 5-25 ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

2.1.2 Εξαπόλυση *A. swirskii* σε τομάτες

Στις τέσσερις κατηγορίες τομάτας που αναφέρονται παραπάνω, έγινε απελευθέρωση ενός θηλυκού ακάρεος *A. swirskii* (εμπορικού πληθυσμού) στη μασχάλη του πρώτου φύλλου. Στο αμέσως επόμενο φύλλο τοποθετήθηκε γύρη για την προσέλκυση αυτών ώστε να μετακινηθούν στο επόμενο φύλλο μέσω του στελέχους του φυτού που περιέχει τριχίδια. Στόχος ήταν η αξιολόγηση της διασποράς από το ένα φίλο στο γειτονικό και της επιβίωσης των αρπακτικών στα στελέχη της τομάτας. Μετά από το διάστημα των 30 λεπτών, έγινε μέτρηση της απόστασης που διήνυσαν τα ακάρεα και παρατήρηση της κατάστασής τους. Συγκεκριμένα η κατάσταση τους προσδιόριζε εάν ήταν σε θέση να συνεχίσουν την διασπορά τους, είτε όχι λόγω του εγκλωβισμού τους στις εκκρίσεις των τριχιδίων. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε έξι (6) φυτά από κάθε κατηγορία (4 κατηγορίες), για τη μετακίνηση των ακάρεων.

2.1.3 Τριχίδια στελέχους τομάτας

Στις τέσσερις κατηγορίες φυτών που εξετάσαμε στην παρούσα εργασία, έγινε καταμέτρηση των τριχιδίων τύπου III (μη αδενώδη) και τύπου VI (αδενώδη) στο στέλεχος της τομάτας. Με τη χρήση στερεοσκοπίου, στη μεγάλη κλίμακα μεγένθυσης και περιοχή ίδιων διαστάσεων (2*3 cm), έγινε η μέτρηση των μη αδενώδη τριχιδίων τύπου III μακριών τριχιδίων, και των αδενώδη τύπου VI που περιλαμβάνουν 4 κύτταρα στη κεφαλή.

2.1.4 Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα σχετικά με τη διασπορά και την απόσταση του ακάρεως *A. swirskii*, προσαρμόστηκαν σε γενικευμένο γραμμικό μοντέλο (glm: Fitting Generalized Linear Models) με διωνυμική κατανομή (πακέτο R). Εφαρμόστηκε η δοκιμή χ^2 για να συγκριθούν οι διακυμάνσεις, λαμβάνοντας το *P*-values για να εξεταστεί η μηδενική υπόθεση ότι αυτές οι πιθανότητες είναι παρόμοιες.

Υπολογίστηκε η μέση τιμή της απόστασης που διήνυσε το άκαρι σε κάθε ποικιλία. Έπειτα τα δεδομένα της απόστασης προσαρμόστηκαν σε γενικευμένο γραμμικό μοντέλο (glm: Fitting Generalized Linear Models) με διωνυμική κατανομή (πακέτο R). Εφαρμόστηκε η δοκιμή χ^2 για να συγκριθεί η απόσταση σε σχέση με τον τύπο των τριχιδίων που μελετήθηκε, με το *P*-values να εξετάζει τη μηδενική υπόθεση ότι αυτές οι πιθανότητες είναι παρόμοιες. Οι παραπάνω αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το πακέτο Rmisc του προγράμματος R (έκδοση 4.1.2).

2.2 Αποτελέσματα

2.2.1 Διασπορά και απόσταση των *A. swirskii* σε τομάτα

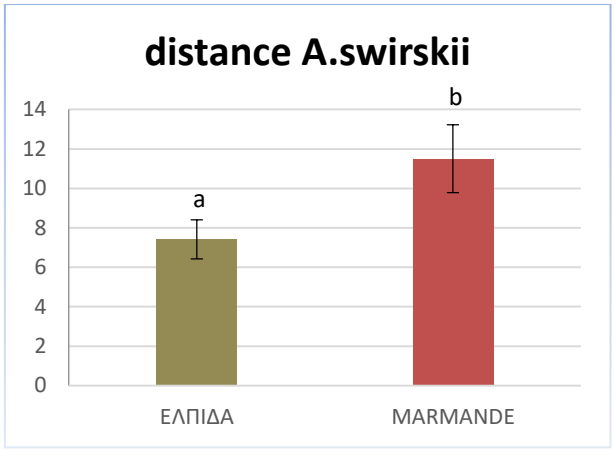
Η ικανότητα διασποράς των ενήλικων θηλυκών *A. swirskii* δοκιμάστηκε σε στελέχη τομάτας σε δύο διαφορετικές ποικιλίες 'MARMADE' και 'ΕΛΠΙΔΑ' και τις ίδιες δύο, εμβολιασμένες με FSK. Έγινε αξιολόγηση της ικανότητας διασποράς των ακάρεων σε γειτονικό φύλλο, μέτρηση της απόστασης που διήνυσαν, και έπειτα έγινε μέτρηση των τριχιδίων τύπου I, III και τύπου VI.

<u>Διασπορά *A. swirskii* σε σχέση με τις τομάτας</u>

Αξιολογήθηκε η ικανότητα διασποράς του *A. swirskii* σε στέλεχος του φυτού τομάτας. Σε καμία από τις περιπτώσεις των φυτών που εξετάστηκαν δεν υπήρχε επιτυχής διασπορά του ακάρεως στο γειτονικό φύλλο, καθώς επίσης παρατηρήθηκε μεγάλο ποσοστό εγκλωβισμού στις εκκρίσεις των τριχιδίων, στο διάστημα των 30'.

<u>Απόσταση *A. swirskii* σε σχέση με τις τομάτας</u>

Ελέγχθηκε η απόσταση που διήνυσε το άκαρι αν επηρεάζεται από την ποικιλία της τομάτας. Φάνηκε ότι η απόσταση επηρεάζεται από την ποικιλία (Pr= 0.04) (Πίνακας 11). Η μέση τιμή της απόστασης των ακάρεων *A. swirskii* στην 'ΕΛΠΙΔΑ' είναι 7.42 ± 0.99 mm και στη 'MARMADE' 11.50 ± 1.72 mm (Γράφημα 4).



Γράφημα 4. Η μέση τιμή της απόστασης που διήνυσαν τα ακάρεα σε κάθε ποικιλία. (DF =12, P>0.05, T-test).

Επίσης, αξιολογήθηκε η απόσταση που διήνυσαν τα ακάρεα σε φυτά αποικισμένα με Fsk^+ σε κάθε ποικιλία χωριστά, αλλά και σε όλα τα δείγματα σε σχέση με αυτά που έχουν αποικιστεί από Fsk^+. Στη ποικιλία 'ΕΛΠΙΔΑ' δεν υπήρχαν διαφορές στην απόσταση που διήνυσαν τα άκαρι στο μάρτυρα σε σχέση με τα Fsk^+ φυτά (Pr=0.94). Το ίδιο φάνηκε και για την ποικιλία 'MARMADE' (Pr=0.85), καθώς σε όλα τα αποικισμένα φυτά Fsk^+, ανεξαρτήτους ποικιλίας, καθώς δεν υπήρχε διαφορά στην απόσταση που διήνυσαν τα ακάρεα (Pr=0.91) (Πίνακας 11).

ΚΑΤΗΓΟΡΊΑ		Distance	
		Mean ± SE (mm)	Pr - value
1	ΕΛΠΙΔΑ FSK^-	7.50 ± 1.64	0.94
2	ΕΛΠΙΔΑ FSK^+	7.33 ± 1.28	
3	MARMADE FSK^-	11.16 ± 2.54	0.85
4	MARMADE FSK^+	11.83 ± 2.56	
5	ΕΛΠΙΔΑ(FSK^- + FSK^+)	7.41 ± 0.99	**$0.04_{1,3}$**
6	MARMADE (FSK^- + FSK^+)	11.5 ± 1.72	
7	FSK^- (ΕΛΠΙΔΑ+MARMADE)	9.33 ± 1.54	0.91
8	FSK^+ (ΕΛΠΙΔΑ+MARMADE)	9.58 ± 1.52	
9	Factor = trichomes I,III		0.89
10	Factor = trichome VI		**0.037**

Πίνακας 11. Κατηγορίες φυτών τομάτας που μελετήθηκαν με την αντίστοιχη μέση τιμή (± τυπική απόκλιση) της απόστασης που διήνυσαν τα *A. swirskii*. Επιπλέον αναφέρεται και ο παράγοντας των τριχιδίων σε σχέση με την απόσταση. Το Pr-value συγκρίνει τις διακυμάνσεις.

2.2.2 Τριχίδια στελέχους τομάτας

Απόσταση *A. swirskii* σε σχέση με τα τριχίδια στο στέλεχος τομάτας

Αφού έγινε καταγραφή των τριχιδίων τύπου I,III και τύπου VI στο στέλεχος της τομάτας, έπειτα αξιολογήθηκε αν η απόσταση επηρεάζεται σε σχέση με το αριθμό των τριχιδίων, των δύο τύπων που μελετήσαμε. Στη πρώτη περίπτωση, η απόσταση που διανύουν τα ακάρεα δεν επηρεάζεται από τα τριχίδια τύπου I, III (Pr=0.89). Ενώ στη δεύτερη περίπτωση φάνηκε ότι η απόσταση που διανύει το *A. swirskii* επηρεάζεται από το τύπο τριχιδίου VI (Pr=0.038) (Πίνακας 11).

2.3 Συζήτηση

Τα φυτά τομάτας έχουν φυσικά αμυντικά χαρακτηριστικά για την προστασία από φυτοφάγους εχθρούς. Η άμυνα μεσολαβεί από τα τριχίδια που καλύπτουν όλο το φυτό, και τα εκκρίματα αυτών (Kennedy 2003; Tixier et al., 2020). Τα τριχίδια στο στέλεχος είναι πυκνά και αποτελούν σημαντικό εμπόδιο για τη διασπορά ωφέλιμων αρπακτικών Phytoseiidae, (Van Haren et al., 1987: Kennedy, 2003; Simmons και Gurr, 2005).

Στα πειράματα της παρούσας εργασίας αποδείχθηκε ότι η ικανότητα διασποράς του αρπακτικού *A. swirskii* επηρεάζεται από τη διαφορετική ποικιλία τομάτας, αποδεικνύοντας ότι μπορεί να υπάρχουν πιο ευνοϊκές ποικιλίες. Μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των ποικιλιών τομάτας και των Phytoseiidae ειδών που συναντώνται σε αυτές (Riddick και Simmons, 2014; Chorąży et al., 2016).

Επίσης, παρατηρήθηκε αρνητική επίδραση των τριχιδίων τύπου VI στη διασπορά των αρπακτικών *A. swirskii*. Τα αδενικά τριχίδια τομάτας έχουν προηγουμένως συσχετιστεί με τον εγκλωβισμό μικρών αρθροπόδων και έχουν αρνητικό αντίκτυπο τόσο στα παράσιτα όσο και στους φυσικούς εχθρούς (Cédola and Sánchez, 2003). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι και η υψηλή πυκνότητα τριχιδίων στο φυτό ξενιστή μπορεί να είναι επιζήμια για τους θηρευτές (Cédola et al., 2001; Riddick και Simmons, 2014). Σε πειράματα με το είδος *P. persimilis* σε στελέχη τομάτας έχουν βρεθεί μεγάλα ποσοστά παγίδευσης σε υψηλές πυκνότητες τριχιδίων (Van Haren et al., 1987; Kennedy, 2003).

Το *Amblyseius swirskii*, όπως φάνηκε και στη συγκεκριμένη μελέτη, δεν μπορεί να προσαρμοστεί στις καλλιέργειες τομάτας, επειδή επηρεάζεται αρνητικά από τα τριχίδια και τους δευτερογενείς μεταβολίτες αυτών (Paspati, 2019). Αντίθετα κάποια Phytoseiidae καταφέρνουν να αναπτυχθούν και να αναπαραχθούν σε φυτά τομάτας (Pijnakker & Wäckers, 2018). Τα είδη *Amblydromalus limonicus*, *Amblyseius andersoni*, *Neoseiulus fallacis* και *Neoseiulus califonicus* είναι αυτά που τα καταφέρνουν καλύτερα σε καλλιέργειες τομάτας, σε σχέση με άλλα Phytoseiidae (Ferrero et al.2010; Chorąży et al., 2016). Ωστόσο προς το παρόν η εισαγωγή βιολογικών παραγόντων Phytoseiidae σε προγράμματα IPM σε καλλιέργειες τομάτας φαίνεται ανεπιτυχής, αφού παρεμποδίζεται η επιβίωση και η αποτελεσματικότητα τους (van Houten et al., 2013).

Στην παρούσα εργασία δεν εντοπίστηκε επίδραση των αποικισμένων φυτών με FSK, έναντι των αρπακτικών *A. swirskii* στις δύο ποικιλίες μελέτης. Παρ' όλα αυτά το ενδοφυτικό στέλεχος *FSK* έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας ωφέλιμος παράγοντας των φυτών τομάτας. Καθώς έχει βρεθεί ότι επηρεάζει τόσο άμεσα όσο και έμμεσα την άμυνα του φυτού ενάντια σε παθογόνα της ρίζας και του φυλλώματος, καθώς επίσης ενισχύει έμμεσα και την ανάπτυξή

του (Kavroulakis et al., 2007; Garantonakis et al., 2018; Kavroulakis et al., 2018; Pappas et al., 2018).

Σύνοψη

Το αρπακτικό άκαρι *Amblyseius swirskii* ανήκει στην οικογένεια Phytoseiidae και είναι ένας γενικός θηρευτής καθώς μπορεί να τραφεί και να αναπαραχθεί με ένα ευρύ φάσμα θηραμάτων. Έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας σημαντικός παράγοντας ελέγχου του αλευρώδη, του θρίπα και του τετρανύχου. Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να μελετηθούν τρόποι βελτίωσης του *A. swirskii* ως βιολογικό παράγοντα. Για τη διερεύνηση των δυνατοτήτων βελτίωσης του αρπακτικού αυτού έγιναν δύο προσεγγίσεις.

Αρχικά έγινε μελέτη της τοξικότητας και των βιολογικών παραμέτρων ενός εμπορικού πληθυσμού και ενός άγριου. Βρέθηκαν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας του άγριου πληθυσμού σε σχέση με τον εμπορικό, σε δύο δραστικές, στην abamectin και στο spinosad. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι ο άγριος πληθυσμός *A. swirskii* εμφανίζει συμβατότητα με αυτές τις δραστικές που ενδείκνυται για συνδυαστική χρήση μαζί τους σε προγράμματα IPM, σε αντίθεση με τον εμπορικό πληθυσμό.

Επιπλέον, στον άγριο πληθυσμό εντοπίστηκε υψηλότερος ρυθμός θήρευσης σε σχέση με τον εμπορικό. Η μείωση της γενετικής ποικιλομορφίας σε εμπορικούς πληθυσμούς μπορεί να επηρεάσει χαρακτηριστικά που είναι σημαντικά στην απόδοσή τους ως παράγοντες βιολογικού ελέγχου, όπως ο ρυθμός θήρευσης. Μελετήθηκε η γενετική ποικιλομορφία των δύο πληθυσμών με την χρήση του μιτοχονδριακού δείκτη *COI* και βρέθηκε στενή συγγένεια μεταξύ των ατόμων από στους δύο πληθυσμούς. Τέλος, επιβεβαιώσαμε την αναπαραγωγική συμβατότητα μεταξύ των δύο πληθυσμών με διασταυρώσεις, και την απουσία ενδοσυμβιωτών.

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας, έγινε έλεγχος της ανταπόκρισης του αρπακτικού *A. swirskii* στο φυτό τομάτας, με τη μελέτη μερικών χαρακτηριστικών του φυτού. Εντοπίστηκε ότι η ποικιλία της τομάτας, επηρεάζει την απόσταση που διανύει το άκαρι *Amblyseius swirskii* στο στέλεχος της τομάτας. Περισσότερο ευνοϊκή φάνηκε η ποικιλία '*MARMADE*' σε σχέση με την '*ΕΛΠΙΔΑ*'. Παρατηρήθηκε ότι η απόσταση του *A. swirskii* επηρεάζεται από τα τριχίδια τύπου VI τα οποία είναι αδενώδη, σε αντίθεση με τα μη αδενώδη τύπου I, III. Επιπλέον δείξαμε ότι η παρουσία του ενδόφυτου Fsk σε φυτά τομάτας, δεν έχει θετική επίδραση στην διασπορά του αρπακτικού

Συνοψίζοντας, από τα παραπάνω ευρήματα παρατηρούμε ότι είναι δυνατή η βελτίωση της αποτελεσματικότητας του *Amblyseius swirskii* ως βιολογικό παράγοντα έναντι των φυτοφάγων, μέσω εμπλουτισμού του εμπορικού πληθυσμού με άγριους πληθυσμούς για την αύξηση της ανθεκτικότητας και του ρυθμού θήρευσης και γενικότερα της γενετικής ποικιλομορφίας του. Επιπλέον, τα παραπάνω αποτελέσματα, αποδεικνύουν την ύπαρξη ποικιλιών τομάτας με λιγότερα αδενώδη τριχίδια που είναι καταλληλότερες για την διασπορά των *A. swirskii*. Το στοιχείο αυτό θέτει τη βάση για περαιτέρω διερεύνηση ποικιλιών τομάτας πιο ευνοϊκών για τα αρπακτικά ακάρεα, οι οποίες θα επέτρεπαν τη χρήση των Phytoseiidae σε προγράμματα IPM για αυτή την καλλιέργεια.

Βιβλιογραφία

Ahmad, M. (2007). Insecticide resistance mechanisms and their management in Helicoverpa armigera (Hübner)–A review. Journal of Agriculture Research, 45(4), 319–335.

Anderson, D. L., & Trueman, J. W. H. (2000). Varroa jacobsoni (Acari: Varroidae) is more than one species. Experimental & Applied Acarology 2000 24:3, 24(3), 165–189. https://doi.org/10.1023/A:1006456720416

Al-Azzazy, M. M., & Alhewairini, S. S. (2020). Effect of temperature and humidity on development, reproduction, and predation rate of *Amblyseius swirskii* (Phytoseiidae) fed on Phyllocoptruta oleivora (Eriophyidae) and Eutetranychus orientalis (Tetranychidae). 46(5), 304–312. https://doi.org/10.1080/01647954.2020.1773922

Álvarez, M. (2015). Insect resistance in tomato (Solanum spp.). Cultivos Tropicales, 36(2), 100–110. https://doi.org/10.13140/RG.2.2.34979.04640

Arnó, J., Gabarra, R., Liu, T. X., Simmons, A. M., & Gerling, D. (2010). Natural enemies of bemisia tabaci: Predators and parasitoids. Bemisia: Bionomics and Management of a Global Pest, 385–421. https://doi.org/10.1007/978-90-481-2460-2_15

Athias-Henriot, C. (1962). *Amblyseius swirskii*, un nouveau phytoseiide voisin d'A. andersoni (Acariens anactinotriches). Annales de l'École Nationale d'Agriculture d'Alger, 3, 1–7.

Audenaert, J., Vissers, M., & Gobin, B. (2014). TESTING SIDE-EFFECTS OF COMMON PESTICIDES ON *A. SWIRSKII* UNDER GREENHOUSE CIRCUMSTANCES. *Communications in agricultural and applied biological sciences*, *79*(2), 207-210.

Beers, E. H., & Schmidt-Jeffris, R. A. (2015). Effects of Orchard Pesticides on Galendromus occidentalis (Acari: Phytoseiidae): Repellency and Irritancy. Journal of Economic Entomology, 108(1), 259–265. https://doi.org/10.1093/jee/tou047

Bjørnson, S. (2008). Natural enemies of mass-reared predatory mites (family Phytoseiidae) used for biological pest control. Experimental and Applied Acarology, 46(1–4), 299–306. https://doi.org/10.1007/s10493-008-9187-1

Bielza, P., Quinto, V., Contreras, J., Torné, M., Martín, A., & Espinosa, P. J. (2007). Resistance to spinosad in the western flower thrips, Frankliniella occidentalis (Pergande), in greenhouses of south-eastern Spain. Pest Management Science, 63(7), 682–687. https://doi.org/10.1002/PS.1388

Bohacsova, M., Mediannikov, O., Kazimirova, M., Raoult, D., & Sekeyova, Z. (2016). Arsenophonus nasoniae and Rickettsiae Infection of Ixodes ricinus Due to Parasitic Wasp Ixodiphagus hookeri. PLOS ONE, 11(2), e0149950. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0149950

Bostanian, N. J., & Akalach, M. (2006). The effect of indoxacarb and five other insecticides on Phytoseiulus persimilis (Acari: Phytoseiidae), Amblyseius fallacis (Acari: Phytoseiidae) and nymphs of Orius insidiosus (Hemiptera: Anthocoridae). Pest Management Science, 62(4), 334–339. https://doi.org/10.1002/ps.1171

Calvo, J., Bolckmans, K., & Belda, J. (2009). Development of a biological control-based Integrated Pest Management method for Bemisia tabaci for protected sweet pepper crops.

Entomologia Experimentalis et Applicata, 133(1), 9–18. https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2009.00896.x

Calvo, J., Bolckmans, K., & Belda, J. (2011). Control of Bemisia tabaci and Frankliniella occidentalis in cucumber by *Amblyseius swirskii*. BioControl, 56(2), 185–192. https://doi.org/10.1007/s10526-010-9319-5

Calvo, J., Bolckmans, K., & Belda, J. (2012). Biological control-based IPM in sweet pepper greenhouses using *Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae). Biocontrol Science and Technology, 22(12), 1398–1416. https://doi.org/10.1080/09583157.2012.731494

Calvo, J. F., Knapp, M., van Houten, Y. M., Hoogerbrugge, H., & Belda, J. E. (2015). *Amblyseius swirskii*: What made this predatory mite such a successful biocontrol agent? Experimental and Applied Acarology, 65(4), 419–433. https://doi.org/10.1007/s10493-014-9873-0

Campos, M. R., Rodrigues, A. R. S., Silva, W. M., Silva, T. B. M., Silva, V. R. F., Guedes, R. N. C., & Siqueira, H. A. A. (2014). Spinosad and the tomato borer Tuta absoluta: a bioinsecticide, an invasive pest threat, and high insecticide resistance. PloS One, 9(8). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0103235

Cavalcante, A. C. C., Borges, L. R., Lourenção, A. L., & de Moraes, G. J. (2015). Potential of two populations of *Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae) for the control of Bemisia tabaci biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) in Brazil. Experimental & Applied Acarology, 67(4), 523–533. https://doi.org/10.1007/S10493-015-9964-6

Cédola, C. V., & Sanchez, N. E. (2003). Effect of tomato pubescence on development, survival and fecundity of Tetranychus urticae Koch and Neoseiulus californicus (McGregor) [Acari: Tetranychidae: Phytoseiidae]. Acarologia, 43(3), 255–260. https://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/acarologia/article.php?id=77

Cédola, C. V., Sánchez, N. E., & Liljesthröm, G. G. (2001). Effect of Tomato Leaf Hairiness on Functional and Numerical Response of Neoseiulus Californicus (Acari: Phytoseiidae). Experimental & Applied Acarology 2001 25:10, 25(10), 819–831. https://doi.org/10.1023/A:1020499624661

Chaisiri, K., McGarry, J. W., Morand, S., & Makepeace, B. L. (2015). Symbiosis in an overlooked microcosm: a systematic review of the bacterial flora of mites. Parasitology, 142(9), 1152–1162. https://doi.org/10.1017/S0031182015000530

Chigira, A., & Miura, K. (2005). Detection of "Candidatus Cardinium" bacteria from the haploid host Brevipalpus californicus (Acari: Tenuipalpidae) and effect on the host. Experimental and Applied Acarology, 37(1–2), 107–116. https://doi.org/10.1007/S10493-005-0592-4

Chorąży, A., Kropczyńska-Linkiewicz, D., Sas, D., & Escudero-Colomar, L. A. (2016). Distribution of Amblydromalus limonicus in northeastern Spain and diversity of phytoseiid mites (Acari: Phytoseiidae) in tomato and other vegetable crops after its introduction. Experimental & Applied Acarology, 69(4), 465–478. https://doi.org/10.1007/S10493-016-0050-5

Cuthbertson, A. G., Mathers, J. J., Croft, P., Nattriss, N., Blackburn, L. F., Luo, W., Northing, P., Murai, T., Jacobson, R. J., & Walters, K. F. (2012). Prey consumption rates and compatibility with pesticides of four predatory mites from the family Phytoseiidae attacking

Thrips palmi Karny (Thysanoptera: Thripidae). Pest Management Science, 68(9), 1289–1295. https://doi.org/10.1002/ps.3296

DeBach, P. (1964) Biological Control of Insect Pests and Weeds. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 844 p.

Díaz-Arias, K. V., Rodríguez-Maciel, J. C., Lagunes-Tejeda, Á., Aguilar-Medel, S., Tejeda-Reyes, M. A., & Silva-Aguayo, G. (2019). Resistance to Abamectin in Field Population of Tetranychus urticae Koch (Acari: Tetranychidae) Associated with Cut Rose from State of Mexico, Mexico. Florida Entomologist, 102(2), 428–430. https://doi.org/10.1653/024.102.0222

Dermauw, W., Ilias, A., Riga, M., Tsagkarakou, A., Grbić, M., Tirry, L., Van Leeuwen, T., & Vontas, J. (2012). The cys-loop ligand-gated ion channel gene family of Tetranychus urticae: Implications for acaricide toxicology and a novel mutation associated with abamectin resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *42*(7), 455–465. https://doi.org/10.1016/J.IBMB.2012.03.002

Döker, İ., & Kazak, C. (2020). Toxicity and risk assessment of acaricides on the predatory mite, Euseius scutalis (Athias-Henriot) (Acari: Phytoseiidae) under laboratory conditions. Chemosphere, 261. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127760

Drukker, B., Janssen, A., Ravensberg, W., & Sabelis, M. W. (1997). Improved control capacity of the mite predator Phytoseiulus persimilis (Acari: Phytoseiidae) on tomato. Experimental and Applied Acarology, 21(6/7), 507–518. https://doi.org/10.1023/B:APPA.0000018885.35044.c6

Dupont, P. Y., Eaton, C. J., Wargent, J. J., Fechtner, S., Solomon, P., Schmid, J., Day, R. C., Scott, B., & Cox, M. P. (2015). Fungal endophyte infection of ryegrass reprograms host metabolism and alters development. New Phytologist, 208(4), 1227–1240. https://doi.org/10.1111/NPH.13614

Duso, C., Van Leeuwen, T., & Pozzebon, A. (2020). Improving the compatibility of pesticides and predatory mites: recent findings on physiological and ecological selectivity. Current Opinion in Insect Science, 39, 63–68. https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.03.005

Dyer, J. G., & Swift, F. C. (1979). Sex Ratio in Field Populations of Phytoseiid Mites (Acarina: Phytoseiidae) 1. Annals of the Entomological Society of America, 72(1), 149–154. https://doi.org/10.1093/aesa/72.1.149

Dykstra, H. R., Weldon, S. R., Martinez, A. J., White, J. A., Hopper, K. R., Heimpel, G. E., Asplen, M. K., & Oliver, K. M. (2014). Factors limiting the spread of the protective symbiont Hamiltonella defensa in Aphis craccivora aphids. Applied and Environmental Microbiology, 80(18), 5818–5827. https://doi.org/10.1128/AEM.01775-14/SUPPL_FILE/ZAM999105659SO1.PDF

Eilenberg, J. (2006). Concepts and Visions of Biological Control. An Ecological and Societal Approach to Biological Control, 1–11. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4401-4_1

Enigl, M., & Schausberger, P. (2007). Incidence of the endosymbionts Wolbachia, Cardinium and Spiroplasma in phytoseiid mites and associated prey. Experimental & Applied Acarology, 42(2), 75–85. https://doi.org/10.1007/S10493-007-9080-3

Famah Sourassou, N., Hanna, R., Breeuwer, J. A. J., Negloh, K., de Moraes, G. J., & Sabelis, M. W. (2014). The endosymbionts Wolbachia and Cardinium and their effects in three populations of the predatory mite Neoseiulus paspalivorus. *Experimental and Applied Acarology*, *64*(2). https://doi.org/10.1007/s10493-014-9820-0

FAO (2021) Integrated Pest Management (IPM) | Pest and Pesticide Management | Food and Agriculture Organization of the United Nations | Retrieved 2021, from https://www.fao.org/pest-and-pesticide-management/ipm/integrated-pest-management/en/

Ferrero, M., Calvo, F. J., Atuahiva, T., Tixier, M. S., & Kreiter, S. (2011). Biological control of Tetranychus evansi Baker & Pritchard and Tetranychus urticae Koch by Phytoseiulus longipes Evans in tomato greenhouses in Spain [Acari: Tetranychidae, Phytoseiidae]. Biological Control, 58(1), 30–35. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.03.012

Fouly, A. H., Al-Deghair, M. A., & Baky, N. F. A. (2010). Biological Aspects and Life Tables of *Typhlodromips swirskii* (Acari: Phytoseiidae) Fed Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyroididae). Journal of Entomology, 8(1), 52–62. https://doi.org/10.3923/je.2011.52.62

Fytrou, N., & Tsagkarakou, A. (2017). Reproductive incompatibility between genetically differentiated populations of Tetranychus urticae from different host plants. Entomologia Hellenica, 23(1), 29. https://doi.org/10.12681/eh.11532

Garantonakis, N., Pappas, M. L., Varikou, K., Skiada, V., Broufas, G. D., Kavroulakis, N., & Papadopoulou, K. K. (2018). Tomato Inoculation With the Endophytic Strain Fusarium solani K Results in Reduced Feeding Damage by the Zoophytophagous Predator Nesidiocoris tenuis. Frontiers in Ecology and Evolution, 6(AUG), 1–7. https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00126

Gerson, U., Smiley, R. L., Ochoa, R., & Wissenschafts Verlag, B. (2003). Mites (Acari) for Pest Control. https://doi.org/10.1002/9780470750995

Gerson, U., & Weintraub, P. G. (2007). Mites for the control of pests in protected cultivation. Pest Management Science, 63(7), 658–676. https://doi.org/10.1002/ps.1380

Ghazy, N. A., Osakabe, M., Negm, M. W., Schausberger, P., Gotoh, T., & Amano, H. (2016). Phytoseiid mites under environmental stress. Biological Control, 96, 120–134. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.02.017

Gherna, R. L., Werren, J. H., Weisburg, W., Cote, R., Woese, C. R., Mandelco, L., & Brenner, D. J. (1991). Arsenophonus nasoniae gen. nov., sp. nov., the causative agent of the son-killer trait in the parasitic wasp Nasonia vitripennis. International Journal of Systematic Bacteriology, 41(4), 563–565. https://doi.org/10.1099/00207713-41-4-563/CITE/REFWORKS

Glass, R., & Egea González, F. J. (2012). Biological control in the greenhouses of Almería and challenges for a sustainable intensive production. Outlooks on Pest Management, 23(6), 276–279. https://doi.org/10.1564/23dec11

González-Cabrera, J., Mollá, O., Montón, H., & Urbaneja, A. (2011). Efficacy of Bacillus thuringiensis (Berliner) in controlling the tomato borer, Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). BioControl, 56(1), 71–80. https://doi.org/10.1007/s10526-010-9310-1

Gotoh, T., Noda, H., & Ito, S. (2006). Cardinium symbionts cause cytoplasmic incompatibility in spider mites. Heredity 2007 98:1, 98(1), 13–20. https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800881

Gözel, Ç., & Kasap, I. (2015). Efficacy of entomopathogenic nematodes against the Tomato leafminer, Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in tomato field. Turkiye Entomoloji Dergisi, 39(3), 229–237. https://doi.org/10.16970/ted.84972

Grindle, N., Tyner, J. J., Clay, K., & Fuqua, C. (2003). Identification of Arsenophonus-type bacteria from the dog tick Dermacentor variabilis. Journal of Invertebrate Pathology, 83(3), 264–266. https://doi.org/10.1016/S0022-2011(03)00080-6

Guay, J. F., Boudreault, S., Michaud, D., & Cloutier, C. (2009). Impact of environmental stress on aphid clonal resistance to parasitoids: Role of Hamiltonella defensa bacterial symbiosis in association with a new facultative symbiont of the pea aphid. Journal of Insect Physiology, 55(10), 919–926. https://doi.org/10.1016/J.JINSPHYS.2009.06.006

Han, J., Choi, B. R., Lee, S. G., Kim, S. Il, & Ahn, Y. J. (2010). Toxicity of plant essential oils to acaricide-susceptible and -resistant Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae) and Neoseiulus californicus (Acari: Phytoseiidae). Journal of Economic Entomology, 103(4), 1293–1298. https://doi.org/10.1603/EC09222

Hertig, M. (1936). The Rickettsia, Wolbachia pipientis (Gen. Et Sp. N.) and Associated Inclusions of the Mosquito, Culex pipiens. Parasitology, 28(4), 453–486. https://doi.org/10.1017/S0031182000022666

Hess, R. T., & Hoy, M. A. (1982). Microorganisms Associated with the Spider Mite Predator Metaseiulus (= Typhlodromus) occidentalis: Electron Microscope Observations. JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY, 40, 98–106.

Hoy, M. A., & Jeyaprakash, A. (2005). Microbial diversity in the predatory mite Metaseiulus occidentalis (Acari: Phytoseiidae) and its prey, Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae). Biological Control, 32(3), 427–441. https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2004.12.012

Hunter, M. S., Perlman, S. J., & Kelly, S. E. (2003). A bacterial symbiont in the Bacteroidetes induces cytoplasmic incompatibility in the parasitoid wasp Encarsia pergandiella. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 270(1529), 2185. https://doi.org/10.1098/RSPB.2003.2475

Hurst, G. D. D., Von Der Schulenburg, J. H. G., Majerus, T. M. O., Bertrand, D., Zakharov, I. A., Baungaard, J., Völkl, W., Stouthamer, R., & Majerus, M. E. N. (1999). Invasion of one insect species, Adalia bipunctata, by two different male-killing bacteria. In Insect Molecular Biology (Vol. 8, Issue 1, pp. 133–139). https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.1999.810133.x

IRAC. (2012). IRAC Mode of Action Classification Scheme. Insecticide Resistance Action Committee, February, 1–23. http://www.irac-online.org/modes-of-action/

Johanowicz, D. L., & Hoy, M. A. (1998). The Manipulation of Arthropod Reproduction by Wolbachia Endosymbionts. The Florida Entomologist, 81(3), 310. https://doi.org/10.2307/3495921

Johnson, M. W., & Tabashnik, B. E. (1999). Enhanced Biological Control through Pesticide Selectivity. In Handbook of Biological Control (Issue Ld, pp. 297–317). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-012257305-7/50060-6

Jones, T., Scott-Dupree, C., Harris, R., Shipp, L., & Harris, B. (2005). The efficacy of spinosad against the western flower thrips, Frankliniella occidentalis, and its impact on associated biological control agents on greenhouse cucumbers in southern Ontario. Pest Management Science, 61(2), 179–185. https://doi.org/10.1002/PS.939

Kavroulakis, N., Doupis, G., Papadakis, I. E., Ehaliotis, C., & Papadopoulou, K. K. (2018). Tolerance of tomato plants to water stress is improved by the root endophyte Fusarium solani FsK. Rhizosphere, 6(April), 77–85. https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.04.003

Kavroulakis, N., Ntougias, S., Zervakis, G. I., Ehaliotis, C., Haralampidis, K., & Papadopoulou, K. K. (2007). Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic Fusarium solani strain. Journal of Experimental Botany, 58(14), 3853–3864. https://doi.org/10.1093/jxb/erm230

Kennedy, G. G. (2003). Tomato,Pests,Parasitoids, and Predators: Tritrophic Interactions Involving the Genus Lycopersicon. Annual Review of Entomology, 48(1), 51–72. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.48.091801.112733

Kumar, P., & Poehling, H. M. (2007). Effects of azadirachtin, abamectin, and spinosad on sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) on tomato plants under laboratory and greenhouse conditions in the humid tropics. Journal of Economic Entomology, 100(2), 411–420. https://doi.org/10.1603/0022-0493(2007)100[411:EOAAAS]2.0.CO;2

Lee, H. S., & Gillespie, D. R. (2011). Life tables and development of *Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae) at different temperatures. Experimental and Applied Acarology, 53(1), 17–27. https://doi.org/10.1007/S10493-010-9385-5

Lima, D. B., Melo, J. W. S., Gondim, M. G. C., Guedes, R. N. C., & Oliveira, J. E. M. (2016). Population-level effects of abamectin, azadirachtin and fenpyroximate on the predatory mite Neoseiulus baraki. Experimental and Applied Acarology, 70(2), 165–177. https://doi.org/10.1007/s10493-016-0074-x

Luckwill LC. 1943. *The genus Lycopersicon: an historical, biological, and taxonomic survery of the wild and cultivated tomatoes*. Aberdeen, Scotland: Aberdeen Univ. Studies, 120. Aberdeen Univ. Press. 44 pp. *Crop Protection*, *19*(6), 375–384.

McMurtry, J. A., & Croft, B. A. (1997). LIFE-STYLES OF PHYTOSEIID MITES AND THEIR ROLES IN BIOLOGICAL CONTROL. Annual Review of Entomology, 42(1), 291–321. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.291

McMurtry, J. A., Huffaker, C. B., & van de Vrie, M. (1970). Ecology of tetranychid mites and their natural enemies: A review: I. Tetranychid enemies: Their biological characters and the impact of spray practices. Hilgardia, 40(11), 331–390. https://doi.org/10.3733/hilg.v40n11p331

Mcmurtry, J. A., Moraes, G. J. D. E., & Sourassou, N. F. (2013). Revision of the lifestyles of phytoseiid mites (Acari : Phytoseiidae). 18(4), 297–320.

Messelink, G. J., Van Steenpaal, S. E. F., & Ramakers, P. M. J. (2006). Evaluation of phytoseiid predators for control of western flower thrips on greenhouse cucumber. BioControl 2006 51:6, 51(6), 753–768. https://doi.org/10.1007/S10526-006-9013-9

Momen, F. M., & Elsaway, S. A. (1993). Biology and feeding behavior of the predatory mite, *Amblyseius swirskii* (Acari, Phytoseiidae). Acarologia, 34(3), 199–204. https://doi.org/10.1051/acarologia/20142144

Morrison, W. R., Milonas, P., Kapantaidaki, D. E., Cesari, M., Di Bella, E., Guidetti, R., Haye, T., Maistrello, L., Moraglio, S. T., Piemontese, L., Pozzebon, A., Ruocco, G., Short, B. D., Tavella, L., Vétek, G., & Leskey, T. C. (2017). Attraction of Halyomorpha halys (Hemiptera: Pentatomidae) haplotypes in North America and Europe to baited traps. Scientific Reports, 7(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-017-17233-0

Nakamura, K., Miura, K., de Jong, P., & Ueno, H. (2013). Comparison of the incidence of sibling cannibalism between male-killing Spiroplasma infected and uninfected clutches of a predatory ladybird beetle, Harmonia axyridis (Coleoptera: Coccinellidae). Http://Www.Eje.Cz/Doi/10.14411/Eje.2006.042.Html, 103(2), 323–326. https://doi.org/10.14411/EJE.2006.042

Navajas, M., Lagnel, J., Fauvel, G., & De Moraes, G. (1999). Sequence Variation of Ribosomal Internal Transcribed Spacers (ITS) in Commercially Important Phytoseiidae Mites. Experimental & Applied Acarology 1999 23:11, 23(11), 851–859. https://doi.org/10.1023/A:1006251220052

Nomikou, M., Janssen, A., Schraag, R., & Sabelis, M. W. (2001). Phytoseiid predators as potential biological control agents for Bemisia tabaci. Experimental & Applied Acarology 2001 25:4, 25(4), 271–291. https://doi.org/10.1023/a:1017976725685

Nomikou, M., Janssen, A., Schraag, R., & Sabelis, M. W. (2002). Phytoseiid predators suppress populations of. 57–68.

Nomikou, M., Janssen, A., & Sabelis, M. W. (2003). Phytoseiid predators of whiteflies feed and reproduce on non-prey food sources. Experimental and Applied Acarology, 31(1–2), 15–26. https://doi.org/10.1023/B:APPA.0000005142.31959.e8

Okassa, M., Tixier, M. S., Cheval, B., & Kreiter, S. (2009). Molecular and morphological evidence for a new species status within the genus Euseius (Acari: Phytoseiidae). Https://Doi.Org/10.1139/Z09-057, 87(8), 689–698. https://doi.org/10.1139/Z09-057

Park, H. H., Shipp, L., & Buitenhuis, R. (2010). Predation, development, and oviposition by the predatory mite Amblyseius swirkii (Acari: Phytoseiidae) on tomato russet mite (Acari: Eriophyidae). Journal of Economic Entomology, 103(3), 563–569. https://doi.org/10.1603/EC09161

Pappas, M. L., Liapoura, M., Papantoniou, D., Avramidou, M., Kavroulakis, N., Weinhold, A., Broufas, G. D., & Papadopoulou, K. K. (2018). The Beneficial Endophytic Fungus Fusariumsolani Strain K Alters Tomato Responses Against Spider Mites to the Benefit of the Plant. Frontiers in Plant Science, 9(November), 1–17. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01603

Paspati, A. (2019). Living on an unfriendly plant host: impact of tomato on the predatory mite *Amblyseius swirskii*. https://www.researchgate.net/publication/261098179_Amblyseius_swirskii

Paspati, A., Rambla, J. L., López Gresa, M. P., Arbona, V., Gómez-Cadenas, A., Granell, A., González-Cabrera, J., & Urbaneja, A. (2021). Tomato trichomes are deadly hurdles limiting the establishment of *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae). Biological Control, 157, 104572. https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2021.104572

Pérez-Hedo, M., Suay, R., Alonso, M., Ruocco, M., Giorgini, M., Poncet, C., & Urbaneja, A. (2017). Resilience and robustness of IPM in protected horticulture in the face of potential invasive pests. Crop Protection, 97, 119–127. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.11.001

Phillips, J., Gillis, D., & Hanner, R. (2019). Incomplete estimates of genetic diversity within species: Implications for DNA barcoding. Ecology and Evolution, 9(5), 2996–3010. https://doi.org/10.1002/ECE3.4757

Pijnakker, J., & Wäckers, F. (2018). Biological control of the tomato russet mite Aculops lycopersici (Acari: Eriophyidae) in greenhouse grown tomatoes. IOBC/WPRS Bulletin, 134, 26–27. https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20203512285Poinar, G., & Poinar, R. (1998). Parasites and pathogens of mites. Annual Review of Entomology, 43, 449–469. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.449

Potter, C. (1952). An improved laboratory apparatus for applying direct sprays and surface films, with data on the electrostatic charge on atomized spray fluids. Annals of Applied Biology, 39(1), 1–28. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1952.tb00993.x

Rasmann, S., Bennett, A., Biere, A., Karley, A., & Guerrieri, E. (2017). Root symbionts: Powerful drivers of plant above- and belowground indirect defenses. Insect Science, 24(6), 947–960. https://doi.org/10.1111/1744-7917.12464

Raworth, D. A. (2001). Control of Two-spotted Spider Mite by Phytoseiulus persimilis. Journal of Asia-Pacific Entomology, 4(2), 157–163. https://doi.org/10.1016/S1226-8615(08)60117-X

Riddick, E. W., & Simmons, A. M. (2014). Do plant trichomes cause more harm than good to predatory insects? Pest Management Science, 70(11), 1655–1665. https://doi.org/10.1002/ps.3772

Riga, M., Tsakireli, D., Ilias, A., Morou, E., Myridakis, A., Stephanou, E. G., Nauen, R., Dermauw, W., Van Leeuwen, T., Paine, M., & Vontas, J. (2014). Abamectin is metabolized by CYP392A16, a cytochrome P450 associated with high levels of acaricide resistance in Tetranychus urticae. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 46(1), 43–53. https://doi.org/10.1016/J.IBMB.2014.01.006

Roditakis, E., Fytrou, N., Staurakaki, M., Vontas, J., & Tsagkarakou, A. (2014). Activity of flonicamid on the sweet potato whitely Bemisia tabaci (Homoptera: Aleyrodidae) and its natural enemies. Pest Management Science, 70(10), 1460–1467. https://doi.org/10.1002/PS.3723

Roush, R. T., & Tabashnik, B. E. (1990). Pesticide Resistance in Arthropods. 1, 1–2. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6429-0

Roychoudhury, N. (2016). Potter spray tower. 3(September), 8–10.

Sanchez, J. A., La-Spina, M., & Lacasa, A. (2014). Numerical response of Nesidiocoris tenuis (Hemiptera: Miridae) preying on Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae) in tomato crops. European Journal of Entomology, 111(3), 387–395. https://doi.org/10.14411/eje.2014.041

Sayers, E. W., Agarwala, R., Bolton, E. E., Brister, J. R., Canese, K., Clark, K., Connor, R., Fiorini, N., Funk, K., Hefferon, T., Holmes, J. B., Kim, S., Kimchi, A., Kitts, P. A., Lathrop, S., Lu, Z., Madden, T. L., Marchler-Bauer, A., Phan, L., … Ostell, J. (2019). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. Nucleic Acids Research, 47(D1), D23–D28. https://doi.org/10.1093/nar/gky1069

Schmidt-Jeffris, R. A., Beers, E. H., & Sater, C. (2021). Meta-analysis and review of pesticide non-target effects on phytoseiids, key biological control agents. Pest Management Science, 77(11), 4848–4862. https://doi.org/10.1002/ps.6531

Schütte, C., & Dicke, M. (2008). Verified and potential pathogens of predatory mites (Acari: Phytoseiidae). Experimental & Applied Acarology, 46(1–4), 307–328. https://doi.org/10.1007/S10493-008-9188-0

Simmons, A. T., & Gurr, G. M. (2005). Trichomes of Lycopersicon species and their hybrids: effects on pests and natural enemies. Agricultural and Forest Entomology, 7(4), 265–276. https://doi.org/10.1111/J.1461-9555.2005.00271.X

Skerman, V. B. D., McGowan, V., & Sneath, P. H. A. (1980). Approved Lists of Bacterial Names. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 30(1), 225–420. https://doi.org/10.1099/00207713-30-1-225

Sørensen, J. G., Addison, M. F., & Terblanche, J. S. (2012). Mass-rearing of insects for pest management: Challenges, synergies and advances from evolutionary physiology. Crop Protection, 38, 87–94. https://doi.org/10.1016/J.CROPRO.2012.03.023

Stenberg, J. A. (2017). A Conceptual Framework for Integrated Pest Management. Trends in Plant Science, 22(9), 759–769. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.06.010

Stouthamer, R., Breeuwer, J. A. J., & Hurst, G. D. D. (1999). Wolbachia pipientis: Microbial manipulator of arthropod reproduction. Annual Review of Microbiology, 53, 71–102. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.53.1.71

Sutáková G, Rüttgen F. Rickettsiella phytoseiuli and virus-like particles in Phytosfiulus persimilis (Gamasoidea: Phytoseiidae) mites. Acta Virol. 1978 Jul;22(4):333-6. PMID: 29476.

Su, Q., Xie, W., Wang, S., Wu, Q., Liu, B., Fang, Y., Xu, B., & Zhang, Y. (2014). The Endosymbiont Hamiltonella Increases the Growth Rate of Its Host Bemisia tabaci during Periods of Nutritional Stress. PLOS ONE, 9(2), e89002. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0089002

Tian, D., Tooker, J., Peiffer, M., Chung, S. H., & Felton, G. W. (2012). Role of trichomes in defense against herbivores: comparison of herbivore response to woolly and hairless trichome mutants in tomato (Solanum lycopersicum). Planta, 236(4), 1053–1066. https://doi.org/10.1007/S00425-012-1651-9

Tissier, A. (2012). Trichome Specific Expression: Promoters and Their Applications. In Transgenic Plants - Advances and Limitations (Issue March 2012). InTech. https://doi.org/10.5772/32101

Tixier, M. S., Kreiter, S., Croft, B. A., & Cheval, B. (2008). Kampimodromus aberrans (Acari: Phytoseiidae) from the USA: Morphological and molecular assessment of its density. Bulletin of Entomological Research, 98(2), 125–134. https://doi.org/10.1017/S0007485307005457

Tixier, M.-S., Okassa, M., & Kreiter, S. (2012). An integrative morphological and molecular diagnostics for Typhlodromus pyri (Acari: Phytoseiidae). Zoologica Scripta, 41(1), 68–78. https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2011.00504.x

Tixier, M. S., Douin, M., & Kreiter, S. (2020). Phytoseiidae (Acari: Mesostigmata) on plants of the family Solanaceae: results of a survey in the south of France and a review of world biodiversity. Experimental & Applied Acarology, 81(3), 357–388. https://doi.org/10.1007/S10493-020-00507-0

Tsagkarakou, A., Guillemaud, T., Rousset, F., & Navajas, M. (1996). Molecular identification of a Wolbachia endosymbiont in a Tetranychus urticae strain (Acari: Tetranychidae). Insect Molecular Biology, 5(3), 217–221. https://doi.org/10.1111/J.1365-2583.1996.TB00057.X

Urbaneja, A., González-Cabrera, J., Arnó, J., & Gabarra, R. (2012). Prospects for the biological control of Tuta absoluta in tomatoes of the Mediterranean basin. Pest Management Science, 68(9), 1215–1222. https://doi.org/10.1002/ps.3344

Vafaie, E. K., Pemberton, H. B., Gu, M., Kerns, D., Eubanks, M. D., & Heinz, K. M. (2021). Adding a Natural Enemy to Respond to Pest Immigration and Delayed Natural Enemy Releases in Augmentative Biological Control. Environmental Entomology, 50(3), 561–570. https://doi.org/10.1093/ee/nvab007

Van Haren, R. J. F., Steenhuis, M. M., Sabelis, M. W., & De Ponti, O. M. B. (1987). Tomato stem trichomes and dispersal success of Phytoseiulus persimilis relative to its prey Tetranychus urticae. Experimental & Applied Acarology, 3(2), 115–121. https://doi.org/10.1007/BF01270473

Van Houten, Y. M., Glas, J. J., Hoogerbrugge, H., Rothe, J., Bolckmans, K. J. F., Simoni, S., van Arkel, J., Alba, J. M., Kant, M. R., & Sabelis, M. W. (2013). Herbivory-associated degradation of tomato trichomes and its impact on biological control of Aculops lycopersici. Experimental and Applied Acarology 2012 60:2, 60(2), 127–138. https://doi.org/10.1007/S10493-012-9638-6

Van Leeuwen, T., Dermauw, W., Van De Veire, M., & Tirry, L. (2005). Systemic use of spinosad to control the two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae) on tomatoes grown in rockwool. Experimental & Applied Acarology, 37(1–2), 93–105. https://doi.org/10.1007/S10493-005-0139-8

van Lenteren, J. C. (2012). The state of commercial augmentative biological control: Plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. BioControl, 57(1), 1–20. https://doi.org/10.1007/s10526-011-9395-1

van Maanen, R., Vila, E., Sabelis, M. W., & Janssen, A. (2010). Biological control of broad mites (Polyphagotarsonemus latus) with the generalist predator *Amblyseius swirskii*. Experimental & Applied Acarology, 52(1), 29–34. https://doi.org/10.1007/S10493-010-9343-2

Villanueva, R. T., & Walgenbach, J. F. (2005). Development, oviposition, and mortality of Neoseiulus fallacis (Acari: Phytoseiidae) in response to reduced-risk insecticides. Journal of Economic Entomology, 98(6), 2114–2120. https://doi.org/10.1093/JEE/98.6.2114

Weeks, A. R., & Stouthamer, R. (2004). Increased fecundity associated with infection by a Cytophaga-like intracellular bacterium in the predatory mite, Metaseiulus occidentalis. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 271(SUPPL. 4), 1999–2001. https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0137

Wu, K., & Hoy, M. A. (2012). Extended starvation reduced and eliminated Wolbachia, but not Cardinium, from Metaseiulus occidentalis females (Acari: Phytoseiidae): A need to reassess Wolbachia's status in this predatory mite? Journal of Invertebrate Pathology, 109(1). https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.09.005

Yorulmaz Salman, S., Aydinli, F., & Ay, R. (2015). Etoxazole resistance in predatory mite Phytoseiulus persimilis A.-H. (Acari: Phytoseiidae): Cross-resistance, inheritance and

biochemical resistance mechanisms. Pesticide Biochemistry and Physiology, 122, 96–102. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.12.014

Zchori-Fein, E., Perlman, S. J., Kelly, S. E., Katzir, N., & Hunter, M. S. (2004). Characterization of a 'Bacteroidetes' symbiont in Encarsia wasps (Hymenoptera: Aphelinidae): proposal of 'Candidatus Cardinium hertigii.' International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54(3), 961–968. https://doi.org/10.1099/IJS.0.02957-0

Zymo Research Corporation (2022). What is TRIzol®? - A BREAKDOWN OF TRIZOL®AND HOW TO OPTIMIZE YOUR RNA EXTRACTION. https://www.zymoresearch.com/pages/what-is-trizol