

**Α.Τ.Ε.Ι ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**“ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ  
ΤΟΥ *Tetranychus urticae* (Acari : Tetranychidae)  
ΣΕ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ ΚΑΙ ΑΚΑΡΕΟΚΤΟΝΑ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ”**

ΕΙΣΗΓΗΤΡΙΑ :

Δρ. ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΤΣΑΓΚΑΡΑΚΟΥ

ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΑ :

ΕΙΡΗΝΗ ΔΕΤΣΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2011

**ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ :**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την καθηγήτρια Δρ. Αναστασία Τσαγκαράκου για την ανάθεση της μελέτης, την επιστημονική καθοδήγησή της και τις πολύτιμες συμβουλές που δέχθηκα καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της μελέτης αυτής.

Ευχαριστώ θερμά τους συμφοιτητές μου που βρίσκονταν στο εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Ινστιτούτου Προστασίας Φυτών Ηρακλείου (ΕΘ. Ι. ΑΓ. Ε) για την πολύτιμη βοήθειά τους κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την συμπαράσταση και την υπομονή που έδειξαν κατά την διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας.

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ :**

Μελετήθηκε η ύπαρξη ανθεκτικότητας σε πληθυσμούς του *Tetranychus urticae* Koch που συλλέχθηκαν από διαφορετικές περιοχές της Κρήτης από υπαίθριες και θερμοκηπιακές καλλιέργειες στις δραστικές ουσίες bifenthrin, abamectin, fenbutatin oxide και spiroadiclofen.

Με τη μέθοδο των βιοδοκιμών προέκυψε ότι οι πληθυσμοί που μελετήθηκαν δεν παρουσίασαν ανθεκτικότητα στις δραστικές ουσίες abamectin και spiroadiclofen αφού τα όρια εμπιστοσύνης του RR (Resistance Ratio) περιελάμβαναν την μονάδα, ενώ κάποιοι από αυτούς εμφάνισαν ανθεκτικότητα στα σκευάσματα bifenthrin και fenbutatin oxide με RR που κυμαινόταν από 3.44 – 236.42 και 2.58 – 8.82 αντίστοιχα.

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ:	5
1.1	ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ	6
1.2	ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ	9
1.2.1	Βιολογική Καταπολέμηση	9
1.2.2	Χημική καταπολέμηση	10
1.3	ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ	15
1.3.1	Τρόποι αντιμετώπισης της ανθεκτικότητας	20
1.3.2	Υπολογισμός των επιπέδων ανθεκτικότητας	22
1.3.3	Ανθεκτικότητα του <i>T.urticae</i>	22
2.	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	25
3.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ:	26
3.1	ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ:	26
3.2	ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ:	27
3.3	ΒΙΟΔΟΚΙΜΕΣ	29
3.3.1	Ακαρεοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν και προετοιμασία διαλυμάτων	29
3.3.2	Επεμβάσεις:	33
3.3.3	Ανάλυση δεδομένων:	34
3.3.4	Πειραματικές εγκαταστάσεις	36
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:	36
4.1	ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟ ABAMECTIN:	38
4.2	ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟ BIFENTHRIN:	39
4.3	ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟ FENBUTATIN OXIDE:	40
4.4	ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟ SPIRODICLOFEN:	41
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ:	43
6.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ:	1

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ :

Τα φυτοφάγα ακάρεα είναι από τους σοβαρότερους ζωικούς εχθρούς των υπαίθριων και θερμοκηπιακών καλλιεργειών παγκοσμίως. Ένα πολύ γνωστό άκαρι είναι το *Tetranychus urticae* Koch, συναντάται σε 1094 είδη ξενιστών τα οποία ανήκουν σε 134 διαφορετικές οικογένειες. Είναι κοσμοπολίτικο άκαρι και απαντάται σε 109 διαφορετικές χώρες παγκοσμίως (<http://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/spmweb/>). Στην χώρα μας είναι από τους σοβαρότερους εχθρούς των θερμοκηπίων (αγγούρι, τομάτα, πιπεριά, μελιτζάνα, καρπούζι, καλλωπιστικά). Προσβάλλει επίσης φυτά μεγάλων καλλιεργειών (βαμβάκι, καπνό), χορτοδοτικά φυτά (μηδική) και δενδρώδεις καλλιέργειες.

Το άκαρι στο παρελθόν αναφερόταν με 48 διαφορετικές επιστημονικές ονομασίες, σήμερα όμως έχει διαπιστωθεί ότι όλα πρόκειται για το ίδιο είδος με το όνομα *Tetranychus urticae* Koch (<http://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/spmweb/>). Πρώτη αναφορά του *T. urticae* στην Ελλάδα έγινε το 1962 από τον Πελεκάση.

Στην διεθνή βιβλιογραφία απαντάται με διαφορετικές κοινές ονομασίες με επικρατέστερη αυτή ως δύστηκτο άκαρι (two spotted spider mite).

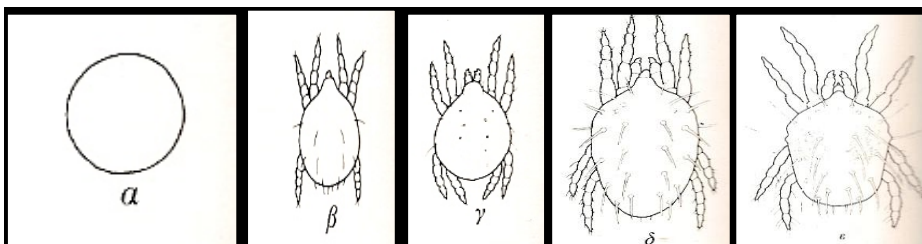
## 1.1 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Το *T. urticae* Koch ανήκει στο φύλο Arthropoda, στην κλάση Arachnida, στην τάξη Acari και στην οικογένεια Tetranychidae (Παπαϊωάννου – Σουλιώτη, 1994).

Ο βιολογικός κύκλος του *T. urticae* περιλαμβάνει 5 στάδια: ωό, προνύμφη, πρωτονύμφη, δευτερονύμφη και ακμαίο μεταξύ των οποίων παρεμβάλλονται τα αντίστοιχα στάδια των χρυσαλλίδων κατά τα οποία το *T. urticae* δεν κινείται και δεν τρέφεται (Εικόνα 1).

Αρχικά το θηλυκό γεννά ωά από τα οποία εκκολάπτονται οι προνύμφες (larva) ή (larvae) μετά από έκδυση το επόμενο στάδιο είναι οι πρωτονύμφες, με δεύτερη έκδυση εμφανίζονται οι δευτερονύμφες και μετά από τρίτη έκδυση εμφανίζονται τα ακμαία θηλυκά και αρσενικά άτομα (Παπαϊωάννου-Σουλιώτη, 1998). Το ωό είναι σφαιρικό, λείο, χωρίς μίσχο, με χρώμα υποκίτρινο έως υπέρυθρο και διάμετρο περίπου 0,14 mm. Η προνύμφη έχει τρία ζεύγη ποδιών, η πρωτονύμφη και όλα τα μετέπειτα στάδια έχουν τέσσερα ζεύγη ποδιών. Το ακμαίο αρσενικό είναι οξύληκτο σχήματος διαμαντιού, μήκους 460mm και είναι ελαφρώς μικρότερο του θηλυκού το οποίο είναι ωοειδές και έχει μήκος 540mm (Εικόνα 2).

Συνήθως ο χρωματισμός των ακμαίων εξαρτάται από την καλλιέργεια στην οποία απαντώνται. Το χρώμα των μη διαπαυόντων θηλυκών είναι πράσινο ή πρασινοκίτρινο με ένα ή περισσότερα ζεύγη σκοτεινόχρωμων κηλίδων στη ραχιαία πλευρά του σώματος. Τα διαχειμάζοντα θηλυκά έχουν πορτοκαλί χρώμα (Κωβαίος, 1999). Τόσο το θηλυκό όσο και το αρσενικό άτομο έχουν δύο μεγάλες μαύρες κηλίδες σε κάθε πλευρά του σώματός τους οι οποίες ποικίλουν σε σχήμα και μέγεθος εξ' ου και η κοινή ονομασία κηλιδωτός ή δύστηκτος τετράνυχος (two spotted-spider mite) (Εικόνα 2).



**Εικόνα 1 : Τα 5 στάδια του βιολογικού κύκλου του *T. urticae***

α : ωό, β : προνύμφη, γ : πρωτονύμφη, δ : δευτερονύμφη, ε : ακμαίο θηλυκό (Malais M., Ravensberg W.J, 1995)

Το *T.urticae* διαχειμάζει σε διάπαυση στο στάδιο του ενήλικου σε προφυλαγμένες θέσεις όπως στο έδαφος κάτω από φύλλα, ξύλα, πέτρες, και σπανιότερα σε ρωγμές του φλοιού των δέντρων.

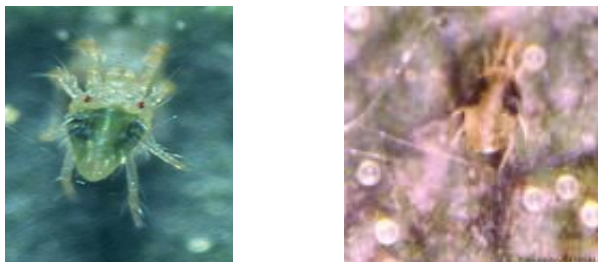
Οι τετράνυχοι συνήθως ζουν στην κάτω επιφάνεια των φύλλων, ενώ σε έντονη προσβολή και στην επάνω επιφάνεια, υφαίνουν ιστό, μέτρο προστασίας για όλα τα στάδια από τον άνεμο, τη βροχή, τα αρπακτικά (Bonnetmaison, 1964). Σε περιπτώσεις έντονης προσβολής, όλο το έλασμα του φύλλου καλύπτεται από χλωρωτικές κηλίδες που προκαλούνται εξ' αιτίας της διατροφής του ακάρεος.

Σε δενδρώδεις καλλιέργειες στην αρχή της προσβολής, η κατανομή του πληθυσμού των ακάρεων δεν είναι ίδια σε όλη την κόμη του φυτού. Είναι μεγαλύτερη, στα εσωτερικά τμήματα και μικρότερη στην περιφέρεια της κόμης του φυτού. Αργότερα με την αύξηση του πληθυσμού η κατανομή είναι ομοιόμορφη.

Τα ακάρεια γενικά για την επιβίωση, τη δραστηριότητα και την προσβολή των φυτών χρειάζονται μία θερμοκρασία περιβάλλοντος από 10 μέχρι 35°C και σχετική υγρασία μεταξύ 30 και 70%. Ο βιολογικός κύκλος διαρκεί από 7 - 50 ημέρες ανάλογα με την θερμοκρασία, η οποία είναι ο σημαντικότερος παράγοντας, την σχετική υγρασία, το είδος της καλλιέργειας και την ηλικία των φυτών. Επιταχύνεται με τις υψηλές θερμοκρασίες και την χαμηλή σχετική υγρασία, για παράδειγμα στους 25°C και 50% Σ.Υ. η διάρκεια συμπλήρωσης του βιολογικού κύκλου είναι 10 ημέρες. Τα αρσενικά άτομα έχουν μικρότερη διάρκεια ζωής.

Σε θερμοκρασία 30 - 32 °C η περίοδος εκκόλαψης των ωών διαρκεί από 3-4 μέρες. Τα αναπτυξιακά στάδια κυμαίνονται από 4 - 5 ημέρες, ενώ η ωοτοκία του θηλυκού διαρκεί από 7,5 - 14 ημέρες (Παπαϊωάννου - Σουλιώτη, 1998). Ένα ακμαίο θηλυκό γεννά 60 - 150 ωά αριθμός που μπορεί να ξεπεράσει και τα 300 (Wtensch, 1985).

Το *T.urticae* αναπαράγεται με αρρενοτόκο παρθενογένεση: τα γονιμοποιημένα ωά παράγουν θηλυκά άτομα που είναι διπλοειδή ενώ τα αρσενικά προέρχονται από μη γονιμοποιημένα άτομα και είναι απλοειδή.



Εικόνα 2 : Αρσενικό (αριστερά) και θηλυκό (δεξιά) άτομο του *T.urticae*

Το *T. urticae* ζει σε αποικίες συγγενών συνήθως ατόμων. Όταν οι πληθυσμοί φτάσουν σε μεγάλα επίπεδα και η ποιότητα της τροφής αρχίσει να φθίνει, οι τετράνυχοι αναζητούν νέα φυτά. Σε μικρές αποστάσεις τα άτομα του *T. urticae* μετακινούνται βαδίζοντας ενώ σε μεγαλύτερες αποστάσεις αφήνονται να παρασυρθούν από τα ρεύματα του αέρα. Μία αποικία μπορεί να ξεκινήσει και από ένα και μόνο θηλυκό. Ένας τελευταίος τρόπος διασποράς είναι η παθητική διασπορά μέσω των γεωργικών μηχανημάτων, των ρούχων των καλλιεργητών ή και από χώρα σε χώρα μέσω του εμπορίου προσβεβλημένων προϊόντων.

Κύρια τροφή των τετράνυχων αποτελούν οι χυμοί των φυτών. Εκκρίνοντας κάποια ένζυμα που βρίσκονται σε ειδικούς αδένες στο γναθόσωμα επιφέρουν τοπικά στο φυτό βιοχημικές και ορμονικές διαταραχές. Διατρυπούν την επιδερμίδα του φυτού με την βοήθεια στιλέτου και απομυζούν το υγρό των φυλλικών κυττάρων επηρεάζοντας την φωτοσύνθεση και την διαπνοή του φυτού.

Οι ζημιές που προκαλούν όλα τα ακάρεα στα καλλιεργούμενα φυτά όπως και το *T.urticae* είναι σημαντικές. Οι μεγάλοι πληθυσμοί τους, κυρίως κατά τους ξηρούς και θερμούς μήνες, μπορούν μέσα σε μικρό χρονικό διάστημα να προκαλέσουν φυλλόπτωση, ανθόρροια, αλλοίωση του σχήματος των φύλλων, πρόωρη ωρίμανση καρπών και τέλος καθολική ξήρανση των φυτών, επιφέροντας ποιοτική και ποσοτική ζημιά στη γεωργία.





Εικόνα 3 : Έντονη προσβολή φυτικού ιστού από *T. urticae*.

## 1.2 ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ

### 1.2.1 Βιολογική Καταπολέμηση

Υπάρχουν πολλά είδη εντόμων και ακάρεων που είναι φυσικοί εχθροί του *T. urticae*. Πιο αποτελεσματικά είναι είδη αρπακτικών ακάρεων που ανήκουν στην οικογένεια Phytoseiidae τα οποία χρησιμοποιούνται σήμερα σε προγράμματα βιολογικού ελέγχου ακάρεων και εντόμων σε έναν αριθμό από αγροτικά οικοσυστήματα, ενώ άλλα αποτελούν σημαντικούς παράγοντες σε συστήματα ολοκληρωμένης αντιμετώπισης εχθρών των καλλιεργειών (Παπαδούλης, 2009). Τα αρπακτικά αυτά τα συναντάμε σε καλλιεργούμενα αυτοφυή φυτά και στο έδαφος και μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο των πληθυσμών. Τα γένη που θεωρούνται πιο σημαντικά για την αντιμετώπιση των τετρανύχων είναι το γένος: *Phytoseiulus* Evans με 4 είδη, *Phytoseius* Ribaga με 125 είδη, το *Typhlodromus* Scheuten με 275 είδη και το *Amblyseius* Berlese με 800 είδη. Από όλα τα παραπάνω είδη περίπου τα 40 παρουσιάζουν πρακτικό ενδιαφέρον σε συστήματα φυσικής και κατευθυνόμενης βιολογικής καταπολέμησης των τετρανύχων των διαφόρων καλλιεργειών και κάποια από αυτά διατίθενται σε εμπορικά σκευάσματα (Παπαιωάννου - Σουλιώτη, 1998)

Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο άκαρι για την καταπολέμηση του κοινού τετρανύχου είναι το *Phytoseiulus persimilis* το οποίο κυκλοφορεί και σε εμπορικό σκευάσμα με την ονομασία SPIDEX. Τα τέλεια αρπακτικά ακάρεια και οι νύμφες

ψάχνουν δραστήρια την τροφή τους απομυζώντας το περιεχόμενο της. Στο εμπόριο κυκλοφορεί επίσης το βιολογικό σκεύασμα SPICAL το οποίο περιέχει το άκαρι *Neoseiulus californicus*. Τα τέλεια αρπακτικά ακάρεα, οι νύμφες αλλά και οι προνύμφες, απαντώνται κυρίως στην κάτω επιφάνεια των φύλλων. Ψάχνουν δραστήρια την τροφή τους ή την περιμένουν. Κυκλοφορεί επίσης και το σκεύασμα MIRICAL που περιέχει το αρπακτικό έντομο *Macrolophus caliginosus* και το SPIDEND το οποίο περιέχει νύμφες του *Feltiella acarisuga* (κηκιδόμυγα) (<http://www.koppert.com/>).



Εικόνα 4 : Αρπακτικό άκαρι του *T. urticae*.



Εικόνα 5 : Σκεύασμα με αρπακτικά του *T. urticae*

### 1.2.2 Χημική καταπολέμηση

Παρ' όλα αυτά ο κύριος τρόπος αντιμετώπισης του *T. urticae* παραμένει η χημική καταπολέμηση. Το κύριο πλεονέκτημα της καταπολέμησης των εντόμων με εντομοκτόνα είναι ότι γενικά αποτελεί την πιο αποτελεσματική και διαδεδομένη μέθοδο. Χωρίς τη χρησιμοποίηση εντομοκτόνων ουσιών, οι ζημιές στην υγεία, την οικονομία του ανθρώπου και οι στερήσεις του θα ήταν τεράστιες. Ο ρόλος των εντομοκτόνων στην πρόληψη ασθενειών του ανθρώπου όπως η ελονοσία, ο κίτρινος πυρετός, ο επιδημικός τύφος, η βουβωνική πανούκλα, η χολέρα και άλλες, με την καταπολέμηση των εντόμων - φορέων των ασθενειών αυτών, ήταν και είναι ανεκτίμητης αξίας.

Άλλο πλεονέκτημα της καταπολέμησης με εντομοκτόνα είναι ότι το αποτέλεσμα επιτυγχάνεται σε μικρό χρονικό διάστημα από την εφαρμογή του εντομοκτόνου, συνήθως μέσα σε λίγες ώρες και σε μερικές περιπτώσεις μέσα σε λίγα λεπτά.

Τα μειονεκτήματα της καταπολέμησης με εντομοκτόνα είναι πολλά και σοβαρά. Για το λόγο αυτό η χρήση τους πρέπει να γίνεται με σύνεση, ώστε να περιορίζονται στο ελάχιστο δυνατόν οι αρνητικές επιπτώσεις. Μερικά από αυτά είναι: ο κίνδυνος για τα

καλλιεργούμενα ή άλλα φυτά, ο κίνδυνος για ωφέλιμα έντομα και άλλα αρθρόποδα (μέλισσες, ωφέλιμα εντομοφάγα έντομα κ.ά.), η δημιουργία φυλών βλαβερών εντόμων ανθεκτικών στα εντομοκτόνα, η αλλοίωση της οσμής ή γεύσης ορισμένων γεωργικών προϊόντων, η ρύπανση του περιβάλλοντος εν γένει και ο κίνδυνος για τον άνθρωπο από το χειρισμό των τοξικών αυτών ουσιών και από την κατανάλωση προϊόντων με ανεπίτρεπτα υπολείμμά τους. Η σωστή χρήση των εντομοκτόνων απαιτεί ευσυνειδησία, πείρα και προσοχή, ιδιαίτερα δε όταν το εντομοκτόνο είναι επικίνδυνο για τον άνθρωπο (Τζανακάκης, 1995).

Για την αντιμετώπιση των τετρανύχων χρησιμοποιούνται πολλές κατηγορίες εντομοκτόνων, τα οποία έχουν ακαρεοκτόνο δράση (οργανοφωσφορικά, καρβαμιδικά, οργανοχλωριωμένα, πυρεθρίνες, αβερμεκτίνες, και ρυθμιστές ανάπτυξης).

Τα **οργανοφωσφορικά** (organophosphates) εντομοκτόνα είναι η πλέον πολυπληθής ομάδα συνθετικών οργανικών εντομοκτόνων με ευρύ φάσμα δράσης κατά πολλών εντόμων και ακάρεων. Η ευρεία εφαρμογή των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων, οφείλεται κυρίως στις φυσικοχημικές και βιολογικές τους ιδιότητες. Σε γενικές γραμμές χαρακτηρίζονται από υψηλή εντομοκτόνο και ακαρεοκτόνο δράση, έχουν ευρύ φάσμα δράσης, μικρή υπολειμματική διάρκεια και σχετικά γρήγορη αποδόμηση σε μεταβολικά προϊόντα μη τοξικά για τον άνθρωπο και τα ζώα. Πολλά από αυτά επιδεικνύουν διασυστηματικές ιδιότητες ή τοπική διεισδυτική δράση εισερχόμενα και διακινούμενα εντός των ιστών των φυτών.

Τα **καρβαμιδικά** (carbamates) εντομοκτόνα είναι παράγωγα φυσοστιγμίνης ή εσερίνης, ενός αλκαλοειδούς με ισχυρή αντιχολινεστερασική δράση, που βρίσκεται στους καρπούς του φυτού *Physostigma venenosum*, γνωστό και ως κύαμο του Calabar. Οι καρβαμιδικές ενώσεις είναι νεότερης γενιάς εντομοκτόνα από τα οργανοχλωριωμένα και τα οργανοφωσφορικά. Πρόκειται για παράγωγα του καρβαμιδικού οξέος ( $\text{NH}_2\text{COOH}$ ) (Ζιώγας και Μάρκογλου, 2007).

Τα **οργανοχλωριωμένα** (organochlorines) εντομοκτόνα είναι από τις παλαιότερες συνθετικές ενώσεις. Πρόκειται για παράγωγα οργανοχλωριωμένων υδρογονανθράκων, μεγάλης εντομολογικής δράσης και διάρκειας που προσλαμβάνονται ταχύτατα από την επιδερμίδα των εντόμων λόγω της μεγάλης λιποδιαλυτότητάς τους.

Τα **πυρεθρινοειδή** (pyrethroids) ή συνθετικές πυρεθρίνες αποτελούν την τέταρτη γενιά συνθετικών οργανικών ενώσεων. Πρόκειται για ενώσεις παράγωγα της φυσικής πυρεθρίνης που παραλαμβάνεται από τις ταξιανθίες του φυτού *Tenacetum* (*Chrysanthemum, Pyrethrum*) *cinerariaefolium*, γνωστό ως πύρεθρο. Τα πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα και ακαρεοκτόνα ιδιαίτερα εκείνα που εμφανίστηκαν από τα μέσα της δεκαετίας του '70, χαρακτηρίζονται από τις καλές ιδιότητες των φυσικών πυρεθρινών και επιπλέον παρουσιάζουν μεγαλύτερη φωτοσταθερότητα, ιδιότητα που της προσδίδει ικανή υπολειμματική διάρκεια. Έχουν μεγαλύτερη υπολειμματική δράση που τους επιτρέπει τη μείωση των δόσεων και του αριθμού των επεμβάσεων. Στον άνθρωπο διασπώνται πολύ σύντομα προς μη τοξικά παράγωγα και έτσι είναι πρακτικά ακίνδυνα. Είναι εντομοκτόνα και ακαρεοκτόνα επαφής και στομάχου, ενώ μερικά από αυτά δρουν και ως ασφυκτικά. Χαρακτηρίζονται από ευρύ φάσμα δράσης εναντίον πολλών ειδών εντόμων και ακαρέων. Από άποψη χημικής δομής πρόκειται για εστέρες του χρυσανθεμικού οξέος, κύριου συστατικού των φυσικών πυρεθρινών I και II, ή παραγώγων τους με διάφορες άλλες αλκοόλες. Σχεδόν στο σύνολό τους περιέχουν ένα έως τρία ασύμμετρα άτομα άνθρακα και επομένως προκύπτουν 2 - 8 ισομερή, η εντομοκτόνος δράση των οποίων διαφέρει ανάλογα με το ισομερές. Η εντομοτοξική δράση των συνθετικών πυρεθρινών είναι ακαριαία. Η δράση τους εντοπίζεται στο νευρικό σύστημα των εντόμων, αλλά ο μηχανισμός παρέμβασης είναι διαφορετικός δεν δεσμεύουν την ακετυλοχολινεστεράση. Ο βιοχημικός μηχανισμός δράσης τους λειτουργεί ως εξής: παρεμποδίζουν την μετάδοση των νευρικών σημάτων προσυναπτικά. Συγκεκριμένα, προσκολλώνται στις πρωτεϊνικές υπομονάδες των διαύλων ιόντων ( $\text{Na}^+$ ), στις μεμβράνες των τελικών κλωνίων του νευράξονα και προκαλούν παρατεταμένο άνοιγμα των διαύλων που έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια ιόντων και τη διατάραξη της ευαίσθητης ισορροπίας μεταξύ ιόντων  $\text{Na}^+$  και  $\text{K}^+$  στο περιβάλλον των νευρικών κυττάρων (Ζιώγας και Μάρκογλου, 2007).

Οι **αβερμεκτίνες** (avermectins) ή αμπαμεκτίνες (abamectins) είναι μεγάλου μοριακού βάρους δευτερογενείς μεταβολίτες του ακτινομύκητα *Streptomyces avermitilis*, με κύριο εκπρόσωπο την avermectin B<sub>1</sub> ή abamectin (ουσία που χρησιμοποιήθηκε και στις βιοδοκιμές που έγιναν στο εργαστήριο όπως θα αναφερθεί παρακάτω). Η avermectin (Agrimec, Dynamec, Romectin, Sunmectin κ.α.) είναι μίγμα

των B<sub>1a</sub> και B<sub>1b</sub> που εισήχθηκε στη γεωργική πράξη το 1985. Πρόκειται για ακαρεοκτόνο και εντομοκτόνο επαφής και στομάχου, με ικανή διελασματική δράση. Η avermectin B<sub>1a</sub> είναι πολύ αποτελεσματική εναντίον των κινητών σταδίων των ακαρέων. Ο βιοχημικός μηχανισμός δράσης των αβερμεκτινών οφείλεται στην παρεμβολή τους στη λειτουργία των διαύλων των ιόντων χλωρίου (Cl<sup>-</sup>) της μετασυναπτικής μεμβράνης που ελέγχονται από τον νευρο – διαβιβαστή GABA. Προκαλούν παρατεταμένο άνοιγμα των διαύλων Cl<sup>-</sup>, αυξάνοντας την πρόσδεση του νευροδιαβιβαστή GABA στον υποδοχέα του.

Οι **ρυθμιστές ανάπτυξης** (Insect Growth Regulators IGRs) αντιπροσωπεύουν μια νέα γενιά εντομοκτόνων ουσιών που παρεμποδίζουν τη φυσιολογική ανάπτυξη και εξέλιξη των εντόμων. Πρόκειται για εντομοκτόνα που δεν είναι τοξικά στον άνθρωπο και τα θηλαστικά, δεν βλάπτουν τα ωφέλιμα παράσιτα και αρπακτικά, είναι φιλικά προς το περιβάλλον και μπορούν να ενταχθούν σε πρόγραμμα ολοκληρωμένης καταπολέμησης. Οι IGRs δρουν σε συγκεκριμένο στάδιο του βιολογικού κύκλου των εντόμων και κατά συνέπεια, ο χρόνος εφαρμογής των ενώσεων αυτών παίζει καθοριστικό ρόλο στην αποτελεσματικότητά τους, γι' αυτό και είναι απαραίτητη η παρακολούθηση των πληθυσμών των εντόμων και η επέμβαση στην κατάλληλη χρονική στιγμή. Με βάση τον βιοχημικό μηχανισμό δράσης ή τις μεταβολικές διεργασίες που επηρεάζουν οι ενώσεις αυτές μπορούν να διακριθούν σε δύο κύριες κατηγορίες: α) τους παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης της χυτίνης και β) τις ενώσεις που επηρεάζουν τη λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος των εντόμων (Ζιώγας και Μάρκογλου, 2007).

Υπάρχουν δραστικές ουσίες οι οποίες έχουν μόνο ακαρεοκτόνο δράση και χρησιμοποιούνται για την προστασία των καλλιεργειών από το φυτοφάγο άκαρι *T.urticae*. Οι ουσίες αυτές ανήκουν σε διάφορες κατηγορίες εντομοκτόνων όπως: οργανοχλωριωμένα, φορμαμιδίνες, οργανοκασσιτερούχα, οργανοθειούχα, παράγωγα φαινόλης, τετραζίνες κ.α. των οποίων η δράση είναι άλλοτε εξακριβωμένη και άλλοτε όχι πλήρως (οκταπαμινικοί υποδοχείς, οξειδωτική φωσφορυλίωση, παρεμποδιστές ανάπτυξης), όπως και τα νεότερα METI ακαρεοκτόνα τα οποία ανήκουν στις χημικές ενώσεις των πυραζολίων, πυρινταζινονίων και κουιναζολινών και δρουν ως παρεμποδιστές μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια. (Βόντας *et al*, 2007).

Τα **οργανοκασσιτερούχα** έχουν εξειδικευμένη δράση στη λειτουργία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και συγκεκριμένα του ενζύμου συνθετάση του ATP (ATPase) που καταλύει τη βιοσύνθεση ATP από ADP. Γνωστοί παρεμποδιστές της συνθετάσης του ATP είναι τα ακαρεοκτόνα azocyclotin, cyhexatin και fenbutatin oxide (το οποίο χρησιμοποιήθηκε και στις βιοδοκιμές). Αυτά τα ακαρεοκτόνα είναι μη διασυστηματικά ακαρεοκτόνα επαφής και δευτερευόντως στομάχου, που εμφανίστηκαν στη γεωργική πράξη στις αρχές της δεκαετίας του '70. Πρόκειται για ενώσεις αποτελεσματικές εναντίον όλων των κινητών μορφών ακάρεων σε πολλές καλλιέργειες.

Χρησιμοποιούνται επίσης κάποιες νέες ενώσεις που παρεμποδίζουν τη βιοσύνθεση των λιπιδίων: (κετοενόλες) της ομάδας του τετρονικού οξέος (tetronic acid), το spirodiclofen, το spiromesifen και το spirotetramat που ανακαλύφθηκαν στη δεκαετία του '90 στα εργαστήρια της εταιρείας Bayer CropScience. Το spirodiclofen (χρησιμοποιήθηκε επίσης στις βιοδοκιμές), είναι ακαρεοκτόνο ευρέου φάσματος δράσης. Μελέτες για τη διερεύνηση του βιοχημικού μηχανισμού δράσης των ενώσεων αυτών έδειξαν σημαντική μείωση στα λιπίδια των θηλυκών ενήλικων του *Tetranychus urticae*, όμως ο ακριβής μηχανισμός δράσης τους δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί. Παρατηρήθηκε ιδιαίτερη παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης των τριγλυκεριδίων και των λιπαρών οξέων, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της λιπογένεσης. Υποστηρίζεται ότι πιθανός μηχανισμός δράσης των ενώσεων αυτών είναι στην καρβοξυλάση του ακετυλοCoA (ACCase) (Ζιώγας και Μάρκογλου, 2007).

Τέλος για την αντιμετώπιση του *T. urticae* χρησιμοποιείται το **bifenazate** (D2341, N' - (4-methoxy - bipheny - 3 - yl) hydrazine carboxylic acid isopropyl ester), που ανήκει στην νέα ομάδα ακαρεοκτόνων τα παράγωγα της υδραζίνης (hydrazine derivatives). Η δραστική αυτή ουσία ανακαλύφθηκε το 1990 και ξεκίνησε να χρησιμοποιείται το 1999. Σήμερα χρησιμοποιείται πολύ στην καταπολέμηση ακαρέων (*Tetranychus spp.*, *Panonychus spp.* και *Oligonychus spp.*) σε θερμοκήπια, φυτώρια, και καλλιέργειες όπως μηλιές, αχλαδιές, εσπεριδοειδή και βαμβάκι. Έχει δοθεί για εμπορική χρήση στην Ευρώπη, την Αφρική, την Ασία, την Ιαπωνία, την Νότια Αμερική και τις ΗΠΑ. Προκαλεί ακαριαίο θάνατο επειδή είναι επαφής και έχει μεγάλη υπολειμματική δράση. Το bifenazate αναφερόταν αρχικά ως νευροτοξίνη μέχρι που πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι στις υψηλές συγκεντρώσεις του δρά στον προσυναπτικό

υποδοχέα (GABA post - synaptic receptor) στο νευρικό σύστημα των εντόμων. Παρ' όλα αυτά οι πληροφορίες αυτές δεν επιβεβαιώθηκαν ποτέ από τα αποτελέσματα των μελετών που αποδεικνύουν γι αυτή την υπόθεση. Επομένως ο IRAC κατέταξε το bifenazate στην ομάδα 25 τρόπου δράσης σαν νευρικό αναστολέα, αλλά με άγνωστο τρόπο δράσης. Πρόσφατες μελέτες όμως το έχουν εξετάσει και έχουν υποβάλει έκθεση σχετικά με μία εναλλακτική περιοχή στόχων: την Qo - περιοχή του μιτοχονδριακού κωδικοποιημένου κυτοχρώματος β σε complex III της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Στην πιο πρόσφατη έκδοση του σχεδίου ταξινόμησης του IRAC (V. 6.1, Αυγούστου 2008), το bifenazate αφαιρέθηκε από την ομάδα 25 και τοποθετήθηκε στην ειδική ομάδα 'un' (ενώσεις με άγνωστο ή αβέβαιο τρόπο δράσης) (Van Leeuwen *et.al.*, 2009).

Η απάντηση του *T. urticae* στην χρησιμοποίηση χημικών σκευασμάτων ήταν η ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε αυτά. Τα προβλήματα με τα φυτοφάγα ακάρεα που αρχικά ήταν δευτερεύοντες εχθροί των καλλιεργειών άρχισαν με την χρήση των φυτοπροστατευτικών ουσιών και έγιναν πολύ σοβαρά λόγω της καταπληκτικής ικανότητάς τους να αναπτύσσουν ανθεκτικότητα διαδοχικά σε μία μεγάλη ποικιλία χημικών σκευασμάτων. Συγκεκριμένα το *T. urticae* βρέθηκε να είναι ανθεκτικό σε πάνω από 80 δραστικές ουσίες σε όλο τον κόσμο (<http://www.irac-online.org>).

### 1.3 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ

Η ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα, οφείλεται στην επιλογή ανθεκτικών γονιδίων που μετατρέπει αρχικά ευπαθείς πληθυσμούς σε ανθεκτικούς, με την πάροδο των γενεών. Έστω κι αν ελάχιστος αριθμός ατόμων φέρει τα ανθεκτικά γονίδια, ο ρυθμός αναπαραγωγής τους, σε συνδυασμό με την ένταση της επιλεκτικής πίεσης επιτρέπει πολύ γρήγορα τη δημιουργία ανθεκτικών πληθυσμών.

Ο βαθμός ανθεκτικότητας στο εντομοκτόνο των ατόμων ενός ανθεκτικού πληθυσμού, δηλαδή η ένταση της ανθεκτικότητας συχνά διαφέρει μεταξύ φυλών ενός είδους που ζουν σε διαφορετικές περιοχές και που κατά κανόνα έχουν διαφορετικό ιστορικό ανάπτυξης (δημιουργίας) την ανθεκτικότητας.

Η σταθερότητα της ανθεκτικότητας μπορεί να διαφέρει από ουσία σε ουσία, από είδος σε είδος εντόμου και από ορισμένες περιπτώσεις σε άλλες. Η ανθεκτικότητα θεωρείται σταθερή όταν διατηρεί την έντασή της επί πολλές γενεές του εντόμου αφού σταματήσει η επίδραση της τοξικής ουσίας. Θεωρείται ασταθής όταν η ένταση της μειώνεται, και μάλιστα σχετικά γρήγορα, όταν σταματήσει η επίδραση της τοξικής ουσίας (Τζανακάκης, 1995).

**Πολλαπλή** ανθεκτικότητα είναι αυτή που αφορά περισσότερες από μια τοξικές ουσίες, μη συγγενείς μεταξύ τους. Δημιουργείται με επιλογή κάτω από την επίδραση εντομοκτόνων που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες και οφείλεται σε περισσότερους από ένα μηχανισμούς ανθεκτικότητας (Τζανακάκης, 1995).

Ως κυριότερους παράγοντες που επηρεάζουν ή καθορίζουν την εξέλιξη ή τη δημιουργία και τον βαθμό ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα, ο Busvine (1971) θεώρησε τους εξής :

(1) Τη συχνότητα, την αποτελεσματικότητα και την υπόσταση (κυριαρχία ή μη) των γονιδίων ανθεκτικότητας στον αρχικό πληθυσμό.

(2) Την ένταση επιλογής, δηλαδή το μέγεθος του πληθυσμού που εκτίθεται στο εντομοκτόνο και το ποσοστό που σκοτώνεται.

(3) Τον αριθμό των γενεών κατ' έτος και αριθμό απογόνων, συνεπώς το πόσο συχνά θα επιλέγεται ο πληθυσμός κατ' έτος. Αναμφίβολα, οι τρεις αυτοί παράγοντες είναι οι σπουδαιότεροι, και από αυτούς σπουδαιότερος ο δεύτερος (Τζανακάκης, 1995).

Σύμφωνα με τον Γεωργίου (Georgiou, 1987) υπάρχουν κάποιοι επιπλέον παράγοντες βιολογικοί και γενετικοί που επηρεάζουν την εμφάνιση και ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Μονογαμία, πολυγαμία, παρθενογένεση όσον αφορά στην βιολογία των ακάρεων. Όσον αφορά στην συμπεριφορά τους η απομόνωση, η κινητικότητα και η μετανάστευση επηρεάζουν την εμφάνιση ανθεκτικότητας. Κάποιοι επιπλέον γενετικοί παράγοντες είναι ο αριθμός των ανθεκτικών γονιδίων, η κυριαρχία των ανθεκτικών γονιδίων, η έκφραση και αλληλεπίδραση των ανθεκτικών αλληλομόρφων και η ενσωμάτωση των R γονιδίων και προσαρμογή στον πληθυσμό.

Οι γενετικοί παράγοντες πρέπει να μελετούνται κατά περίπτωση εμφάνισης ανθεκτικότητας ενός είδους σε μια δραστική ουσία (Georgiou, 1987).



Ο τελικός στόχος ή η θέση δράσης των εντομοκτόνων είναι κατά κανόνα ένα ζωτικό ένζυμο, ή νευρικός ιστός του εντόμου. Τα μόρια του εντομοκτόνου ενώνονται με τον στόχο, τον αδρανοποιούν, και το έντομο τελικά πεθαίνει. Το τελικό αποτέλεσμα, θάνατος ή μη, εξαρτάται από την ποσότητα του αρχικού εντομοκτόνου ή των τοξικών μεταβολιτών του που θα φτάσει στον στόχο σε ορισμένο χρόνο. Η ποσότητα αυτή επηρεάζεται από ορισμένες ιδιότητες του εντόμου, ιδιότητες συμπεριφοράς, μορφολογικές, φυσιολογικές, ή βιοχημικές. Συνεπώς, η φυσική αντοχή ενός ευπαθούς πληθυσμού μπορεί να αφορά ένα η περισσότερα σκαλοπάτια ή στάδια κατά την πορεία του εντομοκτόνου από την επιφάνεια όπου το εφαρμόσαμε ως την άφιξη και τη δράση του στον στόχο. Αντίστοιχα, η επιλογή για ανθεκτικότητα στο εντομοκτόνο και δημιουργία ανθεκτικού σ' αυτό πληθυσμού, μπορεί να αφορά ένα η περισσότερα από τα στάδια αυτά. Η ανθεκτικότητα διακρίνεται σε ηθολογική, φυσιολογική, βιοχημική και ανθεκτικότητα στόχου.

1. Η ηθολογική ανθεκτικότητα αφορά την ποσότητα του εντομοκτόνου που δέχεται το έντομο. Οφείλεται σε ιδιαίτερη συμπεριφορά ή συνήθεια των ανθεκτικών εντόμων που τα κάνει να μην δέχονται ή να μην έρχονται καν σε επαφή με θανατηφόρες ποσότητες από το εντομοκτόνο. Αυξημένη, λοιπόν ερεθιστικότητα ή αποτροπή του εντόμου από το εντομοκτόνο μπορεί να είναι ένα αίτιο της ηθολογικής ανθεκτικότητας. Άλλο αίτιο μπορεί να είναι κάποια ιδιορρυθμία των ανθεκτικών εντόμων που τα κάνει να συγκεντρώνονται σε μέρη του φυτού όπου δεν φτάνει το εντομοκτόνο σε θανατηφόρες ποσότητες. Στην πράξη, ο ηθολογικός εθισμός είναι σπάνιος και μικρής έντασης, ώστε δεν δημιουργεί σοβαρές δυσκολίες.

2. Η φυσιολογική ανθεκτικότητα αφορά την ποσότητα του εντομοκτόνου που διεισδύει στο σώμα του εντόμου και φτάνει στο στόχο σε ορισμένο χρόνο, δηλαδή αφορά κυρίως στην ταχύτητα διείσδυσης σε συνδυασμό με την ταχύτητα απέκκρισης και τυχόν αποθήκευσης της χημικής ουσίας σε μη ευπαθείς ιστούς. Τα ανθεκτικά άτομα έχουν εξωσκελετό λιγότερο περατό στα εντομοκτόνα άρα βραδύτερη διείσδυση ή ταχύτερη απέκκριση. Η βραδύτητα διείσδυσης δίνει ανθεκτικότητα αν στη συνέχεια υπάρχει και άλλο αίτιο που συμβάλλει στην περίπτωση. Για παράδειγμα, όταν υπάρχει και μηχανισμός αποδόμησης του εντομοκτόνου, η αργή διείσδυση δίνει το χρόνο να

αποδομηθεί μεγαλύτερο ποσοστό του εντομοκτόνου που μπαίνει στο σώμα του εντόμου.

3. Η βιοχημική ανθεκτικότητα (metabolic resistance) αφορά στην αποδόμηση του εντομοκτόνου προς μη τοξικά παράγωγα. Ο κυριότερος παράγοντας που προκαλεί αυτού του τύπου την ανθεκτικότητα είναι η αύξηση της ικανότητας των ενζύμων που μεταβολίζουν τα εντομοκτόνα, είτε ποσοτικά με μεγαλύτερη παραγωγή ενζύμων (αυξάνουν την παραγωγή ενζύμων αποικοδόμησης, τα οποία είναι ήδη διαθέσιμα στα ευαίσθητα άτομα σε μικρές ποσότητες) είτε ποιοτικά (με την τροποποίηση των υπαρχόντων ενζύμων, ώστε να γίνονται πιο κατάλληλα για το μεταβολισμό των εντομοκτόνων) με αύξηση της ταχύτητας μεταβολισμού πριν αυτά φτάσουν στο στόχο. Τα ένζυμα που αυξάνουν την ταχύτητα με την οποία αποικοδομούν τα εντομοκτόνα είναι :

α. Οι Υδρολάσες : Τρείς σημαντικές κατηγορίες εντομοκτόνων, τα οργανοφωσφορικά, πολλά από τα καρβαμιδικά και οι πυρεθρίνες είναι εστέρες. Οι εστέρες έχουν την ιδιότητα να αποικοδομούνται κυρίως παρουσία υδρολυτικών ενζύμων. Αυξημένη δραστηριότητα αυτών των ενζύμων προκαλεί τη σχετική ανθεκτικότητα.

β. Οξειδάσες μικτής λειτουργίας (MFO). Η αύξηση της λειτουργίας των MFO είναι από τους πιο διαδεδομένους μηχανισμούς ανθεκτικότητας σε όλες τις κατηγορίες των εντομοκτόνων. Το ευρύ φάσμα των υποστρωμάτων που προσβάλλουν είναι ένα γενικό χαρακτηριστικό τους.

γ. DDT-άσες. Αυτό το ένζυμο εμφανίστηκε σε διαφορετικά επίπεδα δράσης σε πολλά ανθεκτικά και όχι ευαίσθητα άτομα δημιουργώντας ανθεκτικότητα στο DDT. Αυτό το ένζυμο αποικοδομεί το DDT στο μη τοξικό DDE.

δ. Οι μεταφοράσες (τρανσφεράσες) της γλουταθειόνης. Είναι ο τελευταίος σημαντικός μηχανισμός αποικοδόμησης (στην ανθεκτικότητα εντομοκτόνων). Παίζει σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα σε μερικά οργανοφωσφορικά σκευάσματα

Ο βιοχημικός είναι ο πιο συχνός τύπος ανθεκτικότητας. Δημιουργείται σχετικά γρήγορα, έχει μεγαλύτερη ένταση και συνεπώς είναι ο σημαντικότερος από πρακτικής πλευράς. Στον αγρό συνήθως απαιτούνται 15 - 20 γενεές για να δημιουργηθεί σε βαθμό

που να δυσκολεύει την καταπολέμηση. Σε ορισμένα είδη εντόμων και εντομοκτόνα εμφανίστηκαν (δημιουργήθηκαν) ανθεκτικές φυλές 1 - 3 χρόνια μετά την έναρξη ευρείας χρήσης των εντομοκτόνων αυτών. Ο αναγκαίος όμως χρόνος εξαρτάται κυρίως από το εντομοκτόνο, την πίεση επιλογής και τους άλλους παράγοντες που ήδη αναφέρθηκαν (Τζανακάκης, 1995).

#### 4 Αλλαγές στο στόχο δράσης :

##### α. Μειωμένη ευαισθησία της Ακετυλοχολινεστεράσης (AChE)

Η AChE είναι το ένζυμο που βρίσκεται στη σύναψη δύο νευρικών κυττάρων και είναι ο στόχος δράσης των οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών εντομοκτόνων. Είναι γνωστό ότι μεταλλάξεις στο (α) γονίδιο (α) που κωδικοποιεί για την AChE έχουν σαν αποτέλεσμα να μειώνεται η συνάφεια των οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών με το ένζυμο, στα ανθεκτικά άτομα να παράγεται μεταβλημένη AChE, η οποία είναι λιγότερο ευαίσθητη σε αυτά τα εντομοκτόνα.

β. Kdr (knockdown Resistance) Η ανθεκτικότητα αυτή οφείλεται στην τροποποίηση του στόχου στον οποίο δρουν για παράδειγμα το DDT και οι πυρεθρίνες, στα μέρη του νευρικού άξονος που γίνεται η ανταλλαγή των ιόντων K και Na (Sodium channels).

γ. Rdl (Resistance to dieldrin) Αφορά μεταλλάξεις στις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς νατρίου και χλωρίου που μπορεί να μειώσουν τη συνάφεια των εντομοκτόνων με αυτές τις πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα τη μείωση της ευαισθησίας των εντόμων (Ffrench-Constant *et al.*, 1998, Zlotkin, 1999).

Από τους παραπάνω μηχανισμούς στα ακάρεα έχουν αναφερθεί η βιοχημική ανθεκτικότητα και μεταλλαγές στα γονίδια: ace\*, kdr\*, GluCl\*, cytb\* που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες στόχους των ακαρεοκτόνων και προσδίδουν ανθεκτικότητα σε οργανοφωσφορικά, πυρεθρινοειδή, αμπαμεκτίνη και bifenazate αντίστοιχα (Kwon, 2010a).

\* το ace κωδικοποιεί την ακετυλοχολινεστεράση (Ache)

\* το kdr κωδικοποιεί τα κανάλια μεταφοράς ιόντων νατρίου (sodium channels)

\* το GluCl κωδικοποιεί το συζευγμένο κανάλι χλωρίου (glutamate – gated chloride channel)

\* το cytb κωδικοποιεί το μιτοχονδριακό κυτόχρωμα b (mitochondrial kitochrome)

## Τρόποι αντιμετώπισης της ανθεκτικότητας

Η ανθεκτικότητα των αρθροπόδων σε εντομοκτόνα και ακαρεοκτόνα έχει μεγάλη πρακτική και οικονομική σημασία. Η ζημιά μπορεί να αφορά την αύξηση του κόστους καταπολέμησης, διότι χρειάζονται πιο πολλές επεμβάσεις ή πιο ακριβά εναλλακτικά εντομοκτόνα. Επίσης απουσία εναλλακτικών εντομοκτόνων ή άλλης αποτελεσματικής μεθόδου καταπολέμησης, ο αγρότης είναι υποχρεωμένος να στραφεί προς άλλη, συνήθως λιγότερο αποδοτική καλλιέργεια. Οι έρευνες για ανακάλυψη ή σύνθεση νέων εντομοκτόνων είναι αυξημένες και αυτό επιβαρύνει την τιμή των νέων εντομοκτόνων. Επιπλέον το αυξημένο κόστος γεωργικής παραγωγής λόγω ανθεκτικότητας το πληρώνει τελικά ο καταναλωτής. Τέλος το περιβάλλον μολύνεται σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό λόγω των συχνότερων και με μεγαλύτερη ένταση επεμβάσεις με εντομοκτόνα (Τζανακάκης, 1995).

Παρά την σοβαρότητα των δυσκολιών που δημιουργεί η ανθεκτικότητα σε πολλές περιοχές της γης, η καταπολέμηση των εντόμων είναι ακόμη δυνατή στις περισσότερες περιπτώσεις, για τα περισσότερα είδη, χρειάζεται όμως σύνεση και διαφορετική (από την ως τώρα) στρατηγική, για να παρατείνουμε τη χρησιμότητα των εντομοκτόνων, δεδομένου ότι είναι περιορισμένες οι δυνατότητες ανακάλυψης ή σύνθεσης νέων εντομοκτόνων με διαφορετικούς (από τα ήδη γνωστά) τρόπους τοξικής δράσης.

Για την αντιμετώπιση των δυσκολιών που δημιουργεί η ανθεκτικότητα χρειάζεται έγκαιρη διάγνωση ώστε να εφαρμοστούν, κατά κύριο λόγο προληπτικά μέτρα και στη συνέχεια αν χρειαστεί θεραπευτικά.

Τα κυριότερα θεραπευτικά μέτρα που προτάθηκαν κατά καιρούς για την αντιμετώπιση ήδη ανθεκτικών πληθυσμών είναι :

**Η αύξηση της συγκέντρωσης του εντομοκτόνου.** Μέτρο το οποίο συνίσταται όταν η ανθεκτικότητα του πληθυσμού είναι μικρής έντασης. Είναι χρήσιμο για λίγες μόνο γενιές, όσο η ανθεκτικότητα δεν ξεπεράσει ορισμένη τιμή, οπότε τελικά δεν συμφέρει ούτε ωφελεί.

**Η αντικατάσταση του εντομοκτόνου με άλλο** που ανήκει σε άλλη χημική ομάδα, που έχει διαφορετικό τρόπο δράσης, ή που δεν αποδομείται από τον ίδιο μηχανισμό του εντόμου αποτελεί ένα επιπλέον μέτρο.

**Η προσθήκη συνεργιστικής ουσίας ή ουσιών.** Οι περισσότεροι συνεργιστές δεσμεύουν τα αποδομητικά ένζυμα των εντομοκτόνων. Συνεπώς, η προσθήκη κατάλληλου για το συγκεκριμένο εντομοκτόνο συνεργιστή, θα ενισχύσει τη δραστηριότητα του εντομοκτόνου. Ο χρόνος ωφελιμότητας εξαρτάται από την περίπτωση. Αν δεν γνωρίζουμε κατάλληλο συνεργιστή, αλλά γνωρίζουμε ότι το εντομοκτόνο αποδομείται οξειδωτικά για παράδειγμα, θα δοκιμάσουμε συνεργιστή που εμποδίζει τις οξειδάσες. Είναι προφανές ότι οι συνεργιστικές ουσίες δεν βοηθούν όταν η ανθεκτικότητα οφείλεται σε αδράνεια (αδιαφορία) του στόχου.

**Η αλλαγή μεθόδου καταπολέμησης,** δηλαδή χρησιμοποίηση μη χημικής μεθόδου, αν βέβαια υπάρχει για το συγκεκριμένο είδος.

Τα προληπτικά μέτρα στοχεύουν στην αποφυγή ή στην καθυστέρηση δημιουργίας ανθεκτικού πληθυσμού. Συνίσταται στην αποφυγή ή στον περιορισμό των ενεργειών που είναι γνωστό ότι ευνοούν την επιλογή ανθεκτικών γονοτύπων. Τα πιο πολλά στοχεύουν στη μείωση της πίεσης επιλογής, που είναι ο κυριότερος από τους παράγοντες που συμβάλλουν στη δημιουργία ανθεκτικότητας.

Τα βασικότερα προληπτικά μέτρα είναι : Ο **περιορισμός του αριθμού των επεμβάσεων** στον ελάχιστο δυνατό, δηλαδή αραιές επεμβάσεις. Επιπλέον χρειάζονται **επεμβάσεις τοπικά** όχι γενικευμένες. Αυτό επιτρέπει την επιβίωση και ευπαθών στο εντομοκτόνο γονοτύπων. Επιπρόσθετο μέτρο είναι ο **περιορισμός της δόσης** του εντομοκτόνου στην ελάχιστη δυνατή. Η χρησιμοποίηση εντομοκτόνων **με μικρή υπολειμματική διάρκεια** αποτελεί ένα επιπλέον μέτρο. Με την **εναλλαγή ή διαδοχή εντομοκτόνων** που έχουν διαφορετικό τρόπο δράσης μπορούμε ακόμη να αποφύγουμε την δημιουργία ανθεκτικότητας. Η εναλλαγή μπορεί να αφορά διαφορετικά έτη, διαφορετικές γενιές, ή διαφορετικά στάδια εντόμου (ενήλικο, προνύμφη). Για καταπολέμηση ορισμένων φυτοφάγων ακάρεων συνίσταται η εποχική εναλλαγή ακαρεοκτόνων που να μην ανήκουν σε ομάδες που η μία δίνει έμμεση ανθεκτικότητα στα μέλη της άλλης. Πολύ σημαντικό μέτρο είναι η χρήση **μιγμάτων εντομοκτόνων** με διαφορετικό τρόπο δράσης. Ορισμένοι επιστήμονες θεωρούν ότι η χρήση μιγμάτων

ωφελεί. Παρ' όλα αυτά, δεν έχουν διερευνηθεί αρκετά τα τυχόν πλεονεκτήματα της ταυτόχρονης πίεσης επιλογής προς δύο ή τρεις κατευθύνσεις σε σύγκριση με πίεση προς μία κατεύθυνση. Τελευταίο μέτρο είναι η **ενίσχυση των φυσικών εχθρών** του εντόμου, εννοείται σε συνδυασμό με χρήση κατάλληλου εντομοκτόνου, με σκοπό την επίτευξη του πρώτου και δεύτερου μέτρου (Τζανακάκης, 1995).

### 1.3.1 Υπολογισμός των επιπέδων ανθεκτικότητας

Με τη μέθοδο των βιοδοκιμών μπορεί να γίνει η διαπίστωση και η μέτρηση της ανθεκτικότητας ενός πληθυσμού. Μπορεί δηλαδή να προσδιοριστεί ο βαθμός ανθεκτικότητας ενός πληθυσμού, υπολογίζοντας τη θνησιμότητα του συγκριτικά με τη θνησιμότητα ενός ευαίσθητου πληθυσμού αναφοράς. Στις βιοδοκιμές χρησιμοποιούνται άτομα ίδιας ηλικίας. Ως μέτρο σύγκρισης της τοξικότητας χρησιμοποιείται η τιμή  $LC_{50}$  που ορίζεται ως η συγκέντρωση της τοξικής ουσίας που θανατώνει το 50% ενός πληθυσμού. Για τον υπολογισμό των θανατηφόρων συγκεντρώσεων κατασκευάζεται καμπύλη συγκέντρωσης δραστικής ουσίας προς θνησιμότητα όπου η συγκέντρωση τοποθετείται στον άξονα  $x$  και η θνησιμότητα στον άξονα  $y$ .

### 1.3.2 Ανθεκτικότητα του *T.urticae*

Το *T.urticae* έχει αποδεδειγμένα αναπτύξει ανθεκτικότητα σε καλλιέργειες οπωροφόρων δέντρων, κηπευτικών και καλλωπιστικών φυτών. Οι τετράνυχοι έχουν την ικανότητα να αναπτύσσουν ανθεκτικότητα σε μεγάλο βαθμό και σε μεγάλο αριθμό ακαρεοκτόνων και εντομοκτόνων σκευασμάτων. Όταν αναπτύσσεται ανθεκτικότητα σε ένα εντομοκτόνο δεν χάνει την αποτελεσματικότητά του μόνο αυτό αλλά και τα άλλα εντομοκτόνα τα οποία ανήκουν στη ίδια ομάδα και έχουν τον ίδιο τρόπο δράσης, δηλαδή έχουν διασταυρούμενη ανθεκτικότητα (**cross resistance**) (Ιωαννίδης, 2006).

Αυτό οφείλεται κυρίως σε γενετικούς και βιολογικούς παράγοντες, καθώς επίσης και σε λειτουργικούς και οικολογικούς παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά την εμφάνιση της ανθεκτικότητας.

Οι γενετικοί και βιολογικοί παράγοντες δεν ελέγχονται από τις δικές μας ενέργειες και αφορούν στην αρρενοτόκο παρθενογένεση, στο υψηλό αναπαραγωγικό δυναμικό, στην εγγενή αναπαραγωγή, στο σύντομο βιολογικό κύκλο που έχει σαν αποτέλεσμα το μεγάλο αριθμό γενεών, στην διασταύρωση γενετικού υλικού και στους υψηλούς αριθμούς μεταλλάξεων.

Οι λειτουργικοί παράγοντες που είναι ο τύπος του χημικού σκευάσματος, οι δόσεις που εφαρμόζονται, η συχνότητα των επεμβάσεων και ο χώρος, είναι άμεσα ελεγχόμενοι και μπορούν να συμβάλλουν στη μείωση της επιλογής για ανθεκτικότητα.

Σε ότι αφορά τους οικολογικούς παράγοντες που είναι η μετανάστευση και το εποχικό δυναμικό του πληθυσμού των ακαρέων, θα πρέπει προκαταβολικά να γίνεται μία διερεύνηση πριν την εμφάνιση της ανθεκτικότητας για να βελτιωθούν οι γνώσεις των στρατηγικών διαχείρισης της. Οι εναλλαγές των δραστικών ουσιών επίσης συμβάλλουν στη μείωση της συχνότητας εμφάνισης γονιδίων που δημιουργούν ανθεκτικότητα σε μία ουσία (Σουλιώτη, 2001).

Πρώτος ο Smissaert το 1964 απέδειξε ότι η μη ευαισθησία του ενζύμου στόχου ακετυλοχολινεστεράση ήταν ο κύριος μηχανισμός ανθεκτικότητας του *Tetranychus urticae* στα οργανοφωσφορικά. Έκτοτε ο μηχανισμός αυτός ταυτοποιήθηκε σε πολλά έντομα. Μέχρι σήμερα διάφορες μεταλλαγές στο γονίδιο που κωδικοποιεί για την AChE έχουν προσδιοριστεί ως αίτια της ανθεκτικότητας στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα. Η μεταλλαγή F331W (αντικατάσταση μίας φαινυλαλανίνης από τρυπτοφάνη), που έχει προσδιοριστεί και χαρακτηριστεί λειτουργικά στα έντομα βρέθηκε επίσης σε ανθεκτικούς στα OP πληθυσμούς του *T. urticae* από την Ευρώπη και την Κορέα ενώ μία άλλη μεταλλαγή (στην ίδια θέση) F331C (αντικατάσταση φαινυλαλανίνης από κυστεΐνη) βρέθηκε σε έναν ανθεκτικό πληθυσμό από την Ιαπωνία. Εκτός αυτής τρεις επιπλέον μεταλλαγές ανθεκτικότητας στο ace που έχουν βρεθεί στα έντομα βρέθηκαν και στον *T. urticae*: G119S (αντικατάσταση μίας γλυκίνης από σερίνη), G328A (μίας γλυκίνης από αλανίνη) και A201S (αντικατάσταση μίας αλανίνης από σερίνη) που βρέθηκαν σε μερικούς ανθεκτικούς πληθυσμούς του *T. urticae* καθώς επίσης και μία νέα μεταλλαγή A280T (αντικατάσταση μίας αλανίνης από θρεονίνη) που ανιχνεύεται σε μερικούς ανθεκτικούς πληθυσμούς από την Ευρώπη. (Khajehali *et al.*, 2009) και (Kwon *et al.*, 2010a).

Διάφορες περιπτώσεις ανθεκτικότητας του *T.urticae* στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα έχουν αναφερθεί παγκοσμίως. Εντούτοις μόνο ένας περιορισμένος αριθμός των μελετών πραγματοποιήθηκε για να αναλύσει τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας στα πυρεθρινοειδή σε αυτό το είδος. Ανθεκτικότητα του *T.urticae* στο **bifenthrin** αναφέρθηκε πρώτα από τον Farnham *et al* (1992) σε πληθυσμό που συλλέχθηκε από έναν εντατικά ψεκασμένο οπωρώνα κρατικών μήλων της Νέας Υόρκης το 1985. Μέχρι το 1999, το bifenthrin έγινε αναξιόπιστο για τον έλεγχο του *T.urticae* στο αυστραλιανό βαμβάκι, αν και τα επίπεδα ανθεκτικότητας ήταν σχετικά χαμηλά (μέχρι δέκα φορές) (Herron *et al.*, 2001). Η ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή παρατηρήθηκε επίσης στους πληθυσμούς του *T.urticae* σε καλλιέργεια βαμβακιού στην Τουρκία (Ay και Gurkan, 2005). Στην πιο πρόσφατη μελέτη τα επίπεδα ανθεκτικότητας του *T.urticae* στο bifenthrin ελέγχθησαν σε 11 πληθυσμούς στην Ελλάδα από υπαίθριες και θερμοκηπιακές καλλιέργειες λαχανικών. Τα επίπεδα ανθεκτικότητας κυμαίνονταν από 1 (απουσία ανθεκτικότητας) έως πολύ υψηλά. Δύο ιδιαίτερα ανθεκτικές φυλές παρήχθησαν μετά από εργαστηριακή επιλογή των ετερογενών ανθεκτικών πληθυσμών που προσδιορίστηκαν. Το ATHRos - Bf με RR 2,495 που προέρχεται από θερμοκηπιακή καλλιέργεια τριανταφυλλιάς της Αθήνας και το CREVeg - Bf με RR 1,026 που προέρχεται από καλλιέργεια λαχανικών της Κρήτης. Στην περίπτωση του ATHRos - Bf δύο μεταλλαγές αμινοξέων στην πρωτεΐνη στόχο δηλαδή στο κανάλι νατρίου έχουν αναφερθεί: α) η αντικατάσταση μιας φαινυλαλανίνης από ισολευκίνη (ισοδύναμο με την μεταλλαγή F1538I στο είδος *Musca domestica*) στην περιοχή III S6 και β) η αντικατάσταση μίας αλανίνης σε ασπαρτικό οξύ (ισοδύναμη με την μεταλλαγή A1215D) μέσα στο ενδοκυτταρικό interlinker II / III προσδιορίστηκαν στον πληθυσμό ATHRos - BF, σε σύγκριση με τα ευαίσθητα άτομα (Tsagkarakou *et al.*, 2009). Μεταλλαγές στα κανάλια νατρίου έχουν συνδεθεί με την ανθεκτικότητα των πυρεθροειδών εντομοκτόνων σε ένα ευρύ φάσμα παρασίτων όπως επίσης έχουν αναφερθεί και μεταβολική ανθεκτικότητα από καρβοξυλεστεράσες ή P450s.

Η πρώτη αναφορά για μειωμένη δράση στο **abamectin** έγινε στην Καλιφόρνια σε μία καλλιέργεια σποροφύτων. Ο συντελεστής ανθεκτικότητας στο LC<sub>95</sub> κυμαίνονταν από RR = 1 - 658. Η ανθεκτικότητα σχετίστηκε σαφώς με τον υψηλό αριθμό εφαρμογών ανά έτος και τον συνολικό χρόνο χρήσης της δραστικής (Campos *et al.*,



1995). Πρόσφατη εργασία εντόπισε μία μεταλλαγή στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη στόχο των αβερμεκτινών. Συγκρίνοντας ολόκληρη την ακολουθία του cDNA ενός γλουταμινικού καναλιού χλωρίου (TuGluCl) η Kwon και οι συνεργάτες της (Kwon *et al.*, 2010b) προσδιόρισαν την μεταλλαγή G323D (αντικατάσταση μίας γλυκίνης από ασπαρτικό οξύ) που σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στο abamectin (Kwon *et al.*, 2010b).

Οι πρώτοι που ασχολήθηκαν με ανθεκτικότητα στο **spirodiclofen** εργαστηριακά ήταν οι Rauch and Nauen το 2002. Μετά από συνεχόμενες επιλογές για 21 μήνες με το spirodiclofen ο αρχικός πληθυσμός έγινε 13 φορές πιο ανθεκτικός. Σε μια άλλη εργασία του Van Leeuwen και συνεργατών (Van Leeuwen *et al.*, 2010), αναφέρει ότι μετά από πολλές γενιές (> 20) επιλογών στο εργαστήριο, ο συντελεστής ανθεκτικότητας αυξήθηκε έως 274 φορές. Επιπλέον, διάφορα πειράματα (βιοδοκιμές με συνεργιστές, μέτρηση ενεργότητας ενζύμων αποτοξικοποίησης ) υποδεικνύουν την αύξηση του οξειδωτικού μεταβολισμού σαν μηχανισμό ανθεκτικότητας στο spirodiclofen (Van Leeuwen *et al.*, 2010).

Υπάρχουν αναφορές για ανθεκτικότητα σε οργανικές ενώσεις όπως το **fenbutatin oxide** στην Αυστραλία (Edge and James, 1982, Herron *et al.*, 1997), την Αμερική (Croft *et al.*, 1984), και την Ευρώπη (Van Leeuwen *et al.*, 2004). Ο αριθμός των περιπτώσεων είναι πολύ περιορισμένος.

## 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η αναζήτηση ύπαρξης ή μη ανθεκτικότητας καθώς και η διερεύνηση των επιπέδων της, όπου αυτή αναπτύχθηκε. Η διερεύνηση των επιπέδων ανθεκτικότητας έγινε με την μεθοδολογία των τοξικολογικών βιοδοκιμών σε 7 πληθυσμούς του φυτοφάγου ακάρεος *T.urticae* που συλλέχθηκαν από διαφορετικές περιοχές της Κρήτης, στις δραστικές ουσίες: spirodiclofen, bifenthrin, abamectin και fenbutatin oxide.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ :

#### 3.1 ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ :

Οι τοξικολογικές δοκιμές έγιναν σε 7 πληθυσμούς διαφορετικών περιοχών της Κρήτης στους οποίους δόθηκαν ονόματα για την διευκόλυνση των ενεργειών μας. Η δειγματοληψία έγινε από θερμοκήπια αλλά και από τον αγρό. Συλλέχθηκαν ακάρεα από διάφορα μέρη του αγρού αλλά και του φυτού ώστε να είναι αντιπροσωπευτικό το δείγμα. Στη συνέχεια στο εργαστήριο γινόταν η έναρξη του κάθε πληθυσμού με περίπου 100 ενήλικα άτομα από τον καθένα και η διατήρησή τους σε φυτά φασολιού.

Πίνακας 1 : .Πληθυσμοί του *T.urticae*, τόπος και χρόνος συλλογής και επεμβάσεις που είχαν δεχτεί

Πληθυσμός	Ημερομηνία συλλογής	Τοποθεσία	Φυτό Ξενιστής	Επεμβάσεις που είχαν προηγηθεί της δειγματοληψίας
<b>GSS</b> (German Susceptible Strain) κατάγεται από την Γερμανία και εκτρέφεται απουσία ακαρεοκτόνων από το 1965				
<b>HER</b>	12/2006	Ηράκλειο	Malvaceae (αγρός)	Καμία επέμβαση
<b>TU1</b>	06/2006	Τυμπακι-Λάγγος	Πεπόνι (θερμοκήπιο)	abamectin
<b>TU2</b>	06/2006	Τυμπάκι Ανεμολίδι	Τομάτα (θερμοκήπιο)	methamidophos, beta cyfluthrin, dichlorvos , spinosad, imidacloprid, dimethyl phosphate, indoxacarb, cadusafos και το βιολογικό σκεύασμα, <i>B. thuringiensis</i> subspAizawai
<b>TU3</b>	06/2006	Ιεράπετρα-Γρα Λυγιά	Αγγούρι (θερμοκήπιο)	abamectin, spinosad , pyriproxifen, thiacloprid, deltamethrin, imidacloprid, bifenthrin
<b>TU4</b>	06/2006	Αρβη-Λατόμια	Φασόλι (αγρός)	abamectin, deltamethrin, dichlorvos, cyromazine
<b>TU5</b>	07/2006	Ιεράπετρα-Περιστέρα	Τομάτα (θερμοκήπιο)	thiacloprid, pirimiphos methyl, bifenthrin, bifenthrin, abamectin, spinosad, pymetrozine, pyriproxifen, dichlorvos, imidacloprid
<b>TU6</b>	09/2006	Ζάκρος-Ξηρόκαμπος	Μελιτζάνα (αγρός)	Καμία επέμβαση



Εικόνα 6. Απεικόνιση των περιοχών των πληθυσμών σε χάρτη

### 3.2 ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ :

Για τις εκτροφές των πληθυσμών χρησιμοποιήθηκαν φυτά φασολιού. Σε γλαστράκια με compost φυτεύονταν οι σπόροι και βρίσκονταν σε δωμάτιο με σταθερή θερμοκρασία 25°C, μέχρι να φυτρώσουν. Στη συνέχεια μόλις εμφανιζόταν το βλαστίδιο τοποθετούνταν σε θάλαμο με ελεγχόμενες συνθήκες στους 25°C. Με την πάροδο δέκα περίπου ημερών τα φύλλα των πρώτων κοτυληδόνων χρησιμοποιούνταν στις εκτροφές και τις βιοδοκιμές.

Για τις εκτροφές τα φύλλα φασολιού τοποθετούνταν σε βρεγμένο βαμβάκι μέσα σε μεταλλικό μπολ αφού πρώτα είχαν ελεγχθεί προσεκτικά στο στερεοσκόπιο για τυχόν μόλυνση από άλλα έντομα ή ακάρεα. Επάνω στα φύλλα μεταφέρονταν περίπου 100 θηλυκά ακμαία άτομα του *T. urticae*. Για κάθε εκτροφή χρησιμοποιούνταν περίπου 12 - 15 φύλλα. Για την συντήρηση των εκτροφών τοποθετούνταν μικρά κομμάτια από τα παλαιότερα φύλλα, σε φρέσκα φύλλα φασολιού. Οι εκτροφές τοποθετούνταν σε πλαστικές λεκάνες με νερό για αποφυγή επιμολύνσεων σε ειδικούς θαλάμους με κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας (25°C) και φωτισμού (18 : 6) για την ανάπτυξη των πληθυσμών.

Μία φορά την εβδομάδα περίπου, οι λεκάνες με τις εκτροφές πλένονταν προσεκτικά καθώς επίσης και τα κεσεδάκια και αντικαθιστούνταν το παλιό βαμβάκι με νέο.



**Εικόνα 7 : Προετοιμασία φυτών φασολιού για βιοδοκιμές και συντήρηση πληθυσμών**



**Εικόνα 8 : Εκτροφές πληθυσμών στο θάλαμο (αριστερά), «αλλαγή» πληθυσμών (δεξιά)**

### 3.3 ΒΙΟΔΟΚΙΜΕΣ

Για τις βιοδοκιμές υιοθετήθηκε η μέθοδος του FAO για τα αραχνοειδή (Dittrich *et al.*, 1980) και περιγράφηκε λεπτομερώς από τον Edge και τον James (1982) (Herron G., 2001). Όλα τα σκευάσματα δοκιμάστηκαν σε 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις, 4 επαναλήψεις για την κάθε συγκέντρωση και ένας μάρτυρας για κάθε επανάληψη που ψεκαζόταν με απιονισμένο νερό (Πίνακες 2 - 9).

Με την βοήθεια του τύπου  $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$  προετοιμάστηκαν τα διαλύματα και ακολουθήθηκε η διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων.

#### 3.3.1 Ακαρεοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν και προετοιμασία διαλυμάτων

Χρησιμοποιήθηκαν για τις βιοδοκιμές τα σκευάσματα με εμπορικά ονόματα: Tnt, Doble, Talstar και η δραστική ουσία spirodiclofen σε καθαρή μορφή (Εικόνα 9). Το σκεύασμα Tnt έχει δραστική ουσία το Fenbutatin oxide που ανήκει στην ομάδα των οργανοκασιτερούχων ακαρεοκτόνων. Το σκεύασμα Doble έχει δραστική ουσία το abamectin που ανήκει στις αβερμεκτίνες, το σκεύασμα Talstar έχει δραστική ουσία το bifenthrin που ανήκει στην ομάδα των πυρεθροειδών. Οι παραπάνω δραστικές χρησιμοποιήθηκαν στις βιοδοκιμές για την δράση τους ως ακμαιοκτόνα.



Εικόνα 9 : Σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια των βιοδοκιμών. Από αριστερά προς δεξιά διακρίνουμε το Tnt (fenbutatin oxide) Doble (abamectin), Spirodiclofen (καθαρή δραστική) και Talstar (bifenthrin)

Το spirodiclofen ανήκει στην ομάδα των τετρονικών οξέων και χρησιμοποιήθηκε ως προνομοκτόνο. Η συγκεκριμένη δραστική δεν υπήρχε σε εμπορικό σκεύασμα την περίοδο των βιοδοκιμών. Για το λόγο αυτό μας διατέθηκε από την εταιρία Bayer η καθαρή δραστική ουσία και παρασκευάστηκε στο εργαστήριο stock διάλυμα από 100mg δραστικής ουσίας τα οποία διαλύθηκαν σε 1ml μίγμα σε αναλογία 3 : 1 (v/v) από N, N - dimethylformamide και alkylarylpolglycoether (Rauch and Nauen, 2002). Οι αραιώσεις έγιναν σε απιονισμένο νερό.

Σήμερα κυκλοφορεί στο εμπόριο από την εταιρία Bayer με αριθμό έγκρισης κυκλοφορίας 2169/18-8-2008 (Spirodiclofen 24%) με το εμπορικό όνομα Envidor 240 SC.



**Εικόνα 10 : Εμπορικό σκεύασμα της δραστικής ουσίας Spirodiclofen.**

**Πίνακας 2. Συγκεντρώσεις σε ppm (parts per million) που εφαρμόστηκαν στον πληθυσμό GSS για κάθε δραστική ουσία.**

Δραστικές	Συγκεντρώσεις (ppm)						
	Μάρτυρας	1	2	3	4	5	6
Abamectin	0	0.007	0.01	0.03	0.1	0.2	0.3
Bifenthrin	0	0.3	1	3	10	30	
Fenbutatin oxide	0	1	3	10	30	100	
Spirodiclofen	0	1	2	3		-	-

**Πίνακας 3. Συγκεντρώσεις σε ppm (parts per million) που εφαρμόστηκαν στον πληθυσμό HER για κάθε δραστική ουσία.**

Δραστικές	Συγκεντρώσεις (ppm)					
	Μάρτυρας	1	2	3	4	5
Abamectin	0	0.1	0.2	0.3	1	-
Bifenthrin	0	3	5	10	100	500
Fenbutatin oxide	0	10	30	100	300	-
Spirodiclofen	0	1	2	3	-	-

**Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις σε ppm (parts per million) που εφαρμόστηκαν στον πληθυσμό TU1 για κάθε δραστική ουσία.**

Δραστικές	Συγκεντρώσεις (ppm)					
	Μάρτυρας	1	2	3	4	5
Abamectin	0	0.03	0.2	0.3	1	-
Bifenthrin	0	3	10	30	100	300
Fenbutatin oxide	0	10	30	100	300	1000
Spirodiclofen	0	1	3	10	100	-

**Πίνακας 5. Συγκεντρώσεις σε ppm (parts per million) που εφαρμόστηκαν στον πληθυσμό TU2 για κάθε δραστική ουσία.**

Δραστικές	Συγκεντρώσεις (ppm)					
	Μάρτυρας	1	2	3	4	5
Abamectin	0	0.1	0.2	0.3	1	-
Bifenthrin	0	3	5	10	100	500
Fenbutatin oxide	0	10	100	300	-	-
Spirodiclofen	0	1	3	10	100	-

**Πίνακας 6. Συγκεντρώσεις σε ppm (parts per million) που εφαρμόστηκαν στον πληθυσμό TU3 για κάθε δραστική ουσία.**

Δραστικές	Συγκεντρώσεις (ppm)					
	Μάρτυρας	1	2	3	4	5
Abamectin	0	0.1	0.3	1	-	-
Bifenthrin	0	3	10	30	100	300
Fenbutatin oxide	0	10	30	100	-	-
Spirodiclofen	0	1	3	10	-	-

**Πίνακας 7. Συγκεντρώσεις σε ppm (parts per million) που εφαρμόστηκαν στον πληθυσμό TU2 για κάθε δραστική ουσία.**

Δραστικές	Συγκεντρώσεις (ppm)					
	Μάρτυρας	1	2	3	4	5
Abamectin	0	0.1	0.2	0.3	1	-
Bifenthrin	0	10	30	100	300	1000
Fenbutatin oxide	0	30	100	300	1000	-
Spirodiclofen	0	1	2	3	10	-

**Πίνακας 8. Συγκεντρώσεις σε ppm (parts per million) που εφαρμόστηκαν στον πληθυσμό TU5 για κάθε δραστική ουσία.**

Δραστικές	Συγκεντρώσεις (ppm)					
	Μάρτυρας	1	2	3	4	5
Abamectin	0	0.03	0.1	0.2	0.3	1
Bifenthrin	0	3	10	30	100	300
Fenbutatin oxide	0	30	100	300	1000	-
Spirodiclofen	0	1	2	3	10	-

**Πίνακας 9. Συγκεντρώσεις σε ppm (parts per million) που εφαρμόστηκαν στον πληθυσμό TU6 για κάθε δραστική ουσία.**

Δραστικές	Συγκεντρώσεις(ppm)					
	Μάρτυρας	1	2	3	4	5
Abamectin	0	0.03	0.1	0.2	0.3	1
Bifenthrin	0	3	10	30	100	-
Fenbutatin oxide	0	10	30	100	300	1000
Spirodiclofen	0	1	2	3	10	-



### 3.3.2 Επεμβάσεις :

Η διαδικασία των βιοδοκιμών γίνεται με μεταφορά 20 - 25 ενήλικων θηλυκών ακαρέων σε φύλλα φασολιού μέσα σε κύκλο 30 mm. Στη συνέχεια τα φύλλα ψεκάζονται με την κάθε δραστική από την μικρότερη στην μεγαλύτερη συγκέντρωση, χρησιμοποιώντας την συσκευή ψεκασμού (Potter Tower) εξασφαλίζοντας έτσι ομοιογένεια και επαναληψιμότητα των επεμβάσεων. Το Potter Tower είναι μία συσκευή ψεκασμού ακριβείας που συντελεί στην ομοιόμορφη κατανομή του ψεκαστικού υγρού με την μορφή μικροσταγονιδίων και πίεση 15 lb/in<sup>2</sup>, η οποία μπορεί και να ρυθμιστεί (Εικόνα 12). Στο πάνω μέρος της συσκευής υπάρχει ένα σωληνάριο το οποίο με την χορήγηση πίεσης διοχετεύει το διάλυμα μέσω ενός κυλίνδρου ψεκασμού. Τα φύλλα των βιοδοκιμών τοποθετούνται σε υποδοχή στο κάτω μέρος της συσκευής και γίνεται ομοιόμορφη εφαρμογή του ψεκαστικού υγρού. Σε πίεση 15 lb/in<sup>2</sup> (-1 atm) η ποσότητα ψεκαστικού υγρού που πέφτει σε 1 cm φύλλου είναι 2.4 mg όταν ψεκάζουμε με 1 ml / φύλλο.

Για τις βιοδοκιμές με ακμαία άτομα τοποθετούνταν 25 θηλυκά άτομα σε φύλλα φασολιού εντός δακτυλίου με εντομολογική κόλλα διαμέτρου 4cm περίπου, τα οποία βρίσκονταν σε κομμάτι βαμβακιού πάνω σε πλαστικό τριβλίο petri (Εικόνα 10). Σημειώνεται εδώ ότι χρησιμοποιούμε μόνο θηλυκά άτομα (διπλοειδή) γιατί έτσι συνηθίζεται στις βιοδοκιμές. Τα φύλλα εξετάζονταν προσεκτικά στο στερεοσκόπιο για τυχόν μολύνσεις. Προετοιμάζονταν τα διαλύματα τα οποία έμπαιναν σε tubes του 1,5ml και ο ψεκασμός γινόταν με ειδικό ψεκαστικό μηχάνημα ακριβείας (Potter Tower) (Εικόνα 12). Προετοιμάζονταν 5 διαδοχικές συγκεντρώσεις φαρμάκου και ένας μάρτυρας με απιονισμένο νερό. Μετά τον ψεκασμό γινόταν καταμέτρηση των ζωντανών, νεκρών και παγιδευμένων στην κόλλα ατόμων και καταγραφή τους για να υπολογιστεί η θνησιμότητα χειρισμών (handling mortality). Η δεύτερη μέτρηση γινόταν 24 ώρες μετά τον ψεκασμό και 48 ώρες αργότερα η τελική μέτρηση θνησιμότητας.

Η διερεύνηση ύπαρξης ανθεκτικότητας στο spirodiclofen έγινε με προνύμφες *T. urticae*, το πρώτο κινητό στάδιο. Σε φύλλα πρώτων κοτυληδόνων, που δεν έχουν κοπεί από το φυτό, τοποθετούνταν 10 ακμαία θηλυκά μέσα σε δακτύλιο με εντομολογική κόλλα. Είκοσι τέσσερις ώρες μετά αφαιρούνταν τα θηλυκά άτομα αφού είχαν γεννήσει

ικανό αριθμό ωών (30 - 100) σε κάθε φύλλο. Τρείς με τέσσερις μέρες μετά σε θερμοκρασία 26<sup>0</sup>C τα φύλλα ελέγχονταν στο στερεοσκόπιο και αν είχε διαπιστωθεί ότι το 80% των ωών είχαν εκκολαφθεί πραγματοποιούνταν οι βιοδοκιμές. Τα φύλλα κόβονταν και τοποθετούνταν σε βαμβάκι πάνω σε πλαστικά τριβλία petri. Μετά την παρασκευή των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε 2ml ψεκαστικού διαλύματος για κάθε επανάληψη στο Potter Tower. Η μέτρηση γινόταν 4 - 5 ημέρες αργότερα όταν διαπιστώναμε ότι τα άτομα τα οποία υπήρχαν στο μάρτυρα είχαν γίνει ακμαία. Νεκρά θεωρήθηκαν τα άτομα που αδυνατούσαν να διανύσουν απόσταση ίση με δύο φορές το μήκος τους. Τα αποτελέσματα καταγράφονταν και οι αναλύσεις γίνονταν με τον ίδιο τρόπο που γίνονταν και στα ακμαία άτομα με το πρόγραμμα Probit Refer Analysis.



**Εικόνα 10 : Τοποθέτηση ακμαίων θηλυκών από την εκτροφή σε φρέσκο φύλλο φασιολιού για βιοδοκιμή**

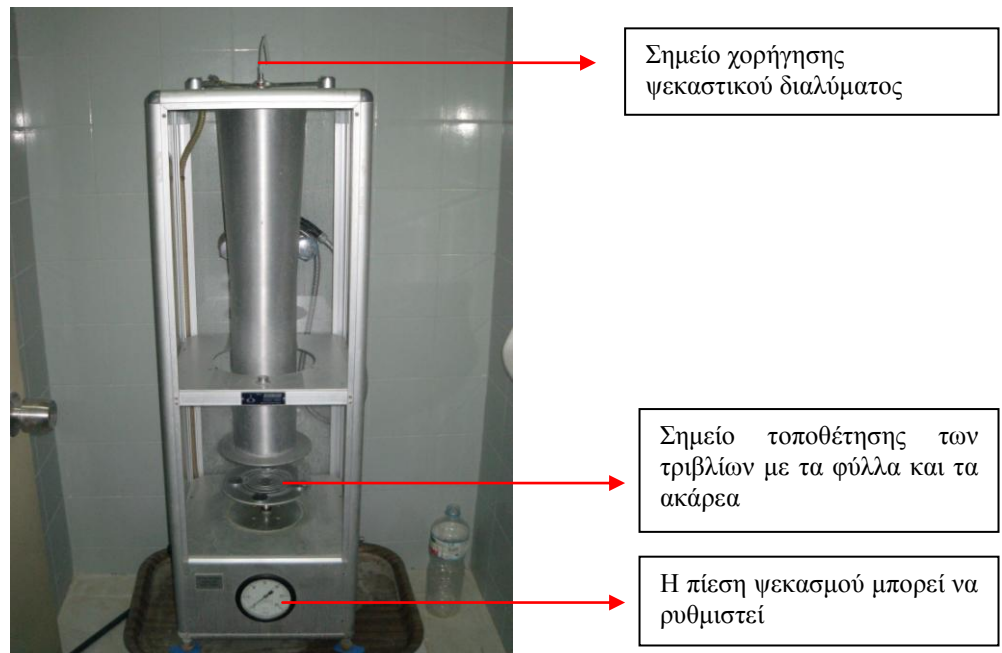
### **3.3.3 Ανάλυση δεδομένων :**

Τα αποτελέσματα των επιπέδων ανθεκτικότητας ‘‘διορθώθηκαν’’ λαμβάνοντας υπόψη τη θνησιμότητα που δεν οφείλεται στην δράση των σκευασμάτων (θνησιμότητα μάρτυρα), χρησιμοποιώντας τον τύπο του Abbot.  $\Delta\Theta = 100 * 1 - \Theta E / \Theta M$  όπου  $\Delta\Theta$  = διορθωμένη θνησιμότητα,  $\Theta E$  = Θνησιμότητα επέμβασης, και  $\Theta M$  = Θνησιμότητα μάρτυρα. Η Probit ανάλυση κατά Finney (Probit analysis, 1971 Cambridge Univ. Press) πραγματοποιήθηκε για την ανάλυση της % θνησιμότητας χρησιμοποιώντας το λογισμικό Probit 3.3 (Praxeme version 3.3, Licence 193019) (Raymond *et al.*, 1993). Το λογισμικό αυτό δίνει την δυνατότητα να δοκιμάσουμε κατά πόσον η καμπύλη

απόκλισης θνησιμότητας - συγκεντρώσεις αντιστοιχεί σε ευθεία γραμμή (δοκιμή  $x^2$ ), την κλίση της ευθείας (slope), τις θανατηφόρες συγκεντρώσεις (lethal concentrations LC), τα όρια εμπιστοσύνης κάθε μίας και τον συντελεστή ανθεκτικότητας RR (Resistance Ratio).



Εικόνα 11 : Προετοιμασία φύλλων για βιοδοκιμή. Τοποθέτηση εντομολογικής κόλλας.



Εικόνα 12 : Potter tower (ψεκαστικό μηχάνημα)

### 3.3.4 Πειραματικές εγκαταστάσεις

Οι βιοδοκιμές, οι εκτροφές των πληθυσμών και οι αναλύσεις των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκαν στο (ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε) Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας στο εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Ινστιτούτου Προστασίας Φυτών Ηρακλείου.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ :

Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών με τα 4 ακαρεοκτόνα αναλύθηκαν με το πρόγραμμα Probit 3.3 συγκρίνοντας τους 6 πληθυσμούς με τον ευαίσθητο πληθυσμό αναφοράς GSS. Αναλυτικά τα αποτελέσματα και οι Probit αναλύσεις παρατίθενται στο παράρτημα στο τέλος της εργασίας. Στον πίνακα 10 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της ανάλυσης της θνησιμότητας και των επιπέδων ανθεκτικότητας των πληθυσμών HER, TU1, TU2, TU3, TU4, TU5 και TU6 συγκριτικά με τον πληθυσμό αναφοράς GSS στα δοκιμαζόμενα σκευάσματα (Spirodiclofen, Bifenthrin, Abamectin και Fenbutatin oxide). Οι τιμές του συντελεστή ανθεκτικότητας RR στις δραστικές, είχαν αρκετές διακυμάνσεις χωρίς όμως να υπάρχει κάποια μεγάλη στατιστική διαφορά μεταξύ τους. Το LC<sub>50</sub> (lethal concentration for 50% mortality) είναι η συγκέντρωση που σκοτώνει το 50% του πληθυσμού.

Παρουσιάζονται παρακάτω τα αποτελέσματα ανά δραστική ουσία (**Spirodiclofen, Bifenthrin, Abamectin και Fenbutatin oxide**). Στα διαγράμματα που ακολουθούν στον άξονα χ τοποθετείται η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας και στον άξονα ψ η θνησιμότητα %

**Πίνακας 10.** Αποτελέσματα ανάλυσης της θνησιμότητας και επίπεδα ανθεκτικότητας των πληθυσμών στις δοκιμαζόμενες δραστικές ουσίες

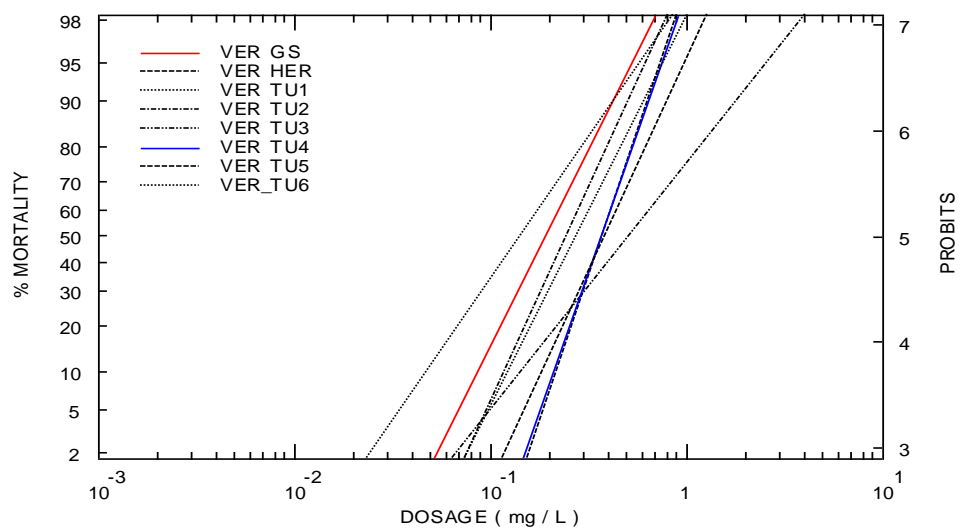
Πληθυσμοί	N	LC <sub>50</sub>	LC <sub>95</sub>	LC <sub>50</sub> 95%	Slope ± SE	X <sup>2</sup>	df	RR	RR 95% CI
<b>Spirodiclofen</b>									
GSS	1658	1.35	3.26	0.62 - 2.9	4.26 ± 3.41	191.87***	1		
HER	434	0.85	1.78	0.73 - 0.94	5.08 ± 0.73	2.92	1	0.63	
TU1	777	2.68	17.86	1.27 - 5.67	1.99 ± 0.82	41.14***	2	1.98	0.43 - 9.21
TU2	1127	3.21	18.58	2.37 - 4.34	2.16 ± 0.34	13.96***	2	2.38	0.57 - 9.87
TU3	643	1.61	5.03	1.42 - 1.81	3.33 ± 0.29	0.01	1	1.19	
TU4	1171	2.48	7.98	1.82 - 3.40	3.25 ± 0.84	37.55***	2	1.84	0.47 - 7.94
TU5	676	2.50	4.62	1.61 - 3.88	6.17 ± 6.37	70.41***	2	1.85	0.30 - 11.34
TU6	1198	0.55	2.27	0.25 - 1.21	2.68 ± 0.99	16.52***	2	0.41	0.08 - 2.15
<b>Bifenthrin</b>									
GSS	257	13.27	110.58	4.38 - 40.73	1.79 ± 0.92	18.09***	2		
HER	266	296.45	48686.09	122.96 - 1561.95	0.74 ± 0.15	1.68	3	22.34	9.98 - 50.03
TU1	439	115.40	2308.56	83.81 - 170.51	1.26 ± 0.15	2.67	3	8.61	2.78 - 26.67
TU2	308	41.57	1093.89	19.17 - 91.92	1.16 ± 0.24	10.44*	3	3.10	0.92 - 10.45
TU3	477	740.88	47900.02	348.92 - 3182.65	0.91 ± 0.17	0.88	3	57.13	17.11 - 190.76
TU4	506	3136.88	448488.43	1307.27 - 19383	0.76 ± 0.15	0.58	3	236.42	104.60 - 534.4
TU5	372	45.25	272.91	36.30 - 58.01	2.11 ± 0.21	4.97	3	3.44	1.06 - 11.12
TU6	327	8.46	38.82	6.78 - 10.58	2.49 ± 0.30	4.71	2	0.65	0.18 - 2.34
<b>Abamectin</b>									
GSS	542	0.19	0.52	0.11 - 0.32	3.73 ± 1.48	107.74***	4		
HER	481	0.38	0.75	0.21 - 0.69	5.50 ± 3.56	62.14***	2	1.93	0.26 - 14.24
TU1	461	0.14	0.59	0.09 - 0.23	2.68 ± 0.74	20.54***	2	0.72	0.19 - 2.79
TU2	460	0.25	0.62	0.22 - 0.28	4.08 ± 0.45	5.59	2	1.26	0.36 - 4.36
TU3	375	0.52	2.64	0.43 - 0.64	2.32 ± 0.29	0.93	1	2.67	0.81 - 8.78
TU4	499	0.36	0.74	0.33 - 0.42	5.34 ± 0.68	1.48	2	1.84	0.50 - 6.72
TU5	498	0.39	1.01	0.24 - 0.64	4.01 ± 1.33	57.77***	3	1.95	0.37 - 10.39
TU6	419	0.28	0.78	0.02 - 3.53	3.68 ± 8.13	503.53***	2	1.49	0.05 - 48.27
<b>Fenbutatin oxide</b>									
GSS	346	17.91	72.09	14.45-22.28	2.72 ± 0.33	3.37	2		
HER	384	51.10	271.66	41.76 - 61.99	2.27 ± 0.22	4.44	2	2.88	2.15 - 3.85
TU1	351	131.18	2199.69	91.30 - 183.53	1.34 ± 0.18	7.38	3	7.32	5.80 - 9.24
TU2	262	113.30	4009.16	73.96 - 182.51	1.06 ± 0.18	2.37	1	6.32	5.01 - 7.98
TU3	318	27.23	70.72	16.59 - 44.63	3.97 ± 1.78	9.95**	1	1.52	0.64 - 3.62
TU4	419	134.64	555.10	95.81 - 188.50	2.67 ± 0.55	6.35*	2	7.52	4.94 - 11.43
TU5	390	157.98	879.14	124.74 - 196.17	2.21 ± 0.25	3.73	2	8.82	6.94 - 11.21
TU6	564	46.23	180.51	25.27 - 84.49	2.78 ± 0.99	28.46***	2	2.58	1.29 - 5.18

N : ο αριθμός ακάρεων, LC<sub>50</sub> : (Lethal concentration for 50% mortality) : συγκέντρωση που σκοτώνει το 50% του πληθυσμού, RR : (Resistance Ratio) : συντελεστής ανθεκτικότητας, Slope και SE : κλίση ευθείας και απόκλιση, χ<sup>2</sup> : δοκιμής καλής αντιπροσώπευσης από ευθεία \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, df : (degrees of freedom) βαθμοί ελευθερίας.

#### 4.1 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟ ABAMECTIN :

Στο διάγραμμα 1 καταγράφεται η θνησιμότητα ακμαίων θηλυκών ατόμων του *T. urticae* για τους πληθυσμούς GSS, HER, TU1, TU2, TU3, TU4, TU5 και TU6 σε σχέση με την εφαρμοζόμενη συγκέντρωση της δραστικής abamectin. Οι πληθυσμοί στην πλειοψηφία τους δεν είναι ομοιογενείς αφού το  $\chi^2$  είναι στατιστικά σημαντικό, με εξαίρεση τους πληθυσμούς TU2, TU3 και TU4 οι οποίοι είναι ομοιογενείς (πίνακας 10).

Ένας μόνο πληθυσμός ο TU1 είχε  $LC_{50}$  μικρότερο του  $LC_{50}$  του GSS [ $LC_{50}$  είναι : Lethal concentration for 50% mortality δηλαδή συγκέντρωση που σκοτώνει το 50% των ατόμων]. Όλοι οι άλλοι πληθυσμοί είχαν  $LC_{50}$  που κυμαίνονταν από 0.62 (TU2) έως 2.64 (TU3). Παρ' όλα αυτά κανένας δεν ήταν στατιστικά ανθεκτικός δεδομένου ότι τα όρια εμπιστοσύνης (95% CI) του συντελεστή ανθεκτικότητας RR (Resistance Ratio) περιελάμβαναν σε όλες τις περιπτώσεις την μονάδα (πίνακας 10).

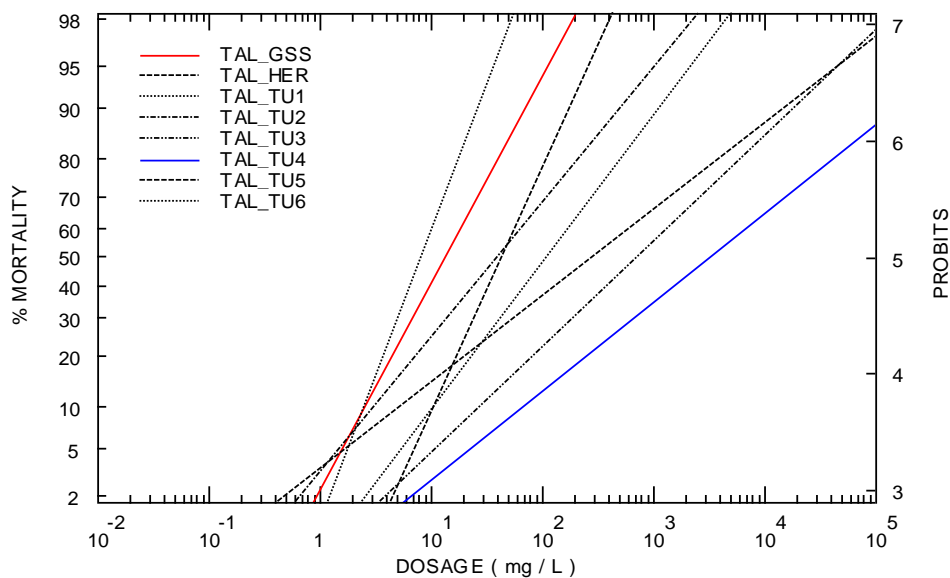


**Διάγραμμα 1. Θνησιμότητα ακμαίων θηλυκών του *T. urticae* σε σχέση με την εφαρμοζόμενη συγκέντρωση της δραστικής abamectin.**

#### 4.2 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟ BIFENTHRIN :

Στο διάγραμμα 2 καταγράφεται η θνησιμότητα ακμαίων θηλυκών ατόμων του *T. urticae* για τους πληθυσμούς GSS, HER, TU1, TU2, TU3, TU4, TU5 και TU6 σε σχέση με την εφαρμοζόμενη συγκέντρωση της δραστικής bifenthrin. Στην πλειοψηφία τους οι πληθυσμοί που δέχτηκαν επέμβαση με την δραστική αυτή είναι ομοιογενείς, με εξαίρεση τους GSS και TU2 οι οποίοι δεν είναι ομοιογενείς αφού το  $\chi^2$  είναι στατιστικά σημαντικό (πίνακας 10).

Παρατηρούμε όλους τους πληθυσμούς, εκτός από τους πληθυσμούς, TU2 και TU6 των οποίων το εύρος δεν περιελάμβανε την μονάδα, να εμφανίζουν διάφορα επίπεδα ανθεκτικότητας στην δραστική ουσία bifenthrin. Ο πληθυσμός που παρουσίασε την μεγαλύτερη ανθεκτικότητα είναι ο TU4 με συντελεστή ανθεκτικότητας  $RR = 236$  και όρια εμπιστοσύνης (95% CI) του RR από 104.60 - 534.37. Ο συντελεστής ανθεκτικότητας των υπολοίπων πληθυσμών κυμαινόταν από 3.44 (TU5) έως 57.13 (TU3) (πίνακας 10).

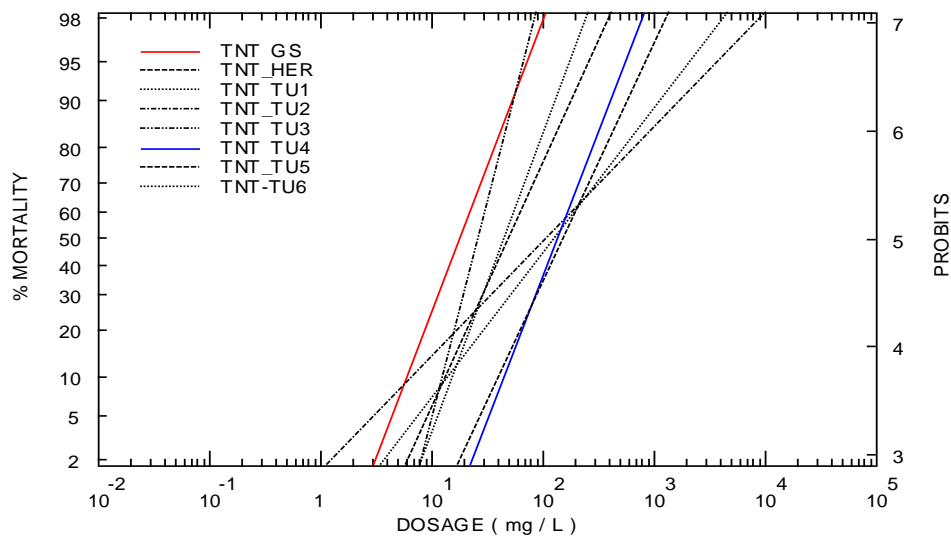


**Διάγραμμα 2. Θνησιμότητα ακμαίων θηλυκών του *T. urticae* σε σχέση με την εφαρμοζόμενη συγκέντρωση της δραστικής bifenthrin.**

### 4.3 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟ FENBUTATIN OXIDE :

Στο διάγραμμα 3 καταγράφεται η θνησιμότητα ακμαίων θηλυκών ατόμων του *T. urticae* για τους πληθυσμούς GSS, HER, TU1, TU2, TU3, TU4, TU5 και TU6 σε σχέση με την εφαρμοζόμενη συγκέντρωση της δραστικής fenbutatin oxide. Με εξαίρεση τους πληθυσμούς TU3, TU4 και TU6 οι υπόλοιποι πληθυσμοί είναι ομοιογενείς αφού το  $\chi^2$  δεν είναι στατιστικά σημαντικό (πίνακας 10).

Με εξαίρεση τον πληθυσμό TU3 του οποίου τα όρια εμπιστοσύνης (95% CI) του συντελεστή ανθεκτικότητας RR δεν περιελάμβαναν την μονάδα, οι υπόλοιποι εμφάνισαν ανθεκτικότητα στην δραστική fenbutatin oxide. Οι συντελεστές ανθεκτικότητας κυμαίνονταν από 2.58 (TU6) έως 8.82 (TU5) (πίνακας 10).



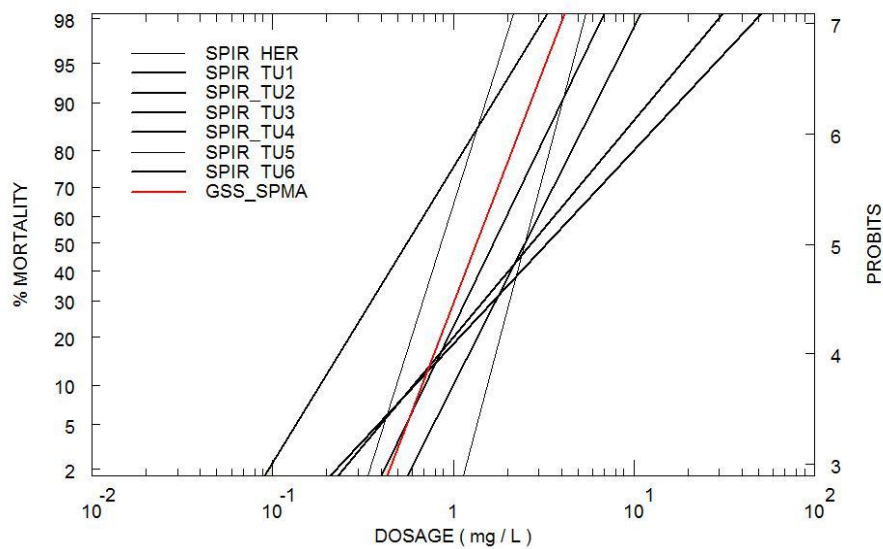
**Διάγραμμα 3. Θνησιμότητα ακμαίων θηλυκών του *T. urticae* σε σχέση με την εφαρμοζόμενη συγκέντρωση της δραστικής fenbutatin oxide.**



#### 4.4 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟ SPIRODICLOFEN :

Στο διάγραμμα 4 καταγράφεται η θνησιμότητα ακμαίων θηλυκών ατόμων του *T. urticae* για τους πληθυσμούς GSS, HER, TU1, TU2, TU3, TU4, TU5 και TU6 σε σχέση με την εφαρμοζόμενη συγκέντρωση της δραστικής spiroadiclofen. Με εξαίρεση τους πληθυσμούς HER και TU3 οι υπόλοιποι είναι ανομοιογενείς αφού το  $\chi^2$  δεν είναι στατιστικά σημαντικό (πίνακας 10).

Οι πληθυσμοί HER και TU6 είχαν μικρότερη τιμή  $LC_{50}$  σε σχέση με τον GSS. Όλοι οι υπόλοιποι είχαν  $LC_{50}$  που κυμαίνονταν από 1,61 (TU3) έως 2,68 (TU1). Παρ' όλα αυτά τα όρια εμπιστοσύνης (95% CI) του συντελεστή ανθεκτικότητας RR περιελάμβαναν σε όλες τις περιπτώσεις την μονάδα που σημαίνει ότι κανένας από τους πληθυσμούς δεν ήταν στατιστικά ανθεκτικός (πίνακας 10).



**Διάγραμμα 4. Θνησιμότητα ακμαίων θηλυκών του *T. urticae* σε σχέση με την εφαρμοζόμενη συγκέντρωση της δραστικής spiroadiclofen.**

Ανακεφαλαιώνοντας, είδαμε ότι ανθεκτικότητα εμφανίστηκε στις δραστικές bifenthrin και fenbutatin oxide στο οποίο όμως τα επίπεδα ανθεκτικότητας ήταν χαμηλότερα σε σχέση με το bifenthrin. Στην δραστική ουσία bifenthrin ο πληθυσμός TU4 ήταν ο πιο ανθεκτικός ενώ τα επίπεδα των πληθυσμών κυμαίνονταν από  $RR = 0,65-236$ . Στην δραστική ουσία fenbutatin oxide τα επίπεδα ανθεκτικότητας ήταν χαμηλότερα με μεγαλύτερο συντελεστή ανθεκτικότητας  $RR = 8.82$  που ανέπτυξε ο πληθυσμός TU5 όπως φαίνεται και στον πίνακα 10.

Οι υπό μελέτη πληθυσμοί δεν εμφάνισαν ανθεκτικότητα στις δραστικές ουσίες spirodiclofen και abamectin. Επιπλέον συγκρίνοντας το  $LC_{95}$  (συγκέντρωση που απαιτείται για να σκοτωθεί το 95% των ατόμων) με τις συνιστώμενες συγκεντρώσεις των σκευασμάτων (96 ppm και 10,8 ppm για το spirodiclofen και abamectin αντίστοιχα) διαπιστώσαμε ότι αυτό ήταν σε όλους τους πληθυσμούς κατά πολύ μικρότερο των αντίστοιχων συνιστώμενων συγκεντρώσεων επιβεβαιώνοντας ότι τα ακαρεοκτόνα αυτά είναι αποτελεσματικά.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ :

Με τοξικολογικές βιοδοκιμές χαρακτηρίσαμε τα επίπεδα ανθεκτικότητας του *T. urticae* σε δραστικές ουσίες που ανήκουν σε διάφορες ομάδες ακαρεοκτόνων (abamectin, bifenthrin, fenbutatin oxide και spiroticlofen), συγκρίνοντας τα  $LC_{50}$  με αυτά ενός ευαίσθητου πληθυσμού αναφοράς του GSS.

Κανένας δεν βρέθηκε ανθεκτικός στο abamectin, και στο spiroticlofen σε αντίθεση με το bifenthrin και το fenbutatin oxide όπου βρέθηκαν ανθεκτικοί πληθυσμοί.

Γενικά οι πληθυσμοί έδειξαν διάφορα επίπεδα ανθεκτικότητας στο **bifenthrin** με RR από 0,65 έως 236. Το μεγαλύτερο RR (236) παρουσιάστηκε σε έναν πληθυσμό (TU4) ο οποίος συλλέχθηκε από υπαίθρια καλλιέργεια φασολιού από την περιοχή Άρβη- Λατόμια που βρίσκεται στην νότια Κρήτη όπου συναντώνται πολλές εντατικές καλλιέργειες. Ο συγκεκριμένος πληθυσμός είχε δεχθεί προηγούμενες επεμβάσεις με πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα ίσως το γεγονός αυτό να οδήγησε στην ύπαρξη ανθεκτικότητας. Παλιότερες έρευνες αναφέρουν επίσης ότι με την πάροδο του χρόνου όσο περισσότερες επεμβάσεις δέχεται ένας πληθυσμός με bifenthrin τόσο αυξάνονται τα επίπεδα ανθεκτικότητας του (Herron G., 2001). Στην Ελλάδα, τα επίπεδα ανθεκτικότητας στο bifenthrin ελέγχθησαν σε 11 πληθυσμούς από υπαίθριες και θερμοκηπιακές καλλιέργειες λαχανικών και καλλωπιστικών και κυμαίνονταν από 1 (απουσία ανθεκτικότητας) έως ~ 2500 σε έναν πληθυσμό από καλλιέργεια τριαντάφυλλου σε θερμοκήπιο του Μαραθώνα (Tsagkarakou *et al.*, 2009).

Χαμηλά επίπεδα ανθεκτικότητας εμφανίστηκαν στην δραστική ουσία **fenbutatin oxide** με RR από 1.52 έως 8.82. Τα υψηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας εμφάνισε ο πληθυσμός TU5 ο οποίος προέρχεται από την περιοχή της Ιεράπετρας και συλλέχθηκε από θερμοκήπιο τομάτας. Ο πληθυσμός αυτός είχε ψεκαστεί με εννέα διαφορετικές δραστικές ουσίες οι οποίες δεν ανήκαν στην ομάδα των οργανοκασσιτερούχων εντομοκτόνων όπως το fenbutatin oxide. Άλλες αναφορές για ανθεκτικότητα στη δραστική αυτή έχουν αναφερθεί και στην Κορέα με RR < 40 (Kim *et al.*, 2006) καθώς επίσης και στο Βέλγιο με RR = 500 (Van Leeuwen *et al.*, 2005).

Κανένας πληθυσμός δεν βρέθηκε ανθεκτικός στην δραστική ουσία **abamectin** παρόλο που οι περισσότεροι είχαν δεχθεί επέμβαση στο παρελθόν με τη συγκεκριμένη

ουσία. Οι τιμές του RR ήταν πολύ χαμηλές. Ίσως ήταν πολύ ορθολογική η χρήση των φυτοφαρμάκων από τους παραγωγούς ή πιθανώς η εναλλαγή χρήσης δραστικών ουσιών διαφορετικών ομάδων βοήθησε στην αποφυγή ανάπτυξης διασταυρωτής ανθεκτικότητας. Σημειώνεται ότι στην Ελλάδα έχουν αναφερθεί υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στο abamectin RR = 250 (Μπιρουράκη, πτυχιακή εργασία 2008), σε έναν πληθυσμό από θερμοκήπιο τριανταφυλλιάς στον Μαραθώνα που δεχόταν πολύ συχνούς ψεκασμούς. Παρομοίως υπάρχουν διεθνείς αναφορές που δείχνουν την ανάπτυξη ανθεκτικότητας του *T. urticae* στο abamectin (Campos *et al.*, 1995, Beers *et al.*, 1998, Stumpf and Nauen, 2002) με RR πάνω από 668 (Sato *et al.*, 2005).

Κανένας από τους πληθυσμούς που ελέχθησαν στην παρούσα εργασία δεν εμφάνισε ανθεκτικότητα στην δραστική **spirodiclofen**. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο ότι είναι νέα η είσοδος της στην αντιμετώπιση του τετρανύχου. Οι πληθυσμοί που χρησιμοποιήθηκαν δεν ψεκάστηκαν ποτέ με την συγκεκριμένη δραστική γιατί δεν υπήρχε σε εμπορική μορφή την περίοδο της διεξαγωγής των τοξικολογικών βιοδοκιμών. Σε αντίθεση με τα δικά μας αποτελέσματα, στην Ελλάδα έχει αναφερθεί ανθεκτικότητα στο spirodiclofen (RR > 60) σε δύο πληθυσμούς από καλλωπιστικές καλλιέργειες (Μπιρουράκη, πτυχιακή εργασία 2008). Οι δύο αυτοί πληθυσμοί δεν είχαν δεχθεί επεμβάσεις με spirodiclofen και τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι είναι δυνατή η ύπαρξη διασταυρούμενης ανθεκτικότητας. Επιπλέον άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι μετά από συνεχή επιλεκτική πίεση (επιλογές με spirodiclofen) είναι δυνατόν να εμφανιστούν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας (RR = 274) η οποία όμως ήταν ασταθής (Pottelberge S.*et al.*, 2009).

Για την αποφυγή εμφάνισης ανθεκτικότητας θα πρέπει να λαμβάνονται ορισμένα μέτρα. Η συνεχής ανάπτυξη νέων φυτοφαρμάκων με νέους τρόπους δράσης και ασφαλή για το περιβάλλον θα μπορούσε να βοηθήσει σημαντικά. Απαραίτητη κρίνεται η σωστή χρήση των ήδη υπαρχόντων φυτοπροστατευτικών προϊόντων με εναλλαγή σκευασμάτων για κάθε καλλιέργεια θα μπορούσε επίσης να φανεί χρήσιμη. Η συχνή ενημέρωση των παραγωγών από καταρτισμένους γεωπόνους για την είσοδο νέων δραστικών ουσιών, την ορθολογική χρήση των εντομοκτόνων, την σοβαρότητα της ανθεκτικότητας που οδηγεί σε αναποτελεσματικότητα της χημικής καταπολέμησης όπως επίσης και τους κινδύνους που μπορεί να προκύψουν για τον άνθρωπο και το

περιβάλλον με την αλόγιστη χρήση τοξικών ουσιών.

**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ :**

- Βόντας Γ., Ροδιτάκης Ε., Τσαγκαράκου Α., 2007. Η μοριακή βάση της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα: παραδείγματα ζωικών εχθρών ελληνικού γεωπονικού ενδιαφέροντος. Γεωτεχνικά Θέματα 18 : 60 - 68
- Ζιώγας Β. Ν., Μάρκογλου Α. Ν., 2007. Γεωργική Φαρμακολογία. Αθήνα .
- Ιωαννίδης Δρ.Φ., 1991, Ανθεκτικότητα των εντόμων στα εντομοκτόνα, Γεωργία-Κτηνοτροφία 6, σελ 55 - 60
- Κωβαίος Δ. 1999. Ακαρολογία σελ 58 - 59 και 82 – 84
- Μπιρουράκη Α., 2008. Επίπεδα ανθεκτικότητας του φυτοφάγου ακάρεος *Tetranychus urticae* (Acari : Tetranychidae) από την αττική και την Πελοπόννησο σε ακαρεοκτόνα σκευάσματα. Πτυχιακή Εργασία
- Παπαδούλης Γ. Θ., Ν. Γ. Εμμανουήλ, Ε. Β. Καπαξίδη. 2009. Τα αρπακτικά ακάρεα Phytoseiidae της Ελλάδας και της Κύπρου. (Acari : Mesostigmata) 13ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο Αλεξανδρούπολη 2009
- Παπαιωάννου-Σουλιώτη Δρ.Π, 1994. Ολοκληρωμένη καταπολέμηση των ακάρεων και εφαρμογή της βιολογικής καταπολέμησης στις υπό κάλυψη καλλιέργειες. Γεωτεχνικό επιμελητήριο Ελλάδας παράρτημα Κρήτης. Ολοκληρωμένη Αντιμετώπιση Εχθρών και Ασθενειών κηπευτικών σε θερμοκήπια
- Παπαιωάννου-Σουλιώτη Δρ.Π, 1998. Σημειώσεις γενικής και ειδικής ακαρολογίας σελ 5 - 8 και 14
- Παπαιωάννου-Σουλιώτη Δρ.Π, 2001. Γεωργία-Κτηνοτροφία 5
- Τζανακάκης Μ.Ε., 1995. Εντομολογία σελ 236-24
- Ay R, Gurkan MO 2005. Resistance to bifenthrin and resistance mechanisms of different strains of the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) from Turkey. Phytop. 33 : 237 – 244
- Beers, E.H., Riedl, H., Dunley, J.E., 1998. Resistance to abamectin and reversion to susceptibility to fenbutatin oxide in spider mite (Acari : Tetranychidae) populations in the Pacific Northwest. J. Econ. Entomol. 91, 352 - 360

- Bonnemaison B.L., 1964. Les enemies animaux des plantes cultivees et des forets. Inst nat de la Rech Agronom. Editions Paris, 104 - 119.
- Campos, F., Dybas, R.A., Krupa, D.A., 1995. Susceptibility of 2-spotted spider-mite (Acari, Tetranychidae) populations in California to abamectin. J. Econ. Entomol. 88, 225e231
- Croft BA, Miller RW, Nelson RD, Westigard PH 1984. Inheritance of early-stage resistance to formetanate and cyhexatin in *Tetranychus urticae* Koch (Acarina, Tetranychidae). J Econ Entomol 77 : 574 – 578
- Edge VE, James DG 1982 Detection of cyhexatin resistance in twospotted mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acarina, Tetranychidae) in Australia. J Austr Entomol Soc 21: 198–198
- Farnham AW, Dennehy TJ, Denholm I, White JC 1992. The microimmersion bioassay : a novel method for measuring acaricidal activity and for characterizing resistance in spider mites. Brighton Crop Protection Conference – Pest and diseases 1992. The Brit Crop Protect1 : 257 – 262
- Ffrench-Constant, R.H. 1993. The molecular and population genetics of cyclodiene insecticide resistance. Insect Biochem. Molec. Biol. 24
- Georgiou, G.P. and G.E. TAYLOR., 1986. Factors influencing the evolution of resistance:In strategies and tactics for management. Nat Academ Press, Washington DC
- Georgiou, G.P. 1987. Insecticides and pest resistance : the consequences of abuse. 36 th Annu. Fac. Res. Lecture, Univ. Calif. Riverside, 27
- Helle, W., 1984. Aspects of pesticide resistance in mites, pp 122 - 131. In D. A. Griffiths and C. E. Bowman (Eds.), Acarol VI, Vol. 1. Ellis Horwood Limited, Chichester.
- Herron G.A., Rophail J. and Wilson L.J. 2001. The development of bifenthrin resistance in two-spotted spider mite (Acari : Tetranychidae) from Australian cotton. Exp Appl Acar 25 : 301 – 310
- Herron GA, Learmonth SE, Rophail J, Barchia I 1997. Clofentezine and fenbutatin oxide resistance in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari :

- Tetranychidae) from deciduous fruit tree orchards in Western Australia. *Exp Appl Acarol* 21 : 163 – 169
- Khajehali J., Leeuwen T V., Grispou M., Morou E., Alout H., Weill M., Tirry L., Vontasc J., and Tsagkarakou A. 2009. Acetylcholinesterase pointmutations in European strains of *Tetranychus urticae* (Acari : Tetranychidae) resistant to organophosphates. *Pest Manag Sci* 66 : 220 – 228
- Kim Y.J., Park H.M., Cho J.R and Ahn Y.J. 2006. Multiple resistance and biochemical mechanisms of pyridaben resistance in *Tetranychus urticae* (Acari : Tetranychidae). *J Econ Entomol.*, 99 (3) : 954 - 958
- Kwon D. H., Im J. S., Ahn J. J, Lee J-H , Marshall C. J.and Lee H. S. 2010 a. Acetylcholinesterase point mutations putatively associated with monocrotophos resistance in the two-spotted spider mite. *Pest Bioch and Physiol* 96 (36 – 42)
- Kwon D. H., Yoon† K. S, Clark† J. M. and Lee S. H. 2010 b. A point mutation in a glutamate-gated chloride channel confers abamectin resistance in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. *Insect Mol Biol* 19 (4), 583 – 591
- Leeuwen T.V, Stillatus V, Tirry L 2004. Genetic analysis and cross-resistance spectrum of a laboratory-selected chlorfenapyr resistant strain of two-spotted spider mite (Acari : Tetranychidae). *Exp Appl Acarol* 32 : 249 – 261
- Leeuwen T.V., Pottelberge S.V. and Tiry L. 2005. Comparative acaricide susceptibility and detoxifying enzyme activities in field-collected resistant and susceptible strains of *Tetranychus urticae*. *Pest Manag Sci*, 61 : 499 - 507
- Leeuwen T.V, Vontas J, Tsagkarakou A, Tirry L 2009. Mechanisms of Acaricide Resistance in the Two-Spotted Spider Mite *Tetranychus urticae*. *Bio con of Arthr pest.* 10 : 347 - 393
- Leeuwen T.V, Vontas J, Tsagkarakou A, Dermauw W. and Tirry L 2010. Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari : A review. *Insect Bioch and Molec Biol*, 40 : 563 - 572
- Malais M., Ravensberg W.J., 1995. Γνωρίζοντας και αναγνωρίζοντας Koppert B.S σελ 1 - 2 και εικόνες από αυτές.



- Pottelberge S. V., Leeuwen T. V., Khajehali J., Tirry L. 2009. Genetic and biochemical analysis of a laboratory-selected spiroadiclofen-resistant strain of *Tetranychus urticae* Koch (Acari : Tetranychidae) Pest manag Sci 65 : 358 - 366
- Rauch N, Nauen R., 2002. Spiroadiclofen resistance risk assessment in *Tetranychus urticae* (Acari : Tetranychidae) : a biochemical approach. Pest Bioch Physiol 74 : 91 – 101
- Sato, M.E., Da Silva, M.Z., Raga, A., De souza M.F., 2005. Abamectin resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari : Tetranychidae) : selection. Cross-resistance and stability of resistance. Neotrop.Entomol. 34, 991 – 998
- Smissaert, H.R., 1964. Cholinesterase inhibition in spider mites susceptible to resistant to organophosphate. Science 143, 129e131.
- Stumpf N. and Nauen R 2002. Biochemical Markers Linked to Abamectin Resistance in *Tetranychus urticae* (Acari : Tetranychidae) Pest. Biochem. Physiol. 72, 111 - 121
- Stumpf N., Zebitz C.P., Kraus W., Moores G.D. and Nauen R. 2002. Resistance to organophosphates and biochemical genotyping of acetylcholinesterases in *Tetranychus urticae* (Acari : Tetranychidae). Pest. Bioch. Physiol.69, 131 - 142
- Tsagkarakou A., Navajas M., Cuany A., Chevillon C., Pasteur N. 2002. Mechanisms of resistance to organophosphates in *Tetranychus urticae* (Acari : Tetranychidae) from Greece. Insect. Biochem. Mol. Biol. 32 (4) : 417 - 24.
- Tsagkarakou A, Van Leeuwen T, Khajehali J, Ilias A, Grispou M, Williamson MS, Tirry L, Vontas J. 2009. Identification of pyrethroid resistance mutations in the para sodium channel of the twospotted spider mite *Tetranychus urticae* (Acari : Tetranychidae) Insect Molec Biol **18**(5), 583–593
- Wrench, D.L. 1985. Reproductive parameters, pp 165 - 170. In W. Helle and M. W. Sabelis (Eds), Spider mites. Their biology, natural enemies and control. Vol. 1A, World Crop Pests, Elsevier, Amsterdam.
- <http://www.irac-online.org>
- <http://www.koppert.com/>
- [http://www.minagric.gr/Scripts/skeyasma\\_DRAST.pl.cgi?id=18](http://www.minagric.gr/Scripts/skeyasma_DRAST.pl.cgi?id=18)
- <http://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/spmweb/>

**6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ :**

Analyzed file : TAL\_GSS.PLD

Date : 7/21/7

Insectide : bifethrin\_GSS\_20/02/07

% control mortality : 0 (0 / 68)

N	Killed	Total	Dose	Observed mortality	Corrected mortality
1	0	54	0.3	0	0
2	2	30	1	6.7	6.7
3	6	38	3	15.8	15.8
4	8	42	10	19.1	19.1
5	24	25	30	96	96

Iterations : 10  $Y = 2.99413 + 1.78656 * X$   $p(X^2 = 18.0897, df = 2) = 0.0001$

Point #	Observed dead	Expected dead	X <sup>2</sup>	Contribution
1	0	0.00	---	---
2 *	2	0.67	2.6762	2.6762
3 *	6	4.73	0.3924	0.3924
4	8	17.35	8.5931	8.5931
5	24	18.42	6.4280	6.4280

A star (\*) after the point number indicates that an eventual high X<sup>2</sup> contribution of the point may be due to a low or high expected dead value.

Heterogeneity = 9.04484 with 2 degree of freedom.

n	Dose	Mortality corr (%)	probit treated	Total	Killed	Killed expected	X <sup>2</sup> contribution
1	0.3000	0.0	---	54	0	0.00*	---
2	1.0000	6.7	3.4987	30	2	0.67*	2.6762
3	3.0000	15.8	3.997	38	6	4.73*	0.3924
4	10.0000	19.0	4.1241	42	8	17.35	8.5931
5	30.0000	96.0	6.7512	25	24	18.42	6.4280

LC	Level of conf.	Range
01 = 0.66133	0.95	0.03992 < LC < 10.27557
02 = 0.93973	0.95	0.07951 < LC < 10.50924
03 = 1.17446	0.95	0.12258 < LC < 10.70812
04 = 1.38886	0.95	0.16923 < LC < 10.89333
05 = 1.59197	0.95	0.21950 < LC < 11.07309
10 = 2.54330	0.95	0.52347 < LC < 11.99299
20 = 4.48532	0.95	1.37072 < LC < 14.45251
30 = 6.75320	0.95	2.42797 < LC < 18.69014
40 = 9.57753	0.95	3.48485 < LC < 26.42586
50 = 13.26816	0.95	4.37533 < LC < 40.73097
60 = 18.38093	0.95	5.06689 < LC < 68.06398
70 = 26.06824	0.95	5.59998 < LC < 124.97701
80 = 39.24890	0.95	6.02607 < LC < 266.03886
90 = 69.21860	0.95	6.39702 < LC < 790.81447
95 = 110.58251	0.95	6.58833 < LC < 1983.31505
96 = 126.75420	0.95	6.63099 < LC < 2598.07596
99 = 266.19613	0.95	6.79325 < LC < 11398.49124

Regression line :  $Y = A + \text{slope} * (X - M)$   $A = 4.62770$  (SE : 0.13065) -Probit unit-  $\text{slope} = 1.7866$  (SE : 0.9235)

$M = 0.9144$  in log<sub>10</sub>(dose) unit and 8.2105 in dose unit

Variance of the LC<sub>50</sub> : 0.00663095 in log<sub>10</sub>(dose) unit

Heterogeneity = 9.04484 with 2 df

Analyzed file : TAL\_HER.PLD

Date : 7/21/7

Insectide : **TALSTAR HER 18/7/06**

% control mortality : 3.0303 (2 / 66)

N	Killed	Total	Dose	Observed mortality	Corrected mortality (1st estimation)
1	2	36	3	5.6	2.6
2	7	51	5	13.8	11
3	10	53	10	18.9	16.3
4	12	35	100	34.3	32.2
5	15	25	500	60	58.8

Iterations : 8

$Y = 3.16443 + 0.742602 * X$  Natural mortality (last estimation) 3 %  $p(X^2 = 1.68261, df = 3) = 0.6409$

The data are well represented by a line

n	Dose	Mortality corr (%)	probit treated	Total	Killed expected	Killed contribution	X <sup>2</sup>	
1	3.0000	2.7	3.0403	36	2	3.48*	0.9374	
2	5.0000	11.1	3.7701	51	7	6.15	0.1674	
3	10.0000	16.4	4.0158	53	10	8.61	0.3075	
4	100.0000	32.3		4.5374	35	12	13.36	0.2282
5	500.0000	58.8		5.2197	25	15	14.49	0.0421

LC	Level of conf.	Range
01 = 0.21809	0.95	0.00768 < LC < 1.01818
02 = 0.50784	0.95	0.02995 < LC < 1.91603
03 = 0.86835	0.95	0.07071 < LC < 2.87653
04 = 1.29984	0.95	0.13438 < LC < 3.91935
05 = 1.80508	0.95	0.22592 < LC < 5.05778
10 = 5.57175	0.95	1.29621 < LC < 12.58310
20 = 21.81585	0.95	9.02213 < LC < 45.21935
30 = 58.38794	0.95	28.35115 < LC < 146.72724
40 = 135.32905	0.95	63.23470 < LC < 477.74656
50 = 296.44935	0.95	122.95587 < LC < 1561.95401
60 = 649.39655	0.95	229.63051 < LC < 5316.82538
70 = 1505.14338	0.95	438.24064 < LC < 20232.09828
80 = 4028.36491	0.95	918.82228 < LC < 98394.30624
90 = 15772.83115	0.95	2524.26694 < LC < 895850.52452
95 = 48686.09839	0.95	5770.56837 < LC < 5593787.74987
96 = 67610.12268	0.95	7336.03622 < LC < 9546059.93356
99 = 402957.45249	0.95	26927.60295 < LC < 175240408.42293

Regression line :  $Y = A + \text{slope} * (X - M)$

A = 4.29714 (SE : 0.11819) -Probit unit-

slope = 0.7426 (SE : 0.1475)

M = 1.5253 in log10(dose) unit and 33.5220 in dose unit

Analyzed file : TAL\_TU1.PLD

Date : 3/6/7

Insectide : bifethrin\_tu1\_20/02/07

% control mortality : 2.04082 (2 / 98)

N	Killed	Total	Dose	Observed mortality	Corrected mortality (1st estimation)
1	5	78	3	6.5	4.4
2	5	68	10	7.4	5.4
3	17	65	30	26.2	24.6
4	33	65	100	50.8	49.7
5	45	65	300	69.3	68.6

Iterations : 13

Y = 2.39261 + 1.26442 \* X Natural mortality (last estimation) 2.5 % p(X<sup>2</sup> = 2.67101, df = 3) = 0.4454

The data are well represented by a line

n	Dose	Mortality corr (%)	probit treated	Total	Killed expected	Killed contribution	X <sup>2</sup>	
1	3.0000	4.1	3.2897	78	5	3.59*	1.1520	
2	10.0000	5.1	3.3857	68	5	7.59	1.2054	
3	30.0000	24.3	4.3113	65	17	16.14	0.0644	
4	100.0000	49.6		4.9924	65	33	31.30	0.1792
5	300.0000	68.5		5.483	65	45	45.98	0.0700

LC	Level of conf.	Range
01 = 1.66722	0.95	0.49906 < LC < 3.56919
02 = 2.73895	0.95	0.95096 < LC < 5.37004
03 = 3.75324	0.95	1.42991 < LC < 6.96821
04 = 4.75662	0.95	1.94155 < LC < 8.48373
05 = 5.76836	0.95	2.48874 < LC < 9.96447
10 = 11.18239	0.95	5.79623 < LC < 17.42747
20 = 24.92740	0.95	15.71109 < LC < 35.22258
30 = 44.44054	0.95	31.01835 < LC < 60.83701
40 = 72.80900	0.95	53.01473 < LC < 101.45903
50 = 115.39766	0.95	83.80875 < LC < 170.51371
60 = 182.89797	0.95	128.34859 < LC < 295.81420
70 = 299.65026	0.95	198.27574 < LC < 545.80967
80 = 534.21611	0.95	324.69296 < LC < 1136.57201
90 = 1190.85658	0.95	633.93525 < LC < 3189.13021
95 = 2308.56418	0.95	1094.10749 < LC < 7526.67776
96 = 2799.59655	0.95	1281.75102 < LC < 9672.92567
99 = 7987.32366	0.95	3019.71662 < LC < 37967.24669

Regression line : Y = A + slope \* (X - M)

A = 4.68156 (SE : 0.08775) -Probit unit-

slope = 1.2644 (SE : 0.1542)

M = 1.8103 in log10(dose) unit and 64.6056 in dose unit

Variance of the LC50 : 0.0057603 in log10(dose) unit

Analyzed file : TALS\_TU2.PLD

Date : 7/21/7

Insectide : talstar tu2 18/7/06

% control mortality : 1.92308 (1 / 52)

N	Killed	Total	Dose	Observed mortality	Corrected mortality (1st estimation)
1	7	59	3	11.9	10.1
2	12	57	5	21.1	19.5
3	9	61	10	14.8	13
4	28	33	100	84.9	84.6
5	39	46	500	84.8	84.5

Iterations : 7

Y = 3.12493 + 1.15841 \* X Natural mortality (last estimation) 2.1 % p(X<sup>2</sup> = 10.435, df = 3) = 0.0153

Point #	Observed dead	Expected dead	X <sup>2</sup> Contribution
1	7	6.56	0.0383
2	12	9.15	1.1585
3	9	15.38	3.6921
4	28	22.35	4.3792
5 *	39	41.25	1.1669

A star (\*) after the point number indicates that an eventual high X<sup>2</sup> contribution of the point may be due to a low or high expected dead value.

Heterogeneity = 3.47832 with 3 degree of freedom.

n	Dose	Mortality corr (%)	probit treated	Total	Killed expected	Killed contribution	X <sup>2</sup>	
1	3.0000	10.1	3.7209	59	7	6.56	0.0383	
2	5.0000	19.4	4.1378	57	12	9.15	1.1585	
3	10.0000	13.0	3.8734	61	9	15.38	3.6921	
4	100.0000	84.5		6.0168	33	28	22.35	4.3792
5	500.0000	84.5		6.014	46	39	41.25*	1.1669

LC	Level of conf.	Range
01 = 0.40750	0.95	0.06668 < LC < 2.23836
02 = 0.70057	0.95	0.14091 < LC < 3.17734
03 = 0.98809	0.95	0.22577 < LC < 3.98204
04 = 1.27969	0.95	0.32109 < LC < 4.72968
05 = 1.57952	0.95	0.42693 < LC < 5.45043
10 = 3.25325	0.95	1.11624 < LC < 9.01919
20 = 7.80407	0.95	3.37085 < LC < 17.60156
30 = 14.66913	0.95	6.96936 < LC < 30.60101
40 = 25.14388	0.95	12.12017 < LC < 52.46328
50 = 41.56706	0.95	19.16656 < LC < 91.91889
60 = 68.71731	0.95	28.94237 < LC < 168.65525
70 = 117.78616	0.95	43.41795 < LC < 335.19706
80 = 221.39986	0.95	67.72369 < LC < 772.44284
90 = 531.10657	0.95	121.56467 < LC < 2536.10233
95 = 1093.89197	0.95	194.00754 < LC < 6875.34884
96 = 1350.18418	0.95	221.92884 < LC < 9209.34532
99 = 4240.02323	0.95	456.83707 < LC < 45517.52703

Regression line : Y = A + slope \* (X - M)

A = 4.64098 (SE : 0.09929) -Probit unit-

slope = 1.1584 (SE : 0.2380)

M = 1.3087 in log10(dose) unit and 20.3583 in dose unit

Variance of the LC50 : 0.0085121 in log10(dose) unit

Heterogeneity = 3.47832 with 3 df

Analyzed file : TAL\_TU3.PLD

Date : 2/10/7

Insectide : talstar tu3 7/02/07

% control mortality : 1.07527 (1 / 93)

N	Killed	Total	Dose	Observed mortality	Corrected mortality (1st estimation)
1	2	88	3	2.3	1.2
2	6	84	10	7.2	6.1
3	8	83	30	9.7	8.6
4	16	74	100	21.7	20.7
5	21	55	300	38.2	37.5

Iterations : 6

Y = 2.39249 + 0.908655 \* X Natural mortality (last estimation) 1.2 %  $p(X^2 = 0.882896, df = 3) = 0.8296$

The data are well represented by a line

n	Dose	Mortality corr (%)	probit treated	Total	Killed expected	Killed contribution	X <sup>2</sup>
1	3.0000	1.2	2.7129	88	2	2.26*	0.0532
2	10.0000	6.1	3.4482	84	6	4.64*	0.5188
3	30.0000	8.6	3.6318	83	8	9.36	0.2411
4	100.0000	20.7	4.183	74	16	16.53	0.0224
5	300.0000	37.5	4.6805	55	21	20.22	0.0475

LC	Level of conf.	Range
01 = 2.03724	0.95	0.26780 < LC < 5.56581
02 = 4.06485	0.95	0.76979 < LC < 9.43907
03 = 6.30139	0.95	1.49691 < LC < 13.26501
04 = 8.76223	0.95	2.45838 < LC < 17.20241
05 = 11.45937	0.95	3.66815 < LC < 21.33298
10 = 28.78739	0.95	13.83533 < LC < 46.76047
20 = 87.83234	0.95	54.71297 < LC < 152.65687
30 = 196.36853	0.95	117.96015 < LC < 448.07441
40 = 390.32362	0.95	209.79692 < LC < 1217.48845
50 = 740.88055	0.95	348.91659 < LC < 3182.65306
60 = 1406.27918	0.95	572.57635 < LC < 8431.88103
70 = 2795.27474	0.95	965.87075 < LC < 24155.57515
80 = 6249.45175	0.95	1771.04043 < LC < 83365.56871
90 = 19067.51249	0.95	4079.63439 < LC < 467231.69833
95 = 47900.02228	0.95	8100.21255 < LC < 1945479.73065
96 = 62644.29949	0.95	9888.25568 < LC < 2948931.04281
99 = 269435.69294	0.95	29185.48638 < LC < 28347763.12991

Regression line : Y = A + slope \* (X - M)

A = 4.05168 (SE : 0.09402) -Probit unit-

slope = 0.9087 (SE : 0.1655)

M = 1.8260 in log10(dose) unit and 66.9868 in dose unit

Analyzed file : TALF\_TU4.PLD

Date : 7/21/7

Insectide : talstar 5/3/07 tu4

% control mortality : 2.0202 (2 / 99)

N	Killed	Total	Dose	Observed mortality	Corrected mortality (1st estimation)
1	5	83	10	6.1	4
2	6	82	30	7.4	5.4
3	12	81	100	14.9	13
4	22	98	300	22.5	20.8
5	24	63	1000	38.1	36.8

Iterations : 10

Y = 2.33107 + 0.763344 \* X Natural mortality (last estimation) 2.3 % p(X<sup>2</sup> = 0.579716, df = 3) = 0.9011

The data are well represented by a line

n	Dose	Mortality corr (%)	probit treated	Total	Killed expected	Killed contribution	X <sup>2</sup>	
1	10.0000	3.9	3.2477	83	5	4.13*	0.3330	
2	30.0000	5.2	3.3842	82	6	6.75	0.1171	
3	100.0000	12.9		3.8722	81	12	11.82	0.0037
4	300.0000	20.7		4.1858	98	22	23.08	0.0693
5	1000.0000	36.7		4.6622	63	24	23.10	0.0566

LC	Level of conf.	Range
01 = 2.80757	0.95	0.17389 < LC < 10.07196
02 = 6.38917	0.95	0.65132 < LC < 18.55605
03 = 10.76660	0.95	1.49894 < LC < 27.47119
04 = 15.94090	0.95	2.79525 < LC < 37.03447
05 = 21.94039	0.95	4.62663 < LC < 47.38649
10 = 65.68082	0.95	24.95197 < LC < 115.46109
20 = 247.80591	0.95	145.20503 < LC < 448.96569
30 = 645.72061	0.95	368.66850 < LC < 1677.33958
40 = 1462.82533	0.95	723.51975 < LC < 5835.51614
50 = 3136.87951	0.95	1307.27230 < LC < 19383.32485
60 = 6726.71773	0.95	2324.44813 < LC < 65424.30780
70 = 15238.80906	0.95	4268.65438 < LC < 243243.16314
80 = 39708.54912	0.95	8640.96314 < LC < 1139807.95544
90 = 149815.62110	0.95	22822.56265 < LC < 9765261.04967
95 = 448488.43502	0.95	50728.20535 < LC < 57732396.69484
96 = 617281.00652	0.95	63995.24841 < LC < 96920113.50486
99 = 3504809.39839	0.95	225833.40691 < LC < 1623343167.03587

Regression line : Y = A + slope \* (X - M)

A = 4.10181 (SE : 0.08710) -Probit unit-

slope = 0.7633 (SE : 0.1499)

M = 2.3197 in log10(dose) unit and 208.7916 in dose unit

Analyzed file : TAL\_TU5.PLD

Date : 7/21/7

Insectide : **TALSTAR 27/11/06 TU5**

% control mortality : 0 (0 / 70)

N	Killed	Total	Dose	Observed mortality	Corrected mortality
1	2	89	3	2.3	2.3
2	4	70	10	5.8	5.8
3	22	69	30	31.9	31.9
4	33	41	100	80.5	80.5
5	32	33	300	97	97

Iterations : 7

$Y = 1.50978 + 2.10816 * X$   $p(X^2 = 4.97145, df = 3) = 0.1740$

The data are well represented by a line

n	Dose	Mortality corr (%)	probit treated	Total	Killed expected	Killed contribution	X <sup>2</sup>
1	3.0000	2.2	2.9945	89	2	0.58*	3.5266
2	10.0000	5.7	3.4205	70	4	5.84	0.6345
3	30.0000	31.9	4.5296	69	22	24.38	0.3602
4	100.0000	80.5		5.8591	41	33 31.41	0.3439
5	300.0000	97.0		6.8769	33	32 31.63*	0.1063

LC	Level of conf.	Range
01 = 3.56380	0.95	1.95697 < LC < 5.40989
02 = 4.79977	0.95	2.81833 < LC < 6.98380
03 = 5.79806	0.95	3.54877 < LC < 8.22089
04 = 6.68337	0.95	4.21748 < LC < 9.29980
05 = 7.50290	0.95	4.85131 < LC < 10.28704
10 = 11.15976	0.95	7.80758 < LC < 14.61327
20 = 18.04941	0.95	13.67505 < LC < 22.71036
30 = 25.53104	0.95	20.12132 < LC < 31.78088
40 = 34.32926	0.95	27.51776 < LC < 43.05647
50 = 45.25089	0.95	36.30484 < LC < 58.01440
60 = 59.64716	0.95	47.29622 < LC < 79.16310
70 = 80.20207	0.95	62.13623 < LC < 111.64354
80 = 113.44652	0.95	84.73196 < LC < 168.57790
90 = 183.48446	0.95	128.93927 < LC < 301.54478
95 = 272.91342	0.95	181.42014 < LC < 489.96605
96 = 306.37857	0.95	200.27957 < LC < 564.72520
99 = 574.56702	0.95	341.82005 < LC < 1225.83102

Regression line :  $Y = A + \text{slope} * (X - M)$

A = 4.68800 (SE : 0.10211) -Probit unit-

slope = 2.1082 (SE : 0.2140)

M = 1.5076 in log10(dose) unit and 32.1799 in dose unit

Variance of the LC50 : 0.0025718 in log10(dose) unit



Analyzed file : TAL\_TU6.PLD

Date : 7/21/7

Insectide : **Talstar-Tu6-14-12-06**

% control mortality : 4.30108 (4 / 93)

N	Killed	Total	Dose	Observed mortality	Corrected mortality (1st estimation)
1	12	87	3	13.8	9.9
2	33	51	10	64.8	63.1
3	41	44	30	93.2	92.9
4	51	52	100	98.1	98

Iterations : 10

Y = 2.694 + 2.48656 \* X Natural mortality (last estimation) 4 %  $p(X^2 = 4.70911, df = 2) = 0.0951$

The data are well represented by a line

n	Dose	Mortality corr (%)	probit treated	Total	Killed expected	Killed contribution	X <sup>2</sup>
1	3.0000	10.3	3.7083	87	12	14.39	0.5765
2	10.0000	63.3	5.3337	51	33	30.01	0.7164
3	30.0000	92.9	6.4664	44	41	40.37*	0.1144
4	100.0000	98.0		7.0519	52	51	51.81*
							3.3018

LC	Level of conf.	Range
01 = 0.98101	0.95	0.48621 < LC < 1.54157
02 = 1.26271	0.95	0.67258 < LC < 1.90153
03 = 1.48210	0.95	0.82579 < LC < 2.17394
04 = 1.67185	0.95	0.96316 < LC < 2.40531
05 = 1.84411	0.95	1.09132 < LC < 2.61259
10 = 2.58210	0.95	1.67044 < LC < 3.48045
20 = 3.88155	0.95	2.76897 < LC < 4.97605
30 = 5.20826	0.95	3.93880 < LC < 6.51813
40 = 6.69451	0.95	5.25330 < LC < 8.31455
50 = 8.46108	0.95	6.77549 < LC < 10.58330
60 = 10.69381	0.95	8.60912 < LC < 13.67394
70 = 13.74545	0.95	10.96477 < LC < 18.26573
80 = 18.44359	0.95	14.34476 < LC < 26.01521
90 = 27.72538	0.95	20.48862 < LC < 43.16632
95 = 38.82073	0.95	27.28247 < LC < 66.10240
96 = 42.82059	0.95	29.63083 < LC < 74.90461
99 = 72.97562	0.95	46.21746 < LC < 148.43382

Regression line : Y = A + slope \* (X - M)

A = 4.98497 (SE : 0.11921) -Probit unit-

slope = 2.4866 (SE : 0.2975)

M = 0.9213 in log10(dose) unit and 8.3434 in dose unit

Variance of the LC50 : 0.00229879 in log10(dose) unit

Analyzed file : GSS\_SPMA.PLD

Date : 3/1/8

Insectide : 25/2/08-gss-spirodiclofen

% control mortality : 0 (0 / 401)

N	Killed	Total	Dose	Observed mortality	Corrected mortality
1	130	475	1	27.4	27.4
2	329	341	3	96.5	96.5
3	438	441	10	99.4	99.4

Iterations : 9

$Y = 4.44614 + 4.25603 * X$   $p(X^2 = 191.867, df = 1) = 0.0000$

Point #	Observed dead	Expected dead	X <sup>2</sup> Contribution
1	130	137.67	0.6021
2	329	317.18	6.3097
3 *	438	440.95	184.9549

Heterogeneity = 191.867 with 1 degree of freedom.

n	Dose	Mortality corr (%)	probit treated	Total	Killed expected	Killed contribution	X <sup>2</sup>
1	1.0000	27.4	4.3987	475	130	137.67	0.6021
2	3.0000	96.5	6.81	341	329	317.18	6.3097
3	10.0000	99.3	7.468	441	438	440.95*	184.9549

LC	Level of conf.	Range
01 = 0.38322	0.95	0.04650 < LC < 3.15786
02 = 0.44412	0.95	0.06676 < LC < 2.95394
03 = 0.48770	0.95	0.08380 < LC < 2.83809
04 = 0.52326	0.95	0.09926 < LC < 2.75818
05 = 0.55412	0.95	0.11379 < LC < 2.69793
10 = 0.67454	0.95	0.18000 < LC < 2.52758
20 = 0.85593	0.95	0.30265 < LC < 2.42052
30 = 1.01634	0.95	0.42117 < LC < 2.45248
40 = 1.17690	0.95	0.53162 < LC < 2.60536
50 = 1.34946	0.95	0.62481 < LC < 2.91453
60 = 1.54732	0.95	0.69222 < LC < 3.45882
70 = 1.79176	0.95	0.72925 < LC < 4.40248
80 = 2.12754	0.95	0.73411 < LC < 6.16627
90 = 2.69966	0.95	0.69959 < LC < 10.41873
95 = 3.28637	0.95	0.65402 < LC < 16.51555
96 = 3.48016	0.95	0.63946 < LC < 18.94277
99 = 4.75188	0.95	0.55765 < LC < 40.49915

Regression line :  $Y = A + slope * (X - M)$

A = 4.97897 (SE : 0.05232) -Probit unit-

slope = 4.2560 (SE : 3.4123)

M = 0.1252 in log10(dose) unit and 1.3341 in dose unit

Variance of the LC50 : 0.000151204 in log10(dose) unit

Heterogeneity = 191.867 with 1 df

Analyzed file : SPIR\_HER.PLD

Date : 5/18/7

Insectide : **SPIRODICLOFEN her 26/09/06**

% control mortality : 5.92593 (8 / 135)

N	Killed	Total	Dose	Observed mortality	Corrected mortality (1st estimation)
1	113	172	1	65.7	63.5
2	128	130	2	98.5	98.4
3	96	97	3	99	99

Iterations : 6

$Y = 5.36067 + 5.08413 * X$  Natural mortality (last estimation) 6 %  $p(X^2 = 2.91962, df = 1) = 0.0878$

The data are well represented by a line

n	Dose	Mortality corr (%)	probit treated	Total	Killed expected	Killed contribution	X <sup>2</sup>
1	1.0000	63.5	5.3447	172	113	113.87	0.0192
2	2.0000	98.4	7.1358	130	128	126.42*	0.6788
3	3.0000	98.9	7.2919	97	96	96.76*	2.2216

LC	Level of conf.	Range
01 = 0.29609	0.95	0.17189 < LC < 0.40268
02 = 0.33499	0.95	0.20403 < LC < 0.44372
03 = 0.36230	0.95	0.22746 < LC < 0.47195
04 = 0.38429	0.95	0.24682 < LC < 0.49439
05 = 0.40317	0.95	0.26378 < LC < 0.51346
10 = 0.47531	0.95	0.33124 < LC < 0.58491
20 = 0.58018	0.95	0.43591 < LC < 0.68570
30 = 0.66991	0.95	0.53062 < LC < 0.77012
40 = 0.75742	0.95	0.62649 < LC < 0.85190
50 = 0.84934	0.95	0.72953 < LC < 0.93851
60 = 0.95241	0.95	0.84548 < LC < 1.03886
70 = 1.07683	0.95	0.98086 < LC < 1.16954
80 = 1.24335	0.95	1.14504 < LC < 1.36965
90 = 1.51767	0.95	1.37667 < LC < 1.75750
95 = 1.78926	0.95	1.58191 < LC < 2.18790
96 = 1.87717	0.95	1.64554 < LC < 2.33452
99 = 2.43634	0.95	2.03079 < LC < 3.33501

Regression line :  $Y = A + \text{slope} * (X - M)$

A = 5.66000 (SE : 0.09264) -Probit unit-

slope = 5.0841 (SE : 0.7340)

M = 0.0589 in log<sub>10</sub>(dose) unit and 1.1452 in dose unit

Variance of the LC50 : 0.000683208 in log<sub>10</sub>(dose) unit

Analyzed file : SPIR\_TU1.PLD

Date : 5/18/7

Insectide : **spirodiclofen tu1 12/09/06**

% control mortality : 6.12245 (9 / 147)

N	Killed	Total	Dose	Observed mortality	Corrected mortality (1st estimation)
1	18	138	1	13.1	7.3
2	107	158	3	67.8	65.6
3	137	156	10	87.9	87.1
4	176	178	100	98.9	98.9

Iterations : 16

Y = 4.14599 + 1.99606 \* X Natural mortality (last estimation) 5.1 % p(X<sup>2</sup> = 41.1448, df = 2) = 0.0000

Point #	Observed dead	Expected dead	X <sup>2</sup> Contribution
1	18	32.76	10.0007
2	107	88.89	8.3520
3	137	137.24	0.0033
4 *	176	177.86	22.7887

A star (\*) after the point number indicates that an eventual high X<sup>2</sup> contribution of the point may be due to a low or high expected dead value.

Heterogeneity = 20.5724 with 2 degree of freedom.

n	Dose	Mortality corr (%)	probit treated	Total	Killed expected	Killed contribution	X <sup>2</sup>
1	1.0000	8.4	3.5441	138	18	32.76	10.0007
2	3.0000	66.0	5.4007	158	107	88.89	8.3520
3	10.0000	87.2	6.1271	156	137	137.24	0.0033
4	100.0000	98.8		7.2583	178	176	177.86* 22.7887

LC	Level of conf.	Range
01 = 0.18290	0.95	0.01567 < LC < 2.11518
02 = 0.25048	0.95	0.02735 < LC < 2.27587
03 = 0.30580	0.95	0.03887 < LC < 2.38795
04 = 0.35532	0.95	0.05059 < LC < 2.47843
05 = 0.40149	0.95	0.06264 < LC < 2.55660
10 = 0.61064	0.95	0.12950 < LC < 2.86451
20 = 1.01466	0.95	0.30459 < LC < 3.36779
30 = 1.46346	0.95	0.54705 < LC < 3.90522
40 = 2.00078	0.95	0.86754 < LC < 4.60722
50 = 2.67854	0.95	1.26545 < LC < 5.66595
60 = 3.58590	0.95	1.72212 < LC < 7.46871
70 = 4.90247	0.95	2.20873 < LC < 10.89484
80 = 7.07095	0.95	2.71979 < LC < 18.42661
90 = 11.74930	0.95	3.33341 < LC < 41.57599
95 = 17.86983	0.95	3.79868 < LC < 84.50423
96 = 20.19179	0.95	3.93179 < LC < 104.27827
99 = 39.22766	0.95	4.66190 < LC < 332.61948

Regression line : Y = A + slope \* (X - M)

A = 5.18014 (SE : 0.07105) -Probit unit-

slope = 1.9961 (SE : 0.8218)

M = 0.5181 in log<sub>10</sub>(dose) unit and 3.2968 in dose unit

Variance of the LC<sub>50</sub> : 0.0013341 in log<sub>10</sub>(dose) unit

Heterogeneity = 20.5724 with 2 df

Analyzed file : SPIR\_TU2.PLD

Date : 5/18/7

Insectide : **spirodiclofen tu2 14/11/06**

% control mortality : 0.775194 (1 / 129)

N	Killed	Total	Dose	Observed mortality	Corrected mortality (1st estimation)
1	42	249	1	16.9	16.2
2	67	173	3	38.8	38.2
3	292	329	10	88.8	88.7
4	246	247	100	99.6	99.6

Iterations : 10

$Y = 3.90858 + 2.15634 * X$  Natural mortality (last estimation) 0.9 %  $p(X^2 = 13.9632, df = 2) = 0.0009$

Point #	Observed dead	Expected dead	X <sup>2</sup> Contribution
1	42	36.18	1.1484
2	67	83.00	5.9326
3	292	282.23	2.3630
4 *	246	246.84	4.5192

A star (\*) after the point number indicates that an eventual high X<sup>2</sup> contribution of the point may be due to a low or high expected dead value.

Heterogeneity = 6.98161 with 2 degree of freedom.

n	Dose	Mortality corr (%)	probit treated	Total	Killed	Killed expected	X <sup>2</sup> contribution
1	1.0000	16.1	4.0112	249	42	36.18	1.1484
2	3.0000	38.2	4.7	173	67	83.00	5.9326
3	10.0000	88.7	6.2086	329	292	282.23	2.3630
4	100.0000	99.6		7.6455	247	246	246.84* 4.5192

LC	Level of conf.	Range
01 = 0.26739	0.95	0.11282 < LC < 0.62733
02 = 0.35773	0.95	0.16416 < LC < 0.77254
03 = 0.43031	0.95	0.20813 < LC < 0.88235
04 = 0.49445	0.95	0.24866 < LC < 0.97560
05 = 0.55364	0.95	0.28730 < LC < 1.05913
10 = 0.81621	0.95	0.47011 < LC < 1.40893
20 = 1.30601	0.95	0.84391 < LC < 2.01312
30 = 1.83310	0.95	1.26935 < LC < 2.64021
40 = 2.44855	0.95	1.77080 < LC < 3.38054
50 = 3.20768	0.95	2.37058 < LC < 4.33833
60 = 4.20217	0.95	3.10382 < LC < 5.69248
70 = 5.61302	0.95	4.04391 < LC < 7.80424
80 = 7.87838	0.95	5.37632 < LC < 11.57979
90 = 12.60606	0.95	7.76182 < LC < 20.57323
95 = 18.58457	0.95	10.37225 < LC < 33.51160
96 = 20.80959	0.95	11.27081 < LC < 38.68358
99 = 38.48082	0.95	17.58641 < LC < 84.97776

Regression line :  $Y = A + \text{slope} * (X - M)$

A = 5.11464 (SE : 0.05407) -Probit unit-

slope = 2.1563 (SE : 0.3380)

M = 0.5593 in log<sub>10</sub>(dose) unit and 3.6250 in dose unit

Variance of the LC50 : 0.000638735 in log<sub>10</sub>(dose) unit

Heterogeneity = 6.98161 with 2 df

Analyzed file : SPIR\_TU3.PLD

Date : 5/18/7

Insectide : **spirodiclofen tu3 18/09/06**

% control mortality : 1.37931 (2 / 145)

N	Killed	Total	Dose	Observed mortality	Corrected mortality (1st estimation)
1	30	118	1	25.5	24.4
2	127	155	3	82	81.7
3	224	225	10	99.6	99.6

Iterations : 4

$Y = 4.30985 + 3.32693 * X$  Natural mortality (last estimation) 1.4 %  $p(X^2 = 0.00904565, df = 1) = 0.9242$

The data are well represented by a line

n	Dose	Mortality corr (%)	probit treated	Total	Killed expected	Killed contribution	X <sup>2</sup>
1	1.0000	24.4	4.3038	118	30	30.14	0.0009
2	3.0000	81.7	5.9026	155	127	126.75	0.0027
3	10.0000	99.5	7.6117	225	224	224.07*	0.0054

LC	Level of conf.	Range
01 = 0.32217	0.95	0.21504 < LC < 0.43091
02 = 0.38907	0.95	0.26958 < LC < 0.50718
03 = 0.43856	0.95	0.31109 < LC < 0.56257
04 = 0.47988	0.95	0.34642 < LC < 0.60828
05 = 0.51637	0.95	0.37806 < LC < 0.64829
10 = 0.66408	0.95	0.50986 < LC < 0.80756
20 = 0.90061	0.95	0.73001 < LC < 1.05710
30 = 1.12194	0.95	0.94210 < LC < 1.28862
40 = 1.35350	0.95	1.16631 < LC < 1.53260
50 = 1.61240	0.95	1.41566 < LC < 1.81143
60 = 1.92083	0.95	1.70625 < LC < 2.15616
70 = 2.31727	0.95	2.06545 < LC < 2.62258
80 = 2.88675	0.95	2.55480 < LC < 3.33552
90 = 3.91493	0.95	3.38313 < LC < 4.72090
95 = 5.03482	0.95	4.23598 < LC < 6.33396
96 = 5.41770	0.95	4.51939 < LC < 6.90532
99 = 8.06971	0.95	6.40397 < LC < 11.08196

Regression line :  $Y = A + \text{slope} * (X - M)$

A = 5.32048 (SE : 0.08460) -Probit unit-

slope = 3.3269 (SE : 0.2937)

M = 0.3038 in log10(dose) unit and 2.0127 in dose unit

Variance of the LC50 : 0.000718877 in log10(dose) unit

Analyzed file : SPIR\_TU4.PLD

Date : 12/14/6

Insectide : **spirodiclofen 21/11/06 tu4**

% control mortality : 0.847458 (2 / 236)

N	Killed	Total	Dose	Observed mortality	Corrected mortality (1st estimation)
1	24	216	1	11.2	10.3
2	109	220	2	49.6	49.1
3	101	221	3	45.8	45.2
4	277	278	10	99.7	99.7

Iterations : 10

$Y = 3.71758 + 3.24524 * X$  Natural mortality (last estimation) 1 %  $p(X^2 = 37.5545, df = 2) = 0.0000$

Point #	Observed dead	Expected dead	X <sup>2</sup> Contribution
1	24	23.36	0.0209
2	109	84.86	11.2443
3	101	134.48	21.2236
4	277	271.16	5.0658

Heterogeneity = 18.7773 with 2 degree of freedom.

n	Dose	Mortality corr (%)	probit treated	Total	Killed expected	Killed contribution	X <sup>2</sup>
1	1.0000	10.3	3.7331	216	24	23.36	0.0209
2	2.0000	49.1	4.9767	220	109	84.86	11.2443
3	3.0000	45.2	4.8793	221	101	134.48	21.2236
4	10.0000	99.6	7.685	278	277	271.16	5.0658

LC	Level of conf.	Range
01 = 0.47666	0.95	0.19753 < LC < 1.14753
02 = 0.57838	0.95	0.26256 < LC < 1.27141
03 = 0.65391	0.95	0.31423 < LC < 1.35819
04 = 0.71715	0.95	0.35946 < LC < 1.42822
05 = 0.77311	0.95	0.40085 < LC < 1.48860
10 = 1.00058	0.95	0.58015 < LC < 1.72349
20 = 1.36740	0.95	0.89417 < LC < 2.08937
30 = 1.71290	0.95	1.19839 < LC < 2.44708
40 = 2.07620	0.95	1.50569 < LC < 2.86227
50 = 2.48427	0.95	1.81738 < LC < 3.39603
60 = 2.97255	0.95	2.13741 < LC < 4.13526
70 = 3.60302	0.95	2.48147 < LC < 5.23454
80 = 4.51338	0.95	2.88998 < LC < 7.05517
90 = 6.16803	0.95	3.48900 < LC < 10.91916
95 = 7.98282	0.95	4.03238 < LC < 15.83114
96 = 8.60576	0.95	4.20132 < LC < 17.66039
99 = 12.94754	0.95	5.22229 < LC < 32.17961

Regression line :  $Y = A + \text{slope} * (X - M)$

A = 4.95646 (SE : 0.05170) -Probit unit-

slope = 3.2452 (SE : 0.8386)

M = 0.3818 in log10(dose) unit and 2.4085 in dose unit

Variance of the LC50 : 0.000254477 in log10(dose) unit

Heterogeneity = 18.7773 with 2 df

Analyzed file : SPIR\_TU5.PLD

Date : 11/16/6

Insectide : **spirodiclofen tu5 2/10/06**

% control mortality : 15.0376 (20 / 133)

N	Killed	Total	Dose	Observed mortality	Corrected mortality (1st estimation)
1	23	145	1	15.9	0.9
2	37	124	2	29.9	17.4
3	98	120	3	81.7	78.4
4	153	154	10	99.4	99.3

Iterations : 22

Y = 2.54362 + 6.16628 \* X Natural mortality (last estimation) 14.5 % p(X<sup>2</sup> = 70.4057, df = 2) = 0.0000

Point #	Observed dead	Expected dead	X <sup>2</sup> Contribution
1	23	21.81	1.4049
2	37	47.00	4.0499
3	98	87.80	4.0259
4 *	153	153.99	60.9250

A star (\*) after the point number indicates that an eventual high X<sup>2</sup> contribution of the point may be due to a low or high expected dead value.

Heterogeneity = 35.2029 with 2 degree of freedom.

n	Dose	Mortality corr (%)	probit treated	Total	Killed expected	Killed contribution	X <sup>2</sup>
1	1.0000	1.7	2.6146	145	23	21.81	1.4049
2	2.0000	18.0	4.0587	124	37	47.00	4.0499
3	3.0000	78.6	5.7855	120	98	87.80	4.0259
4	10.0000	99.2	7.4256	154	153	153.99*	60.9250

LC	Level of conf.	Range
01 = 1.04962	0.95	0.16690 < LC < 6.56249
02 = 1.16209	0.95	0.22586 < LC < 5.94849
03 = 1.23964	0.95	0.27340 < LC < 5.59428
04 = 1.30135	0.95	0.31543 < LC < 5.34524
05 = 1.35384	0.95	0.35421 < LC < 5.15324
10 = 1.55066	0.95	0.52488 < LC < 4.56637
20 = 1.82770	0.95	0.83040 < LC < 4.01414
30 = 2.05776	0.95	1.12538 < LC < 3.75756
40 = 2.27698	0.95	1.40055 < LC < 3.69936
50 = 2.50250	0.95	1.61205 < LC < 3.88460
60 = 2.75034	0.95	1.71242 < LC < 4.41993
70 = 3.04335	0.95	1.69910 < LC < 5.45794
80 = 3.42643	0.95	1.59751 < LC < 7.36421
90 = 4.03859	0.95	1.40786 < LC < 11.62155
95 = 4.62572	0.95	1.24867 < LC < 17.20544
96 = 4.81230	0.95	1.20404 < LC < 19.31692
99 = 5.96645	0.95	0.98130 < LC < 36.48586

Regression line : Y = A + slope \* (X - M)

A = 5.01906 (SE : 0.10088) -Probit unit-

slope = 6.1663 (SE : 6.3701)

M = 0.4014 in log<sub>10</sub>(dose) unit and 2.5203 in dose unit

Variance of the LC<sub>50</sub> : 0.000267921 in log<sub>10</sub>(dose) unit

Heterogeneity = 35.2029 with 2 df



Probit analysis

Analyzed file : SPIR\_TU6.PLD

Date : 2/12/7

Insectide : **spirodiclofen-tu6-19/1/07-aris**

% control mortality : 1.30719 (2 / 153)

N	Killed	Total	Dose	Observed mortality	Corrected mortality (1st estimation)
1	162	222	1	73	72.6
2	237	244	2	97.2	97.1
3	234	242	3	96.7	96.7
4	236	237	10	99.6	99.6

Iterations : 9

Y = 5.69019 + 2.67705 \* X Natural mortality (last estimation) 1.3 %  $p(X^2 = 16.5232, df = 2) = 0.0003$ 

Point #	Observed dead	Expected dead	X <sup>2</sup> Contribution
1	162	168.31	0.9682
2	237	227.79	5.5406
3	234	236.13	0.7841
4 *	236	236.91	9.2303

A star (\*) after the point number indicates that an eventual high X<sup>2</sup> contribution of the point may be due to a low or high expected dead value.

Heterogeneity = 8.26162 with 2 degree of freedom.

n	Dose	Mortality corr (%)	probit treated	Total	Killed	Killed expected	X <sup>2</sup> contribution
1	1.0000	72.6	5.6001	222	162	168.31	0.9682
2	2.0000	97.1	6.8947	244	237	227.79	5.5406
3	3.0000	96.7	6.8318	242	234	236.13	0.7841
4	10.0000	99.6	7.6297	237	236	236.91*	9.2303

LC	Level of conf.	Range
01 = 0.07465	0.95	0.00799 < LC < 0.66595
02 = 0.09438	0.95	0.01199 < LC < 0.71182
03 = 0.10952	0.95	0.01551 < LC < 0.74270
04 = 0.12249	0.95	0.01882 < LC < 0.76689
05 = 0.13417	0.95	0.02203 < LC < 0.78723
10 = 0.18342	0.95	0.03778 < LC < 0.86187
20 = 0.26784	0.95	0.07247 < LC < 0.96384
30 = 0.35195	0.95	0.11566 < LC < 1.04727
40 = 0.44438	0.95	0.17194 < LC < 1.12713
50 = 0.55236	0.95	0.24802 < LC < 1.21139
60 = 0.68658	0.95	0.35570 < LC < 1.30950
70 = 0.86688	0.95	0.51734 < LC < 1.44055
80 = 1.13909	0.95	0.77566 < LC < 1.66604
90 = 1.66339	0.95	1.18151 < LC < 2.34616
95 = 2.27393	0.95	1.44260 < LC < 3.60857
96 = 2.49078	0.95	1.50662 < LC < 4.15156
99 = 4.08682	0.95	1.82085 < LC < 9.31962

Regression line : Y = A + slope \* (X - M)

A = 6.14311 (SE : 0.06807) -Probit unit-

slope = 2.6771 (SE : 0.9913)

M = 0.1692 in log<sub>10</sub>(dose) unit and 1.4763 in dose unitVariance of the LC<sub>50</sub> : 0.00367224 in log<sub>10</sub>(dose) unit

Heterogeneity = 8.26162 with 2 df

## Probit analysis

Analyzed file : TNT\_GS.PLD

Date : 2/10/7

Insectide : **tnt 23/01/07 gss**

% control mortality : 1.47059 (1 / 68)

N	Killed	Total	Dose	Observed mortality	Corrected mortality (1st estimation)
1	0	63	1	0	0
2	6	69	3	8.7	7.3
3	14	60	10	23.4	22.2
4	30	39	30	77	76.6
5	56	57	100	98.3	98.3

Iterations : 99

Y = 1.59047 + 2.72072 \* X Natural mortality (last estimation) 4.6 %  $p(X^2 = 3.36637, df = 2) = 0.1861$ 

The data are well represented by a line

n	Dose	Mortality corr (%)	probit treated	Total	Killed expected	Killed contribution	X <sup>2</sup>
1	1.0000	0.0	---	63	0	0.00*	---
2	3.0000	4.3	3.5416	69	6	4.29*	2.4922
3	10.0000	19.7	4.2318	60	14	16.79	0.7007
4	30.0000	75.8	5.7241	39	30	28.91	0.1551
5	100.0000	98.2	7.1015	57	56	55.85*	0.0183

LC	Level of conf.	Range
01 = 2.50031	0.95	1.30882 < LC < 3.79449
02 = 3.14910	0.95	1.76083 < LC < 4.59825
03 = 3.64563	0.95	2.12409 < LC < 5.19823
04 = 4.06997	0.95	2.44473 < LC < 5.70307
05 = 4.45158	0.95	2.74020 < LC < 6.15210
10 = 6.05506	0.95	4.04132 < LC < 8.00470
20 = 8.78848	0.95	6.40511 < LC < 11.12068
30 = 11.49769	0.95	8.82540 < LC < 14.26152
40 = 14.46282	0.95	11.46592 < LC < 17.84846
50 = 17.91457	0.95	14.45238 < LC < 22.28472
60 = 22.19011	0.95	17.97987 < LC < 28.19011
70 = 27.91271	0.95	22.42952 < LC < 36.74286
80 = 36.51732	0.95	28.68739 < LC < 50.76259
90 = 53.00221	0.95	39.76768 < LC < 80.62964
95 = 72.09383	0.95	51.69094 < LC < 119.03464
96 = 78.85360	0.95	55.74906 < LC < 133.44924
99 = 128.35700	0.95	83.72546 < LC < 249.46067

Regression line : Y = A + slope \* (X - M)

A = 4.96493 (SE : 0.12654) -Probit unit-

slope = 2.7207 (SE : 0.3280)

M = 1.2403 in log<sub>10</sub>(dose) unit and 17.3892 in dose unitVariance of the LC50 : 0.00216544 in log<sub>10</sub>(dose) unit

Probit analysis

Analyzed file : TNT\_HER.PLD

Date : 2/10/7

Insectide : **tnt 23/01/07 her**

% control mortality : 2.66667 (2 / 75)

N	Killed	Total	Dose	Observed mortality	Corrected mortality (1st estimation)
1	6	76	10	7.9	5.3
2	28	78	30	35.9	34.1
3	50	74	100	67.6	66.7
4	80	81	300	98.8	98.8

Iterations : 8

Y = 1.1266 + 2.26731 \* X Natural mortality (last estimation) 2.8 %  $p(X^2 = 4.44083, df = 2) = 0.1087$ 

The data are well represented by a line

n	Dose	Mortality corr (%)	probit treated	Total	Killed	Killed expected	Killed contribution	X <sup>2</sup>
1	10.0000	5.3	3.3809	76	6	6.11		0.0031
2	30.0000	34.1	4.5901	78	28	24.92		0.5796
3	100.0000	66.6		5.4298	74	50	55.71	2.3230
4	300.0000	98.7		7.2359	81	80	77.80*	1.5352

LC	Level of conf.	Range
01 = 4.81034	0.95	2.57191 < LC < 7.44222
02 = 6.34463	0.95	3.60743 < LC < 9.42845
03 = 7.56325	0.95	4.46910 < LC < 10.96155
04 = 8.63155	0.95	5.24841 < LC < 12.28079
05 = 9.61161	0.95	5.98052 < LC < 13.47444
10 = 13.90332	0.95	9.34130 < LC < 18.56860
20 = 21.74049	0.95	15.91191 < LC < 27.58369
30 = 30.01257	0.95	23.15946 < LC < 37.02125
40 = 39.52503	0.95	31.60259 < LC < 48.05768
50 = 51.09920	0.95	41.76090 < LC < 61.99432
60 = 66.06266	0.95	54.47588 < LC < 81.01283
70 = 87.00116	0.95	71.41885 < LC < 109.45895
80 = 120.10439	0.95	96.62575 < LC < 158.04326
90 = 187.80611	0.95	144.45009 < LC < 267.50951
95 = 271.66388	0.95	199.62994 < LC < 416.64717
96 = 302.50966	0.95	219.16355 < LC < 474.48421
99 = 542.81587	0.95	362.43023 < LC < 966.18673

Regression line : Y = A + slope \* (X - M)

A = 5.10970 (SE : 0.09661) -Probit unit-

slope = 2.2673 (SE : 0.2219)

M = 1.7568 in log<sub>10</sub>(dose) unit and 57.1155 in dose unitVariance of the LC<sub>50</sub> : 0.00183815 in log<sub>10</sub>(dose) unit

Probit analysis

Analyzed file : TNT\_TU1.PLD

Date : 10/31/6

Insectide : TNT TU130/09/06

% control mortality : 9.58904 (7 / 73)

N	Killed	Total	Dose	Observed mortality	Corrected mortality (1st estimation)
1	12	44	10	27.3	19.5
2	16	56	30	28.6	21
3	28	61	100	46	40.1
4	38	55	300	69.1	65.8
5	58	62	1000	93.6	92.9

Iterations : 30

Y = 2.15454 + 1.34359 \* X Natural mortality (last estimation) 12.6 % p(X<sup>2</sup> = 7.37891, df = 3) = 0.0608

The data are well represented by a line

n	Dose	Mortality corr (%)	probit treated	Total	Killed expected	Killed contribution	X <sup>2</sup>
1	10.0000	16.8	4.1395	44	12	8.10	5.5627
2	30.0000	18.3	4.1907	56	16	16.58	0.0383
3	100.0000	38.1	4.7497	61	28	30.99	0.5947
4	300.0000	64.6	5.406	55	38	39.87	0.2962
5	1000.0000	92.6	6.4655	62	58	55.61	0.8871

LC	Level of conf.	Range
01 = 2.43277	0.95	0.54647 < LC < 6.00744
02 = 3.88141	0.95	1.01833 < LC < 8.76541
03 = 5.22095	0.95	1.51043 < LC < 11.14930
04 = 6.52499	0.95	2.03065 < LC < 13.36715
05 = 7.82346	0.95	2.58278 < LC < 15.50045
10 = 14.58622	0.95	5.87563 < LC < 25.86077
20 = 31.01508	0.95	15.69867 < LC < 48.67693
30 = 53.44170	0.95	31.35429 < LC < 78.13548
40 = 85.04590	0.95	55.36725 < LC < 119.64913
50 = 131.18393	0.95	91.29965 < LC < 183.53029
60 = 202.35218	0.95	144.82840 < LC < 292.64254
70 = 322.01860	0.95	227.74131 < LC < 503.23022
80 = 554.86639	0.95	372.22768 < LC < 987.09494
90 = 1179.82737	0.95	709.05578 < LC < 2606.01872
95 = 2199.69563	0.95	1188.60945 < LC < 5900.40921
96 = 2637.43256	0.95	1379.60013 < LC < 7497.68770
99 = 7073.92967	0.95	3079.81053 < LC < 27770.00154

Regression line : Y = A + slope \* (X - M)

A = 5.11041 (SE : 0.09917) -Probit unit-slope = 1.3436 (SE : 0.1757)

M = 2.2000 in log10(dose) unit and 158.4814 in dose unit

Variance of the LC50 : 0.00556297 in log10(dose) unit

Probit analysis

Analyzed file : TNT\_TU2.PLD

Date : 5/11/7

Insectide : TNT\_tu2 25/07/06

% control mortality : 5 (2 / 40)

N	Killed	Total	Dose	Observed mortality	Corrected mortality (1st estimation)
1	16	79	10	20.3	16
2	31	71	100	43.7	40.7
3	53	72	300	73.7	72.2

Iterations : 11

$Y = 2.81809 + 1.06221 * X$  Natural mortality (last estimation) 5.7 %  $p(X^2 = 2.3703, df = 1) = 0.1238$

The data are well represented by a line

n	Dose	Mortality corr (%)	probit treated	Total	Killed expected	Killed contribution	X <sup>2</sup>
1	10.0000	15.5	4.0043	79	16	14.27	0.3330
2	100.0000	40.3		4.7635	71	31	35.97
3	300.0000	72.0		5.5883	72	53	49.82

LC	Level of conf.	Range
01 = 0.73062	0.95	0.06365 < LC < 2.56458
02 = 1.31925	0.95	0.15269 < LC < 4.02811
03 = 1.91953	0.95	0.26577 < LC < 5.37049
04 = 2.54492	0.95	0.40292 < LC < 6.67220
05 = 3.20164	0.95	0.56501 < LC < 7.96600
10 = 7.04015	0.95	1.79330 < LC < 14.71896
20 = 18.28097	0.95	7.10351 < LC < 31.65111
30 = 36.38340	0.95	18.48829 < LC < 57.01374
40 = 65.48247	0.95	39.52613 < LC < 99.75696
50 = 113.29552	0.95	73.96348 < LC < 182.51435
60 = 196.02001	0.95	127.09243 < LC < 363.64826
70 = 352.79476	0.95	213.29358 < LC < 810.54047
80 = 702.14402	0.95	375.53023 < LC < 2158.35106
90 = 1823.23963	0.95	797.30930 < LC < 8659.09933
95 = 4009.16206	0.95	1466.48422 < LC < 27609.24388
96 = 5043.72111	0.95	1749.31772 < LC < 38750.34811
99 = 17568.40773	0.95	4537.66894 < LC < 246044.70557

Regression line :  $Y = A + \text{slope} * (X - M)$

A = 4.90517 (SE : 0.09872) -Probit unit-

slope = 1.0622 (SE : 0.1787)

M = 1.9648 in log10(dose) unit and 92.2231 in dose unit

Probit analysis

Analyzed file : TNT\_TU3.PLD

Date : 5/11/7

Insectide : TNT\_TU3\_4/09/06

% control mortality : 8.19672 (5 / 61)

N	Killed	Total	Dose	Observed mortality	Corrected mortality (1st estimation)
1	4	100	10	4	4
2	50	78	30	64.2	60.9
3	77	79	100	97.5	97.3

Iterations : 612

Y = -0.696764 + 3.96962 \* X Natural mortality (last estimation) 5.8 % p(X<sup>2</sup> = 9.94972, df = 1) = 0.0016

Point #	Observed dead	Expected dead	X <sup>2</sup> Contribution
1	4	9.67	7.9741
2	50	46.10	0.7951
3 *	77	78.07	1.1804

Heterogeneity = 9.94972 with 1 degree of freedom.

n	Dose	Mortality corr (%)	probit treated	Total	Killed expected	Killed contribution	X <sup>2</sup>
1	10.0000	0.0	3.249	100	4	9.67	7.9741
2	30.0000	61.9	5.2752	78	50	46.10	0.7951
3	100.0000	97.3	6.9177	79	77	78.07*	1.1804

LC	Level of conf.	Range
01 = 7.06257	0.95	1.75863 < LC < 27.71894
02 = 8.27246	0.95	2.34981 < LC < 28.53299
03 = 9.14567	0.95	2.82086 < LC < 29.09703
04 = 9.86255	0.95	3.23386 < LC < 29.55122
05 = 10.48738	0.95	3.61221 < LC < 29.94337
10 = 12.94903	0.95	5.25392 < LC < 31.49046
20 = 16.71588	0.95	8.13411 < LC < 34.03217
30 = 20.09610	0.95	10.92886 < LC < 36.71589
40 = 23.51827	0.95	13.75403 < LC < 40.05584
50 = 27.23417	0.95	16.59072 < LC < 44.63293
60 = 31.53718	0.95	19.36931 < LC < 51.38443
70 = 36.90766	0.95	22.02159 < LC < 62.05317
80 = 44.37097	0.95	24.56019 < LC < 80.65108
90 = 57.27842	0.95	27.23958 < LC < 121.66875
95 = 70.72312	0.95	28.97918 < LC < 174.93707
96 = 75.20366	0.95	29.43386 < LC < 194.93855
99 = 105.01838	0.95	31.64978 < LC < 355.40197

Regression line : Y = A + slope \* (X - M)

A = 5.17773 (SE : 0.13484) -Probit unit-

slope = 3.9696 (SE : 1.7817)

M = 1.4799 in log10(dose) unit and 30.1899 in dose unit

Variance of the LC50 : 0.00119438 in log10(dose) unit

Heterogeneity = 9.94972 with 1 df

Probit analysis

Analyzed file : TNT\_TU4.PLD

Date : 5/11/7

Insectide : TNT TU4 5/10/06

% control mortality : 7.29167 (7 / 96)

N	Killed	Total	Dose	Observed mortality	Corrected mortality (1st estimation)
1	5	100	30	5	5
2	38	85	100	44.8	40.3
3	55	67	300	82.1	80.7
4	70	71	1000	98.6	98.5

Iterations : 30

Y = -0.693877 + 2.67426 \* X Natural mortality (last estimation) 5.8 % p(X<sup>2</sup> = 6.35354, df = 2) = 0.0418

Point #	Observed dead	Expected dead	X <sup>2</sup> Contribution
1	5	9.56	5.3458
2	38	34.11	0.7666
3	55	55.88	0.0801
4 *	70	70.34	0.1610

A star (\*) after the point number indicates that an eventual high X<sup>2</sup> contribution of the point may be due to a low or high expected dead value.

Heterogeneity = 3.17677 with 2 degree of freedom.

n	Dose	Mortality corr (%)	probit treated	Total	Killed	Killed expected	Killed contribution	X <sup>2</sup>
1	30.0000	0.0	3.3549	100	5	9.56		5.3458
2	100.0000	41.3		4.7547	85	38	34.11	0.7666
3	300.0000	81.0		5.8654	67	55	55.88	0.0801
4	1000.0000	98.5		7.1652	71	70	70.34*	0.1610

LC	Level of conf.	Range
01 = 18.15960	0.95	6.85473 < LC < 44.81987
02 = 22.96366	0.95	9.52275 < LC < 51.99681
03 = 26.65212	0.95	11.72171 < LC < 57.18645
04 = 29.81129	0.95	13.69628 < LC < 61.46196
05 = 32.65732	0.95	15.54018 < LC < 65.20440
10 = 44.65870	0.95	23.88417 < LC < 80.17135
20 = 65.23976	0.95	39.70382 < LC < 104.23522
30 = 85.75053	0.95	56.44396 < LC < 127.83466
40 = 108.29557	0.95	74.97553 < LC < 154.69788
50 = 134.64149	0.95	95.80545 < LC < 188.50058
60 = 167.39680	0.95	119.61428 < LC < 235.08172
70 = 211.40780	0.95	147.87933 < LC < 305.65553
80 = 277.87243	0.95	184.48258 < LC < 427.17284
90 = 405.93058	0.95	243.05609 < LC < 700.76088
95 = 555.10770	0.95	300.61003 < LC < 1070.70399
96 = 608.10279	0.95	319.30244 < LC < 1213.37329
99 = 998.27810	0.95	439.78242 < LC < 2413.83205

Regression line : Y = A + slope \* (X - M)

A = 5.13244 (SE : 0.11030) -Probit unit-

slope = 2.6743 (SE : 0.5549)

M = 2.1787 in log10(dose) unit and 150.8917 in dose unit

Variance of the LC50 : 0.00173427 in log10(dose) unit

Heterogeneity = 3.17677 with 2 df

Probit analysis

Analyzed file : TNT\_TU5.PLD

Date : 5/11/7

Insectide : TNT TU5 12/12/06

% control mortality : 6.18557 (6 / 97)

N	Killed	Total	Dose	Observed mortality	Corrected mortality (1st estimation)
1	7	87	30	8.1	1.9
2	27	61	100	44.3	40.6
3	51	73	300	69.9	67.9
4	70	72	1000	97.3	97.1

Iterations : 14

$Y = 0.147948 + 2.20694 * X$  Natural mortality (last estimation) 5.5 %  $p(X^2 = 3.73181, df = 2) = 0.1549$

The data are well represented by a line

n	Dose	Mortality corr (%)	probit treated	Total	Killed	Killed expected	Killed contribution	X <sup>2</sup>
1	30.0000	2.7	2.9201	87	7	9.36		1.2161
2	100.0000	41.0		4.7607	61	27	22.41	1.5592
3	300.0000	68.1		5.463	73	51	54.42	0.8133
4	1000.0000	97.1		6.8866	72	70	69.38*	0.1432

LC	Level of conf.	Range
01 = 13.94056	0.95	6.42997 < LC < 23.22229
02 = 18.52679	0.95	9.21219 < LC < 29.45762
03 = 22.19164	0.95	11.56722 < LC < 34.27550
04 = 25.41791	0.95	13.72239 < LC < 38.42426
05 = 28.38736	0.95	15.76583 < LC < 42.18018
10 = 41.47945	0.95	25.33118 < LC < 58.22776
20 = 65.65914	0.95	44.64869 < LC < 86.68343
30 = 91.44497	0.95	66.59447 < LC < 116.54307
40 = 121.33885	0.95	92.74112 < LC < 151.59018
50 = 157.97675	0.95	124.74306 < LC < 196.16610
60 = 205.67736	0.95	165.22978 < LC < 257.77986
70 = 272.91445	0.95	219.37081 < LC < 351.70395
80 = 380.09417	0.95	299.79736 < LC < 516.06942
90 = 601.66306	0.95	451.97364 < LC < 898.21873
95 = 879.14682	0.95	627.40657 < LC < 1435.18009
96 = 981.85309	0.95	689.52414 < LC < 1647.00931
99 = 1790.21840	0.95	1145.59887 < LC < 3500.53180

Regression line :  $Y = A + slope * (X - M)$

A = 5.18787 (SE : 0.10568) -Probit unit-

slope = 2.2069 (SE : 0.2458)

M = 2.2837 in log10(dose) unit and 192.1651 in dose unit

Variance of the LC50 : 0.00238274 in log10(dose) unit



Probit analysis

Analyzed file : TNT-TU6.PLD

Date : 5/11/7

Insectide : **tnt\_tu6-12/12/06**

% control mortality : 3.77358 (4 / 106)

N	Killed	Total	Dose	Observed mortality	Corrected mortality (1st estimation)
1	14	100	10	14	10.6
2	21	92	30	22.9	19.8
3	97	103	100	94.2	94
4	90	94	300	95.8	95.6
5	69	69	1000	100	100

Iterations : 45

Y = 0.370192 + 2.78088 \* X Natural mortality (last estimation) 6.5 % p(X<sup>2</sup> = 28.4627, df = 2) = 0.0000

Point #	Observed dead	Expected dead	X <sup>2</sup> Contribution
1	14	9.48	6.5598
2	21	31.83	6.0613
3	97	86.07	8.0031
4 *	90	92.95	7.8386
5	69	68.99	---

A star (\*) after the point number indicates that an eventual high X<sup>2</sup> contribution of the point may be due to a low or high expected dead value.  
Heterogeneity = 14.2314 with 2 degree of freedom.

n	Dose	Mortality corr (%)	probit treated	Total	Killed	Killed expected	Killed contribution	X <sup>2</sup>
1	10.0000	8.1	3.7483	100	14	9.48		6.5598
2	30.0000	17.5	4.1485	92	21	31.83		6.0613
3	100.0000	93.8		6.5502	103	97	86.07	8.0031
4	300.0000	95.5		6.7036	94	90	92.95*	7.8386
5	1000.0000	100.0		---	69	69	68.99*	---

LC	Level	Range of conf.
01 = 6.73276	0.95	1.38015 < LC < 32.51339
02 = 8.43762	0.95	2.00191 < LC < 35.24305
03 = 9.73712	0.95	2.53101 < LC < 37.14900
04 = 10.84461	0.95	3.01628 < LC < 38.68682
05 = 11.83847	0.95	3.47674 < LC < 40.01387
10 = 15.99593	0.95	5.62648 < LC < 45.20732
20 = 23.03056	0.95	9.88083 < LC < 53.45780
30 = 29.95553	0.95	14.49463 < LC < 61.73008
40 = 37.49419	0.95	19.61568 < LC < 71.53984
50 = 46.22814	0.95	25.27347 < LC < 84.49149
60 = 56.99658	0.95	31.46901 < LC < 103.25736
70 = 71.34045	0.95	38.26141 < LC < 133.19584
80 = 92.79151	0.95	45.99693 < LC < 187.68174
90 = 133.59905	0.95	56.21702 < LC < 318.89076
95 = 180.51666	0.95	64.48978 < LC < 508.25476
96 = 197.06011	0.95	66.91608 < LC < 583.96884
99 = 317.40911	0.95	80.55683 < LC < 1261.43342

Regression line : Y = A + slope \* (X - M)

A = 5.19197 (SE : 0.09659) -Probit unit-

slope = 2.7809 (SE : 0.9921)

M = 1.7339 in log<sub>10</sub>(dose) unit and 54.1878 in dose unit

Variance of the LC<sub>50</sub> : 0.00124897 in log<sub>10</sub>(dose) unit

Heterogeneity = 14.2314 with 2 df

Probit analysis

Analyzed file : VER\_GS.PLD

Date : 5/17/7

Insectide : **vertimec 31/1/07 gss**

% control mortality : 1.35135 (1 / 74)

N	Killed	Total	Dose	Observed mortality	Corrected mortality (1st estimation)
1	1	77	0.007	1.3	1.3
2	3	76	0.01	4	2.6
3	4	78	0.03	5.2	3.8
4	7	76	0.1	9.3	7.9
5	13	62	0.2	21	19.9
6	98	99	0.3	99	99

No convergence at 1000 iterations, at 2000 iterations, at 3000 iterations, at 4000 iterations.

No convergence at 5000 iterations, at 6000 iterations. Iterations : 6001

$Y = 7.70338 + 3.72865 * X$  Natural mortality (last estimation) 4 %  $p(X^2 = 107.743, df = 4) = 0.0000$

Point #	Observed dead	Expected dead	X <sup>2</sup>	Contribution
1 *	1	1.93	16.9217	
2 *	3	2.02	5.8433	
3 *	4	4.87	0.2584	
4	7	22.94	16.4328	
5	13	34.58	30.3186	
6	98	69.86	37.9686	

A star (\*) after the point number indicates that an eventual high X<sup>2</sup> contribution of the point may be due to a low or high expected dead value.

Heterogeneity = 26.9359 with 4 degree of freedom.

n	Dose	Mortality corr (%)	probit treated	Total	Killed	Killed expected	X <sup>2</sup> contribution
1	0.0070	0.0	2.7731	77	1	1.93*	16.9217
2	0.0100	0.0	3.0453	76	3	2.02*	5.8433
3	0.0300	1.2	3.2169	78	4	4.87*	0.2584
4	0.1000	5.5	3.5862	76	7	22.94	16.4328
5	0.2000	17.7	4.1516	62	13	34.58	30.3186
6	0.3000	98.9	7.3176	99	98	69.86	37.9686

LC	Level	Range of conf.
01 = 0.04477	0.95	0.01424 < LC < 0.14047
02 = 0.05298	0.95	0.01890 < LC < 0.14820
03 = 0.05895	0.95	0.02258 < LC < 0.15366
04 = 0.06388	0.95	0.02577 < LC < 0.15810
05 = 0.06820	0.95	0.02867 < LC < 0.16199
10 = 0.08536	0.95	0.04096 < LC < 0.17771
20 = 0.11202	0.95	0.06124 < LC < 0.20478
30 = 0.13629	0.95	0.07922 < LC < 0.23438
40 = 0.16113	0.95	0.09573 < LC < 0.27119
50 = 0.18836	0.95	0.11097 < LC < 0.31981
60 = 0.22020	0.95	0.12525 < LC < 0.38733
70 = 0.26033	0.95	0.13916 < LC < 0.48737
80 = 0.31673	0.95	0.15380 < LC < 0.65295
90 = 0.41566	0.95	0.17203 < LC < 1.00589
95 = 0.52027	0.95	0.18606 < LC < 1.45758
96 = 0.55543	0.95	0.19006 < LC < 1.62650
99 = 0.79256	0.95	0.21155 < LC < 2.97707

Regression line :  $Y = A + \text{slope} * (X - M)$

A = 4.79617 (SE : 0.08262) -Probit unit-

slope = 3.7287 (SE : 1.4759)

M = -0.7797 in log<sub>10</sub>(dose) unit and 0.1661 in dose unit

Variance of the LC50 : 0.000508396 in log<sub>10</sub>(dose) unit Heterogeneity = 26.9359 with 4 df

Probit analysis

Analyzed file : VER\_HER.PLD

Date : 5/17/7

Insectide : **vertimec 31/1/07 her**

% control mortality : 3.09278 (3 / 97)

N	Killed	Total	Dose	Observed mortality	Corrected mortality (1st estimation)
1	10	91	0.1	11	8.1
2	13	94	0.2	13.9	11
3	35	99	0.3	35.4	33.3
4	99	100	1	99	99

Iterations : 15

Y = 7.31087 + 5.49931 \* X Natural mortality (last estimation) 8.8 % p(X<sup>2</sup> = 62.1395, df = 2) = 0.0000

Point #	Observed dead	Expected dead	X <sup>2</sup> Contribution
1	10	7.99	62.0659
2	13	13.57	0.0584
3	35	34.49	0.0128
4 *	99	99.05	0.0023

A star (\*) after the point number indicates that an eventual high X<sup>2</sup> contribution of the point may be due to a low or high expected dead value.

Heterogeneity = 31.0697 with 2 degree of freedom.

n	Dose	Mortality corr (%)	probit treated	Total	Killed expected	Killed contribution	X <sup>2</sup>
1	0.1000	2.5	3.5984	91	10	7.99	62.0659
2	0.2000	5.6	3.7728	94	13	13.57	0.0584
3	0.3000	29.2	4.5667	99	35	34.49	0.0128
4	1.0000	98.9	7.3147	100	99	99.05*	0.0023

LC	Level of conf.	Range
01 = 0.14345	0.95	0.04713 < LC < 0.43551
02 = 0.16079	0.95	0.05987 < LC < 0.43091
03 = 0.17287	0.95	0.06947 < LC < 0.42935
04 = 0.18255	0.95	0.07753 < LC < 0.42908
05 = 0.19083	0.95	0.08464 < LC < 0.42955
10 = 0.22220	0.95	0.11270 < LC < 0.43760
20 = 0.26717	0.95	0.15186 < LC < 0.46982
30 = 0.30516	0.95	0.17885 < LC < 0.52063
40 = 0.34184	0.95	0.19732 < LC < 0.59240
50 = 0.38002	0.95	0.20944 < LC < 0.69003
60 = 0.42247	0.95	0.21693 < LC < 0.82362
70 = 0.47325	0.95	0.22094 < LC < 1.01518
80 = 0.54054	0.95	0.22193 < LC < 1.31905
90 = 0.64994	0.95	0.21921 < LC < 1.93184
95 = 0.75678	0.95	0.21488 < LC < 2.67329
96 = 0.79110	0.95	0.21340 < LC < 2.94194
99 = 1.00674	0.95	0.20428 < LC < 4.98115

Regression line : Y = A + slope \* (X - M)

A = 4.50300 (SE : 0.11646) -Probit unit-

slope = 5.4993 (SE : 3.5595)

M = -0.5106 in log<sub>10</sub>(dose) unit and 0.3086 in dose unit

Variance of the LC<sub>50</sub> : 0.000558618 in log<sub>10</sub>(dose) unit

Heterogeneity = 31.0697 with 2 df

Probit analysis

Analyzed file : VER\_TU1.PLD

Date : 11/16/6

Insectide : **vertimec tu1 7/11/06**

% control mortality : 0 (0 / 89)

N	Killed	Total	Dose	Observed mortality	Corrected mortality
1	8	92	0.03	8.7	8.7
2	18	96	0.1	18.8	18.8
3	79	90	0.3	87.8	87.8
4	93	94	1	99	99

Iterations : 8

Y = 7.25925 + 2.68398 \* X p(X<sup>2</sup> = 20.5374, df = 2) = 0.0000

Point #	Observed dead	Expected dead	X <sup>2</sup> Contribution
1 *	8	3.11	7.9786
2	18	32.21	9.4338
3	79	72.36	3.1116
4 *	93	92.88	0.0134

A star (\*) after the point number indicates that an eventual high X<sup>2</sup> contribution of the point may be due to a low or high expected dead value.

Heterogeneity = 10.2687 with 2 degree of freedom.

n	Dose	Mortality corr (%)	probit treated	Total	Killed expected	Killed contribution	X <sup>2</sup>
1	0.0300	8.7	3.6401	92	8	3.11*	7.9786
2	0.1000	18.8	4.1131	96	18	32.21	9.4338
3	0.3000	87.8	6.1641	90	79	72.36	3.1116
4	1.0000	98.9	7.3036	94	93	92.88*	0.0134

LC	Level of conf.	Range
01 = 0.01956	0.95	0.00590 < LC < 0.06415
02 = 0.02471	0.95	0.00836 < LC < 0.07230
03 = 0.02867	0.95	0.01042 < LC < 0.07812
04 = 0.03205	0.95	0.01229 < LC < 0.08288
05 = 0.03510	0.95	0.01404 < LC < 0.08704
10 = 0.04795	0.95	0.02205 < LC < 0.10361
20 = 0.06995	0.95	0.03729 < LC < 0.13066
30 = 0.09184	0.95	0.05318 < LC < 0.15820
40 = 0.11589	0.95	0.07026 < LC < 0.19094
50 = 0.14397	0.95	0.08869 < LC < 0.23371
60 = 0.17886	0.95	0.10884 < LC < 0.29427
70 = 0.22569	0.95	0.13167 < LC < 0.38782
80 = 0.29635	0.95	0.15974 < LC < 0.55201
90 = 0.43234	0.95	0.20176 < LC < 0.93208
95 = 0.59055	0.95	0.24036 < LC < 1.46231
96 = 0.64671	0.95	0.25245 < LC < 1.67059
99 = 1.05976	0.95	0.32633 < LC < 3.47993

Regression line : Y = A + slope \* (X - M)

A = 5.01185 (SE : 0.08963) -Probit unit-

slope = 2.6840 (SE : 0.7412)

M = -0.8373 in log10(dose) unit and 0.1454 in dose unit

Variance of the LC50 : 0.00111528 in log10(dose) unit

Heterogeneity = 10.2687 with 2 df

Probit analysis

Analyzed file : VER\_TU2.PLD

Date : 5/17/7

Insectide : **vertimec tu2ii 8/11/06**

% control mortality : 2.10526 (2 / 95)

N	Killed	Total	Dose	Observed mortality	Corrected mortality (1st estimation)
1	3	93	0.1	3.3	1.1
2	40	91	0.2	44	42.7
3	51	85	0.3	60	59.1
4	95	96	1	99	99

Iterations : 21

$Y = 7.46795 + 4.08096 * X$  Natural mortality (last estimation) 1.6 %  $p(X^2 = 5.58415, df = 2) = 0.0615$

The data are well represented by a line

n	Dose	Mortality corr (%)	probit treated	Total	Killed expected	Killed contribution	X <sup>2</sup>
1	0.1000	1.7	2.6894	93	3	6.36	2.4015
2	0.2000	43.1	4.8162	91	40	32.81	2.4930
3	0.3000	59.4	5.2298	85	51	54.12	0.4917
4	1.0000	98.9	7.3031	96	95	95.36*	0.1979

LC	Level of conf.	Range
01 = 0.06685	0.95	0.04658 < LC < 0.08490
02 = 0.07797	0.95	0.05656 < LC < 0.09657
03 = 0.08596	0.95	0.06394 < LC < 0.10483
04 = 0.09251	0.95	0.07011 < LC < 0.11153
05 = 0.09821	0.95	0.07556 < LC < 0.11732
10 = 0.12056	0.95	0.09752 < LC < 0.13979
20 = 0.15455	0.95	0.13206 < LC < 0.17384
30 = 0.18487	0.95	0.16308 < LC < 0.20502
40 = 0.21543	0.95	0.19352 < LC < 0.23816
50 = 0.24847	0.95	0.22476 < LC < 0.27665
60 = 0.28658	0.95	0.25853 < LC < 0.32448
70 = 0.33395	0.95	0.29790 < LC < 0.38818
80 = 0.39946	0.95	0.34928 < LC < 0.48217
90 = 0.51209	0.95	0.43258 < LC < 0.65565
95 = 0.62866	0.95	0.51457 < LC < 0.84764
96 = 0.66737	0.95	0.54109 < LC < 0.91379
99 = 0.92350	0.95	0.70994 < LC < 1.3770

Regression line :  $Y = A + \text{slope} * (X - M)$

A = 4.87186 (SE : 0.09037) -Probit unit-

slope = 4.0810 (SE : 0.4504)

M = -0.6361 in log<sub>10</sub>(dose) unit and 0.2311 in dose unit

Variance of the LC50 : 0.000502364 in log<sub>10</sub>(dose) unit

Probit analysis

Analyzed file : VER\_TU3.PLD

Date : 5/17/7

Insectide : **vertimec 23/11/06 tu3**

% control mortality : 4.25532 (4 / 94)

N	Killed	Total	Dose	Observed mortality	Corrected mortality (1st estimation)
1	7	102	0.1	6.9	2.7
2	32	93	0.3	34.5	31.5
3	64	86	1	74.5	73.3

Iterations : 13

Y = 5.66465 + 2.32374 \* X Natural mortality (last estimation) 3.8 %  $p(X^2 = 0.934923, df = 1) = 0.3340$

The data are well represented by a line

n	Dose	Mortality corr (%)	probit treated	Total	Killed expected	Killed contribution	X <sup>2</sup>
1	0.1000	3.2	3.0601	102	7	8.62	0.5556
2	0.3000	31.8	4.5166	93	32	29.56	0.3112
3	1.0000	73.4	5.6203	86	64	65.05	0.0681

LC	Level of conf.	Range
01 = 0.05161	0.95	0.02460 < LC < 0.08181
02 = 0.06761	0.95	0.03506 < LC < 0.10205
03 = 0.08025	0.95	0.04387 < LC < 0.11751
04 = 0.09129	0.95	0.05190 < LC < 0.13071
05 = 0.10140	0.95	0.05949 < LC < 0.14259
10 = 0.14536	0.95	0.09474 < LC < 0.19284
20 = 0.22485	0.95	0.16450 < LC < 0.28124
30 = 0.30798	0.95	0.24097 < LC < 0.37524
40 = 0.40289	0.95	0.32745 < LC < 0.48936
50 = 0.51763	0.95	0.42665 < LC < 0.64048
60 = 0.66504	0.95	0.54482 < LC < 0.85533
70 = 0.86999	0.95	0.69644 < LC < 1.18576
80 = 1.19165	0.95	0.91620 < LC < 1.76164
90 = 1.84325	0.95	1.32342 < LC < 3.08819
95 = 2.64249	0.95	1.78289 < LC < 4.93706
96 = 2.93485	0.95	1.94347 < LC < 5.66349
99 = 5.19198	0.95	3.09694 < LC < 11.97910

Regression line : Y = A + slope \* (X - M)

A = 4.84732 (SE : 0.09921) -Probit unit-

slope = 2.3237 (SE : 0.2924)

M = -0.3517 in log10(dose) unit and 0.4449 in dose unit

Variance of the LC50 : 0.00189124 in log10(dose) unit

Probit analysis

Analyzed file : VER\_TU4.PLD

Date : 5/17/7

Insectide : **VERTIMEC TU4 7/12/06**

% control mortality : 7.54717 (8 / 106)

N	Killed	Total	Dose	Observed mortality	Corrected mortality (1st estimation)
1	9	110	0.1	8.2	0.6
2	13	92	0.2	14.2	7.1
3	36	93	0.3	38.8	33.7
4	97	98	1	99	98.9

Iterations : 7

$Y = 7.33879 + 5.34124 * X$  Natural mortality (last estimation) 7.7 %  $p(X^2 = 1.47972, df = 2) = 0.4773$

The data are well represented by a line

n	Dose	Mortality corr (%)	probit treated	Total	Killed expected	Killed contribution	X <sup>2</sup>
1	0.1000	0.6	2.4749	110	9	8.57	1.2774
2	0.2000	7.0	3.5255	92	13	13.98	0.1394
3	0.3000	33.6	4.5781	93	36	35.03	0.0463
4	1.0000	98.9	7.2892	98	97	97.12*	0.0166

LC	Level of conf.	Range
01 = 0.13382	0.95	0.09869 < LC < 0.16227
02 = 0.15051	0.95	0.11502 < LC < 0.17890
03 = 0.16216	0.95	0.12669 < LC < 0.19044
04 = 0.17151	0.95	0.13618 < LC < 0.19968
05 = 0.17953	0.95	0.14440 < LC < 0.20758
10 = 0.20998	0.95	0.17610 < LC < 0.23779
20 = 0.25386	0.95	0.22197 < LC < 0.28280
30 = 0.29110	0.95	0.25966 < LC < 0.32373
40 = 0.32719	0.95	0.29418 < LC < 0.36666
50 = 0.36488	0.95	0.32797 < LC < 0.41501
60 = 0.40691	0.95	0.36340 < LC < 0.47263
70 = 0.45735	0.95	0.40365 < LC < 0.54600
80 = 0.52444	0.95	0.45456 < LC < 0.64926
90 = 0.63403	0.95	0.53354 < LC < 0.82922
95 = 0.74159	0.95	0.60761 < LC < 1.01720
96 = 0.77623	0.95	0.63090 < LC < 1.07987
99 = 0.99489	0.95	0.77300 < LC < 1.49658

Regression line :  $Y = A + slope * (X - M)$

A = 4.61585 (SE : 0.12479) -Probit unit-

slope = 5.3412 (SE : 0.6804)

M = -0.5098 in log<sub>10</sub>(dose) unit and 0.3092 in dose unit

Variance of the LC50 : 0.000629846 in log<sub>10</sub>(dose) unit

Probit analysis

Analyzed file : VER\_TU5.PLD

Date : 5/17/7

Insectide : **vertimec 21/11/06 tu5**

% control mortality : 5.10204 (5 / 98)

N	Killed	Total	Dose	Observed mortality	Corrected mortality (1st estimation)
1	2	87	0.03	2.3	2.3
2	8	73	0.1	11	6.1
3	9	86	0.2	10.5	5.6
4	20	65	0.3	30.8	27
5	88	89	1	98.9	98.9

No convergence at 1000 iterations, at 2000 iterations, at 3000 iterations, at 4000 iterations..

No convergence at 5000 iterations, at 6000 iterations, at 7000 iterations, at 8000 iterations.

No convergence at 9000 iterations, at 10000 iterations. Iterations : 10001

$$Y = 6.62688 + 4.01097 * X$$

Natural mortality (last estimation) 5.8 %

$$p(X^2 = 57.7696, df = 3) = 0.0000$$

Point #	Observed dead	Expected dead	X <sup>2</sup> Contribution
1 *	2	3.58	35.0635
2	8	6.49	0.6526
3	9	21.69	10.8823
4	20	27.39	3.5105
5	88	79.97	7.6608

A star (\*) after the point number indicates that an eventual high X<sup>2</sup> contribution of the point may be due to a low or high expected dead value.

Heterogeneity = 19.2565 with 3 degree of freedom.

n	Dose	Mortality corr (%)	probit treated	Total	Killed expected	Killed contribution	X <sup>2</sup>
1	0.0300	0.0	3.0041	87	2	3.58*	35.0635
2	0.1000	5.6	3.4511	73	8	6.49	0.6526
3	0.2000	5.0	3.4062	86	9	21.69	10.8823
4	0.3000	26.6	4.3867	65	20	27.39	3.5105
5	1.0000	98.8	7.2624	89	88	79.97	7.6608

LC	Level	Range of conf.
01 = 0.10335	0.95	0.04161 < LC < 0.25600
02 = 0.12086	0.95	0.05302 < LC < 0.27483
03 = 0.13348	0.95	0.06171 < LC < 0.28811
04 = 0.14383	0.95	0.06907 < LC < 0.29892
05 = 0.15284	0.95	0.07563 < LC < 0.30833
10 = 0.18831	0.95	0.10236 < LC < 0.34596
20 = 0.24245	0.95	0.14387 < LC < 0.40825
30 = 0.29092	0.95	0.17918 < LC < 0.47219
40 = 0.33991	0.95	0.21140 < LC < 0.54656
50 = 0.39302	0.95	0.24188 < LC < 0.63882
60 = 0.45443	0.95	0.27191 < LC < 0.76001
70 = 0.53096	0.95	0.30317 < LC < 0.93087
80 = 0.63711	0.95	0.33868 < LC < 1.20031
90 = 0.82029	0.95	0.38693 < LC < 1.74260
95 = 1.01063	0.95	0.42697 < LC < 2.39825
96 = 1.07398	0.95	0.43879 < LC < 2.63570
99 = 1.49460	0.95	0.50525 < LC < 4.43652

Regression line : Y = A + slope \* (X - M)

A = 4.73100 (SE : 0.09597) -Probit unit-

slope = 4.0110 (SE : 1.3378)

M = -0.4727 in log<sub>10</sub>(dose) unit and 0.3368 in dose unit

Variance of the LC50 : 0.000598458 in log<sub>10</sub>(dose) unit Heterogeneity = 19.2565 with 3 df



Probit analysis

Analyzed file : VER\_TU6.PLD

Date : 2/7/7

Insectide : **vertimec-tu6-19/12/06**

% control mortality : 7.14286 (8 / 112)

N	Killed	Total	Dose	Observed mortality	Corrected mortality (1st estimation)
1	11	73	0.03	15.1	8.5
2	14	83	0.1	16.9	10.4
3	48	82	0.3	58.6	55.3
4	68	69	1	98.6	98.5

Iterations : 17

$$Y = 7.0354 + 3.68173 * X$$

Natural mortality (last estimation) 11.6 %  $p(X^2 = 503.53, df = 2) = 0.0000$

Point #	Observed dead	Expected dead	X <sup>2</sup> Contribution
1	11	8.45	503.2910
2	14	13.25	0.1433
3	48	48.92	0.0418
4 *	68	67.72	0.0539

A star (\*) after the point number indicates that an eventual high X<sup>2</sup> contribution of the point may be due to a low or high expected dead value.

Heterogeneity = 251.765 with 2 degree of freedom.

n	Dose	Mortality corr (%)	probit treated	Total	Killed expected	Killed contribution	X <sup>2</sup>
1	0.0300	4.0	3.6236	73	11	8.45	503.2910
2	0.1000	6.0	3.7395	83	14	13.25	0.1433
3	0.3000	53.1	5.133	82	48	48.92	0.0418
4	1.0000	98.4	7.1544	69	68	67.72*	0.0539

LC	Level of conf.	Range
01 = 0.06534	0.95	0.00005 < LC < 84.30868
02 = 0.07749	0.95	0.00012 < LC < 50.28624
03 = 0.08634	0.95	0.00020 < LC < 36.45593
04 = 0.09366	0.95	0.00031 < LC < 28.73957
05 = 0.10008	0.95	0.00042 < LC < 23.75319
10 = 0.12562	0.95	0.00124 < LC < 12.69009
20 = 0.16543	0.95	0.00421 < LC < 6.49245
30 = 0.20177	0.95	0.00912 < LC < 4.46086
40 = 0.23906	0.95	0.01562 < LC < 3.65808
50 = 0.28002	0.95	0.02224 < LC < 3.52609
60 = 0.32800	0.95	0.02649 < LC < 4.06085
70 = 0.38861	0.95	0.02615 < LC < 5.77472
80 = 0.47397	0.95	0.02081 < LC < 10.79660
90 = 0.62418	0.95	0.01192 < LC < 32.70104
95 = 0.78351	0.95	0.00669 < LC < 91.78924
96 = 0.83716	0.95	0.00559 < LC < 125.50329
99 = 1.19998	0.95	0.00198 < LC < 729.39144

Regression line :  $Y = A + \text{slope} * (X - M)$

A = 5.14966 (SE : 0.12833) -Probit unit-

slope = 3.6817 (SE : 8.1254)

M = -0.5122 in log<sub>10</sub>(dose) unit and 0.3075 in dose unit

Variance of the LC<sub>50</sub> : 0.00124678 in log<sub>10</sub>(dose) unit

Heterogeneity = 251.765 with 2 df

