

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

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ *BEMISIA TABACI*
(HEMIPTERA:ALEYRODIDAE) ΣΤΟ
IMIDACLOPRID**

**ΣΠΟΥΔΑΣΤΗΣ: Γιαννιός Νικόλαος
ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: Δρ. Ροδιτάκης Εμμανουήλ**

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2003

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ θερμά τον εισηγητή μου, Δρ. Ροδιτάκη Εμμανουήλ για την συνεχή καθοδήγηση και αμέριστη συμπαράσταση που μου παρείχε κατά τη διάρκεια της πτυχιακής μελέτης καθώς και σε όλη τη διάρκεια της πρακτικής μου εξάσκησης.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Δρ. Ροδιτάκη Νικόλαο για την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε, κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Καλιοντζάκη Καλλιόπη, Ροδιτάκη Ζαχαρία, Τσούκα Δήμητρα, καθώς και τους Μακρυγιαννάκη Μαρίνα και Σκουντάκη Ζαχαρένια, για την βοήθεια και την συμπαράσταση που μου πρόσφεραν στην προσπάθειά μου αυτή.

Bemisia tabaci resistance to the insecticide imidacloprid

Sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci* is a very important pest of field and greenhouse crops, due to the high reproduction rate and the transmission of serious plant viruses, pest control relayed heavily on chemical insecticides. The intensive chemical control in combination with the haplodiploid reproduction of *B. tabaci* resulted to the rapid development of insecticide resistance worldwide.

The aim of this dissertation is the investigation of the resistance level was observed of three whitefly population collected from greenhouse crops from Crete to the insecticide imidacloprid. The neonicotinoids insecticide imidacloprid is widely used for *B. tabaci* control all over the world.

A significant increase of the insecticide resistance level was observed for all three whitefly populations from Crete compared to the susceptible population Sud-s. In addition a positive correlation was observed between the resistance level and pest control tactics (i.e. frequency of insecticide applications). Particularly for the highly resistant population from Malades (heavily selected with chemical insecticides), a 30% of the population was totally insensitive to the presence of the insecticide imidacloprid at any concentration tested.

These finding are very important for *B. tabaci* resistance management and the implementation of integrated pest control management in greenhouse crops.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1°	2
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	2
1.1. <i>Bemisia tabaci</i>	2
1.1.1 Γενικά	2
1.1.2 Φυτά ξενιστές και ζημιές	2
1.1.3 Μορφολογικά – Βιολογικά χαρακτηριστικά	5
1.1.4 Αντιμετώπιση	8
1.2 IMIDACLOPRID	9
1.2.1 Γενικά	9
1.2.2 Μηχανισμός δράσης	11
1.2.3 Νικοτινοειδή – νεονικοτινοειδή	11
1.2.4 Εξειδικευμένη τοξικότητα του imidacloprid στα έντομα : που οφείλεται	12
1.3 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ENTOMOKTONA	13
1.3.1 Γενικά	13
1.3.2 Ανθεκτικότητα του <i>B. tabaci</i> στα εντομοκτόνα	14
1.3.3 Ανθεκτικότητα imidacloprid	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2°	16
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	16
2.1 Υλικά	16
2.1.1 Πληθυσμοί αλευρωδών	16
2.1.2 Φυτικό υλικό	18
2.1.3 Εντομολογικά κλουβιά	18
2.1.4 Όργανο αναρρόφησης των αλευρωδών	19
2.1.5 Νάρκωση αλευρωδών	20
2.1.6 Αεριζόμενα τριβλία petri	22
2.1.7 Χημικές ουσίες	23

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	23
2.2.1 Μέθοδος εμβάπτισης των φύλλων (leaf – dip)	23
2.2.2 Στατιστική μελέτη	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3°	27
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	27
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	31
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	34

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο αλευρώδη του καπνού, *Bemisia tabaci*, είναι ένας από τους πιο σημαντικούς εχθρούς των κηπευτικών και ανθοκομικών καλλιεργειών, εντός και εκτός θερμοκηπίου.

Ο ταχύς ρυθμός ανάπτυξης και η ικανότητα μετάδοσης καταστρεπτικών ιολογικών ασθενειών, οδήγησε τους καλλιεργητές στην εντατική χρήση εντομοκτόνων. Η χρήση αποκλειστικά χημικών για την αντιμετώπιση του σε συνδυασμό με τον τρόπο πολλαπλασιασμού οδήγησε στην ταχύτερη εμφάνιση του φαινομένου της ανθεκτικότητας.

Το αντικείμενο της παρούσας πτυχιακής μελέτης, είναι η διερεύνηση του επιπέδου ανθεκτικότητας στο εντομοκτόνο imidacloprid σε τρεις τοπικούς πληθυσμούς. Το imidacloprid ανήκει στην ομάδα εντομοκτόνων νεονικοτινοειδή, που χρησιμοποιείτε ευρύτατα, για την καταπολέμηση του *B. tabaci*.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν, βρέθηκε σημαντική αύξηση στα επίπεδα ανθεκτικότητας και στους τρεις τοπικούς πληθυσμούς (Μαλάδες, Στόμιο και Ιεράπετρα) σε σχέση με τον ευαίσθητο πληθυσμό αναφοράς.

Βρέθηκε επίσης θετική συσχέτιση μεταξύ πλήθους επεμβάσεων/καλλιεργητικών τεχνικών και του επιπέδου ανθεκτικότητας που παρατηρήθηκε. Ιδιαίτερα για τον πληθυσμό που είχε δεχτεί μεγάλη πίεση επιλογής (Μαλάδες), βρέθηκε ένα ποσοστό 30 % να είναι άνοσο.

Οι παραπάνω διαπιστώσεις, είναι πολύ σημαντικές για τον σχεδιασμό των προγραμμάτων αντιμετώπισης και διαχείρισης της ανθεκτικότητας του *B. tabaci*, σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 *Bemisia tabaci*

1.1.1 Γενικά

Ο αλευρώδης του καπνού *Bemisia tabaci* Gennadius, είναι ρυγχωτό της οικογένειας Aleurodidae και ανήκει στην τάξη Hemiptera και υπόταξη Homoptera. Είναι γνωστό και με τον αδόκιμο όρο «άσπρο» μυγάκι (Pollini, Ronti et al. 2000). Αποτελεί ένα από τα πιο επιβλαβή έντομα πολλών καλλιεργειών στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές σε ολόκληρο τον κόσμο (Kirk, Lacey et al. 1993).

Ο αλευρώδης του καπνού, αναφέρθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα το 1889 πάνω σε φυτά καπνού από τον Gennadius (1889) αν και η προέλευσή του δεν έχει διευκρινιστεί. Στης Η.Π.Α. καταγράφηκε στην γλυκοπατάτα το 1987 και στην ξένη βιβλιογραφία αναφέρεται ως sweetpotato whitefly. Την δεκαετία του '80 αναφερόταν ως σποραδικό παράσιτο. Στην Κρήτη ο *B. tabaci* επισημάνθηκε για πρώτη φορά το 1993 ως δευτερεύουσας σημασίας εχθρός στις θερμοκηπιακές καλλιέργειες στην περιοχή της Ιεράπετρας (Kirk, Lacey et al. 1993).

1.1.2 Φυτά ξενιστές και ζημιές

Ο *B. tabaci* εμφανίστηκε ως εχθρός αρχικά σε τροπικές, υποτροπικές και μεσογειακές περιοχές. Στην χώρα μας εμφανίζεται στην κεντρική και κυρίως στην νότια και νησιωτική Ελλάδα.

Ο *B. tabaci* αποτελεί σήμερα, έναν πολύ σοβαρό εχθρό. Έχουν αναφερθεί συνολικά, πάνω από 500 ξενιστές. Προσβάλει πολλά είδη

καλλιεργούμενων φυτών εντός και εκτός του θερμοκηπίου, καθώς και ανθοκομικών καλλιεργειών, με προτίμηση στα σολανώδη (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Κύρια καλλιεργούμενα φυτά που προσβάλλει ο *B. tabaci*.

Λαχανοκομικά και Φυτά Μεγάλης Καλλιέργειας	Ανθοκομικά
Τομάτα	Poisetia
Αγγούρια	Plumeria
Πεπόνια	Chrysanthemum
Βαμβάκι	Euphorbia
Φασολιά	Ipomoea
Πατάτα	Hibiscus
Μελιτζάνα	Dendrodium
Καπνός	Lantana
Πιπεριά	
Κολοκυθιά	

Ο *B. tabaci* προκαλεί ζημιές από την νύξη των φυτικών ιστών και την απομύζηση των φυτικών χυμών που πραγματοποιούνται από όλα τα νυμφικά στάδια και το ενήλικό. Λόγω της απομύζησης των χυμών, παρατηρούνται κιτρινίσματα στα φύλλα και μερική φυλλόπτωση με συνέπεια τη βλαστική αλλοίωση και συχνά ως επακόλουθο, στις σοβαρές περιπτώσεις, την καταστροφή του φυτού. Τα άφθονα μελιτώδη εκκρίματα που παράγει, επικαλύπτουν τη βλάστηση και τους καρπούς. Όταν μάλιστα παρατηρείται αυξημένη υγρασία, αναπτύσσεται καπνιά, η οποία πέρα από το ότι αλλοιώνει τα βλαστικά όργανα του φυτού, μειώνει και τη φωτοσυνθετική του δραστηριότητα και τη λειτουργία της διαπνοής του φυτού, καθώς και την εμπορική αξία των καρπών (Pollini, Ponti et al. 2000) (Εικόνα1).

Σημαντικές ζημιές προκαλούνται επίσης από την μετάδοση ιώσεων. Μπορεί να μεταφέρει πάνω από 20 διαφορετικούς ιούς όπως, ο ιός του κίτρινου καρουλιάσματος των φύλλων της ντομάτας (TYLCV) (Εικόνα 2), ο ιός του χρυσίζοντος μωσαϊκού της φασολιάς (BGMV) και ο ιός της ποικιλοχλώρασης της ντομάτας (ToMoV) (Pollini, Ponti et al. 2000).



Εικόνα 1. Συμπτώματα από την νύξη φυτικών ιστών και ανάπτυξη καπνιάς.



Εικόνα 2. Προσβολή από τον ιό του κίτρινου καρουλιάσματος των φύλων στην τομάτα.
Χαρακτηριστικός κίτρινος μεταχρωματισμός και μικροφυλλία.

1.1.3 Μορφολογικά – Βιολογικά χαρακτηριστικά

Ο διάρκεια του βιολογικού του κύκλου, επηρεάζεται κυρίως από την θερμοκρασία. Οι Gerling και Horowitz παρατήρησαν ότι στους 20 °C ο ρυθμός ανάπτυξης (R) ήταν 0,025 και η διάρκεια του κύκλου 40 ημέρες, ενώ στους 30 °C παρατηρήθηκε ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης (R) 0,60 (διάρκεια βιολογικού κύκλου 16 ημέρες) (Gerling, Horowitz et al. 1986).

Στο θερμοκήπιο, η διαχείμαση συντελείται σε οποιοδήποτε στάδιο ανάπτυξης κάτω από ευνοϊκές συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας. Την περίοδο του χειμώνα ο αλευρώδης βρίσκει καταφύγιο σε άγρια φυτά / ξενιστές που εξασφαλίζουν την επιβίωση του εντόμου.

Ο τρόπος αναπαραγωγής του *B. tabaci* είναι απλοδιπλοειδής. Συγκεκριμένα, έχουμε παρθενογενετική αρενοτοκία, όπου τα αρσενικά απλοειδή άτομα προέρχονται από αγονιμοποίητα ωά, ενώ τα θηλυκά διπλοειδή προέρχονται από γονιμοποιημένα ωά.

Στάδια του βιολογικού κύκλου του *B. tabaci*

Αυγό: Είναι καστανό και με σχήμα ωοειδές (Εικόνα 3). Τα ωά παραμένουν «καρφωμένα» στα φύλλα, μέσω ενός κοντού μίσχου. Είναι διατεταγμένα σε ημικύκλιο, σε μια ή δύο σειρές, καθώς το θηλυκό περιστρέφει το σώμα του γύρω από το βυθισμένο στον φυτικό ιστό ρύγχος του όταν γεννά μια ομάδα αυγών, προτού μετακινηθεί σε άλλη θέση. Στην περίπτωση έντονης προσβολής, τα ωά εναποτίθενται με άτακτο τρόπο, καταλαμβάνοντας μεγάλο μέρος του ελάσματος του φύλλου. Ο αριθμός τους εξαρτάται από την θερμοκρασία και από το φυτό ξενιστή (Pollini, Ponti et al. 2000).

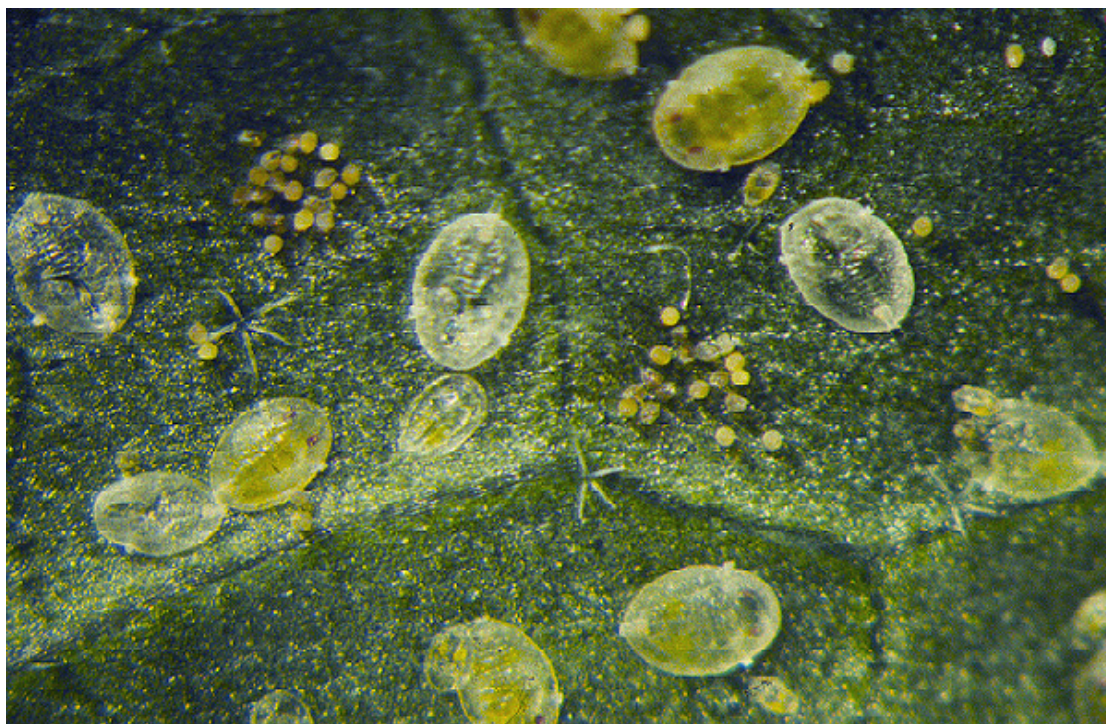
Προνύμφη: Η νυμφική ανάπτυξη, ολοκληρώνεται μέσα από 4 στάδια (Εικόνα 4). Η νύμφη πρώτου σταδίου είναι κινητή, χρώματος ανοιχτοπράσινο. Αφού επιλέξει κατάλληλη θέση στην κάτω επιφάνεια του φύλλου, εισάγει το ρύγχος της και παραμένει σε αυτή την θέση ως την ενηλικίωση. Η νύμφη δευτέρου σταδίου σκεπάζεται σε μικρό βαθμό από κηρώδη νήματα και από σταγόνα μελιτώδους απεκκρίματος, ενώ οι προνύμφες 3^{ου} και 4^{ου} σταδίου και η νύμφη

σκεπάζεται με άφθονα τέτοια κηρώδη νήματα. Το τελευταίο στάδιο ονομάζεται ρυρα, από το οποίο εξέρχεται το ακμαίο (Pollini, Ponti et al. 2000).

Ενήλικο: Το χαρακτηριστικό τους γνώρισμα είναι το λευκό χρώμα των πτερυγών που οφείλετε σε μια πολύ λεπτή, άσπρη, κηρώδη ουσία που εκκρίνεται από τους αδένες του εντόμου (Pollini, Ponti et al. 2000) (Εικόνα 5). Το σώμα του εντόμου είναι χρώματος ωχροκίτρινου και έχει μήκος 1,2-1,8 mm, διακεκριμένη κεφαλή, σύνθετους οφθαλμούς και δύο απλούς οφθαλμούς. Οι κεραίες είναι κοντές ή λίγο μακρύτερες από το κεφάλι τους και ρύγχος ελεύθερο. Ο θώρακας στα περισσότερα είδη φέρει δύο ζεύγη πτερυγών έχοντας μόνο δύο νευρώσεις. Τα πόδια τους είναι μακριά και λεπτά. Η κοιλιά τους διακρίνεται καλά και καταλήγει στον ωσθέτη (Τζανακάκης 1998).



Εικόνα 3. Ωά του *B. tabaci*.



Εικόνα 4. Προνύμφες του *B. tabaci*.



Εικόνα 5. Ενήλικο άτομο του *B. tabaci*.

Τα βιολογικά χαρακτηριστικά όπου υπογραμμίζουν την δυναμικότητα του αλευρώδη του καπνού, ως εχθρού των κηπευτικών αλλά και την δυσκολία ανάπτυξης ενός αποτελεσματικού τρόπου διαχείρισης συνοψίζονται παρακάτω:

- μεγάλος αριθμός γενεών το χρόνο, (12 γενιές σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες)
- υψηλή αναπαραγωγική ικανότητα, (80-300 αυγά/ θηλυκό) (Gerling, Horowitz et al. 1986)
- δυνατότητα μετανάστευσης, (σε μεγάλες αποστάσεις) (Byrne 1999)
- αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες, (max 32⁰ C) (Gerling, Horowitz et al. 1986)
- μεγάλος αριθμός ξενιστών (> από 500) και
- ικανότητα να μεταδίδει καταστροφικούς ιούς στα φυτά (> από 20) (Ellsworth, Siegla et al. 1999; Naranjo 2001; Oliveira, Henneberry et al. 2001).

1.1.4 Αντιμετώπιση

Η αντιμετώπιση του αλευρώδη, αποδεικνύεται αρκετά δύσκολη, εάν δεν πραγματοποιηθεί με ορθολογικό τρόπο, μέσα από την χρήση βιολογικών και χημικών μέσων. Πριν αρχίσει ο νέος καλλιεργητικός κύκλος, απαιτείται ο καθαρισμός του θερμοκηπίου από κάθε είδους βλάστηση, φροντίζοντας να καταστραφούν τα αυτοφυή σολανώδη και όλα τα άλλα προσβεβλημένα φυτά ξενιστές, που βρίσκονται γύρω από το θερμοκήπιο. Αρκετά χρήσιμη έχει αποδειχθεί η απολύμανση του χώρου με υποκαπνισμό (Pollini, Ponti et al. 2000).

Στην εγκατάσταση μιας καλλιέργειας θα πρέπει πάντα να χρησιμοποιούνται υγιή φυτά. Στις υπό κάλυψη καλλιέργειες, φαίνεται να είναι αρκετά χρήσιμη η χρήση χρωματροπικών παγίδων ή πιάτα κίτρινου χρώματος, αλειμμένα με εντομολογική κόλλα, τα οποία προσελκύουν και συλλαμβάνουν τα ακμαία. Οι παγίδες, κρεμιούνται όρθιες, 20 cm πάνω από τα φυτά (40 παγίδες / στρέμμα). Η αντιμετώπιση του *B. tabaci* μπορεί να γίνει

επίσης με βιολογικούς εχθρούς όπως το Υμενόπτερο *Eretmocerus mundus*, *E. eremicus*, *E. orientalis tejanus*, τα αρπακτικά είδη της οικογένειας Miridae (*Macrolophus caliginosus*, *M. costalis*, *Dicyphus errans* και το *Nesidiocoris tenuis*) και της οικογένειας Anthocoridae (*Orius niger*, *O. laevigatus maderensis*, *O. horvathi* και *O. minutus* (Naranjo 2001). Επίσης η αντιμετώπιση του *B. tabaci* μπορεί να γίνει με μύκητες όπως *Aschersonia aleyrodidis*, *A. andropogonis*, *Beauveria bassiana* και *Verticillium lecanii* (Faria and Wraight 2001).

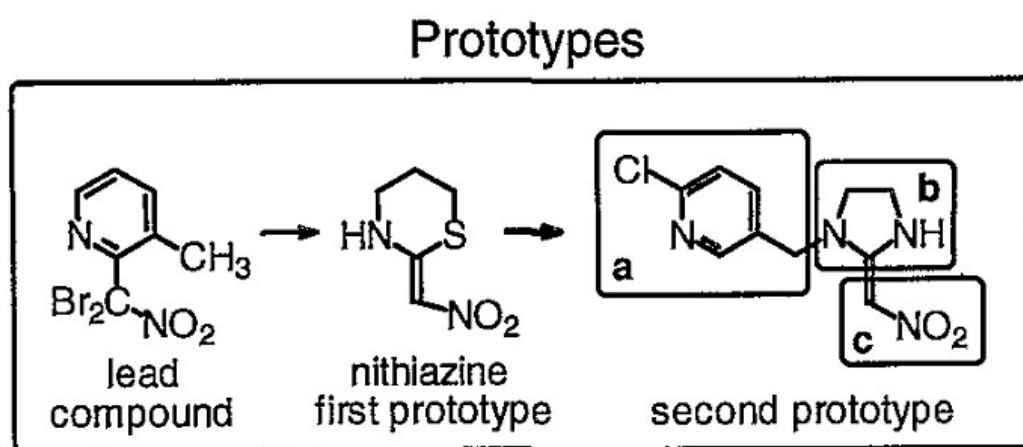
Η χημική καταπολέμηση είναι ιδιαίτερα δύσκολη, λόγω της σύγχρονης παρουσίας διαφορετικών σταδίων εξέλιξης των εντόμων και λόγω της συνεχούς αλληλουχίας των γενεών. Εναντίον των ακμαίων του *B. tabaci* χρησιμοποιούνται οργανοφωσφορικά, καρβαμιδικα, πυρεθρινοειδή και τα νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα. Πολλά εντομοκτόνα δείχνουν να μην είναι σε θέση να μπορούν να ελέγξουν τα στάδια των ωών και των νυμφών. Το pyriprooxyfen και το buprofezin είναι δραστικές ουσίες που ανήκουν στην ομάδα των ρυθμιστών αύξησης εντόμων, οι οποίες είναι πολύ αποτελεσματικές κατά των ωών και των νυμφών του 2^{ου} και 3^{ου} σταδίου αντίστοιχα (Faria and Wraight 2001).

1.2 IMIDACLOPRID

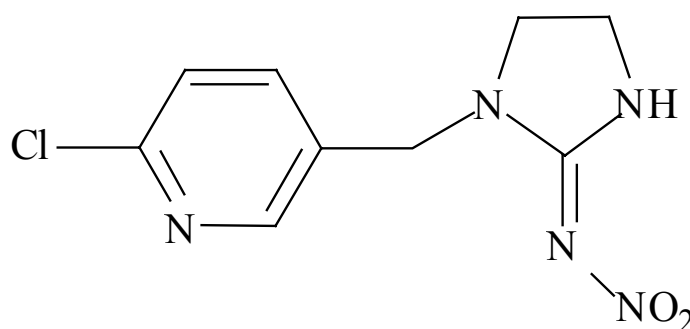
1.2.1 Γενικά

Το imidacloprid ανήκει σε μια από τις πιο σημαντικές νέες ομάδες εντομοκτόνων, τα νεονικοτινοειδή. Ο τρόπος δράσης του imidacloprid (IMI), είναι παρόμοιος με αυτόν της νικοτίνης, όμως η ένωση από την οποία προήλθε είναι η 2-(dibromonitromethyl)-3-methylpyridine (Εκόνα 6, Lead compound). Η ένωση αυτή, ανακαλύφθηκε από την εταιρία Shell το 1970 και είχε χαμηλή εντομοκτόνο δράση. Από μετατροπές στην στέρεοδομή αυτής της ένωσης από τους Soloway *et al* προέκυψε η nithiazine, μια νιτρομεθυλιωμένη ετεροκυκλική οργανική ένωση με πολύ υψηλή εντομοκτόνο δράση, αλλά με πολύ μικρή φωτοσταθερότητα.

Το imidacloprid (Εικόνα 7), ανακαλύφθηκε από τους Kagabu *et al* το 1985 στην Ιαπωνία (Nihon Tokushu Noyaku Seizo Co.) από μελέτες βελτιστοποίησης των ιδιοτήτων της nithiazine. Ο πρόδρομος του imidacloprid, φαίνεται στην Εικόνα 6 και αναφέρεται ως: *second prototype*, (1-(6-chloropyridin-3-ylmethyl)-2-nitromethylene-imidazolidine). Ανάλογα με το είδος του εντόμου βρέθηκε ότι, το imidacloprid ήταν από 62 έως 3000 φορές πιο δραστικό από τη νικοτίνη. Το imidacloprid κυκλοφόρησε στην αγορά το 1991, από την εταιρία Bayer AG και πολύ γρήγορα σημείωσε μεγάλη επιτυχία (Perry, Yamamoto *et al.* 1997; Tomizawa and Casida 2003)



Εικόνα 6. Οι ενώσεις 'πρόγονοι' του imidacloprid (Tomizawa and Casida 2003).



Εικόνα 7. Ο χημικός τύπος του imidacloprid.

Ονομασία κατά IUPAC: 1-((6-chloro-3-pyridinyl)methyl)-N-nitro-2-imidazolidinimine (Perry, Yamamoto *et al.* 1997)

1.2.2 Μηχανισμός δράσης

Η ακετυλοχολίνη (ACh), είναι ο σημαντικότερος νευροδιαβιβαστής στο νευρικό σύστημα των εντόμων αλλά και των θερμόαιμων. Η μετάδοση του νευρικού παλμού στο σημείο σύναψης μεταξύ δύο κύτταρων του νευρικού συστήματος, γίνεται σε δύο φάσεις. Πρώτα, απελευθερώνεται Ach από την μεμβράνη του κυττάρου πριν την σύναψη (presynaptic membrane), η οποία αλληλεπιδρά με την περιοχή στόχου στην εξωκυτταρική περιοχή του συμπλέγματος nAChR / διόδου ιόντων επί της μεμβράνης του κυττάρου, μετά την σύναψη (postsynaptic membrane). Στην επόμενη φάση, αλλάζει η μορφή της διόδου ιόντων του νευρικού κυττάρου και επιτρέπεται η εισροή ιόντων Na⁺ και η έξοδος ιόντων K⁺ με αποτέλεσμα, να επιδρά στην ισορροπία του δυναμικού της μεμβράνης και κατά συνέπεια να μεταφέρεται ο νευρικός παλμός (Tomizawa and Casida 2003).

Εντομοκτόνα όπως, η νικοτίνη και το imidacloprid, αλληλεπιδρούν ανταγωνιστικά με τον υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (nicotine acetylcholine receptor: nAChR) Η ισχυρή δέσμευση του υποδοχέα προκαλεί διέγερση του νευρικού συστήματος, παράλυση και θάνατο του εντόμου (Perry, Yamamoto et al. 1997).

Ο μηχανισμός δράσης του imidacloprid, έχει μελετηθεί στον *B. tabaci* και βρέθηκε να είναι παρόμοιος με αυτόν στα άλλα είδη εντόμων (Chao, Dennehy et al. 1997).

1.2.3 Νικοτινοειδή – νεονικοτινοειδή

Τα νικοτινοειδή και νεονικοτινοειδή, είναι δυο ομάδες εντομοκτόνων, που αποτελούνται από ενώσεις οι οποίες έχουν κοινά χαρακτηριστικά :

α) στην χημική δομή τους και β) στον τρόπο δράσης τους (αλληλεπιδρούν ανταγωνιστικά με τον υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (nAChR)).

Στα νικοτινοειδή ανήκουν μεταξύ άλλων οι ενώσεις, nicotine, anabasine και epibatidine. Στα νεονικοτινοειδή ανήκουν οι ενώσεις, imidacloprid

thiacloprid, acetamiprid, thiamethoxam και άλλες, που ονομάζονται νεονικοτινοειδή δεύτερης γενιάς.

Τα νικοτινοειδή και νεονικοτινοειδή, παρουσιάζουν μεταξύ τους δύο πολύ σημαντικές διαφορές:

1. Σε ουδέτερο pH, τα νικοτινοειδή βρίσκονται σε ιοντική μορφή ενώ τα νεονικοτινοειδή δεν βρίσκονται σε ιοντική μορφή
2. Τα νικοτινοειδή, εμφανίζουν εξειδικευμένη τοξικότητα για τα θερμόαιμα ενώ τα νεονικοτινοειδή εμφανίζουν εξειδικευμένη τοξικότητα για τα έντομα (Perry, Yamamoto et al. 1997; Tomizawa and Casida 2003).

1.2.4 Εξειδικευμένη τοξικότητα του imidacloprid στα έντομα

Παρακάτω αναλύονται οι λόγοι για τους οποίους παρατηρείται εξειδικευμένη τοξικότητα του imidacloprid και γενικότερα των νεονικοτινοειδών στα έντομα.

A) Για να επιτευχθεί ισχυρή δέσμευση του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης στα έντομα, απαιτείται η παρουσία στο μόριο της δραστικής ένωσης δυο ατόμων φορτισμένων θετικά (+) σε απόσταση 5.9 Å (ισχύει στα νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα). Για την δέσμευση του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης στα θερμόαιμα απαιτείται μόνο ένα άτομο, ενώ η παρουσία 2 ατόμων έχει σαν αποτέλεσμα ασθενέστερη δέσμευση του υποδοχέα.

B) Στα έντομα, οι υποδοχείς της ακετυλοχολίνης, βρίσκονται μόνο στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Το imidacloprid δεν μπορεί να διαπεράσει εύκολα την επιδερμίδα των εντόμων. Όμως αφού εισέλθει στο σώμα του εντόμου (μυζητικά έντομα), μεταφέρετε εύκολα στο νευρικό σύστημα διότι δεν είναι σε ιοντική μορφή. Αντίθετα η νικοτίνη βρίσκεται σε ιοντική μορφή, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως και δεν μπορεί το μόριο να φτάσει εύκολα στην περιοχή στόχου του νευρικού συστήματος.

Γ) Στα θερμόαιμα, οι υποδοχείς της ακετυλοχολίνης, βρίσκονται στο κεντρικό αλλά και στο περιφερικό νευρικό σύστημα. Το imidacloprid δεν μπορεί να διαπεράσει εύκολα την επιδερμίδα των εντόμων, αλλά και πάλι η δέσμευση με τον nAChR είναι ασθενής. Αντίθετα, η νικοτίνη λόγω της ιοντικής μορφής,

δεσμεύεται ισχυρά με τους nAChR του περιφερειακού νευρικού συστήματος με αποτέλεσμα, την υψηλή τοξικότητα στα θερμόαιμα παρότι και αυτή η ένωση παρουσιάζει μειωμένη διαπερατότητα της επιδερμίδας (Perry, Yamamoto et al. 1997; Tomizawa and Casida 2003).

1.3 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ

1.3.1 Γενικά

Η ανθεκτικότητα, ορίζεται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization) ως εξής: *'the development of an ability in a given strain of insect to tolerate doses of an insecticide which would prove lethal to the majority of individuals in a normal population of the same species'* (Brown 1958). Σε ελεύθερη μετάφραση, η ανθεκτικότητα ορίζεται ως η ανάπτυξη της ικανότητας από ένα πληθυσμό (στέλεχος) ενός είδους εντόμου, να ανέχεται την έκθεση σε δόση εντομοκτόνου που κανονικά θα ήταν θανατηφόρα για τα περισσότερα άτομα του πληθυσμού του ίδιου είδους.

Η ανάπτυξη της ανθεκτικότητας, οφείλεται στην επιλογή ατόμων από τον πληθυσμό που φέρουν αλληλόμορφα γονίδια, όπου σχετίζονται με την εμφάνιση της ανθεκτικότητας.

Οι πιο σημαντικοί παράγοντες που εμπλέκονται στην εμφάνιση της ανθεκτικότητας στα έντομα είναι:

1. Η αυξημένη αποδόμηση (μεταβολισμός) του εντομοκτόνου που οφείλεται σε ενζυμικά συστήματα τα οποία έχουν τροποποιηθεί είτε ως προς την δραστικότητα των ενζύμων είτε ως προς την παραγόμενη ποσότητα
2. Η τροποποιημένη περιοχή βιοχημικής δράσης του εντομοκτόνου με αποτέλεσμα την μειωμένη συγγένεια μεταξύ στόχου - εντομοκτόνου και κατά συνέπεια μειωμένη δέσμευση του στόχου.

Η ανθεκτικότητα επίσης οφείλεται, στην μειωμένη διαπερατότητα του εντομοκτόνου λόγω μορφολογικών διαφοροποιήσεων του εντόμου, όπως επίσης και σε τροποποιημένη συμπεριφορά του εντόμου (π.χ. αποφυγή) κατά την παρουσία του εντομοκτόνου.

1.3.2 Ανθεκτικότητα του *B. tabaci* στα εντομοκτόνα

Στη διάρκεια των τελευταίων 30 χρόνων, ο *B. tabaci* ανέπτυξε ανθεκτικότητα σε όλες σχεδόν της ομάδες εντομοκτόνων. Τρεις λόγοι οδήγησαν στο φαινόμενο αυτό:

1. Η συχνή εφαρμογή εντομοκτόνων
2. Ο μεγάλος αριθμός γενεών το χρόνο σε συνδυασμό με τον τρόπο αναπαραγωγής (παρθενογενετική αρενοτοκία) (Dittrich, Uk et al. 1990; Byrne and Devonshire 1993; Denholm, Cahill et al. 1996; Palumbo, Horowitz et al. 2001).

Ανθεκτικότητα έχει αναφερθεί, στις παρακάτω ομάδες εντομοκτόνων:

1. Οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα: 16 δραστικές ουσίες (acephate, chlorfenvinphos, chlorpyrifos, dicrotophos, dimethoate, isazophos, malathion, methamidophos, methidathion, methyl parathion, monocrotophos, parathion, phospholan, profenofos, quinalphos, sulprofos) (Horowitz, Toscano et al. 1988; Moore, Tabashnik et al. 1989; Dittrich, Ernst et al. 1990; Georghiou and Lagunes-Tejeda 1991; Omer, Tabashnik et al. 1993; Cahill, Denholm et al. 1996; Grafton - Cardwell, Ouyang et al. 1998)
2. Πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα: 7 δραστικές ουσίες (bifenthrin, cyhalothrin, cypermethrin, deltamethrin, fenpropathrin, fenvalerate, permethrin) (Horowitz, Toscano et al. 1988; Moore, Tabashnik et al. 1989; Dittrich, Ernst et al. 1990; Georghiou and Lagunes-Tejeda 1991; Cahill, Denholm et al. 1996)
3. Καρβαμιδικα εντομοκτόνα: 3 δραστικές ουσίες (carbofuran, methomyl, butocarboxim) (Georghiou and Lagunes-Tejeda 1991; Omer, Johnson et al. 1993)
4. Οργανοχλωριομένα εντομοκτόνα: 3 δραστικές ουσίες (bhc / cccycloienes, ddt, endosulfan) (Georghiou and Lagunes-Tejeda 1991; Cahill, Denholm et al. 1996)
5. Νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα: 3 δραστική ουσία (imidacloprid, acetamiprid, thiamethoxan) (Cahill, Gorman et al. 1996; Nauen, Stumpf et al. 2002) και τέλος
6. Ρυθμιστές ανάπτυξης εντόμων (μιμητικά νεανικής ορμόνης και παρεμποδιστές σύνθεσης χητίνης): 3 δραστικές ουσίες (buprofezin, etofenprox, pyriproxyfen) (Horowitz and Ishaaya 1994).

1.3.3 Ανθεκτικότητα στο imidacloprid

Ο μηχανισμός ανθεκτικότητας που έχει αναφερθεί για τα νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα, σχετίζεται με την αποδόμηση της δραστικής ουσίας, από την αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα οξειδωτικών ένζυμων (microsomal mixed-function oxidases ή MFO). Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι, η παρατηρούμενη ανθεκτικότητα δεν οφείλεται σε μειωμένη ικανότητα δέσμευσης του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης από την δραστική ουσία λόγω τροποποίησης της περιοχής στόχου (Nauen, Stumpf et al. 2002).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ

2.1.1 Πληθυσμοί αλευρωδών

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις πληθυσμοί αλευρωδών, οι οποίοι διατηρούνταν στον χώρο του θερμοκήπιο και του εργαστηρίου εντομολογίας, μέσα σε ειδικούς εντομολογικούς κλωβούς (Εικόνα 8).

Οι πληθυσμοί αυτοί προέρχονταν :

A) Από την περιοχή Μαλάδες από θερμοκήπιο με ανθοκομικά φυτά, *Lantana camara* και *Hibiscus* sp.. Η καλλιέργεια αυτή ήταν ιδιαίτερα απομονωμένη καθώς στην περιοχή καλλιεργούνταν αποκλειστικά αμπέλια και ελιές. Η καταπολέμηση γινόταν με χημικά μέσα κατά περίπτωση.

B) Από την περιοχή της Ιεράπετρας (Σταθμός Γεωργικής Έρευνας της Ιεράπετρας), από φυτά μελιτζάνας σε θερμοκήπιο. Η καλλιέργεια ήταν πειραματική και γίνονταν 10 ψεκασμοί ανά καλλιεργητική περίοδο.

Γ) Από την περιοχή Στόμιο, από φυτά μελιτζάνας σε θερμοκήπιο. Η καλλιέργεια ήταν εμπορική και γίνονταν 30 ψεκασμοί ανά καλλιεργητική περίοδο.

Δ) Ο πληθυσμός SUD-S είχε συληχθεί το 1978 και έκτοτε διατηρείται στο εργαστήριο του επιστημονικού σταθμού Rothamster Research (UK). Χρησιμοποιείται διεθνώς ως ευαίσθητος πληθυσμός αναφοράς.



Εικόνα 8. Εντομολογικός κλωβός.

2.1.2 Φυτικό υλικό

Για της ανάγκες των πειραμάτων και της εκτροφής των αλευρωδών χρησιμοποιήθηκαν φυτά βαμβακιού, τα οποία αναπτύχθηκαν στον χώρο του θερμοκηπίου και ήταν προστατευμένα από έντομα και άλλους ζωικούς εχθρούς.

Η σπορά τους έγινε σε δίσκους των 50 θέσεων (4x4 cm) και το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν HUMINSUBSTRAT N2. Όταν τα φυτά αναπτύχθηκαν και έφτασαν στα δύο πραγματικά φύλλα μεταφυτεύτηκαν σε πλαστικά γλαστράκια, 10 x 9 cm, με το ίδιο φυτικό υπόστρωμα.

Τα φυτά ποτίζονταν καθημερινά και για την καλύτερη ανάπτυξη τους, λιπαίνονταν με υδατοδιαλυτό λίπασμα Complezal σε δοσολογία 5ml / Lt ανά εβδομάδα.

2.1.3 Εντομολογικά Κλουβιά

Η εκτροφή των πληθυσμών από τις περιοχές Μαλάδες, Ιεράπετρα και Στόμιο, γινόταν σε ειδικούς εντομολογικούς κλωβούς που διατηρούνταν στο χώρο του θερμοκηπίου. Οι διαστάσεις τους ήταν, 0,80 x 0,80 x 1,50 cm και ήταν κατασκευασμένοι, από ξύλο και περιμετρικά καλυμμένοι με λευκή σήτα, για αερισμό. Ο SUD-S διατηρούταν μέσα σε ειδικά εντομολογικά κλουβιά διαστάσεων 0,50 x 0,50 x 1 cm, στο χώρο του εργαστηρίου, κατασκευασμένα από ξύλο και καλυμμένα περιμετρικά από πλαστικό τζάμι και ανοίγματα, καλυμμένα με λεπτή σήτα, επέτρεπαν τον καλό αερισμό.

Σε κάθε κλωβό, τοποθετήθηκαν τρία με τέσσερα φυτά βαμβακιού και μια φορά την εβδομάδα γινόταν αντικατάσταση των παλαιότερων φυτών, με νεαρά φυτά.

2.1.4 Όργανο αναρρόφησης των αλευρωδών

Το όργανο αναρρόφησης, κατασκευάστηκε στο εργαστήριο για την συλλογή των αλευρωδών από τους εντομολογικούς κλωβούς (Εικόνα 9). Το όργανο αυτό αποτελείται από ένα κυλινδρικό πλαστικό δοχείο μήκους 7 cm και διαμέτρου 6 cm, ένα σωλήνα πολυαιθυλενίου 30 cm, ένα κομμάτι ειδικής λεπτής σήτας και τέλος δυο κίτρινα 'tips', V=100μl, που χρησιμοποιούνται στις αυτόματες πιπέτες.

Στο καπάκι του δοχείου, ανοίχτηκαν δύο οπές διαμέτρου 1 mm και τοποθετήθηκαν τα δύο 'tips'. Στο ένα 'tip', προσαρμόστηκε ο σωλήνας πολυαιθυλενίου, αφού πριν στην άκρη του σωλήνα είχε τοποθετηθεί με κόλλα, ειδική λεπτή σήτα έτσι ώστε να εμποδίζει, την αναρρόφηση των αλευρωδών στον σωλήνα πολυαιθυλενίου.

Το άλλο 'tip' ερχόταν σε επαφή με το φύλλο του φυτού, όπου εκτρέφονταν οι αλευρώδης και με αναρρόφηση, συλλέγονταν μέσα στο δοχείο.



Εικόνα 9. Όργανο αναρρόφησης αλευρωδών.

2.1.5 Νάρκωσης αλευρωδών

Για την νάρκωση των αλευρωδών κατασκευάστηκε στο εργαστήριο, μια συσκευή νάρκωσης (Εικόνα 10), η οποία αποτελούταν από ένα ειδικά διαμορφωμένο πλαστικό ορθογώνιο κουτί διαστάσεων 10 x 7 x 4 cm, που ήταν συνδεδεμένο με ένα σύστημα σωλήνων πολυαιθυλενίου, ένα υγραντήρα, ένα πλαστικό φελλό και μια φιάλη CO₂ υπό πίεση (Εικόνα 11).

Στο τοίχωμα του πλαστικού κουτιού, ανοίχτηκε μια οπή από την οποία, πέρασε η μια άκρη του σωλήνα πολυαιθυλενίου παροχής CO₂. Στο πάνω μέρος του κουτιού είχε ανοιχτεί ένα καπάκι, πάνω στο οποίο είχε προσαρμοστεί με μια οπή, διαστάσεων 9 x 5,5 cm, ειδική λεπτή σήτα.

Η άλλη άκρη του σωλήνα ήταν συνδεδεμένη με τον υγραντήρα. Ο υγραντήρας είναι μια κωνική φιάλη, V=1Lt, που περιείχε, 250 ml απεσταγμένο νερό. Η κωνική φιάλη είχε μια οπή εισόδου και μια εξόδου CO₂. Η οπή εισόδου ήταν μία πιπέτα, η οποία είχε προσαρμοστεί αεροστεγώς στον πλαστικό φελλό και σφράγιζε τον υγραντήρα. Η μια άκρη της πιπέτας ήταν συνδεδεμένη με την φιάλη του CO₂, μέσω του σωλήνα πολυαιθυλενίου, ενώ η άλλη ήταν τοποθετημένη μερικά εκατοστά κάτω από την επιφάνεια του νερού (Εικόνα 11). Το CO₂, διερχόταν αναγκάστηκε μέσω του υδάτινου περιβάλλοντος και τελικά το εξερχόμενο αέριο είχε αυξημένη σχετική υγρασία. Η παρουσία του υγραντήρα ήταν κρίσιμη, μειώνοντας έτσι το ποσοστό θνησιμότητας των αλευρωδών κατά τη διάρκεια των χειρισμών.



Εικόνα 10. Συσκευή νάρκωσης. Στο εσωτερικό παρατηρείται ο διάτρητος σωλήνας πολυαιθυλενίου παροχής CO₂.



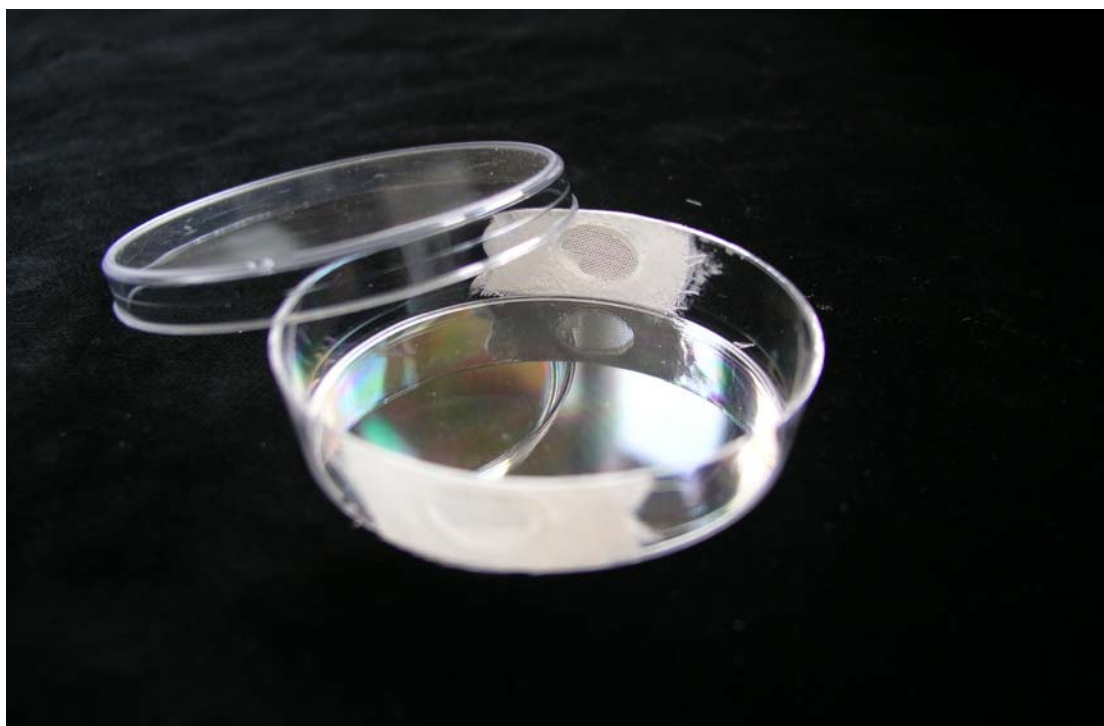
Εικόνα 11. Σύστημα νάρκωσης αλευρωδών.

2.1.6 Αεριζόμενα τριβλία Petri

Αεριζόμενα τριβλία petri, χρησιμοποιήθηκαν κατά την διεξαγωγή όλων των τοξικολογικών τεστ (Εικόνα 12).

Περιφερειακά των τριβλίων, ανοίχτηκαν 2 οπές διαμέτρου 1 cm με πυρακτωμένο μεταλλικό σωλήνα, οι οποίες επέτρεπαν τον καλό αερισμό στο εσωτερικό των τριβλίων, έτσι ώστε να επικρατούν ιδανικές συνθήκες κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων. Με την χρήση λίμας, εξαλείψαμε τις ανώμαλες επιφανείες που είχαν δημιουργηθεί από το άνοιγμα των οπών,

Στην συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε κόλλα και ειδική λεπτή σήτα διαστάσεων 2 x 1,5 cm για την κάλυψη των οπών.



Εικόνα 12. Αεριζόμενα τριβλία petri. Οι οπές είναι καλυμμένες με ειδική λεπτή σήτα που επιτρέπει τον αερισμό τους.

2.1.7 Χημικές ουσίες

Σε όλα τα διαλύματα χρησιμοποιήθηκε το εντομοκτόνο, Confidor 200 SL (BAYER AG, GERMANY) που περιείχε τη δραστική ουσία imidacloprid, (20,6% β./ο.).

Χρησιμοποιήθηκε επίσης το διαβρεκτικό σκεύασμα, Triton X-100 (Art. 11869 MERCK, GERMANY)(0,2 gr / Lt), το οποίο βοηθάει στην καλύτερη εμβάπτιση του φύλλου.

Για την δημιουργία στρώματος άγαρ, χρησιμοποιήθηκε το σκεύασμα Agar Bios Special LL (Biolife, Italy), με συγκέντρωση 2% β./ο. σε κωνική φιάλη 500 ml. Το αιώρημα θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων για 6 min μέχρι βρασμού. Μετά την θέρμανση, το μείγμα αφέθηκε να κρυώσει για 10 min πριν χρησιμοποιηθεί.

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Μέθοδος εμβάπτισης των φύλλων (leaf-dip)

Για την παρασκευή των διαλυμάτων, χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες όγκου 200 ml αφού πρώτα ξεπλύθηκαν με ακετόνη και στη συνέχεια με αιθανόλη, για εξάλειψη υπολειμμάτων εντομοκτόνων από προηγούμενα πειράματα.

Φύλλα βαμβακιού κόπηκαν περιφερειακά με αποστειρωμένο νυστέρι, σε διάμετρο 5,5 mm, έτσι ώστε να προσαρμόζονται στα αεριζόμενα τριβλία petri (Εικόνα 13). Έγινε εμβάπτιση 5 φύλλων σε διαδοχικές συγκεντρώσεις για 5 sec. Για τον μάρτυρα, τα φύλλα εμβαπτίστηκαν σε απεσταγμένο νερό και Triton X-100. Στην συνέχεια τοποθετήθηκαν πάνω σε διηθητικό χαρτί για να στεγνώσουν (1h).

Μετά το πέρασ 1h, τα φύλλα τοποθετήθηκαν με την επάνω πλευρά τους στο καπάκι των τριβλία petri, αφού προηγουμένως είχε τοποθετηθεί στρώμα άγαρ 2% β./ο.

Οι αλευρώδεις που συλλέχθηκαν από τα εντομολογικά κλουβιά, αναισθητοποιήθηκαν με την διοχέτευση CO₂ και τοποθετήθηκαν στην συσκευή νάρκωσης κάτω από το στερεοσκόπιο για να γίνει διαλογή των θηλυκών ατόμων. Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν μόνο θηλυκά άτομα, μειώνοντας έτσι την παραλλακτικότητα στα αποτελέσματα, λόγω του διαφορετικού αριθμού χρωμοσωμάτων μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων (βλέπε κεφ 1.1.3). Σε κάθε επανάληψη χρησιμοποιήθηκαν 20 άτομα αλευρωδών. Για κάθε συγκέντρωση διαλύματος πραγματοποιήθηκαν 5 επαναλήψεις. Ο συνολικός αριθμός αλευρωδών για κάθε συγκέντρωση ήταν 100 άτομα (Εικόνα 14). Κατά την διάρκεια της διαλογής τους, είχαμε συνεχή διοχέτευση διοξειδίου του άνθρακα.

Μετά την τοποθέτηση των αλευρωδών και σε διάστημα 30 min, έγινε καταμέτρηση των νεκρών ατόμων σε κάθε τριβλίο και ο αριθμός αυτός αφαιρέθηκε από της επόμενες μετρήσεις ως θνησιμότητα λόγω χειρισμών.

Μετρήσεις γίνονταν κάθε 24 h και η διάρκεια του πειράματος ήταν 72h. Γινόταν καταγραφή του αριθμού των ζωντανών και των νεκρών ατόμων των αλευρωδών. Ένα άτομο αλευρώδη θεωρείται ως νεκρό, όταν δεν παρουσιάζει καμία δραστηριότητα μετά από παρενόχληση.

Καταγραφή της θερμοκρασίας και της σχετικής υγρασίας (Rh) του χώρου, γινόταν καθ' όλη την διάρκεια των τεστ με την ειδικά συσκευή HOBO (Onset Computer Corporation), η οποία έπαιρνε μετρήσεις κάθε 3 min.

Όλα τα αντικείμενα που ήρθαν σε επαφή με τα διαλύματα, τοποθετήθηκαν σε δοχεία που περιείχαν αλκοόλη για 1 ημέρα έτσι ώστε αποφευχθούν προβλήματα υπολειμματικότητας. Πριν την φύλαξη τους καθαρίστηκαν με ακετόνη.



Εικόνα 13. Περιφερειακό κόψιμο των φύλλων με την βοήθεια νυστεριού. Η διάμετρος ήταν ίση με την διάμετρο από το καπάκι των τριβλίων petri.



Εικόνα 14. Αεριζόμενο τριβλίο petri μετά την τοποθέτηση των αλευρωδών.

2.2.2 Στατιστική μελέτη

Για την εκτίμηση της θνησιμότητας, όλα τα αποτελέσματα από τα τοξικολογικά τεστ είναι διορθωμένα, χρησιμοποιώντας τον τύπο του Abbott (1925):

$$M_c \% = M_\mu - M_t / 100 - M_t$$

όπου :

M_c = διορθωμένη θνησιμότητα

M_μ = εκτιμώμενη θνησιμότητα

M_t = θνησιμότητα μάρτυρα

Για την ανάλυση Probit των τοξικολογικών τεστ, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Probit – Logit Analysis Version 2.0 Raymond, Prato et al. (Raymond, Prato et al. 1993) βασισμένο στον Finney(1971).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

Αποτελέσματα

Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τους πληθυσμούς Μαλάδες, Στόμιο, Ιεράπετρα και SUD-S.

Πίνακας 2. Αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν στα τοξικολογικά τεστ για τους πληθυσμούς SUD-S, Μαλάδες, Στόμιο, Ιεράπετρα. Τα αποτελέσματα είναι διορθωμένα, με βάση την θνησιμότητα του μάρτυρα με τον τύπο του Abbott.

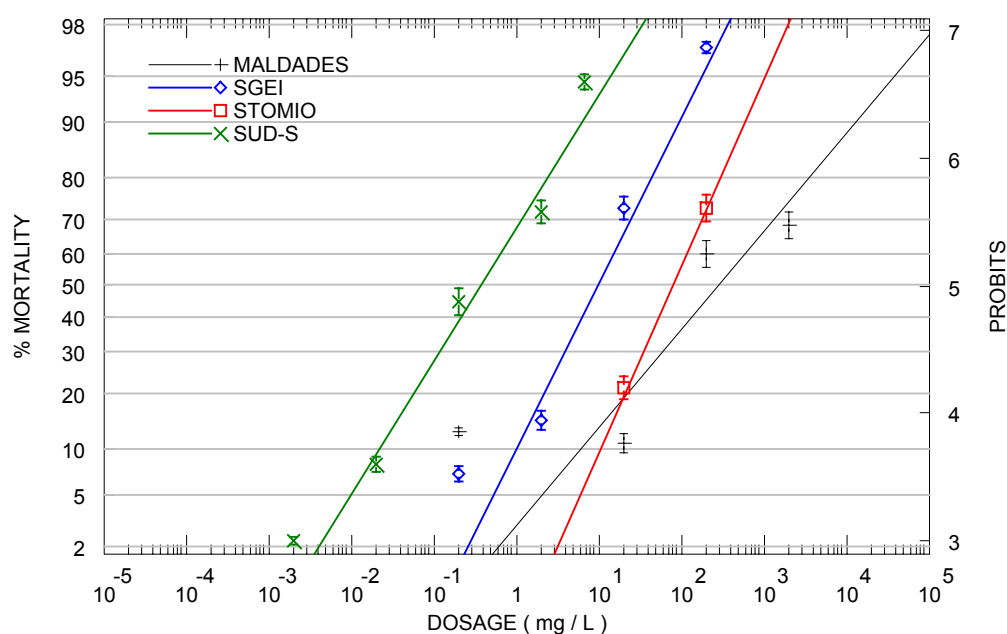
Θνησιμότητα (Mortality)				
Συγκέντρωση (ppm)	SUD-S	Μαλάδες	Στόμιο	Ιεράπετρα
2060	-	67,9%	98,4%	100%
206	-	59,7%	72,5%	100%
20,6	-	10,7%	21,1%	72,6%
6,866	94,3%	-	-	-
2,060	71,5%	1,3%	0	14,3%
0,206	44,7%	0	0	7 %
0,020	8,1%	-	-	-
0,002	2,3%	-	-	-

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2, οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στα τοξικολογικά τεστ, είναι διαφορετικές για τον SUD-S σε σχέση με τους άλλους πληθυσμούς. Αυτό έγινε επειδή ο πληθυσμός SUD-S είναι ευαίσθητος, με αποτέλεσμα στις υψηλές συγκεντρώσεις να έχουμε 100 % θνησιμότητα. Έτσι έχουμε ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων για καλύτερη αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Πίνακας 3. Αποτελέσματα ανάλυσης Probit από τις τοξικολογικές δοκιμές για τους τέσσερις πληθυσμούς του *B. tabaci*.

Πληθυσμοί	LC ₅₀	95% conf. limits	X ²	Slope	s.e.
SUD-S	0,36	0,24 - 0,52	62,35	1,04	0,10
Ιεράπετρα	9,54	4,14 – 21,85	17,87	1,30	0,32
Στόμιο	77,70	9,88 – 607,39	55,10	1,46	0,94
Μαλάδες	266,07	23,53 – 3011,92	5,37	0,76	0,46

Τα LC₅₀ προσδιορίστηκαν με ανάλυση Probit και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Συγκεκριμένα το LC₅₀ για τους πληθυσμούς SUD-S, Ιεράπετρα, Στόμιο και Μαλάδες είναι 0,36 9,54 77,70 και 266,07 αντίστοιχα.



Εικόνα 15. Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων από τα τοξικολογικά tests. Η συγκέντρωση σε λογαριθμική κλίμακα (Log10) και η θνησιμότητα σε κλίμακα Probit για τους πληθυσμούς Μαλάδες (—), Ιεράπετρα (—), Στόμιο (—) και SUD-S (—). Οι ευθείες προσδιορίστηκαν από την ανάλυση Probit, η οποία φαίνεται στον Πίνακα 3.

Από την Εικόνα 15, παρατηρούμε διαφορές μεταξύ των πληθυσμών. Διακρίνουμε τον πληθυσμό από τις Μαλάδες, ο οποίος φαίνεται να είναι και ο πιο ανθεκτικός από όλους του πληθυσμούς που εξετάστηκαν κατά τις τοξολογικές δοκιμές. Ακολουθεί ο πληθυσμός από το Στόμιο, έπειτα ο πληθυσμός από την Ιεράπετρα και τέλος ο SUD-S, που ήταν και ο πιο ευαίσθητος.

Πίνακας 4. Συγκριτική ανάλυση Probit για τους τέσσερις πληθυσμούς του *B. tabaci*, χρησιμοποιώντας γραμμικό μοντέλο για μη παράλληλες γραμμές. Στις γραμμές που σημειώνονται με * τα όρια εμπιστοσύνης (95 %) δεν αλληλεπικαλύπτονται και τα LC που προσδιορίστηκαν, διαφέρουν σημαντικά.

LC	Resistance Factor	95% conf. limits
Ιεράπετρα / Στόμιο		
50	8	2,52 – 26,22*
90	6	1,40 – 28,19*
10	11	1,18 – 93,58*
Ιεράπετρα / Μαλάδες		
50	28	12,72 – 61,03*
90	136	26,85 – 685,72*
10	6	1,17 – 27,90*
Στόμιο / Μαλάδες		
50	3	0,93 – 12,49
90	22	2,79 – 166,66*
10	1	0,04 – 6,57
SUD-S / Ιεράπετρα		
50	26	17,21 – 39,86*
90	25	7,95 – 27,93*
10	46	20,96 – 101,09*
SUD-S / Στόμιο		
50	213	70,12 – 648,01*
90	94	23,20 – 378,74*
10	485	60,59 – 3876,72*
SUD-S / Μαλάδες		
50	730	364,76 – 1460,76*
90	2023	440,58 – 9287,38*
10	263	62,68 – 1106,78*

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 4 βρέθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών. Ο πληθυσμός SUD-S βρέθηκε να διαφέρει σημαντικά από όλους τους πληθυσμούς. Συγκεκριμένα οι πληθυσμοί Μαλάδες, Στομίου και Ιεράπετρας ήταν, 730, 213 και 26 φορές πιο ανθεκτικοί από τον SUD-S.

Ο πληθυσμός από την Ιεράπετρα επίσης, παρουσίασε σημαντικές διαφορές από τους δύο άλλους τοπικούς πληθυσμούς. Συγκεκριμένα, οι πληθυσμοί από Μαλάδες και Στόμιο ήταν 28 και 8 φορές πιο ανθεκτικοί, σε σχέση με τον πληθυσμό από την Ιεράπετρα,

Οι πληθυσμοί από Μαλάδες και Στόμιο δεν παρουσίασαν σημαντική διαφοροποίηση.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όλοι οι πληθυσμοί που συλλέχθηκαν από καλλιεργούμενα φυτά, παρουσίασαν σημαντική αύξηση της ανθεκτικότητας σε σύγκριση με τον ευαίσθητο πληθυσμό SUD-S. Η παρατήρηση αυτή, ήταν αναμενόμενη καθώς όλοι οι πληθυσμοί δέχονταν πίεση επιλογής από τα εντομοκτόνα που εφαρμόζονταν στις καλλιέργειες.

Από τα αποτελέσματα βλέπουμε σημαντικές διαφορές μεταξύ των τοπικών πληθυσμών. Παρατηρούμε ότι αυτές οι διαφορές, μπορούν να συσχετιστούν με τις γεωργικές πρακτικές των καλλιεργειών από τις οποίες συλλέχθηκαν.

Ο πληθυσμός από την περιοχή Μαλάδες, ($LC_{50} = 266$) ήταν ο πιο ανθεκτικός από τους τέσσερις πληθυσμούς που ελέγχθηκαν. Ο πληθυσμός αυτός δέχτηκε πολύ έντονη πίεση από την εφαρμογή εντομοκτόνων για τρεις λόγους :

A) Στις ανθοκομικές καλλιέργειες επιτρέπονται εντομοκτόνα ευρέου φάσματος με μεγάλη υπολειμματική δράση που επιτρέπουν την επιλογή του πληθυσμού για μεγάλο χρονικό διάστημα.

B) Η καλλιέργεια των ανθοκομικών φυτών, γινόταν ολόκληρο το χρόνο χωρίς διακοπή έτσι ώστε να υπάρξει εξάλειψη του πληθυσμού για μεγάλο χρονικό διάστημα πριν την επαναμόλυνση της καλλιέργειας με άτομα *B. tabaci* που δεν θα είχαν υποστεί επιλογή.

Γ) Η καλλιέργεια είναι ιδιαίτερα απομονωμένη, καθώς στην περιοχή καλλιεργούνται αποκλειστικά αμπέλια και ελιές.

Ο πληθυσμός από το Στόμιο παρουσίασε ενδιάμεση αλλά υψηλή ανθεκτικότητα στο imidacloprid ($LC_{50} = 77$). Οι εμπορικές καλλιέργειες στην περιοχή της Ιεράπετρας δέχονται ένα ψεκασμό με εντομοκτόνο ανά εβδομάδα (30 / καλλιεργητική περίοδο). Στα προγράμματα αντιμετώπισης εντομολογικών εχθρών σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες, δίδεται ιδιαίτερα μεγάλο βάρος στο εντομοκτόνο imidacloprid στην αρχή της καλλιέργειας με ριζοπότισμα (φυτώριο, μεταφύτευση) και στη συνέχεια με ψεκασμούς.

Η πίεση επιλογής στον κλειστό χώρο του θερμοκηπίου για το διάστημα 8 μηνών περίπου που διαρκεί η καλλιεργητική περίοδος είναι πολύ μεγάλη.

Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, να παρατηρηθούν αυξημένα επίπεδα ανθεκτικότητας στον πληθυσμό από το Στόμιο, σε σύγκριση με τον πληθυσμό από την Ιεράπετρα ($LC_{50} = 9,54$) που προερχόταν από πειραματική καλλιέργεια μελιτζάνας ο οποίος δέχτηκε δέκα μόνο επεμβάσεις με εντομοκτόνο όλη την καλλιεργητική περίοδο.

Οι Nauen *et al* (2002), μελέτησαν πληθυσμούς από την περιοχή Almeria της Ισπανίας όπου είχαν αναφερθεί προβλήματα στην αντιμετώπιση του *B. tabaci* με το εντομοκτόνο imidacloprid. Οι Nauen *et al* (2002), βρήκαν ότι ο πληθυσμός E99-2 (Almeria Q) ήταν δεκατέσσερις φορές πιο ανθεκτικός από τον SUD-S στο εντομοκτόνο imidacloprid. Όπως διαπιστώθηκε, η ανθεκτικότητα στο imidacloprid οφειλόταν στην αυξημένη δραστηριότητα οξειδωτικών ενζύμων και όχι, σε μειωμένη ικανότητα δέσμευσης του imidacloprid στην περιοχή στόχου του νευρικού συστήματος.

Ο πληθυσμός από την περιοχή της Ιεράπετρας ήταν 26 φορές πιο ανθεκτικός από τον SUD-S. Η ανθεκτικότητα ήταν ίδιας τάξης μεγέθους με τον πληθυσμό από την Almeria. Αντίθετα οι πληθυσμοί από Στόμιο και Μαλάδες ήταν 213 και 760 φορές πιο ανθεκτικοί από τον SUD-S αντίστοιχα.

Για πρώτη φορά καταγράφηκαν παγκοσμίως, τέτοια επίπεδα ανθεκτικότητας στο εντομοκτόνο imidacloprid για τον αλευρώδη του καπνού, *B. tabaci*.

Συγκεκριμένα για τον πληθυσμό από Μαλάδες, δεν επιτεύχθηκε ποτέ θνησιμότητα 100 %. Παρατηρήθηκε δε, παρόμοια ανθεκτικότητα για την συγκέντρωση 206 ppm και 2060 ppm (59 και 67 %). Από τα αποτελέσματα μπορούμε να διαπιστώσουμε ότι, το 30 % του πληθυσμού ήταν άνοσο στο imidacloprid, καθώς δεν μπορεί να εφαρμοστεί μεγαλύτερη συγκέντρωση από 2060 ppm διότι παρατηρείται καθίζηση της δραστικής ουσίας.

Ο μηχανισμός της ανθεκτικότητας για τους τοπικούς πληθυσμούς δεν έχει μελετηθεί. Υποθέτουμε όμως ότι η ανθεκτικότητα που παρατηρήθηκε δεν οφείλεται μόνο σε ενζυμική διάσπαση της δραστικής ουσίας αλλά πολύ πιθανόν, να υπάρχει τροποποίηση της περιοχής στόχου (nAChR). Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από δύο λόγους:

A) Λόγο της μεγάλης διαφοράς που παρατηρήθηκε στο επίπεδο ανθεκτικότητας μεταξύ του τοπικού ανθεκτικού πληθυσμού (Μαλάδες) και του ανθεκτικού πληθυσμού από Almeria.

B) Λόγο του φαινομένου της ανοσίας που παρατηρήθηκε στο 30% του ανθεκτικού πληθυσμού.

Μειωμένη ικανότητα δέσμευσης του imidacloprid στον υποδοχέα nAChR σε ανθεκτικό έντομο, δεν έχει παρατηρηθεί έως σήμερα (Tomizawa and Casida 2003).

Οι παραπάνω διαπιστώσεις είναι πολύ σημαντικές για τον σχεδιασμό των μελλοντικών προγραμμάτων αντιμετώπισης και διαχείρισης ανθεκτικότητας του *B. tabaci* σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες.

Δημοσιεύσεις

Τα αποτελέσματα της παρούσας πτυχιακής μελέτης, έχουν παρουσιαστεί στο 10^ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο (Ηράκλειο 4 – 7 Νοεμβρίου 2003).

Ροδιτάκης, Ε., Ροδιτάκης, Ν.Ε., Γιαννιός, Ν., Αυγελής, Α. & Τσαγκαράκου, Ν. (2003). Ανθεκτικότητα του αλευρώδη *Bemisia tabaci* στα εντομοκτόνα. 10^ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο (Ηράκλειο 4 – 7 Νοεμβρίου) σελ. 52.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abbott, S. W. (1925). "A method of computing the effectiveness of an insecticide." Journal of Economic Entomology **18**: 265-267.
- Brown, A. (1958). Nature and characterization of resistance. Insecticide resistance in arthropods, WHO Geneva. **38**: 240.
- Byrne, D. N. (1999). "Migration and dispersal by the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci*." Agricultural and forest meteorology **97**(4): 309-316.
- Byrne, F. J. and A. L. Devonshire (1993). "Insensitive Acetylcholinesterase and esterase polymorphism in susceptible and resistant populations of the tobacco Whitefly *Bemisia tabaci* (Genn)." Pesticide Biochemistry and Physiology **45**(1): 34-42.
- Cahill, M., I. Denholm, et al. (1996). "Relationship between bioassay data and the simulated field performance of insecticides against susceptible and resistant adult *Bemisia tabaci* (Homoptera, Aleyrodidae)." Bulletin of Entomological Research **86**(2): 109-116.
- Cahill, M., K. Gorman, et al. (1996). "Baseline determination and detection of resistance to imidacloprid in *Bemisia tabaci* (homoptera: aleyrodidae)." Bulletin of Entomological Research **86**: 343-349.
- Chao, S.-L., T. J. Dennehy, et al. (1997). "Whitefly (Hemiptera : Aleyrodidae) binding site for imidacloprid and related insecticides:a putative nicotinic acetylcholine receptor." Journal of Economic Entomology **90**(4): 879-882.
- Denholm, I., M. Cahill, et al. (1996). Progress with documenting and combating insecticide resistance in *Bemisia*. *Bemisia*:1995 Taxonomy, Biology, Damage, Control and Management. D. Gerling and R. T. Mayer. Andover, Hants, UK, Intercept Ltd.: 577-603.
- Dittrich, V., G. H. Ernst, et al. (1990). "Resistance Mechanisms in Sweetpotato Whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) Populations from Sudan, Turkey, Guatemala, and Nicaragua." Journal of Economic Entomology **83**(5): 1665-1670.
- Dittrich, V., S. Uk, et al. (1990). Chemical control and insecticide resistance of whiteflies. Whiteflies: their Bionomics, Pest Status and Management. D. Gerling, Intercept. **Andover, UK**: 263-286.
- Ellsworth, P. C., D. H. Siegl, et al. (1999). Monitoring *Bemisia* susceptibility to Applaud (buprofezin) during the 1998 cotton season. Cotton, A College of Agriculture Report. J. C. Silvertooth. Tucson, AZ, University of Arizona, College of Agriculture. **Series P-116**.: 361-375, URL - <http://ag.arizona.edu/pubs/crops/az1123/az11237g.pdf>.
- Faria, M. and S. P. Wraight (2001). "Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi." Crop Protection **20**: 767 -778.
- Finney, D. J. (1971). Probit analysis. UK.
- Gennadius, P. (1889). "Disease of tobacco plantations in the Trikonía. The aleurodid of tobacco." Ellenike Georgia **5**: 1-3.
- Georghiou, G. P. and A. Lagunes-Tejeda (1991). "The Occurrence of Resistance to Pesticides in Arthropods: An Index of Cases reported through 1989."
- Gerling, D., A. R. Horowitz, et al. (1986). "Agriculture, Ecosystems and Environment." Crop Protection **17**: 5-19.

- Grafton - Cardwell, E. E., Y. Ouyang, et al. (1998). "Insecticide Resistance and Esterase Enzyme Variation in the California Red Scale (Homoptera: Diaspididae)." Journal of Economic Entomology **91**(4): 812-819.
- Horowitz, A. R. and I. Ishaaya (1994). "Managing Resistance to Insect Growth Regulators in the Sweetpotato Whitefly (Homoptera: Aleyrodidae)." Journal of Economic Entomology **87**(4): 866-871.
- Horowitz, A. R., N. C. Toscano, et al. (1988). "Synergism of Insecticides with DEF in Sweetpotato Whitefly (Homoptera: Aleyrodidae)." Journal of Economic Entomology **81**: 110-114.
- Kirk, A. A., L. A. Lacey, et al. (1993). "The status of *Bemisia tabaci* (Hom, Aleyrodidae), *Trialeurodes vaporariorum* (Hom, Aleyrodidae) and their natural enemies in Crete." Entomophaga **38**(3): 405-410.
- Moore, A., B. E. Tabashnik, et al. (1989). "Leg Autotomy: A Novel Mechanism of Protection against Insecticide Poisoning in Diamondback Moth (Lepidoptera:Plutellidae)." Journal of Economic Entomology **82**(5): 1295-1298.
- Naranjo, S. E. (2001). "Conservation and evaluation of natural enemies in IPM systems for *Bemisia tabaci*." Crop Protection **20**: 835-852.
- Nauen, R., N. Stumpf, et al. (2002). "Toxicological and mechanistic studies on neonicotinoid cross resistance in Q-type *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae)." Pest Management Science **58**: 868-875.
- Oliveira, M. R. V., T. J. Henneberry, et al. (2001). "History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*." Crop Protection **20**(709-723).
- Omer, A. D., M. W. Johnson, et al. (1993). "Sweetpotato whitefly resistance to insecticides in Hawaii: intra-island variation is related to insecticide use." Entomologia Experimentalis et Applicata **67**: 173-182.
- Omer, A. D., B. E. Tabashnik, et al. (1993). "Genetic and Environmental Influences on Susceptibility to Acephate in Sweetpotato Whitefly (Homoptera: Aleyrodidae)." Journal of Economic Entomology **86**(3): 652-659.
- Palumbo, J. C., A. R. Horowitz, et al. (2001). "Insecticidal control and resistance management for *Bemisia tabaci*." Crop Protection **20**: 739-765.
- Perry, A. S., I. Yamamoto, et al. (1997). Insecticides in Agriculture and Environment : retrospects and prospects, Springer.
- Pollini, A., I. Ponti, et al. (2000). Εχθροί Των Κηπευτικών.
- Raymond, M., G. Prato, et al. (1993). Probit-Logit Analysis.
- Tomizawa, M. and E. J. Casida (2003). "Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors." Ann. Rev. Entomol. **48**: 339-364.
- Τζανακάκης, Μ. Ε. Κ., Β. Ι. (1998). Έντομα Καρποφόρων Δέντρων Και Αμπέλου.