ارزیابی نماتد های بیمارگر حشرات در برابرمگس میوه زیتون Bactrocera oleae

چکیده

شیوع شش گونه نماتد بیمارگر حشرات در برابرBactrocera oleae مقایسه شد. سطوح آلودگی مشابه زمانی مشابه شد که لارو سن سوم در معرض IJs ها در سوبستر های خاک گلدانی قرار گرفتند. وقتی IJs بر روی زیتون های افتاده آلوده اسپری شدند، بسیاری از لارو ها در زیتون های فراوری شده علاوه بر خاک مردند. Steinernema feltiae موجب بالاترین مرگ ومیر کلی ۶۷,۹ درصد شد. به علاوه، سه ازمایش برای بهینه سازی دوره زمانی برای کاربرد مزرعه ای Feltiae.S انجام شد.۱- فراوانی لارو های مگس در زیتون های افتاده در دوره ۲۰۰۶-۲۰۰۷ با بالاترین تعدد لاور های حساس در هر ۱۰۰ زیتون مشاهده شده طی دسامبر ۲۰۰۶ براورد شد۲-کارایی S. feltiae در برابر لارو مگس به استعمال پس از IJ تعیین شد.B. oleae به سوبسترا قبل و بعد از استعمال نماتد در سطوح مشابه آلوده شد.۳- اثر سه رژیم دمایی متناظر با اکتبر تا دسامبر در دیوس کالیفرنیا بر بقا و آلودگی S. feltiae تعیین شد. بعد از ۸ هفته، لارو های سن سوم در تیمار ۳-۱۲ درجه، بالاترین سرعت بقا را نشان دادند. با این حال دمای سرد به طور معنی داری آلودگی و شیوع S. feltiae کاهش داد. نتایج نشان دهنده این است که لارو بالغ B. oleae به عفونت EPN هم در خاک و هم در زیتون های الوده حساس است.S. feltiae به عنوان کارامد ترین گونه، پتانسیل توقف رشد B. oleae را دارد. پیشنهاد ما این است که نوامبر زمان بهینه برای استعمال میدانی S. feltiae در کالیفرنیای شمالی است

لغات کلیدی:oleae ،Tephritidae،،Steinernema،Heterorhabditis، Bactrocera،نماتد پارازیت حشره، زیتون

۱-مقدمه

مگس میوه زیتون (Bactrocera oleae(Rossi، مهم ترین آفت حشره ای درختان زیتون در سرتاسر دنیا است(رایس ۲۰۰۰). این مگس برای اولین بار در ۱۹۹۸ در اکتبر در کالیفرنیا مشاهده شده و اگنون در بسیاری از

منطق کشت زیتون در این ایالت منتشر شده است(رایس و همکاران ۲۰۰۳). در طبیعت، این آفت چند نسله تنها در میوه زیتون تولید مثل می کند(جانسون و همکاران ۲۰۰۶). اولین افراد بالغ در هر سال در بهار به دنیا امده و تخم گذاری در زیر پوست زیتون هایی انجام می شود که بر روی درختان سال قبل باقی مانده اند. لارو بر روی گوشت میوه تغذیه کرده و از این روی سه نسل خود را قبل از شفیرگی کامل می کنند. در طی ماه های گرم تر سال، شفیرگی در درون میوه رخ می دهد(رایس ۲۰۰۰). با گذشت زمان، نسبت زیادی از لارو ها میوه ها در سومین نسل ترک می کنند یا بعد از این که میوه بر روی زمین افتاد و یا زمانی که آن ها هنوز بر روی درخت قرار دارند. آن ها سپس شفیره شده و در زمستان در خاک می مانند(کاپتوس و فلچر ۱۹۸۴) در عمق ۱-۴ سانتی متر است(دیمو و همکارا۲۰۰۳).آلودگی توسط B.

Oleae موجب می شود تا میوه به طور نارس بیفتد و کیفیت میوه هم در زیتون های جعبه ای و همه زیتون های روغنی کاهش می یابد((Michelakis and Neuenschwander, 1983; Kapatos and Fletcher, 1983).

امروزه، ابزار مدیریتی اصلی برای B. oleae متشکل از کاربرد و استعمال مواد آفت کش بر اساس اسپینوزاد می باشد.(جانسون و همکاران ۲۰۰۶)/اگرچه اسپینوزاد به صورت یک ترکیب کم خطر طبقه بندی می شود، توسعه راهبرد های ایمن از نظر محیطی و پایدار تضمین می شود. این راهبرد ها شامل استفاده از نماتد های بیمار گر حشرات در برابر مراحلی از مگس هایی می باشند که در مرحله زمستانه در تماس با خاک هستند. به دلیل نگرانی های ایمنی مربوط به استعمال شیمیایی و سطح کم مورد نیاز برای تیمار، استفاده از نماتد های بیمار گر حشرات ا یک روش ایمن و اقتصادی برای مدیریت B. oleae در حیات خانه و اراضی عمومی است که هر دوی آن ها منابع مهم آلودگی باغ های تجاری محسوب می شود.

EPNs ها متعلق به جنس های Steinernema وHeterorhabditis هستند. آن ها دارای رابطه متقابل دو سویه با باکتری ها در جنس های Xenorhabdus وPhotorhabdus برای steinernematids وheterorhabditids دارند(پوینار ۱۹۹۰). باکتری ها، میزبان را با تولید توکسین می کشند و برای نماتد مواد غذایی ارایه کرده و مانع از الودگی جسد میزبان می شود(فورست و کلارگ ۲۰۰۲). لارو های نسل سوم

که حامل باکتری ها در روده است، تنها مرحله آزاد زی در در سیکل حیات EPN است. لارو های نسل سوم وارد بدن میزبان از طریق منافذ طبیعی شده و باکتری ها را درون هوموکل کرده و میزبان را در طی ۲۴ تا ۴۸ ساعت می کشند. نماتد ها بر روی باکتری ها تغذیه کرده و ۱-۳ نسل را کامل می کنند و بعد از آن لارو ها وارد مرحله بیماری زایی شده و برای جست و جوی میزبان جدید از جسد یا لاشه خارج می شوند(بوتمر ۲۰۰۲).

EPNs به طور کارامدی در برابر طیف وسیعی از افات حشره ای از جمله دو بالان استفاده شده است((Georgis et al., 2005; Jagadale et al., 2004; Jess et al., 2005; Grewal et al., 2005). هیچ مطالعه ای به تست نماتد ها در برابرB. oleae, نپرداخته است ولیSteinernema riobraveCabanillas, Poinar و Raulston,S. carpocapsae (Weiser), و S. feltiae (Filipjev) وقتی بر روی تفریتید های Ceratitis capitata اعمال شدند نتایج قابل قبولی را نشان دادند((Gazit et al., 2000; Lindegren et al., 1990)).

در این مطالعه سه هدف دنبال می شود: ۱- فراوانی لارو های مگس در زیتون های افتاده در دوره ۲۰۰۶-۲۰۰۷ با بالاترین تعدد لاور های حساس در هر ۱۰۰ زیتون مشاهده شده طی دسامبر ۲۰۰۶ براورد شد۲-کارایی S. feltiae در برابر لارو مگس به استعمال پس از IJ تعیین شد.B. oleae به سوبسترا قبل و بعد از استعمال نماتد در سطوح مشابه آلوده شد.۳- اثر سه رژیم دمایی متناظر با اکتبر تا دسامبر در دیوس کالیفرنیا بر بقا و آلودگی S. feltiae تعیین شد.

۲-مواد و روش ها

۲-۱ نماتد ها و حشرات

S. riobrave, S. ،Steinernema feltiae(SN strain),S. carpocapsae(All strain) H. marelatusLiu,glaseri(Steiner) (NC strain),Heterorhabditis bacteriophora Poinar و Berry در سومین نسلGalleria mellonella در دمای اتاق کشت شد. لارو های عفونی و بیمارگر در دام های سفید بر اساس روش Kaya and Stock (۱۹۹۷) برداشت شدند. اطلاعات بیشتر در مورد نماتد ها برای آزمایشات خاص ارایه شده است. S. feltiae تنها در آزمایشات کارایی استفاده شد.

لارو B. oleae نسل سوم در ازمایشات از میوه های پوسیده طبیعی جمع اوری شده از درختان زیتون خوراکی مدیریت نشده در محیط دانشگاه کالیفرنیا دیویس در نوامبر و دسامبر بدست امد. زیتون های جمع اوری شده بر روی صافی های سیمی و لوله های پلاستیکی در دمای ۵ تا۱۵ درجه قرار داده شدند نا لارو ها هنگام خروج از میوه به مدت ۲۴ ساعت نگه داری شوند. به علاوه، برای ازمایشات دیگر، زیتون های افتاده از زیر درختان مدیریت نشده در شهر دیویس از نوامبر تا ژانویه جمع اوری شدند.

۲-۲ حساسیت به نماتد ها

دو ازمایش ازمایشگاهی برای تعیین حساسیت B. oleae به هر گونه EPN انجام شدند. برای هر دو ازمایش، لارو های نسل سوم جمع اوری شده در آب دمای ۲۰ درجه باقی مانده و در ۳ هفتگی استفاده شدند. نرخ استعمال نماتد ها ۲۵ لارو در هرسانتی متر مربع بود و مقدار کل رطوبت سوبسترا ۱۰ درصد بود و ۵ تکرار در هر گونه EPN انجام شد.

۲-۲-۱ آزمایش ۱

حساسیت لارو B. oleae به آلودگی با نماتد های نسل سوم تعیین شد که به طور طبیعی از زیتون ها در لارو ها در پلیت های پلاستیکی ۳۷ میلی لیتری تا عمق ۳ سانتی متری با سوبسترای متشکل از ترکیب ۱ به ۱ شن غربال شده و خاک گلدان در رطوبت ۱۰ درصد ظهور یافتند. شن قبل از شروع آزمایش آون خشک شده و مقدار رطوبت اولیه خاک ۱۰ درصد بود. نماتد ها به سوبسترای شن/خاک در آب با استفاده از پیپت با سرعت فوق اعمال شدند. در ۱ ساعت پس از استعمال نماتد، ۵ لارو به هر کاپ اعمال شده و و به درون سوبسترا نفوذ کردند.کاپ ها پوشش دهی شده و در دمای ۲۵ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبات شدند و بعد از آن حشرات جمع اوری شده و برای تعیین وضعیت عفونی و الودگی حشرات تشریح شدند. چون زمان اجرای ازمایش تنها ۲۴ ساعت بود، و وضعیت عفونت، نه مرگ و میر تعیین شد، تیمار های شاهد عاری از نماتد در این مطالعه استفاده نشدند.

۲-۲-۲ ازمایش ۲

برای تایید نتایج ازمایش ۱ با استفاده از زیتون های آلوده، دومین ازمایش انجام شد. لوله های پلاستیکی($40\ cm \times 30\ cm \times 18\ cm$، ۱۲۰۰ سانتی متر مربع در سطح خاک) با ترکیب ۳ به ۱ شن غربال شده از ۳۰ سانتی متر و خاک گلدانی در عمق ۴ سانتی متر پرشدند و بعد از آن ۱۲۰ زینون بر روی سطح سوبسترا قرار داده شد. زیتون های زیر درختان زیتون جمع اوری شده و وضعیت بیماری آن ها نامشخص بود. با این حال فرض شد که هر لوله دارای نسبت یکسانی از ینون های لاروی بود زیرا زیتون ها فورا قبل از ازمایش ترکیب شدند. نماتد ها بر روی زیتون ها با استفاده از اسپری دستی اسپری شدند. آب به صورت شاهد نیز اسپری شد. لوله ها با پوشش پلاستیکی پوشیده شده و در دمای اتاق قرار داده شدند. دما و رطوبت بالای زیتون ها به ترتیب ۲۴ و ۱۸ درصد بود. بعد از ۷۲ ساعت، زیتون ها تشریح شده و خاک برای جمع اوری لارو و شفیره غربال شد. شفیره های درون زیتون های تشریح شده در تحلیل قرار نگرفتند زیرا فرض شد که شفیره ها قبل از استعمال نماتد تشکیل شده اند یعنی زمانی که میوه ها هنوز روی درختان بوده و شفیره های B. oleae حساس نبودند و این بر اساس نتایج مطالعات دیگر بر روی دو بالان است((Belton et al., 1987; Ishibashi and Kondo, 1990; Lindegren and Vail, 1986; Yee and Lacey, 2003).

۲-۳ دوره زمانی بهینه برای استعمال گونه های EPN در مزرعه

تنها موثر ترین گونه های ازمایشات ۱ و ۲ یعنی feltiae مورد تست بیشتر قرار گرفت. برای بقای لارو نسل سوم و ازمایشات الودگی و بیماری، لارو های نسل سوم یک روز در میان برداشت شدند. ان هایی که در روز ششم بعد از شروع ظهور برداشت شدند در اب در دمای ۲۰ درجه باقی مانده و طی ۱ هفته استفاده شدند.

۲-۳-۱ براورد جمعیت لاروی B. oleae درون زیتون های افتاده

برای براورد تعداد لارو های B. oleae حساس به S. feltiae درون زیتون های طی فصل رشد، زیتون از زیر ۳ درخت زیتون بر روی محوطه دانشگاه از نوامبر ۲۰۰۶ تا مارس ۲۰۰۷ جمع اوری شدند. درختان بر ااس سطح بالای الودگی مشاهده شده سال قبلی انتخاب شدند. در هر تاریخ نمونه برداری، زیتون های جمع اوری شده ترکیب شده و ۵۰۰ زیتون به صور تصادفی انتخاب شدند. لارو های S. OLEA درون زیتون وقتی در ۱ گالن

سر بسته انکوبات شدند از میوه خارج شدند. لارو ها شمارش شده و به دو گروه تقسیم شدند: ۳ میلی متر و بزرگ تر، کوچک تر از ۳ میلی متر

۲-۳-۲ کارایی در برابر B. oleae افتاده به خاک بعد از استعمال نماتد نسل سوم

کارایی S. feltiae استعمال شده به خاک قبل از قرار دادن زیتون های الوده در سطح با استفاده از نماتد های تجاری ارزیابی شد. بخش کوچکی از بچ به ۳۰۰ میلی لیتر آب افزوده شده و ۱۵دقیقه هم زده شده و طی ۱۲ ساعت استعمال شد. پروتکل های ازمایشی مشابه با ازمایش ۲ بود. لارو های نسل سوم بر روی زیتون های الوده سوبسترا در اولین تیمار استعمال شدند. در دومین تیمار، نماتدهای نسل بر روی سوبسترا ۱ ساعت قبل از قرار دادن زینون ها بر روی خاک استعمال شدند. سپس ۱۰ میلی لیتر آب بر روی زیتون ها برای تامین رطوبت استعمال شدند. آب بدون نماتد بر روی زیتون ها به صورت شاهد استعمال شدند. مقدار کل رطوبت سوبسترا بعد از اسپری ۱۰ درصد در همه تیمار ها بود.

۲-۳-۳ اثر دما بر روی بقای گونه EPN

برای تعیین دوره بهینه زمان برای استعمال نماتد، اثر دمای فصلی بر روی بقای موثر ترین گونه از ازمایشات ۱ و ۲، S. feltiae بررسی شدند. آزمایشات در سه دمای نوسانی بر اساس ماکزیمم و مینیمم دمای روزانه طی ماه های اکتبر تا دسامبر صورت گرفت. این دوره زمانی بود که نسبت زیادی از لارو های از میوه برای تولید شفیره در خاک خارج می شوند(کاپتوس ۱۹۸۴). داده های دما در ۲۵ سال توسط ایستگاه هوشناسی ارایه شد. و اتاقک های رشد با یکی از سه رژیم حرارتی با حداقل و حداکثر دمای ۱۰-۲۷، ۶-۱۸ و ۳-۱۲ تنظیم شدند. در طی ۲۴ ساعت، دما در رژیم ۱۰-۲۷ درجه با الگوی زیر نوسان داشت: ۸ ساعت در ۲۷ درجه، ۴ ساعت در ۱۷ درجه، ۸ ساعت در ۱۰ درجه و ۴ ساعت در ۱۷ درجه. در ۶-۱۸ و ۳-۱۲ درجه تعداد ساعت در ماکزمیم و می نمیمم دما برابر با ۱۰-۲۷ درجه بود ولی دما های ۴ ساعت، ۱۲ و ۷ درچه بود.

یک هزار لارو نسل سوم S. feltiae به اب مقطر به میزان ۲۵ گرم شن اتوکلاو درون لوله سانتریفیوژ پلاستیکی ۵۰ ملیلیتری با انتهای مخروطی افزوده شد. مقدار کل رطوبت شن در همه لوله ها ۱۰ درصد بود. برای هر رژیم

دمایی، ۹۰ قسمت تهیه شد. در لوله های شاهد، ۱۰ لوله ذر دمای ۲۵ درجه انکوبات شد و بعد از آن نماتد های نسل سوم از شن استخراج شد. ۸۰ لوله باقی مانده وزن شده و پارافیلم پوشش دهی شده و در دمای طرح انکوبات شدند. هر ۴ روز، لوله ها وزن شده و آب مقطر کافی به آن ها برای حفظ مقدار رطوبت شن به میزان ۱۰ درصد افزوده شده و پارافیلم تعویض شد. لارو های نسل سوم از شن در ۱۰ لوله تصادفی در هر هفته استحراج شده و تحت میکروسکوپ شمارش شدند. تعداد لارو های بدست امده در فرایند استخراج به صورت معرف تعداد لارو های نسل سوم باقی مانده در نظر گرفته شدند.

برای استخراج لارو های نسل سوم از شن، ۴۰ میلی لیتر آب مقطر به لوله ازمایشی اعمال شده و منافذ با دستمال کاغذی ۱ لایه پوشیده شده و پوشش پلاستیکی اصلاح شده بر روی آن ها قرار داده شد. لوله ها درون پتری دیش های ۱۰۰ میلی متر مربعی واژگون شدند و ۶۰ میلی لیتر آب مقطر به آن ها افزوده شد. لوله های واژگون در دمای ۲۵ درجه به مدت ۴۸ ساعت انکوبات شدند که بعد از آن خارج شده و لارو ها در دیش شمارش شدند

۲-۳-۴ اثر دما بر بیماری زایی گونه EPN

بیماری زایی S. feltiae در پلیت های ۲۴ چاهکی در سه رژیم دمایی ارزیابی شد. ۲۰ لارو به آب مقطر ۵۰ میکرولیتری در هر چاهگ افزوده شد. چاه خا دارای ۳ گرم شن اتوکلاو شده با ۱ درصد رطوبت بودند. ۵۰ چاهک با لارو و ۵۰ چاهک شاهد در هر رژیم دمایی تست شدند. در چاهک ها با پارافیلم مسدود شده و پلیت ها در رژیم طراحی شده برای سازکاری لارو ها به مدت ۲۴ ساعت انکوبات شدند. حشره جایگزین G. mellonella ذر این ازمایش به دلیل نبود لارو مگس زیتون استفاده شذ. یک لارو G. mellonella به هر چاهک بعد از دوره سازگاری افزوده شده و پلیت ها پوشش دهی شده و به تیمار های دمایی خود بازگشتند. لارو ها هر ۱۲ ساعت چک شدند . برای تعیین مرگ لاروی هر یک از آن ها بعد از نگه داشتن در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه پروب شدند و در صورتی که پاسخ نمی داد به صورت مرده تلقی می شد. لارو های مرده با آب برای شست و شوی لارو های چسبیده شده اب کشی شده و در پتری دیش های تمیز با کاغذ صافی به مدت ۵ روز دمای ۲۵ درچه انکوبات شدند. و بعد از آن برای تعین وضعیت بیماری زایی تشریح شدند. لارو های زنده بعد از یک هفته با اب

ابگشی شده و در پلیت های ۲۴ چاهکی در دمای ۲۵ درجه به مدت ۷ روز دیگر انکوبات شده و پساز آن حشرات مرده برای تعیین وضعیت الودگی تشریح شدند.

۲-۴ تولید مثل نماتد در لارو های B. oleae

توانایی تولید مثلی S. feltiae درون B. oleae ارزیابی شد. ۵۰ لارو نسل سوم در معرض ۵۰ IJs/cm درون ۱۰ کاپ پلاستیکی ۳۰ میلی متری قرار داده شده، ۵ بارو در هر کاپ قرار داده شده و در ۲۵ سانتی گراد مورد بررسی قرار گرفتند. سوبسترا متشکل از ترکیب ۱ به ۱ شن غربال شده و خاک کلدان با رطوبت ۱۰ درصد بودند. بعد از ۲ روز، حشرات جمع اوری شده و بر روی وایت تراپ در دمای اتاق قرار داده شدند. در طی ۳ هفته، شفیره های توسعه یافته به حشرات الوده کنار گذاشته شده و باقی مانده ها به صورت الوده در نظر گرفته شده و به مدت سه هفته برای جمع اوری نماتد های لاور نسل سوم استفاده شدند. شفیره های یکه از آن ها لارو های ایجاد نشده بود برای تعیین حضور EPN درون اجساد تشریح شدند.

۲-۲ تحلیل آماری

داده های کارایی، بقا و حساسیت با ANOVA(SAS ۲۰۰۲-۲۰۰۳) .و سپس مقایسه میانگین استیودنت، نویمن و کول تحلیل شدند.داده های جمع اوری شده از لارو های ۳ میلی متر و بزرگ در در تحلیل ها در نظر گرفته شدند و لارو های کوچک تر هرگز در طی ازمایش ما الوده نشدند. ازمون T به مقایسه نرخ الودگی و بیماری میان زیتون ها و خاک برای هر تیمار EPN پرداخت. مرگ و میر G. mellonella و بقای S. feltiae در دما های مختلف از نظر مرگ و میر شاهد و بقا تصحیح شد. تست کای اسکور برای مقایسه الودگی و بیماری زایی S. Feltiae در دماهای مختلف استفاده شد. داده های ثبت شده به صورت درصد الودگی یا درصد بقا در معرض تبدیل ارک سینوس قبل از تحلیل قرار گرفت. میانگین های تبدیل نشده در همه اشکال نشان داده شده است.

۳-نتایج

۳-۱ حساسیت به نماتد

۳-۱-۱ ازمایش ۱

همه شش گونه EPNs B. oleae را در سطوح یکسان الوده کردند.S. feltiae ۱۰۰ درصد لارو های پیشنهادی را الوده کرده و S. riobraveوS. Glaseri موجب کم ترین سطح ۷۶ درصد شدند. بسیاری از لارو های در معرض نماتد به صورت شفیره مردند به جز انواع الوده شده توسطS. Feltiae که همه آن ها قبل از شفیرگی مردند.

۳-۱-۲ آزمایش ۲

همه شش گونه EPN ایجاد مرگ و میر بیشتری نسبت به شاهد نشان دادند که در آن هیچ گونه آلودگی دیده نشد:S. feltiae کارامد ترین گونه بود و این موجب ایجاد الودگی۶۷,۹٪ شد. سطح الودگی درون زیتون ها و حاک نیز در جدول ۱ارایه شده است. همه لارو های الوده شده ۳ میلی متر یا بزرگ تر بودند. شفیره های الوده تنها در خاک دیده شدند. به دلیل دسترسی متغیر لارو B. oleae علی رغم ترکیب زیتون های جمع اوری شده، تعداد کل لارو ها و شفره ها در میان تیمار ها متفاوت بودند.

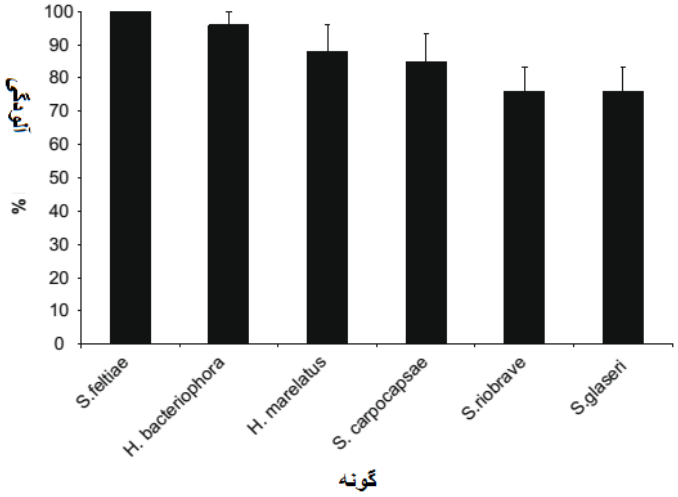
۳-۲ دوره زمانی بهینه برای استفاده از گونه های EPN در مزرعه

۳-۲-۱ براورد جمعیت لاروی B. oleae در زیتون های افتاده

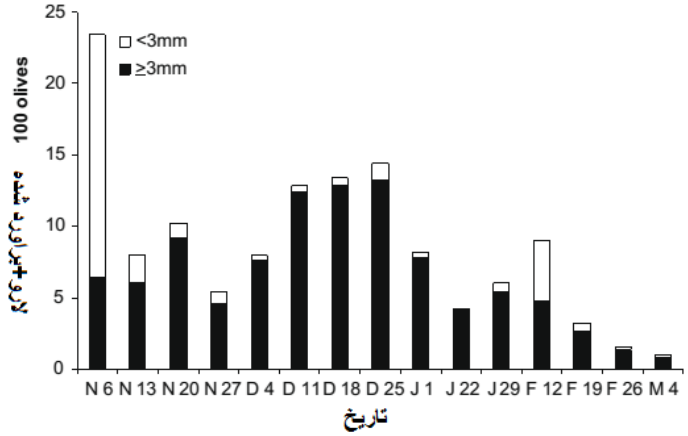
بیشترین تعداد لارو های براورد شده در هر ۱۰۰ زیتون ۲۳ بود و از زیتون های جمع اوری شده در تاریخ اول نمونه برداری در ۶ نوامبر حاصل شدند. بیشترین تعداد لارو های ۳ میلی متر و بزرگ تر از زیتون های جمع اوری شده در ۱۱ ، ۱۸ و ۱۵ دسامبر ۲۰۰۶ حاصل شدند. جمع اوری در دو تاریخ نمونه برداری ژانویه و در فوریه به دلیل بارندگی سنگین قطع شد. ازمایش در ۴ مارس ۲۰۰۷ به لدیل عدم دسترسی کافی به زیتون ها پافت.

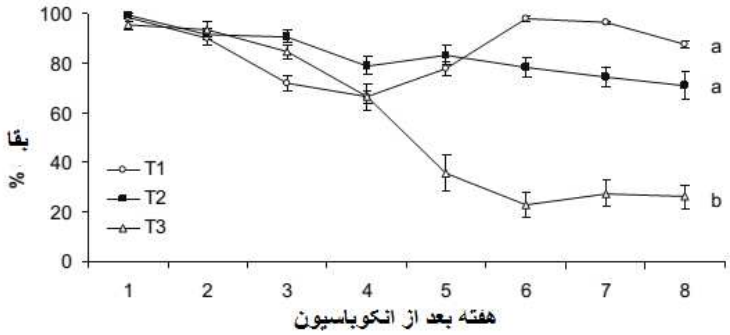
شکل ۱: سطح آلودگی لارو های نسل سوم Bactrocera oleae توسط Steinernema feltiae(SN strain),S. carpocapsae(All strain),S. riobrave, S. glaseri، و H. marelatus در ۲۵ لارو در

سانتی متر مربع بعد از ۲۴ ساعت در سوبسترای خاک کلدان و شن درون کیسه های پلاستیکی ۳۷ میلی متری در ۲۵ درجه



شکل ۲: تعداد براورد شده لارو هایBactrocera oleae به ازای هر ۱۰۰ زیتون افتاده جمع اوری شده در هفته طی ۲۰۰۶-۲۰۰۷





شکل ۳: بقای درصد میانگین لارو سوم Steinernema feltiae اتکوبات شده در سوبسترا در سه تیمار دمایی.T1:۲-۱۲ درجه، T2:۶-۱۸ درجه، T3: ۱۰-۲۷. در دمای ۲۴ ساعت،نوسان دما به شکل زیر بود: ۸ ساعت در ماکزیمم و ۸ساعت در مینیمم دما با دو بازه ۴ ساعت در دمای ۷،۱۲ و ۱۷ درجه. داده ها بر اساس تست SNK تبدیل شدند. خطوط با حرف مشترک اختلاف معنی داری دارند.

۳-۲-۲ کارایی در برابر B. oleae ریخته شده بر خاک بعد از کاربرد لارو نسل سوم

آلودگی ناشی از S. feltiae بر روی زیتون ها مشابه با لارو نسل سوم استعمال شده بر روی خاک قبل از افزودن به زیتون ها استعمال شده و هر دو بهتر از شاهد بودند. بسیاری ازB. Oleae به ۲صورت شفیره در خاک مردند. وقتی که در ۱۰ زیتون اسپری شدند،S. feltiae موجب الودگی ۵۰ درصد با ۱۶,۴ درصد B. oleae در زیتون ها کرده و ۳۳,۶ درصد در خاک مردند. لارو های نسل سوم استعمال شده به سوبسترا قبل از افزودن به زیتون ها موجب الودگی ۴۷,۲ درصد شند. در تیمار بعدی، ۱۰,۲ درصد B. oleae در زیتون و ۳۷ درصد در خاک مردند. هیچ الودگی در شاهد دیده نشد.

۳-۲-۳ اثر دما بر بقای گونه های EPN

بقای S. feltiae تحت تاثیر زمان و دما قرار گرفت. برای ۲ هفته اول انکوباسیون،S. feltiae برای همه دما ها مشابه بود. بعد از ۴ هفته، لارو های نسل سوم در سرد ترین و گرم ترین رژیم های دمایی دارای نرخ بقای کم تری تسبت به تیمار متوسط ۶-۱۸ درجه داشتند. در هفته ۸، با این حال،S. feltiae انکوبات شده در سرد ترین و گرم ترین رژیم بالاترین و پایین ترین درصد بقا را به ترتیب نشان دادند. درصد زنده مانی S. feltiae در سه رژیم دمایی در جدول ۲ ارایه شده است.

۳-۲-۴ اثر دما بر روی بیماری زایی گونه EPN

دمای سرد به طور معنی داری موجب محدود شدن مرگ و میرG. Mellonella توسط S. feltiae شد. مرگ و کیر در تیمار ۳-۱۲ درجه طی ۷ روز اول تلقیح دیده شد. در طی ۴ روز،S. feltiae موجب ۲ و ۱۸,۴ درصد مرگ و میر به ترتیب در ۶-۱۸ و ۱۰-۲۷ درجه شد. هفت روز بعد از تلقیح، مرگ و میر های مشاهده شده ،

۴۲,۸ درصد در ۶-۱۸ درجه و ۵۳ درصد در دمای ۱۰-۲۷ درجه بودند. بعد از انکوباسیون لارو های زنده در دمای ۲۵ درجه برای ۷ روز دیگر، همه حشرات در معرض S. feltiae از هر دو تیمار ۶-۱۸ و ۱۰-۲۷ درجه قرار گرفتنه و مردند در حالی که ۳۰,۲ درصد مرگ و میر برای حشرات در رژیم دمایی ۳-۱۲ درجه مشاهده شدند.

جدول۱:

Overall infection levels of *Bactrocera oleae* and percentage that died in the soil compared to that inside infested olives resting on a sand-potting soil substrate and treated with *Steinernema* and *Heterorhabditis* species (25 infective juveniles/cm^2) in the laboratory.

Nematode species	Percent[a] overall infection ± SEM	Percent[b] of all *B. oleae* infected ± SEM		Total larvae and pupae
		Inside olives[a]	In the soil	
S. feltiae	67.9 ± 6.0a	42.1 ± 9.0a	25.8 ± 4.2a	78
S. carpocapsae	45.6 ± 4.9b	30.2 ± 6.2ab	15.4 ± 2.5a	73
S. riobrave	35.8 ± 4.6bc	5.5 ± 2.4b	30.3 ± 4.2a	70
S. glaseri	33.7 ± 6.4bc	28.5 ± 4.1ab	5.2 ± 2.8c	117
H. bacteriophora	37.3 ± 6.4bc	10.2 ± 6.1b	27.1 ± 5.9b	60
H. marelatus	19.1 ± 8.4c	10.3 ± 5.4b	8.8 ± 3.9b	63

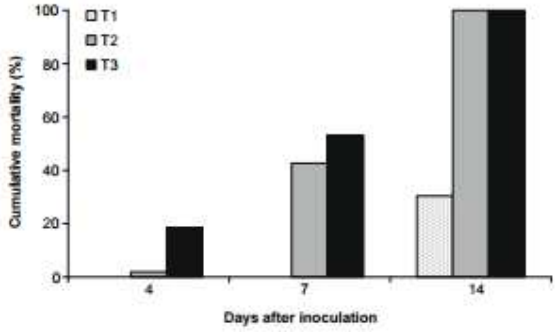
[a] Means followed by the same letter are not significantly different (SNK test, $P < 0.05$).
[b] Two means followed by the same letter within each row are not significantly different (*t*-test, $\alpha = 0.05$).

جدول۲:

Mean percent[a] survival (±SEM) of *Steinernema feltiae* incubated on a sand substrate (10% moisture) at three different temperature (°C) treatments.

Treatment[b]	Week(s) after incubation							
	1	2	3	4	5	6	7	8
T1	98.7 ± 0.5a	90.1 ± 2.8b	72.1 ± 3.0cd	66.5 ± 2.6c	78.1 ± 2.9d	97.9 ± 1.0a	96.4 ± 0.9a	87.6 ± 1.4e
T2	99.5 ± 0.5a	91.9 ± 2.3b	90.9 ± 2.5b	79.1 ± 3.5cd	83.1 ± 3.9c	78.4 ± 3.8cd	74.7 ± 3.9cd	71 ± 5.4cd
T3	95.5 ± 1.7a	93.8 ± 3.1a	84.7 ± 2.8b	66.6 ± 5.1c	35.8 ± 7.5d	23.1 ± 5.0e	27.6 ± 5.0e	26.3 ± 4.5e

[a] Means followed by the same letters within rows are not significantly different (SNK test, $P < 0.05$).
[b] T1: 3–12 °C (min–max); T2: 6–18 °C; T3: 10–27 °C; In a 24 h period, the temperature fluctuated in the following pattern: 8 h at the maximum and 8 h at the minimum temperature with two 4 h intervals at 7, 12, and 17 °C, respectively.



شکل۴

۳-۳ تولید مثل نماتد در لارو B. oleae

همه حشرات در معرض EPN شفیره شده بعد از ۲ روز قرار گرفتند. هیچ ظهور لارو نسل سوم بعد از ۳ هفته دیده نشد که طی آن ۱۹ مورد از ۵۰ شفیره به مکس بالغ تبدیل شدند. وقتی که شفیره ها تشریح شدند ۳۵,۵ درصد ۳ض آن ها دارای تعداد زیادی از لارو های زنده نسل سوم بودند. ۹,۷ درصد دارای تعداد زیادی از لارو های

نسل سوم مرده بودند و ۲۶ درصد دارای نماتد های مرده ماده بودند .و ۹,۷ درصد دارای مراحل انگلی مختلف بودند که بسیاری از آن ها مردند هیچ نماندی در ۱۹ درصد باقی مانده مشاهده نشد.

۴-بحث

نتایج ما نشان می دهد که لاروB. Oleae که سه میلی متر و بزرگ تر است حساس به الودگی EPN نه تنها در خاک بوده بلکه درون زیتون های افتاده وجود داشتند. این می تواند فرصت را برای نماتد ها برای استفاده علیه B. oleae فراهم می کند زیرا بسیاری از زیتون های الوده که به زمین در انتهای فصل می افتند دارای لارو بالغ می باشند. این یافته ها نشان می دهند که S. feltiae قادر به بقا و عفونی برای B. oleae در دما های پاییز و ا وایل زمستان می شود به خصوص زمانی که لارو ها زیر درختان زیتون به تعداد زیاد بر روی خاک در شرایط اقلیمی مشابه افتادند. از این روی S. feltiae یک عامل کنترل زیستی برای کاهش جمعیت های زمستانه B. oleae است پیشنهاد ما این است که ماه نوامبر زمان بهینه برای استعمالS. feltiae بر علیه B. oleae در مزرعه کارولینای شمالی به دلیل شرایط دمایی و رطوبتی آن است.

لارو های نسل سوم حساسیت مشابهی به الودگی توسط سویه های SteinernemaوHeterorhabditis نشان دادند به خصوص زمانی که در معرض نماتد ها در سوبتسرای خاک گلدان و شن قرار گرفتند. بسیاری از لارو ها به صورت شفیره مردند که مشابه با نتایج مربوط به R. indifferens در معرضS. feltiae وS. carpocapsae است((Patterson Stark and Lacey, 1999; Yee and Lacey, 2003).هم چنین C. capitata, Dacus dorsalisHendel و D. cucurbitaeCoquillet در معرضS. carpocapsae نیز به صورت لارو الوده شدند ولی بعد از شفیرگی مردندوS. feltiae موجب مرگ ومیر ۱۰۰ درصد قبل از شفیرگی شدند زیرا لارو های مگس در طی چند ساعت بعد از ترک میوه در دمای ۲۵ درجه شفیره شدند. این ناشی از پاتوژنسیته بالا و یا درجه پاتوژنسیته بالا است. وقتی S. feltiae در برابرC. capitata تست شدند، عملکرد بهتری از S. riobrave داشتند(گازیت و همکاران ۲۰۰۰).

وقتی گونه های EPN بر روی زیتون های الوده به مگس زیتون اعمال شدند،دارای سطوح الودگی متفاوتی با S. feltiae بودند که به عنوان عفونی ترین گروه بود. این ازمایش مطابق باشرابط طبیعی بود که در آن پتانسیل

نماتد ها برای الودگی لارو های درون زیتون موجب بهبود کارایی ان ها می شود. یک زیتون افتاده همراه یا بدون سوراخ خروجی، دارای بیش از یک لارو در مراحل مختلف است. وقتی که زیتون ها جمع اوری شدند، نمی دانستیم که کدام یک الوده و کدام یک سالم است و از این روی ۱۲۰ زینون در هر تکرار در نظر گرفته شدند و هدف داشتن تعداد کافی از گونه های الوده بود. حساسیت منحصر به فرد لارو های ۳ میلی متری و بزرگ تر تاشی از خروج و انتشار دی اکسید کربن بالا است که نماتد جذب می کند(لوییس و همکاران۱۹۹۳) و منافذ طبیعی بزرگ آن ها از مهم ترین درگاه های ورودی لارو های نسل سوم است(گریف و همکاران ۲۰۰۵).

بسیاری از لارو های درون زیتون های تیمار شده که نشان می دهد لارو های نسل سوم قادر به یافتن آن ها قبل از خروج می باشند، نماتد ها به احتمال زیاد وارد کانال های تغذیه ای در زیتون ها از طریق منافذ خروجی می شوند به طور مشابه S. feltiae وS. carpocapsae موجب الودگی لارو های Anaplophora glabipennis درون کانال های سوراخ شده در رژیم غذایی مصنوعی شد(فالون و همکاران ۲۰۰۴). به علاوه، LeBeck et al. (۱۹۹۳) اثبات کردند که S. carpocapsae وارد برگ های Liriomyza trifolii از طریق منافذ تخم گذاری شدند. گونه های EPN به گونه های کمین کننده که دارای راهبرد غذایابی بشین و منتظر بمان استفاده می کنند و گشت زن، یعنی آن هایی که به جست و جوی میزبان می پردازند(S. glaseri) و یا بینابین(S. feltiaeandS. riobrave)، تقسیم می شوند(کمپل و لوییس ۲۰۰۲). نوع گشت زن S. glaseri لارو ها راکشته و در حالی که درون زیتون همانند S. feltiae و S. carpocapsae باقی می مانند. از این روی حتی گونه های کمین کننده به اندازه کافی حرکت کرده و لارو را الوده می کنند. نتایج مشابه در تست های میدانی باcarpocapsae در برابرAmyelois transitella مشاهده شدند که در میوه پسته افتاده در زمستان باقی می مانند(سیگل و همکاران ۲۰۰۴).

در براورد جمعیت لاروی B. Oleae درون زیتونهای افتاده، زیتون های جمع اوری شده در سه تاریخ نمونه برداری دسامبر ۲۰۰۶ دارای بالاترین تعداد لاروهای سه میلی متر و بزرگ تر بودند که به آلودگی و بیمار ی توسط S. feltiae حساس بودند. با این حال، دماها طی این دوره، برای استعال ایده ال نمی باشد. وقتی که افتادن میوه ها شروع می شود، نسبت زیادی از لارو ها از میوه هایی که هنوز در روی درختان هستند برای شفیره شدن در خاک

شروع می شود(کاپتوس و فلچر ۱۹۸۴). این نسبت در مطالعه ما تعیین نشد. از این روی داده ها تنها نشان دهنده بخشی از لارو هایی هستند که اهداف بالقوه در استعمال EPN می باشند. با این وجود، نتایج ما را می توان معرف جمعیت لاروی B. Oleaeدر نظر گرفت که حساس به S. feltiae است.

برای تعیین دوره زمانی بهینه طی فصل برای کاربرد و استعمال مزرعه ای گونه های EPN انتخاب شده، برای بررسی اثرات عوامل غیر زنده بر روی بقای EPN و بیماری طی دوره زمانی بالقوه ضروری است. دما یکی از عوامل مهم محدود کننده فعالیت های EPN است(کریفین ۱۹۹۳، کروال و همکاران ۱۹۹۴) زیرا بر نمو(کایا ۱۹۷۷)، رفتار تغذیه(بیرز و پینر ۱۹۸۱)، بیماری((Molyneux, 1986; Saunders and Webster, 1999; Chen et al., 2003) نماتد ها اثر دارد. مقادیر پایین و بالای موسط طی ژانویه، فوریه و مارس در دسامبر، نوامبر و اکتبر دیده شدند که شامل رژیم های دمایی سه ماهه بودند.

آزمایش بقای لارو های نسل سوم نشان داد لارو های سومین نسلS. Feltiae قادر به تحمل دمای پایین بوده و در طی ماه های نوامبر و دسامبر در کالیفرینا تحت هوای سرد زنده می مانند وقتی که بقای S. feltiae در سه دما با دمای حداقل حداکثر ۳-۶،۱۲-۱۸ و ۱۰-۲۷ در طی ۸ هفته ارزیابی شده و لارو های نسل سوم در سرد ترین دما بالاترین بقا را در انتهای ازمایش نشان داد. اگرچه برای تیمار متوسط در مقایسه با سرد ترین رژیم در طی سه هفته کم تر بود، لارو های سومین نسل در رژیم اول سرعت بقای بالایی را به طور متوسط برای ۵ هفته اول نشان دادند.S. feltiae مقاوم به سرما بوده و به دماهای سرد تر سازگار تر است((Grewal et al., 1994; Wright, 1992;Hazir et al., 2001)..اگرچه دماهای پایین اثر منفی بر تحرکS.feltiae دارد، EPN به طور لعال به جست و جوی الوده کردن B. oleae در طی ۷۲ ساعت با توجه به دمای بهینه می کند.

دما یک عامل مهم در الودگی EPNs((Griffin, 1993; Hazir et al., 2001)). وقتی لارو های G. mellonella در معرضS. Feltiae در تیمار های دمایی قرار داده شدند، مرگ و میر لاروی به طور معنی داری در سرد ترین رژیم پایین تر بود. مشابه با نتایج ما، S. feltiae موجب الودگی لارو G. mellonella در دمای ۸ درجه برای ۱۰ روز اولیه انکوباسیون شد(ساندرز و بستر ۱۹۹۹). در مطالعات دیکر،S. feltiae موجب آلوده شدن لارو Delia radicum بعد از ۴ روز در ۱۰ درجه شده و مرگ و میر لارو G. mellonella بعد از ۵ روز

در دمای ۸ درجه ۵۰ درصد بود(گریول و همکاران ۱۹۹۴). مرک و میر های مشابه ناشی از S. feltiae در تیمار های متوسط و گرم ترین نشان می دهد که دمای پایین طی ماه نوامبر در مقایسه با اکتبر، اثری بر عفونت S. feltiae نداشت.

نتایج نشان می دهد که سرد ترین رژیم موجب الودگی و بیماری نهان شد(براون و همکاران ۲۰۰۲). EPN می تواند از این راهبرد برای بقا تحت شرایط سرد و زمستانه درون میزبان استفاده کند. با این حال، مرگ و میر ناشی از S. feltiae بعد از انتقال بارو به دمای ۲۵ درجه پایین بود. از این رویS. Feltiae انتظار نمی رود که موجب مرگ و میر قابل توجهی در دامنه دمایی شود. تاخیر در الودگی برای سایر گونه های EPN گزارش شده است. براون و همکاران ۲۰۰۲ نشان داد که ۱۰۰ درصد لارو mellonella که در معرضS. Carpocapsae در ۵ درصد زنده باقی ماندند، در ۷۲ ساعت پس از انتقال به ۲۵ درجه مرد.

S. feltiae که که قبلا به خاک اعمال شده بود، موجب الوده شدن B. oleae زیتون ها در حاک شد. یافته های ما نشان می دهد که S. feltiae در برابر B. oleae افتاده در حاک بعد از استعمال EPN موثر بود و زمانیکه شرایط بهینه وجود داشته باشد،B. oleae قادر به بقا خواهد بود. این موجب افزایش انعطاف پذیری در زمان بندی استعمالS. Feltiae و تعداد استعمال ها شده و از این روی فرصت را برای طرح های مدیریتی B. oleae فراهم کرد. پیشنهاد زمان بهینه بین استعمال EPN و لاروB. Oleae افتاده در خاک نیاز به مطالعه بیشتر دارد.

References

Abbott, W.S., 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology 18, 265–267.

Belton, P., Trotter, T.A., Webster, J.M., 1987. *Heterorhabditis heliothidis*: a potential biological control agent of house flies in caged-layer poultry barns. Journal of Nematology 19, 263–266.

Boemare, N., 2002. Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: Gaugler, R. (Ed.), Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing, Wallingford, pp. 35–56.

Brown, I.M., Lovett, B.J., Grewal, P.S., Gaugler, R., 2002. Latent infection: a low temperature survival in steinernematid nematodes. Journal of Thermal Biology 27, 531–539.

Byers, J.A., Poinar Jr., G.O., 1982. Location of insect host by nematode, *Neoaplectana carpocapsae*, in response to temperature. Behaviour 79, 1–10.

Campbell, J.F., Lewis, E.E., 2002. Entomopathogenic nematode host-search strategies. In: Lewis, E.E., Campbell, J.F., Sukhdeo, M.V.K. (Eds.), The Behavioral Ecology of Parasites. CABI Publication, Wallingford, pp. 13–38.

Chen, S., Li, J., Han, X., Moens, M., 2003. Effect of temperature on the pathogenicity of entomopathogenic nematodes (*Steinernema* and *Heterorhabditis* spp.) to *Delia radicum*. BioControl 48, 713–724.

Dimou, I., Koutsikopoulos, C., Economopoulos, A.P., Lykakis, J., 2003. Depth of pupation of the wild olive fruit fly, *Bactrocera (Dacus) oleae* (Gmel.) (Dipt., Tephritidae), as affected by soil abiotic factors. Journal of Applied Entomology 127, 12–17.

Fallon, D.J., Solter, L.F., Keena, M., McManus, M., Cate, J.R., Hanks, L.M., 2004. Susceptibility of Asian longhorn beetle, *Anoplophora glabripennis* (Motchulsky) (Coleoptera: Cerambycidae) to entomopathogenic nematodes. Biological Control 30, 430–438.

Forst, S., Clarke, D., 2002. Bacteria-nematode symbiosis. In: Gaugler, R. (Ed.), Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing, Wallingford, pp. 54–77.

Gazit, Y., Rossler, Y., Glazer, I., 2000. Evaluation of entomopathogenic nematodes for the control of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). Biocontrol Science and Technology 10, 157–164.

Georgis, R., Köppenhofer, A.M., Lacey, L.A., Bélair, G., Duncan, L.W., Grewal, P.S., Samish, M., Tan, L., Torr, P., van Tol, R.W.H.M., 2005. Success and failures in the use of parasitic nematodes for pest control. Biological Control 38, 103–123.

Grewal, P.S., Koppenhöfer, A.M., Choo, H.Y., 2005. Lawn, turfgrass and pasture applications. In: Grewal, P.S., Ehler, R.-U., Shapiro-Ilan, D.I. (Eds.), Nematodes As Biocontrol Agents. CABI Publishing, Wallingford, pp. 115–146.

Grewal, P.S., Selvan, S., Gaugler, R., 1994. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: niche breath for infection, establishment and reproduction. Journal of Thermal Biology 19, 245–253.

Griffin, C.T., 1993. Temperature responses of entomopathogenic nematodes: implication for the success of biological control programmes. In: Bedding, R.,

Akhurst, Kaya, H. (Eds.), Nematodes and the Biological Control of Insect Pests. CSIRO Publishing, East Melbourne, pp. 115–126.
Griffin, C.T., Boemare, N.E., Lewis, E.E., 2005. Biology and behavior. In: Grewal, P.S., Ehler, R.-U., Shapiro-Ilan, D.I. (Eds.), Nematodes As Biocontrol Agents. CABI Publishing, Wallingford, pp. 47–64.
Hazir, S., Stock, S.P., Kaya, H.K., Koppenhöfer, A.M., Keskin, N., 2001. Developmental temperature effects on five geographic isolates of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae). Journal of Invertebrate Pathology 77, 243–250.
Ishibashi, N., Kondo, E., 1990. Behavior of infective juveniles. In: Gaugler, R., Kaya, H.K. (Eds.), Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Boca Raton, pp. 139–150.
Jagadale, G.B., Casey, M.L., Grewal, P.S., Lindquist, R.K., 2004. Effects of application rate and timing, potting medium and host plant on efficacy of *Steinernema feltiae* against fungus gnat, *Bradysia coprophila*, in floriculture. Biological Control 29, 296–305.
Jess, S., Schweizer, H., Kilpatrick, M., 2005. Mushroom applications. In: Grewal, P.S., Ehler, R.-U., Shapiro-Ilan, D.I. (Eds.), Nematodes As Biocontrol Agents. CABI Publishing, Wallingford, pp. 191–213.
Johnson, M.W., Zalom, F.G., Van Steenwyk, R., Vossen, P., Devarenne, A.K., Daane, K.M., Krueger, W.H., Connell, J.H., Yokoyama, V., Bisabri, B., Caprile, J., Nelson, J., 2006. Olive fruit fly management guidelines for management guidelines for 2006. UC Plant Protection Quarterly 16 (3), 1–7.
Kapatos, E.T., Fletcher, B.S., 1983. An assessment of components of crop loss due to infestation by *Dacus oleae*, in Corfu. Entomologia Hellenica 1, 7–16.
Kapatos, E.T., Fletcher, B.S., 1984. The phenology of the olive fly, *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera, Tephritidae), in Corfu. Zeitschrift fur Angewandte Entomologie 97, 360–370.
Kaya, H.K., 1977. Development of the DD-136 strain of *Neoaplectana carpocapsae* at constant temperature. Journal of Nematology 9, 346–349.
Kaya, H.K., Stock, S.P., 1997. Techniques in insect nematology. In: Lacey, L.A. (Ed.), Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press, London, pp. 281–324.
Kung, S.P., Gaugler, R., Kaya, H.K., 1991. Effects of soil temperature, moisture, and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence. Journal of Invertebrate Pathology 57, 242–249.
LeBeck, L.M., Gaugler, R., Kaya, H.K., Hara, A.H., Johnson, M.W., 1993. Host stage suitability of the leafminer *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) to the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). Journal of Invertebrate Pathology 62, 58–63.
Lewis, E.E., Campbell, J., Griffin, C., Kaya, H., Peters, A., 2006. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. Biological Control 38, 66–79.
Lewis, E.E., Gaugler, R., Harrison, R., 1993. Response of cruiser and ambusher entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) to host volatile cues. Canadian Journal of Zoology 71, 765–769.
Lindegren, J.E., Vail, P.V., 1986. Susceptibility of Mediterranean fruit fly, melon fly, and oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) to the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* in laboratory tests. Environmental Entomology 15, 465–468.
Lindegren, J.E., Wong, T.T., McInnis, D.O., 1990. Response of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) to the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* in field tests in Hawaii. Environmental Entomology 19, 383–386.
Michelakis, S.E., Neuenschwander, P., 1983. Estimates of the crop losses caused by *Dacus Oleae* (Gmel.)(Diptera: Tephritidae) in Crete, Greece. In: Cavalloro, R. (Ed.), Fruit Flies of Economic Importance. A. A. Balkema, Rotterdam, pp. 603–611.
Molyneux, A.S., 1986. *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* (=*Neoaplectana*) spp.: temperature and aspects of behavior and infectivity. Experimental Parasitology 62, 169–180.
Patterson Stark, J.E., Lacey, L.A., 1999. Susceptibility of western cherry fruit fly (Diptera: Tephritidae) to five species of entomopathogenic nematodes in laboratory studies. Journal of Invertebrate Pathology 74, 206–208.
Poinar Jr., G.O., 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: Gaugler, R., Kaya, H.K. (Eds.), Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Boca Raton, pp. 23–61.
Rice, R.E., 2000. Bionomics of the olive fruit fly, *Bactrocera (Dacus) oleae*. UC Plant Protection Quarterly 10 (3), 1–5.
Rice, R.E., Phillips, P.A., Stewart-Leslie, J., Sibbet, G.S., 2003. Olive fruit fly populations measured in central and southern California. California Agriculture 57 (4), 122–127.
SAS Institute. 2002-2003. SAS 9.1 for Windows, SAS Institute, Cary, NC.
Saunders, J.E., Webster, J.M., 1999. Temperature effects on *Heterorhabditis megidis* and *Steinernema carpocapsae* infectivity to *Galleria mellonella*. Journal of Nematology 31, 299–304.
Shapiro-Ilan, D.I., Fuxa, J.R., Lacey, L.A., Onstad, D.W., Kaya, H.K., 2005. Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. Journal of Invertebrate Pathology 88, 1–7.
Siegel, J., Lacey, L.A., Fritts, R., Higbee, B.S., Noble, P., 2004. Use of steinernematid nematodes for post harvest control of navel orangeworm (Lepidoptera: Pyralidae, *Amyelois transitella*) in fallen pistachios. Biological Control 30, 410–417.
Wright, P.J., 1992. Cool temperature reproduction of steinernematid and heterorhabditid nematodes. Journal of Invertebrate Pathology 60, 148–151.
Yee, W.L., Lacey, L.A., 2003. Stage-specific mortality of *Rhagoletis indifferens* (Diptera: Tephritidae) exposed to three species of *Steinernema* nematodes. Biological Control 27, 349–356.