ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη της γενετικής βάσης της ανθεκτικότητας & του κόστους προσαρμοστικότητας στο έντομο *Tuta absoluta* για το εντομοκτόνο indoxacarb

Μεταπτυχιακή φοιτήτρια: Κατερίνα Μετοχιανάκη

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2018

ΤΟ ΕΡΓΟ ΑΥΤΟ ΥΛΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΑΜΠΕΛΟΥ ΛΑΧΑΝΑΚΟΜΙΑΣ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ, ΤΟΥ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟΥ ΕΛΙΑΣ ΥΠΟΤΡΟΠΙΚΩΝ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΑΜΠΕΛΟΥ, ΤΟΥ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΓΕΩΡΓΙΚΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ – ΔΗΜΗΤΡΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΒΟΝΤΑΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ: ΚΑΘ. ΒΟΝΤΑΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΕΡΕΥΝ. ΡΟΔΙΤΑΚΗΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ

ΚΑΘ. ΚΑΛΑΝΤΙΔΗΣ ΚΡΙΤΩΝ

ABSTRACT

The tomato borer *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: *Gelechiidae*) is considered as the most important pest for tomato crops. DPX-MP062 (indoxacarb) is an oxidiazine insecticide which has activity against Lepidoptera. Extensive utilization of indoxacarb pesticide against insect *T. absoluta* causes the development of resistance in field populations of this lepidopteran pest. To evaluate the risk of resistance evolution and to develop a better resistance management strategy, a field-collected population was selected with indoxacarb in the laboratory. Thereafter, the inheritance and fitness cost of indoxacarb resistance in *T. absoluta* were investigated.

In this study the genetic basis of oxidiazine resistance was investigated in an oxidiazine resistant strain from Ierapetra. The genetics of resistance was investigated by reciprocally crossing strain Ierapetra with a susceptible strain from Peloponnhso and revealed an autosomal incompletely recessive mode of inheritance. x^2 value and degrees of freedom revealed that multiple genes are responsible for the resistant.

Fitness cost of the resistant strain from Ierapetra was also studied. Specifically, from the study of female and male adults viability, the duration of developmental stages (egg, L1, L2, L3, L4, pupa), the longevity, the weight of male and female pupa, the mortality in every developmental stage, fertility, parameters as net reproduction rate (R_o), gross reproductive rate (GRR), mean generation time (T), intrinsic rate of increase (r) were identified and compared with the susceptible strain. No differentiation between susceptible and resistant strain in indoxacarb was revealed. Additional, reverse resistance was detected to the population from Ierapetra. Higher total mortality in whole developmental stages resistant strain may be responsible for this reverse resistance.

Key words

Tuta absoluta, indoxacarb, resistance, fitness cost, reverse resistance

ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ

Οι συντομεύσεις που χρησιμοποιούνται μέσα στο κείμενο και στις Εικόνες / Σχήματα

Σύντμηση	Πλήρες όνομα
Ι.ΕΛ.Υ.Α	Ινστιτούτο Ελιάς Υποτροπικών φυτών και Αμπέλου
ΕΛ.Γ.Ο.	Ελληνικός Γεωργικός Οργανισμός
EPPO	European and Mediterranean Plant Protection Organization
IRAC	Insecticide Resistance Action Committee
FAO	Food and Agriculture Organization
ΕΕ	Ευρωπαϊκή Ένωση
USDA	United States Department of Agriculture
APHIS	Animal and Plant Health Inspection Service
GMO	Genetic modified organism
RH	Relative humidity
Ppm	Parts per million
SCBIs	Sodium channel blocker insecticides

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία με τίτλο "Μελέτη της γενετικής βάσης της ανθεκτικότητας και του κόστους προσαρμοστικότητας στο έντομο *Tuta absoluta* για το εντομοκτόνο "indoxacarb" πραγματοποιήθηκε και ολοκληρώθηκε στο εργαστήριο εντομολογίας του Ινστιτούτου Προστασίας Φυτών Ηρακλείου, ΕΛΓΟ Δήμητρα κατά το ακαδημαϊκό έτος 2017-2018.

Πριν την παρουσίαση των αποτελεσμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας, αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω ορισμένους από τους ανθρώπους που γνώρισα, συνεργάστηκα μαζί τους και έπαιξαν πολύ σημαντικό ρόλο στην πραγματοποίησή της.

Πρώτο από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της διπλωματικής εργασίας κ. Βόντα Ιωάννη για την καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον ερευνητή κ. Ροδιτάκη Εμμανουήλ για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο εργαστήριο του φέροντας εις πέρας αυτό το παγκόσμια καινοτόμο ερευνητικό έργο που μου ανέθεσε.

Τις ευχαριστίες μου εκφράζω στον καθηγητή και πρόεδρο του μεταπτυχιακού, κ. Καλαντίδη Κρίτωνα που δέχθηκε να είναι μέλος της τριμελής επιτροπής αξιολόγησης της μεταπτυχιακής εργασίας, αλλά και για την υποστήριξη που μου πρόσφερε όταν τη χρειάστηκα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Σταυρακάκη Μαριάννα που με βοήθησε με την εμπειρία της σε όλη αυτή την προσπάθεια, αλλά και για την καλή συνεργασία που είχαμε όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα παιδιά του εργαστηρίου που έκαναν το χρονικό διάστημα παραμονής μου στο εργαστήριο ευχάριστο.

Αναμφίβολα αξίζουν πολλά ευχαριστώ στην οικογένεια μου που πάντα ήταν και είναι στο πλευρό μου, στηρίζοντάς με όλα αυτά τα έτη, αλλά και στους πολύ κοντινούς μου ανθρώπους και φίλους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1 Η τομάτα *Lycopersicon esculentum* **8**

1.1 Εξάπλωση- κατανάλωση-παραγωγή παγκοσμίως **9**

1.2 Εχθροί της τομάτας **10**

2 Ο Υπονομευτής των φύλλων της τομάτας *Tuta absoluta* **11**

2.1 Ταξινόμηση *T. absoluta* και γενικά στοιχεία **12**

2.2 Αναπτυξιακά στάδια-Κύκλος ζωής του εντόμου **12**

2.2.1 Κύκλος ζωής 12

2.2.2 Ωό 14

2.2.3 Προνύμφη 15

2.2.4 Νύμφη 15

2.2.4 Ενήλικο 16

2.2.5 Γονιμοποίηση 17

2.3 Καταγωγή του εντόμου *T. absoluta* **19**

2.3.1 Εξάπλωση του εντόμου *T. absoluta* εκτός Ν.Αμερικής 20

2.4 Τρόποι καταπολέμησης του *T. absoluta* **22**

2.4.1 Χημικός τρόπος καταπολέμησης 22

2.5 Ορισμός και γενικές πληροφορίες της ανθεκτικότητας **27**

2.5.1 Προέλευση της ανθεκτικότητας 28

2.5.2 Μηχανισμοί της ανθεκτικότητας 29

2.5.3 Τρόποι μελέτης της ανθεκτικότητας 30

2.6 Σκοπός της Μεταπτυχιακής Εργασίας **34**

3 Υλικά & μέθοδοι **35**

3.1 Πειραματικές εγκαταστάσεις **35**

3.2 Φυτικό υλικό **35**

3.3 Συλλογή πληθυσμών *T. absoluta* **37**

3.4 Διαχείριση νεομεταφερθέντων πληθυσμών στο εργαστήριο ***38***

3.4.1 Καθαρισμός εκτροφής 38

3.4.2 Ανάπτυξη και διατήρηση των πληθυσμών μέσα στον θάλαμο σε σταθερές συνθήκες ανάπτυξης 39

3.5 Δημιουργία ελεγχόμενων ωοθεσιών στους πληθυσμούς **39**

3.6 Τοξικολογική βιοδοκιμή **40**

3.6.1 Εργαστηριακή επιλογή με το εντομοκτόνο indoxacarb 43

3.7 Μελέτη της γενετικής βάσης της ανθεκτικότητας **46**

3.8 Μελέτη του κόστους προσαρμοστικότητας (fitness cost) 50

3.8.1 Πείραμα ανάπτυξης 50

3.8.2 Πείραμα βιωσιμότητας-γονιμότητας 52

3.8.3 Πίνακας ζωής γονιμότητας ..... **Error! Bookmark not defined.**

4 Αποτελέσματα 57

4.1 Αποτελέσματα του πειράματος Ανάπτυξης, βιωσιμότητας και γονιμότητας.. 57

4.2 Αποτελέσματα του πειράματος μελέτης της γενετικής της ανθεκτικότητας ... 59

5 Συζήτηση 60

1 Η τομάτα *Lycopersicon esculentum*

Η τομάτα (*Lycopersicon esculentum Miller*) είναι ένα ετήσιο κατά κανόνα λαχανικό το οποίο κατέχει μια πολύ σημαντική θέση στην μεσογειακή διατροφή (Ολυμπίου, 2001). Ανήκει στο γένος Solanum, την ίδια οικογένεια Solanaceae που ανήκει και η πατάτα. Τα είδη της οικογένειας Solanaceae καλλιεργούνται για τα εδώδιμα φρούτα τους για τα φυλλώδη λαχανικά (*S.Macrocarpon* στην Αφρική), για τους κονδύλους (πατάτες), για τις δευτερογενείς ενώσεις (καπνός) και σαν διακοσμητικά λουλούδια (petunia, Nicotiana spp.). Η τομάτα από την οικογένεια Solanaceae, αποτελεί κεντρικό στοιχείο της γενετικής και μοριακής έρευνας. Αυτό το οφείλει, στα χαρακτηριστικά του είδους, στα οποία συμπεριλαμβάνεται η διπλοειδής μορφή του μέτριου μεγέθους γονιδιώματος (950 Mb), η επιδεκτικότητα στον γενετικό μετασχηματισμό και του καλού χαρακτηρισμένου γενετικού υλικού της.

Η κατανάλωσή της τομάτας αυξήθηκε κατά τον 20^{ο} αιώνα διότι μέχρι τότε στις περιοχές της Μεσογείου, Β. Ευρώπης και Β. Αμερικής υπήρχαν διάφορες φοβίες γύρω από την κατανάλωσή της. Συγκεκριμένα πίστευαν πως περιέχονται σε αυτήν τοξικές ουσίες (γλυκοαλκαλοειδή). Τα συγκεκριμένα γλυκοαλκαλοειδή, περιέχονται στα φύλλα και τους καρπούς άλλων ειδών της οικογένειας της τομάτας έτσι η συγκεκριμένη ιδεοληψία ξεπεράστηκε (Ολυμπίου, 2001). Η τομάτα του είδους *Lycopersicon esculentum Miller* ποικιλίας *cerasiforme* είναι σχεδόν βέβαιο ότι αποτελεί τον άμεσο πρόγονο των σύγχρονων καλλιεργούμενων τύπων τομάτας, ενώ είναι και το μοναδικό άγριο είδος που απαντάται εκτός Νότιας Αμερικής (Taylor, 1986). Στον πίνακα 1 παρατίθεται η συστηματική ταξινόμησή της.

Η καταγωγή της καλλιεργούμενης τομάτας είναι το Μεξικό, από την περιοχή Vera Cruz-Puebla (Jenkins, 1948). Τον 16^{ο} αιώνα μεταφέρθηκε στην Ευρώπη ενώ περίπου το 1818 εισήχθη στην Αθήνα.

Βασίλειο	Φυτά (Plantae)
Συνομοταξία	Αγγειόσπερμα (Magnoliophyta)
Ομοταξία	Δικοτυλήδονα (Magnoliopsida)
Υφομοταξία	Αστερίδες (Asteridae)
Τάξη	Στρυχνώδη (Solanales)
Οικογένεια	Στρυχνοειδή (Solaneceae)
Γένος	Λυκοπερσικόν (*Lycopersicon*)
Είδος	*Solanum lycopersicum L.*, πρώην *Lycopersicon esculentum* Miller

Πίνακας 1 Συστηματική ταξινόμηση τομάτας, Σύστημα κατά CRONQUIST, 1981

1.1 Εξάπλωση- κατανάλωση-παραγωγή παγκοσμίως

Σύμφωνα με την Véronique Bergougnoux (2014), η τομάτα εισήχθη τον 16^{ο} αιώνα από την περιοχή των Άνδεων στην Ευρώπη. Σήμερα είναι παγκόσμια ευρέως διαδεδομένη και αντιπροσωπεύει την πιο οικονομικά σημαντική καλλιέργεια λαχανικών παγκοσμίως. Αποτελεί μια απίστευτη πηγή σημαντικών για την υγεία θρεπτικών συστατικών όπως λυκοπένιο, β-καροτένιο και βιταμίνη C. Η παραγωγή και η κατανάλωσή της αυξάνεται με την αύξηση του πληθυσμού. Η παγκόσμια παραγωγή της το 2011 φτάνει σχεδόν τους 160 εκατομμύρια τόνους, αυτό την καθιστά την έβδομη σε σειρά, των πιο σημαντικών καλλιεργούμενων ειδών μετά τον αραβόσιτο, το ρύζι, το σιτάρι, την πατάτα, τη σόγια και τη μανιόκα.

Η παραγωγή τομάτας τα τελευταία 20 χρόνια (Πίνακας 2) και η καλλιεργούμενη έκτασή της (Πίνακας 3) διπλασιάστηκε. Ενδιαφέρον αποτελεί ότι, οι χώρες που φιλοξενούν την υψηλότερη απόδοση στην καλλιέργεια τομάτας προέρχονται από την Β. Ευρώπη, όπου οι κλιματολογικές συνθήκες δεν είναι ευνοϊκές για την καλλιέργειά της και η περιοχή που είναι αφιερωμένη στην καλλιέργεια είναι πολύ μικρή. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι χώρες αυτές παράγουν το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής τομάτας υπό ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκηπίου. Η Λιβύη, η Αίγυπτος και Ελλάδα είναι οι τρείς χώρες με την μεγαλύτερη κατανάλωση τομάτας με την κατανάλωση να υπερβαίνει τα 100 kg/ κεφαλή/ έτος. Στις μεσογειακές και αραβικές χώρες η κατανάλωση είναι υψηλότερη με μέσες τιμές μεταξύ 40 και 100 kg/ κεφαλή/ έτος (Véronique Bergougnoux, 2014). Καλλιεργείται για τον καρπό της, ο οποίος καταναλώνεται ώριμος, νωπός, αποξηραμένος, σε άλμη, ακέραιος ή σε πολτό.

ΘΕΣΗ	ΧΩΡΑ	ΠΑΡΑΓΩΓΗ (TN)
1.	ΚΙΝΑ (ΗΠΕΙΡΩΤΙΚΗ ΧΩΡΑ)	50.000.000
2.	ΙΝΔΙΑ	17.500.000
3.	Η.Π.Α	13.206.950
4.	ΤΟΥΡΚΙΑ	11.350.000
19.	ΕΛΛΑΔΑ	979.600

Πίνακας 2 Κατάταξη στην παραγωγή τομάτας και η θέση της Ελλάδας (Fao, 2012)

ΘΕΣΗ	ΧΩΡΑ	ΈΚΤΑΣΗ (ΗΑ)
1.	ΚΙΝΑ (ΗΠΕΙΡΩΤΙΚΗ ΧΩΡΑ)	1.000.000
2.	ΙΝΔΙΑ	870.000
3.	ΤΟΥΡΚΙΑ	300.000
4.	ΝΙΓΗΡΙΑ	270.000
5.	ΑΙΓΥΠΤΟ	216.395
37	ΕΛΛΑΔΑ	16.000

Πίνακας 3 Παγκόσμια κατάταξη σε καλλιεργούμενη έκταση τομάτας και η θέση της Ελλάδας (Fao, 2012)

1.2 Εχθροί της τομάτας

Στους εχθρούς της τομάτας ανήκουν οι σιδηροσκώληκες, οι αφίδες, οι θρίπες, οι τετράνυχοι, οι γυμνοσάλιαγκες και τα σαλιγκάρια, οι αλευρώδης και οι φυλλορύκτες της τομάτας. Στον παρακάτω πίνακα που ακολουθεί, αναφέρονται τα προσβαλλόμενα μέρη της τομάτας που κάθε εχθρός καταστρέφει.

Κοινή ονομασία	Λατινική ονομασία	Προσβαλλόμενο μέρος
Σιδηροσκώληκες	*Agriotes obscures*	Τα νεαρά φυτά στη βάση του βλαστού λίγο κάτω από την επιφάνεια του εδάφους
Αφίδες	*Aphis persicae, Aphis gossypii*	Τα φύλλα και τους νεαρούς βλαστού
Θρίπες	*Thrips tabaci*	Τα φύλλα, σημαντικός φορέας ιώσεων
Φυλλορύκτες της τομάτας	*Liriomyza solani* *Tuta absoluta*	Στοές στα φύλλα και στους καρπούς
Αλευρώδης	*Trialeurodes vaporariorum*	Τα φύλλα και φορέας ιώσεων
Τετράνυχοι	*Tetranychus urticae & T.telarius*	Κυρίως τα φύλλα
Γυμνοσάλιαγκες και σαλιγκάρια		Τα φύλλα και τους καρπούς

Πίνακας 4 Εχθροί της τομάτας στον Ελλαδικό χώρο (Ολυμπίου, 2015)

2 Ο Υπονομευτής των φύλλων της τομάτας *Tuta absoluta*

Οι τομάτες, όπου καλλιεργούνται, φιλοξενούν πολλά είδη εντόμων. Όλα τα μέρη του φυτού προσφέρουν τροφή, καταφύγιο, και μέρη αναπαραγωγής για τα έντομα. Τα έντομα μπορούν να προκαλέσουν μείωση της ανάπτυξης ή θάνατο των φυτών της τομάτας και βλάβη στους καρπούς των φρούτων υπό μορφή ουλών, καταστροφή των ιστών και αλλαγή στο σχήμα ή το χρώμα τους (W.H. Lange and Lorin Brouson, 1981).

Το έντομο *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) θεωρείται ότι είναι ο κύριος υπονομευτής των φύλλων τομάτας *Lycopersicon esculentum*, είναι ένας καταστροφικός για την τομάτα ξενιστής, πρωτοεμφανιζόμενος στην Νότια Αμερική (Desneux, 2010). Τα συνώνυμα ονόματα με τα οποία έχει χαρακτηριστεί είναι *Scrobipalpuloides absoluta* Povolny, *Gnorimoschema absoluta* Clarke, *Scrobipalpula absoluta* Povolny, *Phthorimaea absoluta* Meyrick. Στην Ευρώπη, το εν λόγω έντομο εντοπίστηκε για πρώτη φορά στα τέλη του 2006 στο Βόρειο τμήμα του Castellón de la Plana στην ανατολική πλευρά της Ισπανίας (Caroline De Smedt et al., 2016). Τα φυτά τομάτας μπορούν να προσβληθούν σε οποιοδήποτε αναπτυξιακό στάδιο, από νεαρά φυτά έως ώριμα φυτά (OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 35, 434–435, 2005). Εκτός από τις τομάτες, αυτό το έντομο έχει αναφερθεί και σε άλλα με οικονομική σημασία φυτά των σολανοειδών, συμπεριλαμβανομένων των ειδών *Solanum tuberosum* (L.), *Solanum melongena*, *Solanum nigrum* L., *Atropa belladonna L*, *Datura ferox* (L.), *Nicotiana longiflora Cav.*, *Nicotiana glauca Graham*, *Salpichroa origanifolia* (Lam.) *Baill.*, *Solanum americanum Mill.*, *Solanum sisymbriifolium* Lam., *Brugmansia arborea* (L.), *Solanum chenopodioides Lam.*, *Solanum sarrachoides Sendtner*, *Solanum pygmaeum* and *Datura stramonium* (L.), (Bajonero J. G., 2017).

Η πρώτη αναφορά σε αυτό το Λεπιδόπτερο έγινε στο Περού το 1914 (Jham et al., 2001). Το έντομο *T. absoluta* κυρίως απομυζεί τα φύλλα και τα φρούτα, αλλά μπορεί επίσης να επηρεάσει τους μίσχους, τους οφθαλμούς και τα άνθη προκαλώντας σοβαρές απώλειες καλλιεργειών, έως και πλήρη απώλεια, όταν δεν υπάρχουν μέτρα ελέγχου (Arno et al., 2011). Η ζημιά προκαλείται από τις προνύμφες, που δημιουργούν στοές στα φύλλα και μερικές φορές και στους καρπούς της τομάτας. Οι προνύμφες τρέφονται από το μεσόφυλλο, επηρεάζοντας τη φωτοσυνθετική ικανότητα της καλλιέργειας, μειώνουν την παραγωγή και κάνουν τις τομάτες ακατάλληλες για διάθεση στην αγορά (Caroline De Smedt et al, 2016). Οι προνύμφες του εντόμου, προσβάλλουν όλα τα υπέργεια μέρη του φυτού σε οποιοδήποτε αναπτυξιακό στάδιο αυτό βρίσκεται με αποτέλεσμα την νέκρωση των προσβεβλημένων περιοχών ή την νέκρωση ολόκληρου του φυτού.

Το έντομο *T. absoluta* είναι ένα δύσκολο παράσιτο επειδή είναι δυνητικά πολύ καταστροφικό και έχει την ικανότητα να αναπτύσσει ανθεκτικότητα σε πολλά εντομοκτόνα (Roditakis et al., 2010). Εξαπλώνεται πολύ γρήγορα και η θέση του παγκοσμίως έχει αλλάξει, αφού μέσα σε λίγα χρόνια από ένα ιθαγενές έντομο από την

Ν. Αμερική εξελίχθηκε σε μία μέγιστη απειλή για την παγκόσμια παραγωγή τομάτας (Desneux et al., 2011).

2.1 *Ταξινόμηση T. absoluta και γενικά στοιχεία*

Το είδος *T. absoluta* ταξινομικά ανήκει στο φύλλο αρθρόποδα, στην κλάση Insecta, στην τάξη Lepidoptera, υποτάξη Glossata, υπεροικογένεια Gelechioidea, οικογένεια Gelechiidae, υποοικογένεια Gelechiinae, φυλή Gnorimoschemini και στο γένος *Tuta* (Πίν. 5).

Phylum	Arthropoda
Class	Insecta
Order	Lepidoptera
Suborder	Glossata
Superfamily	Gelechioidea
Family	Gelechiidae
Subfamily	Gelechiinae
Tribe	Gnorimoschemini
Genus	*Tuta*
Full Name	*Tuta absoluta* (Meyrick 1917)

Πίνακας 5 Ταξινόμηση του *T. absoluta* (USDA-APHIS, 2011)

Το έντομο αρχικά περιγράφηκε ως *Phthorimaea absoluta* (Meyrick, 1917) και αργότερα μεταφέρθηκε στο γένος Gnorimoschema (Clarke, 1965), το οποίο μεταγενέστερα αναθεωρήθηκε και άλλαξε στο γένος Scrobipalpula (Povolny, 1967), Scrobipalpuloides (Povolny, 1987), και τέλος στο γένος Tuta (Povolny, 1994). Η κοινή του ονομασία ποικίλει από χώρα σε χώρα, αλλά οι επικρατέστερες ονομασίες στην διεθνή βιβλιογραφία είναι, South American tomato borer, tomato leafminer, tomato pinworm, South American tomato moth.

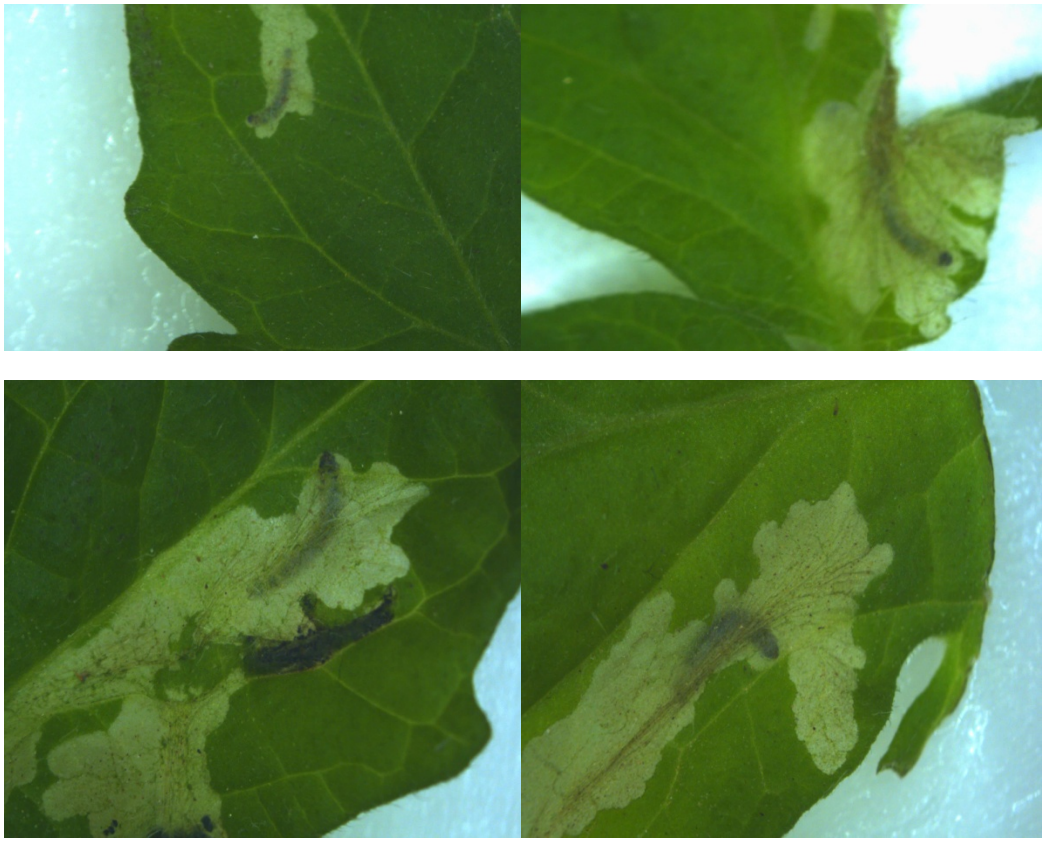
2.2 Αναπτυξιακά στάδια-Κύκλος ζωής του εντόμου

2.2.1 Κύκλος ζωής

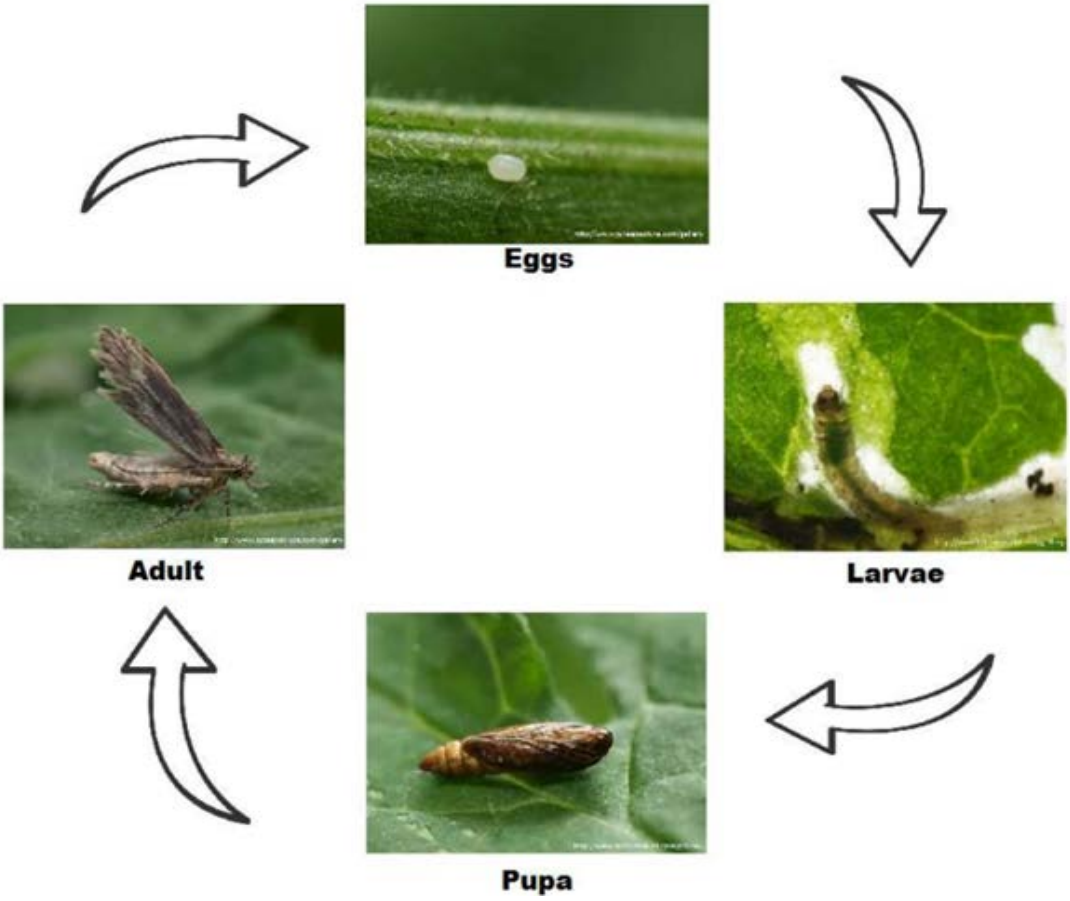
Το *T. absoluta ανήκει στα* ωοτόκα ολομετάβολα έντομα. Ο κύκλος ζωής του εντόμου *T. absoluta* περιλαμβάνει τέσσερα στάδια ανάπτυξης: αυγό, προνύμφη, νύμφη και το ενήλικο στάδιο (Desneux et al., 2010). Ο EPPO το έτος 2009 μετέφερε τον εχθρό στην Α2 λίστα (παράσιτα που υπάρχουν τοπικά ανά περιοχές της Ευρώπης) του ευρωπαϊκού και Μεσογειακού Οργανισμού Προστασίας Φυτών.

Κάθε ενήλικο θηλυκό εγκαθιστά περίπου 250-300 αυγά στα φυτά των

σολανοειδών που είναι ξενιστής. Κατά την εκκόλαψη οι προνύμφες τρέφονται, δημιουργώντας σήραγγες μέσα στα φύλλα, στους μίσχους και στα φρούτα. Τα θηλυκά ωοτοκούν κυρίως στα φύλλα και οι νύμφες παράγουν επεκτεινόμενες στοές στο μεσόφυλλο, μειώνοντας έτσι την φωτοσυνθετική δραστηριότητα (Cocco et al., 2014). Νυμφεύονται μέσα στις στοές τους, στο έδαφος ή στην επιφάνεια του φύλλου. Οι στοές στα φύλλα είναι ακανόνιστες και μπορεί αργότερα να γίνουν νεκρωτικές (OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 35, 434–435, 2015). Οι προνύμφες τρέφονται με τους ιστούς του μεσόφυλλου, και σε υψηλή πυκνότητα προσβάλλουν τους μασχαλιαίους οφθαλμούς, νεαρά στελέχη και καρπούς, αφήνοντας την επιδερμίδα ανέπαφη, δημιουργώντας λεπτές στοές στους εσωτερικούς ιστούς. Οι προνύμφες περνούν από τέσσερα στάδια ανάπτυξης. Οι πλήρως ταϊσμένες προνύμφες συνήθως πέφτουν στο έδαφος μέσα σε ένα μεταξωτό νήμα και νυμφεύονται μέσα στο χώμα (Desneux et.al, 2010). Ο βιολογικός κύκλος του εντόμου διαρκεί από 24-76 ημέρες (Barrientos et al., 1998), ενώ σε εργαστηριακές συνθήκες (σταθερή θερμοκρασία 25°C και 75% σχετική υγρασία), έχει διάρκεια 29 ημέρες (Vargas, 1970). Μελέτες στην Χιλή έχουν δείξει ότι η ανάπτυξη διαρκεί 76.3 μέρες σε θερμοκρασία 14°C, 39.8 σε 19.7°C και 23.8 σε θερμοκρασία 27.1°C αντίστοιχα (Barrientos et al., 1998).



Εικόνα 1 Φύλλα με τυπικές στοές προσβολής



Εικόνα 2 Βιολογικός κύκλος του εντόμου *T. absoluta*

2.2.2 Ωό

Τα θηλυκά εναποθέτουν τα αυγά στις επιφάνειες του φυτού (Tropea Garzia G. et al., 2012). Παίρνουν 4-5 ημέρες για εκκόλαψη, και περισσότερο χρονικό διάστημα σε δροσερές συνθήκες. Τα ωά έχουν σχήμα κυλινδρικό, με μήκος 0,4 mm και 0,2 mm πλάτος (Cocco et al., 2014). Το χρώμα τους ποικίλλει από λευκό (oyster-white) έως έντονο κίτρινο, το οποίο σκουραίνει στην εμβρυϊκή φάση και γίνεται σχεδόν μαύρο κοντά στην έκδυση (Imenes et. al., 1990).

Οι θέσεις ωοτοκίας διαφέρουν στη φάση προ-ανθοφορίας και μετά την ανθοφορία, σε προ-ανθοφορία προτιμούνται οι θέσεις κάτω από την επιφάνεια των φύλλων για ωοτοκία και στο κορυφαίο τμήμα του φυτού. Μετά την ανθοφορία δεν διαπιστώθηκαν διαφορές μεταξύ της πάνω και της κάτω επιφάνειας των φύλλων, με το μεσαίο τμήμα του φυτού να επηρεάζεται εξίσου με το κορυφαίο τμήμα του (Tropea Garzia G. et al., 2012). Η εκκόλαψη γίνεται 4-6 ημέρες μετά τη γέννηση τους.

Εικόνα 3 Ωό πάνω στην φυλλική επιφάνεια

2.2.3 Προνύμφη

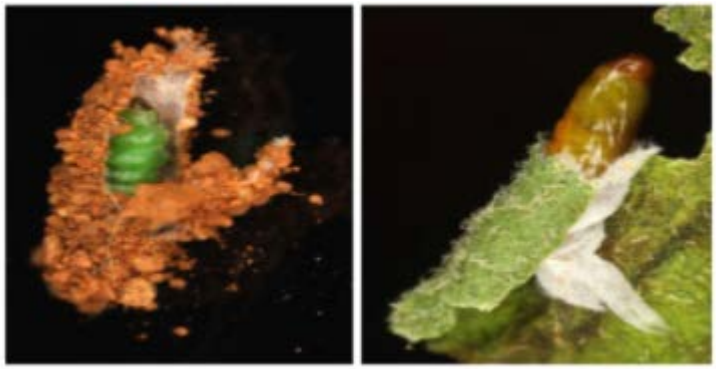
Υπάρχουν τέσσερα προνυμφικά στάδια (Desneux et.al, 2010). Τα τέσσερα στάδια ανάπτυξης (Εικ. 4) έχουν διάρκεια περίπου 8-12 μέρες. Τα νεογνά (αρχή L1 σταδίου ανάπτυξης) έχουν ανοικτό πράσινο χρώμα και αλλάζουν σε πράσινο καθώς μεγαλώνουν και αναπτύσσονται στο εσωτερικό των φύλλων, μίσχων ή φρούτων. Το δεύτερο προνυμφικό στάδιο (L_2) έχει μήκος 2,8 mm, και το τρίτο (L_3) 4,7 mm. Μόλις φθάσουν στο τέταρτο στάδιο (L_4), στην ράχη των ανεπτυγμένων προνυμφών εμφανίζεται μία ρόδινου χρώματος απόχρωση, και το μήκος τους μπορεί να φθάσει μέχρι και 8 mm (Desneux et al., 2010). Χαρακτηριστικό ταξινομικού διαχωρισμού αποτελεί η χαρακτηριστική μαύρη γραμμή που φέρουν στον προθώρακα. Η χρονική διάρκεια της προνύμφης κυμαίνεται από 13-15 μέρες (OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 35, 434–435, 2005). Πριν την νύμφευση, οι προνύμφες του τέταρτου σταδίου εξέρχονται από τις θέσεις σίτισής τους για να νυμφευθούν στο έδαφος ή στα αναδιπλούμενα φύλλα.

Εικόνα 4 Προνύμφες του *T. absoluta* αναπτυξιακών σταδίων L1, L2, L3, L4 (Nayana, B.P., and C.M. Kalleshwaraswamy, 2015)

2.2.4 Νύμφη

Η νύμφη στα αρχικά στάδια δημιουργίας της, έχει πρασινωπό χρωματισμό, και μετατρέπεται σε καφέ (chestnut) χρώμα κατά την ανάπτυξή της ενώ κοντά στην εμφάνιση του ενήλικου σταδίου μετατρέπεται σε σκούρο καφέ (Imenes et al., 1990). Μετά από περίπου 5 ημέρες στους 30° C η νύμφη γίνεται σκούρο καφέ χρώμα και το

ενήλικο είναι έτοιμο να πραγματοποιήσει την έκδυσή του (Monserrat Delgado, 2008). Οι διαστάσεις της νύμφης είναι 4,3 mm και 1,1 mm. Όταν η νύμφη του *T.absoluta* δεν νυμφεύεται στο έδαφος, δημιουργεί συνήθως ένα κουκούλι (EPPO., 2005. Data sheets on quarantine pests: Tuta absoluta. EPPO Bulletin, 35: 434-435). Τα μέρη στα οποία νυμφεύεται είναι το έδαφος, σε στοές, στην φυλλική επιφάνεια ή μέσα στην αναδίπλωση του φύλλου (Εικόνα 5). Η χρονική διάρκεια σε στάδιο νύμφης κυμαίνεται από 9 έως 11 μέρες (EPPO., 2005. Data sheets on quarantine pests: Tuta absoluta. EPPO Bulletin, 35: 434-435).



Εικόνα 5 Θέσεις νύμφευσης. Δεξιά η νύμφη έχει νυμφευτεί στο αναδιπλούμενο φύλλο ενώ αριστερά στο χώμα (Photo D.Viser)

Η Θέση του ανοίγματος των γεννητικών οργάνων είναι ένας ευκρινής χαρακτήρας για τον διαχωρισμό θηλυκών και αρσενικών νυμφών.

Εικόνα 6 Θηλυκή και αρσενική νύμφη *T.absoluta* (Genc. H., 2016)

2.2.4 Ενήλικο

Τα ενήλικα έχουν νυχτερινές συνήθειες καθώς παραμένουν ως επί το πλείστον κρυμμένα μέσα στην βλάστηση κατά την διάρκεια της μέρας (Fernandez &

Montagne A, 1990). Κάθε ενήλικο μπορεί να φθάσει σε μήκος μέχρι και 7 mm, και 10-11 mm κατά το άνοιγμα των πτερύγων του (Εικ. 7).

Εικόνα 7 Ενήλικο άτομο *T. absoluta* (Doremi G.)

Το χρώμα τους ποικίλλει από ασημί σε γκρι, καθώς το πρώτο ζεύγος πτερύγων είναι σκούρο γκρι με καφέ κηλίδες και το δεύτερο ζεύγος των πτερύγων είναι φωτεινό γκρίζο. Οι κεραίες τους είναι μακριές και νηματοειδής, με εναλλασσόμενους δακτυλίους με σκούρο γκρι και ανοιχτό κρεμώδες χρώμα (Urbaneja et al., 2007). Η κοιλιακή χώρα των θηλυκών ενήλικων ατόμων είναι χαρακτηριστικά ευρύτερη και πιο βαριά σε σχέση με τα αρσενικά άτομα (Εικ. 8) (Urbaneja et al., 2013). Τα θηλυκά έχουν συνήθως μεγαλύτερο μέγεθος συγκριτικά με τα αρσενικά ενήλικα.

Εικόνα 8 Αρσενικό (αριστερά) και θηλυκό ενήλικο άτομο (δεξιά) *T. absoluta* (Urbaneja et al., 2013).

2.2.5 Γονιμοποίηση

Το χρονικό διάστημα που το ενήλικο αρσενικό είναι ικανό να συζευχθεί, από την στιγμή της εμφάνισής του, είναι γενικά πολύ μικρό (λίγες ώρες) και περίπου 20–

22 ώρες για το ενήλικο θηλυκό. Τα ενήλικα θηλυκά ζευγαρώνουν μία φορά κατά την διάρκεια της ημέρας, και είναι ικανά να συζευχθούν έως και 6 φορές καθ' όλη την διάρκεια ζωής τους (Tropea Garzia G. et al., 2012). Η σύζευξη συμβαίνει συνήθως την ημέρα, κατά την αυγή (ανατολή) του ηλίου (Miranda-Ibarra E., 1999).

Τα θηλυκά ζούνε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από τα αρσενικά, επιτρέποντάς τους να είναι σεξουαλικά ώριμα όταν εμφανίζονται τα πρώτα αρσενικά (Fernandez & Montagne A, 1990). Η πιο παραγωγική περίοδος είναι 7 ημέρες μετά την πρώτη γονιμοποίηση, όπου τα θηλυκά είναι ικανά να εναποθέσουν το 70% των αυγών τους κατά τις απογευματινές και βραδινές ώρες. Κατά την διάρκεια της ζωής, ένα θηλυκό μπορεί να παράγει έως και 260 αυγά (Ucho^a-Fernandes MA et al., 1995). Η σύζευξη μπορεί να διαρκέσει κατά μέσο όρο 4-5 ώρες (Lee et al., 2014).

Η επαναλαμβανόμενη σύζευξη των θηλυκών, έχει άμεσα οφέλη για τα θηλυκά ενήλικα *T.absoluta* καθώς τους προσφέρει αυξημένη γονιμότητα και μακροβιότητα (Lee et al., 2014). Η μακροβιότητα των ενήλικων ατόμων επηρεάζεται επίσης από τις κλιματολογικές συνθήκες. Η μέση διάρκεια ζωής είναι περίπου 10-15 ημέρες για τα θηλυκά και 6-7 ημέρες για τα αρσενικά. Ωστόσο, τα μη ζευγαρωμένα αρσενικά ζουν σημαντικά περισσότερο, από τα ζευγαρωμένα αρσενικά και θηλυκά άτομα (Urbaneja et al., 2013).

Τα αυγά τοποθετούνται μεμονωμένα ή σε μικρές ομάδες, κυρίως σε νεαρά φύλλα (73%) δευτερευόντως στους βλαστούς (21%), σέπαλα (5%) και τα πράσινα φρούτα (1%) (Estay, 2000).

Η διαδικασία της σύζευξης (Εικ. 9) γίνεται μέσω της θηλυκής φερομόνης φύλου. Η φερομόνη σύζευξης του *T. absoluta* προσδιορίστηκε από τον Attygalle (1995) και την ομάδα του, και χρησιμοποιείται ως δόλωμα σε παγίδες, σε μελέτες, για παρακολούθηση, για την διακοπή της σύζευξης και για την μαζική παγίδευση. Οι Caparros-Megido et al. (2013b) συνοψίζουν τη χρήση μεθόδων που βασίζονται σε φερομόνες για τον έλεγχο του φυλλορήκτη της τομάτας (Lee et al., 2014).

Εικόνα 9 Διαδικασία σύζευξης του *T. absoluta* **(**IRAC, 2017)

2.3 Καταγωγή του εντόμου *T. absoluta*

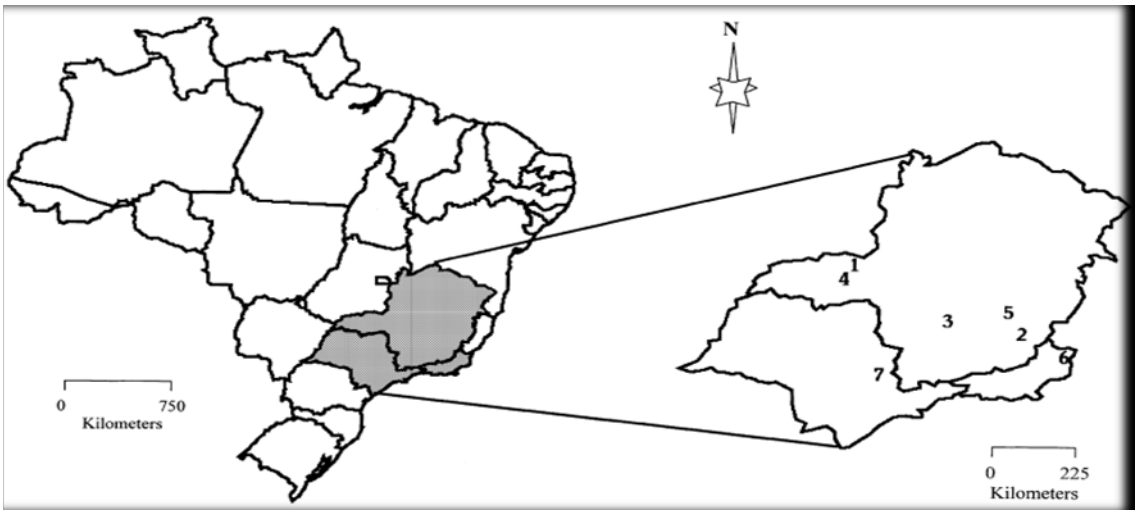
Ο τόπος προέλευσής του εντόμου *T.absoluta* θεωρείται η Νότιος Αμερική (Εικ. 10), ως εκ τούτου το έντομο αναφέρεται συνήθως ως φυλλορήκτης τομάτας της Νότιας Αμερικής (Garcia and Espul, 1982).

Το έντομο *T. absoluta* περιγράφθηκε το 1917 για πρώτη φορά από τον Meyrick ως *Phthorimaea absoluta*, από ένα μοναδικό αρσενικό ενήλικο που συλλέχθηκε στις Περουβιανές Άνδεις (Meyrick, 1917), (G. Tropea Garzia et.al, 2012). Είναι ένα ιθαγενές έντομο της Λατινικής Αμερικής και είναι γνωστό λόγω των μεγάλων καταστροφών που προκαλούσε (Urbaneja et al., 2013).

Από τις αρχές της δεκαετίας του 1980, καταγράφεται ως παράσιτο στην Αργεντινή, τη Βολιβία, τη Βραζιλία, τη Χιλή, την Κολομβία, το Εκουαδόρ, την Παραγουάη, το Περού, την Ουρουγουάη και τη Βενεζουέλα (Desneux et al., 2010). Ενώ λίγα χρόνια αργότερα έκανε την εμφάνισή του και στην Βραζιλία το 1980, όντας κύρια χώρα παραγωγής τομάτας στην Νότια Αμερική (Guedes and Picanço, 2012). Το *T. absoluta* δεν υφίσταται στις περιοχές των Άνδεων που έχουν μεγάλο υψόμετρο (πάνω από 1000 μ.), καθώς οι χαμηλές θερμοκρασίες αποτελούν έναν περιοριστικό παράγοντα για την επιβίωσή του (Notz, 1992). Αν και καθ' εξαίρεση βρέθηκε σε υψηλότερα υψόμετρα στα 3.246 μ. στο Περού (Povolny, 1975).

Το έντομο *T. absoluta* πιστεύεται ότι είχε επωφεληθεί σημαντικά από το γεωργικό εμπόριο εντός της Ηπείρου, για την περαιτέρω εξάπλωσή του (Cáceres 1992). Για παράδειγμα, το γεωργικό εμπόριο μεταξύ Χιλής και Αργεντινής το 1964 ήταν η αιτία που το *T. absoluta* εξαπλώθηκε στην επαρχία Mendoza (Αργεντινή)

(Bahamondes LA, Mallea AR, 1969). Πριν από την άφιξή του στην Ευρώπη, το *T. absoluta* είχε αναφέρθηκε αποκλειστικά στη Νότια Αμερική και το νησί Easter (Ripa et al., 1995).



Εικόνα 10 Θέσεις που δείχνουν την καταγωγή των πληθυσμών του φυλλορήκτη τομάτας (*T. absoluta*) στις ομόσπονδες πολιτείες της Βραζιλίας Μίνας Ζεράις, το Rio de Janeiro και το São Paulo. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις τοποθεσίες που υποδεικνύονται στον πίνακα 6 (Siqueira et al., 2000).

Code number	County	State	Place	Month and year collected
1	Araguari	Minas Gerais	Field	August 1998
2	Guiricema	Minas Gerais	Field	September 1998
3	Lavras	Minas Gerais	Field	August 1998
4	Uberlândia	Minas Gerais	Field	April 1998
5	Viçosa	Minas Gerais	Field	October 1997
6	São João da Barra	Rio de Janeiro	Laboratory	August 1997
7	Paulínia	São Paulo	Laboratory	August 1998

Πίνακας 6 Καταγωγή και έτος συλλογής των πληθυσμών του φυλλορήκτη τομάτας *T. absoluta* (Siqueira et al., 2000)

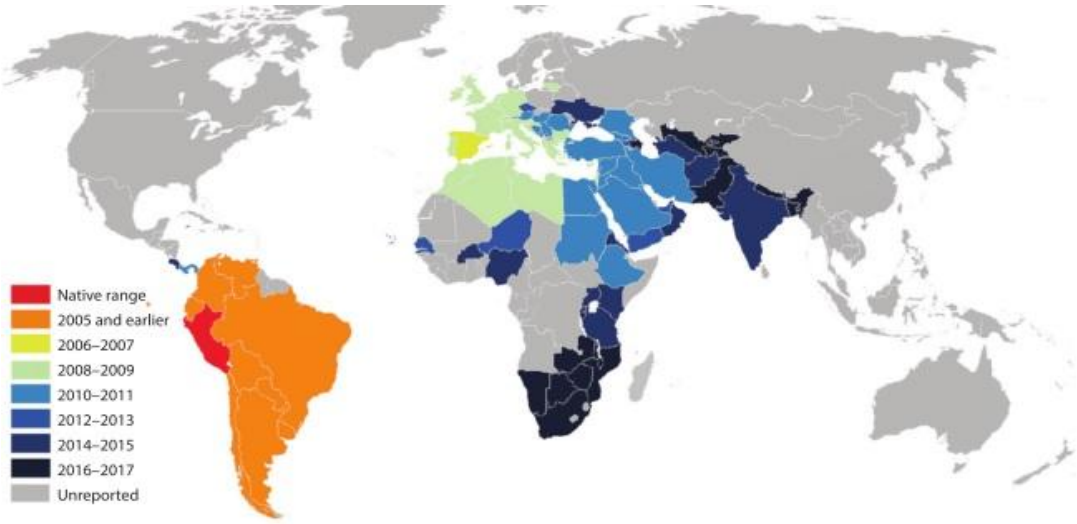
2.3.1 Εξάπλωση του εντόμου *T. absoluta* εκτός Ν. Αμερικής

Προερχόμενο από τη Νότια Αμερική, το έντομο εισέβαλε γρήγορα σε πολλές χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Roditakis et al., 2010). Η Ευρώπη θεωρήθηκε ότι ήταν απαλλαγμένη από το *T. absoluta*, σύμφωνα με τον κατάλογο EPPO A1, έως ότου καταγράφηκε η παρουσία του για πρώτη φορά στα τέλη του 2006 στα θερμοκήπια τομάτας στη Torreblanca (Castellon, Κοινότητα της Βαλένθια, Ισπανία). Από την αρχική του ανίχνευση στην Castellon, εξαπλώθηκε και σε άλλες γεωργικές εκμεταλλευόμενες περιοχές, με εξαιρετική ταχύτητα και επιθετικότητα, προκαλώντας σοβαρές οικονομικές απώλειες στις περιοχές εξαγωγής όπως η Μούρθια

(νοτιοανατολικά της Ισπανίας). Έως το 2009, το *T. absoluta* είχε αποικίσει σε όλες τις γεωργικές περιοχές της Ισπανίας, συμπεριλαμβανομένων των Καναρίων Νήσων και των Βαλεαρίδων Νήσων, καθώς και στις γεωργικές ζώνες άλλων ευρωπαϊκών χωρών και της Βόρειας Αφρικής. Είναι πιθανό ότι, παρά τους ισχύοντες φυτοϋγειονομικούς ελέγχους, οι εμπορικές ανταλλαγές στην Ευρώπη συνέβαλαν στην ταχεία εξάπλωση αυτού του εντόμου, όπως ακριβώς συνέβη εντός και μεταξύ των Νότιων Αμερικανικών Χωρών. Το Υπουργείο Γεωργίας Ζώων των ΗΠΑ και η υπηρεσία φυτοϋγειονομικής επιθεώρησης (USDA-APHIS) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ταχεία εξάπλωση του *T. absoluta* στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) οφειλόταν στην απεριόριστη μετακίνηση φρούτων τομάτας και φυτών τομάτας στην ΕΕ (Cifuentes et al., 2011).

Το *T. absoluta* από την Ισπανία, μεταφέρθηκε βόρεια προς τις Κάτω Χώρες και ανατολικά προς το Ιράν. Στη Βόρεια Αφρική, αναφέρθηκε στην Τυνησία το 2008, στο Μαρόκο το 2008, Βόρεια της Σαχέλ το 2008, στη Δυτική Αφρική στο 2010 ενώ στη Σενεγάλη το 2012 (Nayana, B.P., and C.M. Kalleshwaraswamy, 2015). Η εκρηκτική εξάπλωση και διάδοσή του *T. absoluta* (Εικ. 11) σχετίζεται κυρίως με την εισαγωγή φρούτων και περαιτέρω διανομή (Potting, 2009). Οι ανθρωπογενείς δραστηριότητες ευνοούν τη βιολογική εισβολή, ενώ επιδεινώνεται περαιτέρω από τις σημερινές παγκόσμιες κλιματικές αλλαγές. Το *T. absoluta* προστέθηκε το 2004 από τον Ευρωπαϊκό και Μεσογειακό Οργανισμό Προστασίας Φυτών EPPO στην A1 θέση του Κατάλογου εντόμων που συνιστώνται για ρύθμιση (έντομα που απουσιάζουν από την περιοχή του EPPO) και μεταφέρθηκε το 2009 στον κατάλογο A2 (έντομα τοπικά παρόντα στην περιοχή του EPPO) λόγω της πρόσφατης εξάπλωσής του εντόμου στην περιοχή του EPPO. Μέχρι στιγμής, το *T. absoluta* δεν ρυθμίζεται ως ένα επιβλαβές για καραντίνα έντομο από την ΕΕ (Roditakis et al., 2010).

Στη χώρα μας εντοπίστηκε για πρώτη φορά τον Ιούνιο του 2009, σε θερμοκήπιο με καλλιέργεια τομάτας, στην περιοχή Πλάτανος του νομού Χανίων Κρήτης (Roditakis et al., 2010).



Εικόνα 11 Χρονική κατανομή του *T. absoluta* παγκοσμίως (Biondi et al., 2018)

2.4 Τρόποι καταπολέμησης του *T. absoluta*

Για την αντιμετώπιση και καταπολέμηση του *T. absoluta* οι παραγωγοί έχουν στην διάθεσή τους πολλά εργαλεία. Τα μέτρα που μπορούν να εφαρμόσουν διακρίνονται σε καλλιεργητικά, βιολογικά, μηχανικά, και χημικά.

Τα καλλιεργητικά μέτρα στηρίζονται κυρίως στην χρήση υγιών σποριοφύτων τα οποία είναι απαλλαγμένα από αυγά ή άλλα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου και τη καταστροφή των αυτοφυών ξενιστών στον περιβάλλοντα χώρο.

Στα μηχανικά μέτρα συμπεριλαμβάνεται η χρήση εντομοστεγούς διχτυού (6-9 οπές/ cm2), χρήση προθάλαμου διπλών πορτών στα θερμοκήπια, χρήση κολλητικών παγίδων, φερομονικών παγίδων νερού/ λαδιού. Στα μηχανικά μέτρα συγκαταλέγεται επιπλέον η χρήση ζωντανών εντόμων που εκκρίνουν τη φερομόνη. Η χρήση φερομόνης παρεμποδίζει τη σύζευξη, συγκεκριμένα η χρήση της στηρίζεται στον αποπροσανατολισμό των αρσενικών ατόμων τα οποία δεν μπορούν να εντοπίσουν τα θηλυκά για να πραγματοποιηθεί η σύζευξη.

Στα βιολογικά μέτρα συγκαταλέγεται η εφαρμογή μικροβιακών σκευασμάτων, η χρήση ωφέλιμων αρπακτικών και παρασιτοειδών. Συγκεκριμένα, για την καταπολέμηση του *T. absoluta* έχουν χρησιμοποιηθεί αρπακτικά και παρασιτοειδή όπως τα αρπακτικά της οικογένειας *Miridae*, τα είδη *Macrolophus pygmaeus, Nesidiocoris tenuis* τα οποία προσβάλλουν τόσο τα αυγά όσο και νεαρές προνύμφες, παρασιτοειδή της οικογένειας *Eulophidae, Braconidae*, παρασιτικοί νηματώδεις *Steinernema carpocapsae, Steinernema feltiae* και *Heterorhabditis bacteriophora*. Στα βιολογικά μέτρα συγκαταλέγεται η χρήση στειρωμένων ή γενετικά ελαττωματικών ατόμων του επιζήμιου είδους. Έρευνες έχουν δείξει ότι, η χρήση ορισμένων φυτικών εκχυλισμάτων αυξάνει τα επίπεδα θνησιμότητας του εντόμου *T. absoluta*. Για παράδειγμα, φυτικά εκχύλισματα των ειδών *Thymus vulgaris* και του *Ricinus communis* προκαλούν στις νύμφες του *T. absoluta* 95%, 58% αντίστοιχη θνησιμότητα (Nilahyane et al., 2012).

Τέλος, πολλά είναι τα σκευάσματα που έχουν παρασκευαστεί για την χημική καταπολέμηση του εντόμου *T. absoluta*. Στην χημική καταπολέμηση, η δραστική χημική ουσία δεσμεύεται μέσα στον οργανισμό σε μία περιοχή στόχο, συνήθως πρωτεϊνικής φύσεως, επηρεάζοντας μία κρίσιμη βιοχημική διαδικασία. Ανάλογα τον τρόπο δράσης τους διακρίνονται σε οργανοφωσφωρικά, καρβαμιδικά, πυρεθροειδή, αβερμεκτίνες, νεονικοτινοειδή, σπινοσίνες, διαμίδια, εντομοκτόνα πυραζολίνης. Η επιτυχημένη αντιμετώπιση του εντόμου *T. absoluta* στηρίζεται στην συνδυασμένη εφαρμογή των προαναφερθέντων μεθόδων.

2.4.1 Χημικός τρόπος καταπολέμησης

Ο χημικός τρόπος καταπολέμησης συνίσταται στη χρήση φυσικών ή συνθετικών ουσιών οι οποίες, αυτούσιες ή σε μίγματα, προκαλούν με την τοξική τους

δράση τη θανάτωση των εντόμων και χαρακτηρίζονται ως εντομοκτόνα. Για την καταπολέμηση του εντόμου *T.absoluta* στον Ελλαδικό χώρο χρησιμοποιούνται 11 διαφορετικές χημικές ενώσεις όπως παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίν. 7), οι οποίες ανάλογα τον μηχανισμό δράσης τους διακρίνονται σε 8 ομάδες.

Δραστική ουσία	Σκεύασμα	Κατηγορία		Ομάδα δράσης
Εντομοκτόνα με έγκριση για τον έλεγχο του T. absoluta				
methomyl	Lannate 20 SL	Καρβαμιδικά	1A	
indoxacarb	Steward 30 WG	Οξαδιαζίνες	22A	
metaflumizone	Alverde 24 SC	Ημικαρβαζόνες	22B	
spinosad	Laser 480 SC	Σπινοσίνες	5	
emamectin benzoate	Affirm 095 SG	Αβερμεκτίνες	6	
abamectin	Zoro 1.8 EW	Αβερμεκτίνες	6	
chlorantraniliprole + abamectin	Voliam Targo 063 SC	Διαμίδια + Αβερμεκτίνες	28/6	
chlorantraniliprole	Altacor 35 WG	Διαμίδια	28	
chlorantraniliprole + λ-cyhalothrin	Ampligo 150 ZC	Διαμίδια + Πυρεθρινοειδή	28/3A	
pyrethrins	Πύρεθρο Βιορύλ 5 SC	Πυρεθρίνες	3A	
deltamethrin + thiacloprid	Proteus 170 OD	Πυρεθρινοειδή + Νεονικοτινοειδή	3A/4A	

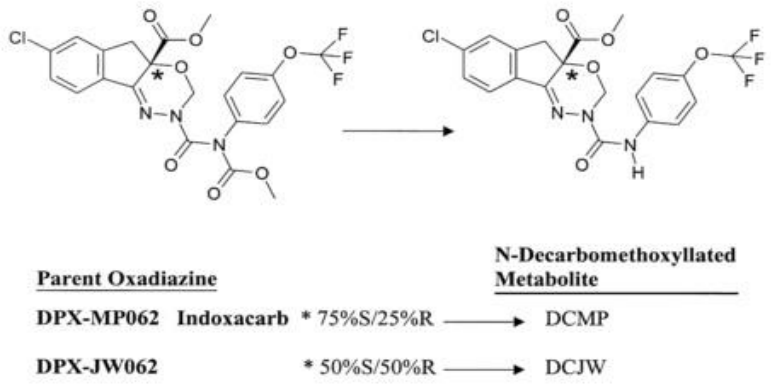
Πίνακας 7 Εγκεκριμένα φυτοπροστατευτικά προϊόντα κατά το έτος 2017 για την αντιμετώπιση του *T. absoluta* στην Ελλάδα (Ροδιτάκης κ.ά., 2017).

2.4.1.1 Οξαδιαζίνες

Το indoxacarb DPX-JW062 είναι ένα καινούργιο σχετικά εντομοκτόνο το οποίο ανήκει στην κατηγορία των οξαδιαζινών και έχει πολύ υψηλή τοξική δράση σε Λεπιδόπτερα και Κολεόπτερα. Σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης του IRAC, ανήκει στο γκρουπ 22A. Το indoxacarb ανήκει στη χημική ομάδα των πυραζολινών (pyrazolines), όπου το 1973 οι ενώσεις αυτές αρχικά αναφέρθηκαν ως δίπλωμα ευρυσιτεχνίας από τον Philips-Duphar (McCann et al., 2001). Το JW062 είναι ένα ρακεμικό μίγμα (50:50) δύο δραστικών και αδρανών εναντιομερών, εκ των οποίων μόνο το S-εναντιομερές έχει εντομοκτόνο δράση, ενώ το R-εναντιομερές είναι ανενεργό (Wing et al., 1998). Το εντομοκτόνο indoxacarb αποτελεί τον μοναδικό αντιπρόσωπο των οξαδιαζινών. Στο παρελθόν υπήρχαν και άλλα εντομοκτόνα πυραζολίνης που μπλόκαραν το κανάλι ιόντων νατρίου όπως η κατηγορία εντομοκτόνων PH 60-41. Οι ενώσεις αυτές παρουσίαζαν προβλήματα τα οποία σχετίζονταν με την μακροπρόθεσμη τοξικότητα, την βιοσυσσώρευση και παρέμεναν στο περιβάλλον για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα παρά το γεγονός ότι οι ενώσεις αυτές ήταν πολύ αποτελεσματικές στην καταπολέμηση των εντόμων. Άλλα εντομοκτόνα όπως το RH-3421, παρά την αποτελεσματικότητα του, παρουσίαζε μακρόχρονη τοξικότητα στα θηλαστικά.

Οι πυραζολίνες ως γνωστόν δρουν κατά τέτοιο τρόπο που παραλύουν τα έντομα, αυτό το επιτυγχάνουν με την παρεμπόδιση του εναρκτήριου δυναμικού δράσης στα νευρικά κύτταρα. Η παρεμπόδιση αυτή οφείλεται σε μπλοκάρισμα των καναλιών νατρίου (SCBIs). Εμπορικά εντομοκτόνα που δρουν στο κανάλι νατρίου με ένα καινοτόμο τρόπο μπορεί να είναι πολύτιμα εργαλεία τόσο για τη διαχείριση των εντόμων που προσβάλλουν φυτά όσο και τη βασική έρευνα (Wing et al., 1998). Η

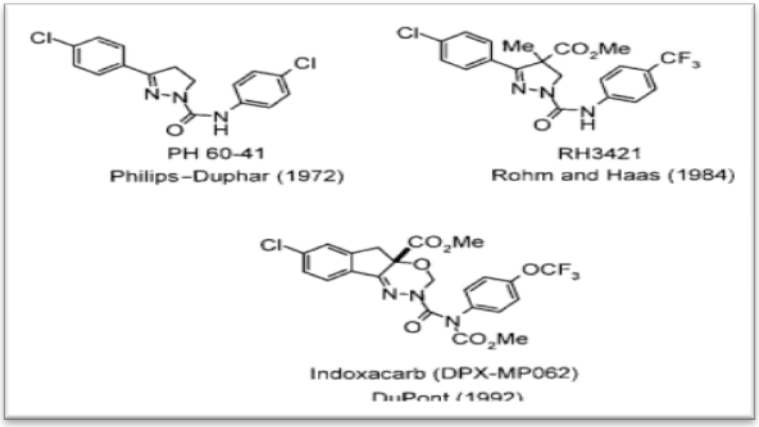
βιοενεργοποιημένη μορφή του indoxacarb, το N-δεκαρβομεθοξυλιωμένο DPX-MP062 (DCMP) προήλθε από τροποποιήσεις που έγιναν από τους χημικούς της DuPont στο μόριο της πυραζολίνης, με αυτό τον τρόπο φτιάχτηκε η χημική ένωση του indoxacarb DPX-MP062 (Silver et al., 2010; Wing et al., 2000). Πιο συγκεκριμένα, οι χημικοί της DuPont διεύρυναν τον δακτύλιο πυραζολίνης με ένα άτομο οξυγόνου και γεφυρώνοντας τη θέση C-4 με το C-3 αρύλιο υποκαταστάτη έδωσαν εξαιρετικά δραστικές ενώσεις οξαδιαζίνης που βελτιστοποιήθηκαν για την δημιουργία του indoxacarb (Silver et al., 2010). Η χημική ένωση MP062 του indoxacarb είναι εμπλουτισμένη κατά 75% στο ενεργό S-ισομερές (Εικ. 12). Το εντομοκτόνο αυτό έχει επιλεκτική τοξικότητα έναντι μόνο των εντόμων, αυτό οφείλεται στην ταχεία βιοενεργοποίηση του ενεργού μεταβολίτη DCMP, τον οποίο τα έντομα δεν είναι σε θέση να αποικοδομήσουν παράγοντας ανενεργούς μεταβολίτες, σε αντίθεση με τα ζώα.



Εικόνα 12 Δομή των πατρικών οξαδιαζινών εντομοκτόνων και οι N- αποκαρβομεθοξυλιωμένοι μεταβολίτες τους (Wing et al., 2000)

Πριν την ανακάλυψη του DPX-MP062, είχαν εξεταστεί σύμφωνα με τον McCann et.al 2001, τόσο μονοκυκλικές όσο και συντηγμένες-τρικυκλικές πυραζολίνες, πυριδαζίνες καθώς και δομικά συγγενείς ημικαρβαζόνες με παρόμοια υψηλή δράση. Παρά το γεγονός ότι οι πυραζολίνες ανακαλύφθηκαν το 1973, δεν υπήρχαν μέχρι πρόσφατα αντίστοιχα εμπορεύσιμα χημικά εντομοκτόνα στο εμπόριο. Το ενδιαφέρον των εταιρειών να στραφούν στην εύρεση ανάλογων πυραζολίνης κέντρισαν, οι μεταγενέστερες ευρεσιτεχνίες και δημοσιεύσεις από τον Philips-Duphar σε ανάλογα πυραζολίνης με βελτιωμένη δράση. Το ενδιαφέρον των εταιρειών στράφηκε επίσης το 1982 όταν αποκαλύφθηκε σε έρευνες ότι ορισμένες πυραζολίνες παρουσίαζαν δραστικότητα σε κάποια είδη εντόμων που ήταν ανθεκτικά σε οργανοφωσφορικά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αναλόγου ήταν αυτό που δημιούργησαν οι Rohm και Haas το 1984. Η δομή αυτού του αναλόγου ήταν παρόμοια με τις ενώσεις τον Philips-Duphar με την διαφορά ότι η τέταρτη θέση είχε υποκατασταθεί από μεθοξυκαρβονυλίο. Η RH3421 ένωση των Rohm και Haas παρουσίαζε χαμηλή τοξικότητα στα θηλαστικά και υψηλή εντομοκτόνο δράση. Μετέπειτα η εταιρεία DuPont είχε επικεντρωθεί στην ανακάλυψη νέων εντομοκτόνων με βάση της την πυραζολίνη. Η DuPont επικεντρώθηκε στην ανακάλυψη αναλόγων

που συνδυάζουν βελτιωμένη δράση, επιλεκτική τοξικότητα στο έντομο στόχο και ταυτόχρονα η παρουσία τους να μην επηρεάζει αρνητικά το περιβάλλον. Οι έρευνες της εταιρείας για την ανακάλυψη ανάλογων οξαδιαζίνης απέδωσαν, και το 1992 οδήγησαν στο νέο εμπορικό εντομοκτόνο indoxacarb ή αλλιώς Steward, Avaunt κατά την εμπορική του ονομασία (Εικ. 13). Ο Ευρωπαϊκός και Μεσογειακός Οργανισμός Προστασίας Φυτών χαρακτηρίζει το indoxacarb ως ένα μειωμένου κινδύνου εντομοκτόνο αφού έχει ένα ή περισσότερα από τα ακόλουθα πλεονεκτήματα έναντι των υφιστάμενων προϊόντων: χαμηλή επίπτωση στην ανθρώπινη υγεία, χαμηλή τοξικότητα σε μη στοχευόμενους οργανισμούς (πουλιά, ψάρια και φυτά), χαμηλότερο ενδεχόμενο μόλυνσης του νερού του εδάφους, χαμηλότερη χρήση ποσότητας, χαμηλότερη εμφάνιση ανθεκτικότητας και συμβατότητα με ολοκληρωμένα συστήματα διαχείρισης εντόμων.



Εικόνα 13 Δομές πυραζολίνης. Το indoxacarb όπως φαίνεται στην εικόνα δημιουργήθηκε το 1992 από την εταιρεία DuPont (McCann et.al 2001)

Το JW062 είναι ένα ιδιαίτερα ενεργό ρακεμικό μίγμα το οποίο έχει δράση στις προνύμφες των Λεπιδόπτερων που τρέφονται στα φύλλα. Όταν οι προνύμφες καταναλώνουν φύλλωμα το οποίο είναι ψεκασμένο ή ψεκάζονται απευθείας με το εντομοκτόνο, μετά από ένα σύντομο χρονικό διάστημα σταματούν να τρώνε και είτε εμφανίζουν ήπιους σπασμούς ή ψευδοπαράλυση (Wing et al., 1998). Υψηλότερες δόσεις πυραζολινών, ειδικά σε προνύμφες Λεπιδόπτερων, οδηγούν στη χαλαρή παράλυσή τους εντός λίγων ωρών (Silver et al., 2010). Στο πεδίο, οι προνύμφες αυτές μετά την κατάποση φύλλου που έχει ψεκαστεί ή τον ψεκασμό τους από το JW062 συχνά μπορεί να παραμείνουν ζωντανές αλλά ανίκανες να τραφούν και να κινηθούν για αρκετές ώρες πριν από το θάνατο. Η τροφική δραστηριότητα των εντόμων που έχουν εκτεθεί στο indoxacarb σταματάει σε διάστημα 0-4 ωρών, με την παράλυση και τον θάνατο να παρουσιάζονται μέσα σε 4-48 ώρες (Nehare et al., 2010a). Η παράλυση και η απουσία τροφικής δραστηριότητας οφείλεται στην απουσία νευρικής δραστηριότητας. Η ολοκληρωτική απουσία από τη νευρική δραστηριότητα στα

δηλητηριασμένα έντομα υποδεικνύει ότι όχι μόνο μπλοκάρουν τους διεγερτικούς υποδοχείς, αλλά επίσης και τη δραστηριότητα δημιουργίας ρυθμού στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Silver et al., 2010).

Το DPX-JW062 (indoxacarb) μεταβολίζεται σε πολλές προνύμφες των Λεπιδόπτερων σε έναν αποκαρβομεθοξυλιωμένο μεταβολίτη JW062 (DCJW) (Wing et al., 1998). Το ένζυμο ή τα ένζυμα, με βάση μελέτες αναστολέων, εμφανίζονται να είναι εστεράσες / αμιδάσες (Wing et al., 1998). Ο αποκαρβομεθοξυλιωμένος μεταβολίτης JW062 (DCJW) είναι ένας εξαιρετικά ισχυρός, εξαρτώμενος από την τάση αναστολέας δυναμικών δράσης που εξαρτώνται από τα ιόντα Na+ (Wing et al., 2000). Ο αποκαρβομεθοξυλιωμένος μεταβολίτης παρουσιάζει ισχυρότερη δράση από το ίδιο το indoxacarb. Έτσι, ο τοξικός μηχανισμός δράσης στα Λεπιδόπτερα και σε άλλα έντομα όπως για παράδειγμα, μυρμήγκια, κατσαρίδες, δίπτερα, στηρίζεται στην δημιουργία S-εναντιομερών των N-δεκαρβομεθοξυλιωμένων μεταβολιτών, οι οποίοι είναι ισχυροί αναστολείς των διαύλων νατρίου προερχόμενοι από την ενεργοποίηση των μητρικών οξαδιαζινών. Από έντομο σε έντομο διαφέρει ο ρυθμός βιοενεργοποίησης ο οποίος προσδιορίζει την ταχύτητα και την τελική τοξικότητα αυτής της ένωσης. Το εντομοκτόνο indoxacarb παρεμποδίζει την ροή ιόντων νατρίου σε μία σημαντική περιοχή ενσωματωμένων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών σύμφωνα με τους Wang et al. το 2015, που είναι υπεύθυνες για την εκκίνηση και την διάδοση των πιθανών δράσεων, σε σχεδόν όλα τα ηλεκτροχημικά κύτταρα. Τα κανάλια νατρίου αποτελούνται, όπως αναφέρεται από τους Silver et al. το 2010, από τέσσερεις ομόλογες περιοχές (I–IV) που η καθεμία περιέχει έξι διαμεμβρανικά τμήματα (S1-S6). Στα θηλαστικά τα διαμεμβρανικά τμήματα S6 των περιοχών I, III και IV είναι αυτά που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη δέσμευση και δράση των αναστολέων διαύλων νατρίου. Τα εξαρτώμενα από την τάση κανάλια νατρίου είναι μια ομάδα διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που είναι υπεύθυνη για την έναρξη και τη διάδοση των δυναμικών δράσης σε όλο σχεδόν τα διεγέρσιμα κύτταρα του νευρικού συστήματος (Catterall, 2012). Η διαφορά στον μηχανισμό δράσης του indoxacarb με τα πυρεθροειδή έγκειται στη προσκόλλησή τους στις υπομονάδες των διαύλων των ιόντων νατρίου στους νευράξονες των νευρικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, τα πυρεθροειδή διατηρούν τις διόδους Na^+ ανοιχτές-ενεργές, ενώ το indoxacarb αναστέλλει την ενεργοποίηση των διόδων Na^+.

2.5 Ορισμός και γενικές πληροφορίες της ανθεκτικότητας.

Ως ανθεκτικότητα ορίζεται "η αναπτυχθείσα ικανότητα μιας φυλής εντόμων να ανέχεται δόσεις τοξικών ουσιών που θα αποδεικνύονταν θανάσιμες για την πλειονότητα των ατόμων ενός φυσιολογικού πληθυσμού του ιδίου είδους" (Βόντας κ.α., 2007). Αποτελεί ένα από τα μέγιστα προβλήματα της γεωργίας παγκοσμίως. Λόγω της ανθεκτικότητας αυξάνεται η ποσότητα του εφαρμοζόμενου εντομοκτόνου με αποτέλεσμα τον κίνδυνο εμφάνισης υπολειμμάτων στις τροφές και στην υποβάθμιση του περιβάλλοντος. Η πρώτη αναφορά ανθεκτικότητας στα φυτοπροστατευτικά σκευάσματα, δημοσιεύθηκε περίπου 100 χρόνια πριν, όταν βρέθηκε ένα στέλεχος, ψώρας του Σαν Ζοζέ (*Quandraspidiotus perniciosus*) ανθεκτικό στο θειασβέστιο (Melander, 1914). Το 1962 ο Reynolds προέτρεψε όλο το προσωπικό του εργαστηρίου και τους εργαζόμενους στο πεδίο που ασχολούνται με είδη επιβλαβών οργανισμών οικονομικής σημασίας να καθορίσουν δεδομένα δοσολογίας - θνησιμότητας για πολλά υποσχόμενα φυτοφάρμακα πριν αναπτυχθεί η ανθεκτικότητα σε αυτά τα είδη.

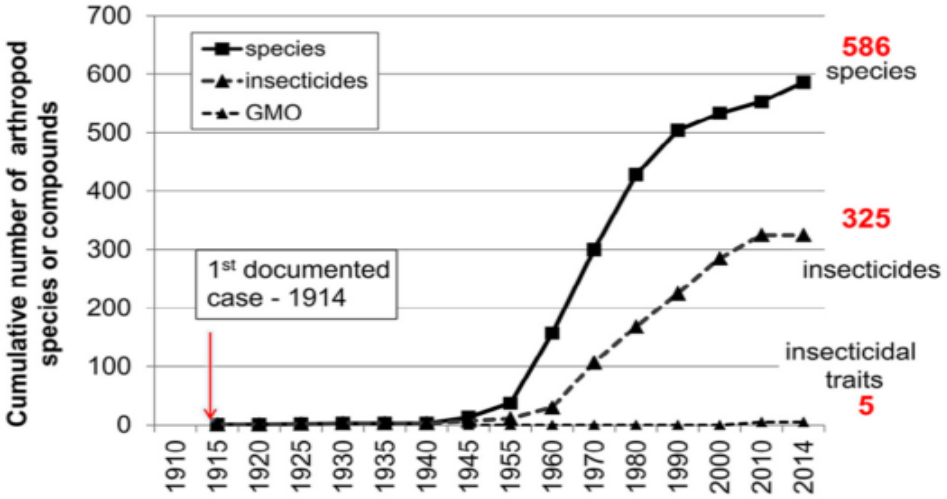
Η ανθεκτικότητα των εντόμων στα εντομοκτόνα σύμφωνα με τον Τζανακάκη 1995 ορίζεται ως η μετεξέλιξη του πληθυσμού από ευπαθή σε ανθεκτικό με την πάροδο των γενεών, με επιλογή των ανθεκτικών στο εντομοκτόνο γονιδίων που ο πληθυσμός ήδη έχει. Παράγοντας επιλογής θεωρείται το εντομοκτόνο, που με την εφαρμογή του επιλέγονται τα ανθεκτικά γονίδια, ενώ τα ευαίσθητα άτομα θανατώνονται. Η ανθεκτικότητα ενός εντόμου σ' ένα εντομοκτόνο, όπως και κάθε οργανισμού σε μια τοξική γι' αυτόν ουσία, ποικίλλει από άτομο σε άτομο ενός πληθυσμού.

Η ανθεκτικότητα διακρίνεται στην διασταυρούμενη ή πολλαπλή ανθεκτικότητα. Η διασταυρούμενη ανθεκτικότητα (cross resistance) αναφέρεται στην ικανότητα ενός μηχανισμού να δίδει ανθεκτικότητα σε μια σειρά εντομοκτόνων, συνήθως της ίδιας χημικής ομάδας. Ως πολλαπλή ορίζεται η παρουσία στο έντομο δυο ή περισσότερων μηχανισμών, ο καθένας με συγκεκριμένο τύπο διασταυρούμενης ανθεκτικότητας (Denholm and Jespersen, 1999).

Σε έναν ευπαθή πληθυσμό, τα άτομα που φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνο είναι σπάνια, με συχνότητα της τάξεως του 10^{-5} με 10^{-8} (Georgiou, 1987). Η συνεχής εφαρμογή του φαρμάκου σε διαδοχικές γενεές του παρασίτου προκαλεί συνεχή επιλογή, με συνέπεια την δημιουργία πληθυσμών στους οποίους τα περισσότερα ή τελικά και όλα τα μέλη είναι ανθεκτικά σ' αυτό. Η διακοπή της εφαρμογής μπορεί να προκαλέσει ή όχι παλινδρόμηση της σύνθεσης του πληθυσμού προς μεγαλύτερα ποσοστά μη ανθεκτικών μελών (Καπετανάκης 2003). Για την ολοκληρωμένη αντιμετώπιση εχθρών επιβάλλεται ο έλεγχος ανθεκτικότητάς τους.

Στις μέρες μας πάνω από 500 είδη εντόμων έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα, με τάση ανοδικής αύξησης και με την παραγωγή νέων δραστικών ουσιών να παραμένει δύσκολη και ακριβή. Στην εικόνα 14 παρουσιάζεται η ραγδαία αύξηση του αριθμού των ειδών που έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα από την χρονολογία 1910 μέχρι και πρόσφατα. Η σοβαρότητα του προβλήματος της

ανθεκτικότητας οδήγησε τις βιομηχανίες παραγωγής φυτοφαρμάκων να συστήσουν το 1984 την επιτροπή IRAC (Insecticide Resistance Action Committee) (Sparks and Nauen, 2015), η οποία ασχολείται με προβλήματα ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα, μέσω της μελέτης και της παροχής οδηγιών που συμβάλλουν στη μείωση απώλειας της γεωργικής παραγωγής.



Εικόνα 14 Συνολική αύξηση (α) στον αριθμό των ειδών, που είναι ανθεκτικά σε ένα ή παραπάνω εντομοκτόνα, (β) στον αριθμό των εντομοκτόνων για τα οποία ένα ή περισσότερα είδη έχουν δείξει ανθεκτικότητα, και (γ) αριθμός GMO χαρακτηριστικών για τα οποία έχει αναφερθεί ανθεκτικότητα (Sparks and Nauen, 2015).

2.5.1 Προέλευση της ανθεκτικότητας

Στον αγρό τα περισσότερα εντομοκτόνα δεν έχουν μεταλλαξιγόνο δράση. Οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν σε ένζυμα αποτοξικοποίησης ή στους μηχανισμούς του στόχου δράσης του εντομοκτόνου, συμβαίνουν τυχαία. Πολλές φορές οι μεταλλάξεις αυτές έχουν εμφανιστεί στα έντομα στόχους του εντομοκτόνου πριν καν έρθουν σε επαφή με αυτό. Τα έντομα μπορούν και αναπαράγονται μεταφέροντας την μετάλλαξη στις επόμενες γενιές και επιβιώνουν σε περιβάλλον εκτεθειμένο στο εντομοκτόνο, αυξάνοντας τον αριθμό τους. Η επιλογή σε αυτή τη περίπτωση δρα θετικά στο έντομο, προσδίδοντάς του ξεχωριστά χαρακτηριστικά για την επιβίωσή του.

Η εκτεταμένη χρήση εντομοκτόνου ευνοεί την επικράτηση των ανθεκτικών στελεχών. Η έλλειψη ενδοειδικού ανταγωνισμού συμβάλει στον γρήγορο πολλαπλασιασμό των ανθεκτικών στελεχών, με αποτέλεσμα μετά από ένα αριθμό γενεών τα ανθεκτικά άτομα να έχουν κυριαρχήσει και το εντομοκτόνο παύει να είναι αποτελεσματικό.

2.5.2 Μηχανισμοί της ανθεκτικότητας

Οι μηχανισμοί της ανθεκτικότητας σύμφωνα με τον Brown (1990) παρουσιάζονται παρακάτω.

<u>Μηχανισμοί ανθεκτικότητας</u>

Φυσιολογικοί παράγοντες & Παράγοντες Συμπεριφοράς

A) *<u>Φαρμακοκινητικοί μηχανισμοί</u>*

α) Μειωμένης διείσδυσης φαρμάκου

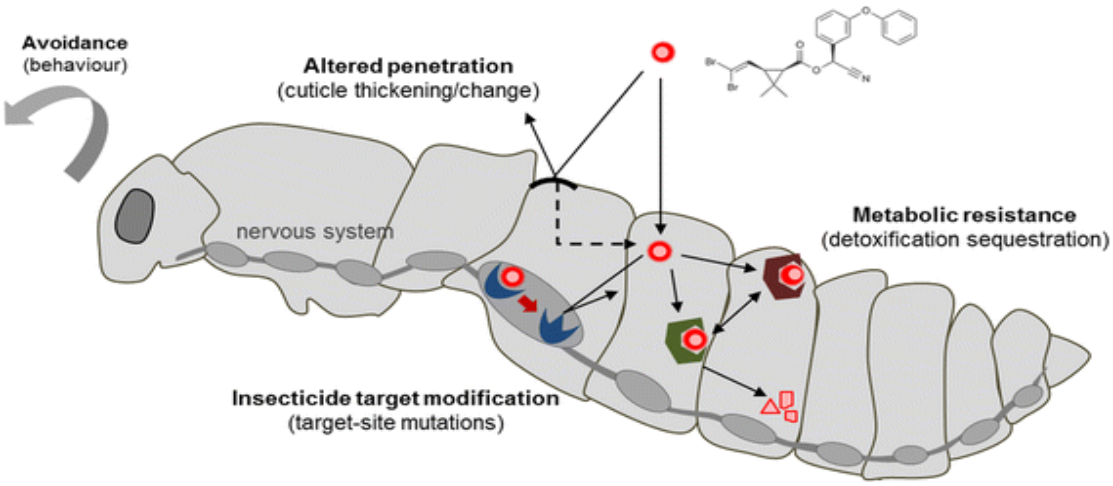
β) Με ενίσχυση της αποτοξικοποίησης από ένζυμα

i. mono-oxygenase
ii. arylhydrolase
iii. carboxyl ester hydrolase
iv. catalytic hydrolase
v. glutathione s- transferase.

B) *<u>Φαρμακοδυναμικούς μηχανισμούς</u>*

i. Acetyl cholinesterase
ii. Sodium-ion channel
iii. GABA factor

Ανθεκτικότητα μπορεί να προκαλείται από επιδερμικές διαφοροποιήσεις και αλλαγές στην συμπεριφορά των εντόμων, που έχουν ως αποτέλεσμα είτε να εμποδίζεται η είσοδος είτε να αυξάνεται η απέκκριση των εντομοκτόνων. Αυτός ο τύπος ανθεκτικότητας ονομάζεται φυσιολογική ή ηθολογική ανθεκτικότητα (Βόντας κ.ά., 2007).



Εικόνα 15 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας των εντόμων στα εντομοκτόνα (Corbel et al., 2017).

Τα έντομα έχουν την δυνατότητα αποτοξικοποίησης φυσικών τοξικών παραγόντων, αυτό επιτυγχάνεται μέσα από μηχανισμούς ανεπτυγμένων ενζυμικών συστημάτων που τα έντομα φέρουν. Η ανθεκτικότητα αυτή ονομάζεται μεταβολική ανθεκτικότητα (Εικ. 15). Η μεταβολική ανθεκτικότητα συνίσταται από ένζυμα που μεταβολίζουν τα εντομοκτόνα προτού αυτά φτάσουν στους στόχους τους. Στα κύρια ένζυμα που συμβάλλουν στην αποτοξικοποίηση συγκαταλέγονται οι εστεράσες, οι μονοοξυγενάσες, και οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης. Η ανθεκτικότητα μπορεί να επέμβει είτε με αλλαγές που στοχεύουν στην ευαισθησία των στόχων του εντομοκτόνου στο νευρικό σύστημα (π.χ. κανάλια νατρίου) ή με τον μεταβολισμό του εντομοκτόνου πριν φθάσει σε αυτούς τους στόχους (Daborn et al., 2002). Οι εστεράσες είναι μια μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών, μέλη της οποίας δεσμεύουν και κατακρατούν εντομοκτόνα μόρια στον εξωκυταρικό χώρο υδρολύοντας, συνήθως αργά, εστερικούς δεσμούς (Hemingway and Karunaratne, 1998). Ο μηχανισμός της γονιδιακής ενίσχυσης, συντελεί στην ύπαρξη ατόμων που διαθέτουν μεγάλες ποσότητες της πρωτεΐνης.

Οι P450 κυτοχρωμικές μονοοξυγενάσες αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια που σχετίζονται σε μια μεγάλη ποικιλία από μεταβολικές λειτουργίες. Πρόκειται για μικροσωμικές (εντός των μικροσωμάτων) αιμοπρωτεΐνες που καταλύουν την οξειδωτική διάσπαση των εντομοκτόνων (Scott, 1999). Είναι από τα πιο σημαντικά ένζυμα της φάσης Ι του μεταβολισμού. Σχετίζονται από τον μεταβολισμό ορμονών έως τον μεταβολισμό ξένων ουσιών φυσικής ή συνθετικής προέλευσης. Οι P450 οξειδάσες έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν ως υπόστρωμα και να μεταβολίζουν πολύ διαφορετικά τοξικά μόρια (Daborn et al., 2002).

Οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης έχουν την ικανότητα να καταλύουν την προσθήκη γλουταθειόνης στο λιπόφιλο μόριο των εντομοκτόνων με σκοπό την αύξηση της υδατοδιαλυτότητας τους και την αποβολή τους από τον οργανισμό (Vontas et al. 2001). Οι μεταφορείς της γλουταθειόνης προκαλούν σχετικά ήπια επίπεδα ανθεκτικότητας σε όλες σχεδόν τις κατηγορίες εντομοκτόνων (Vontas et al., 2001, Vontas et al., 2002).

Η **ανθεκτικότητα στόχου** είναι ένας μηχανισμός ανθεκτικότητας ο οποίος οφείλεται σε σημειακές μεταλλάξεις στα διαμεμβρανικά κανάλια ιόντων νατρίου. Οι χημικές ενώσεις των εντομοκτόνων δρουν σε συγκεκριμένα σημεία στόχους του νευρικού συστήματος στο έντομο τα οποία διαφοροποιούνται μέσω των σημειακών μεταλλαγών, με αποτέλεσμα η αποτελεσματικότητα της δέσμευσης του εντομοκτόνου με τον στόχο να είναι αδύνατη. Η ανίχνευση της ανθεκτικότητας στόχου γίνεται μέσω βιοδοκιμών, βιοχημικών ή μοριακών διαγνωστικών μεθόδων.

2.5.3 Τρόποι μελέτης της ανθεκτικότητας

Σύμφωνα με τον Herne το 1969 μία μέθοδος για την ανίχνευση της ανθεκτικότητας πρέπει να είναι ακριβής και να ανιχνεύει την ανθεκτικότητα στα αρχικά της στάδια, να είναι παράλληλα αρκετά απλή ώστε να επιτρέπει την εφαρμογή

παρατεταμένων ερευνών.

Η μελέτη της ανθεκτικότητας επιτυγχάνεται μέσα από πολλούς τρόπους, οι οποίοι χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες, στις **κλασσικές** στις **βιοχημικές** και **μοριακές** μεθόδους.

Ο κλασσικός τρόπος μελέτης, περιλαμβάνει τις τοξικολογικές βιοδοκιμές, βιοδοκιμές με διαφορετικές δόσεις του εντομοκτόνου που εξετάζεται κάθε φορά. Οι βιοδοκιμές αυτές μπορεί να γίνουν με διάφορες μεθόδους. Η μέθοδος που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από το είδος το μέγεθος του εντόμου αλλά και τον τρόπο ελέγχου του. Τα αποτελέσματα των τοξικολογικών βιοδοκιμών φανερώνουν την θνησιμότητα ενός πληθυσμού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις εντομοκτόνου. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων των τοξικολογικών βιοδοκιμών του ανθεκτικού πληθυσμού με τα αποτελέσματα ενός ευαίσθητου πληθυσμού αναφοράς στο ίδιο εντομοκτόνου, αποτελεί μέτρο σύγκρισης της σχετικής τοξικότητας ουσιών. Συγκεκριμένα, από τα αποτελέσματα των τοξικολογικών βιοδοκιμών, μέτρο σύγκρισης της τοξικότητας λαμβάνεται από τη τιμή LC50 που είναι η συγκέντρωση της τοξικής ουσίας που σκοτώνει το 50% του πληθυσμού και ονομάζεται θανατηφόρος συγκέντρωση (lethal concentration), ή τη τιμή LD50 που είναι η δόση που σκοτώνει το 50% του πληθυσμού και χαρακτηρίζεται ως η μέση θανατηφόρος δόση (dosis letalis). Οι τιμές αυτές είναι διεθνώς δεκτές ως βάση σύγκρισης της σχετικής τοξικότητας ουσιών. Μέσω των τοξικολογικών βιοδοκιμών δεν προσδιορίζεται ο μηχανισμός ανθεκτικότητας που είναι υπεύθυνος.

Οι βιοχημικές μέθοδοι σχετίζονται με την κινητικότητα την υπερπαραγωγή ή την τροποποίηση ενζύμων. Οι μοριακές μέθοδοι δίνουν ακριβή διάγνωση για τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας. Συγκεκριμένα οι μοριακές μέθοδοι μπορούν να ανιχνεύσουν μεταλλάξεις στα ένζυμα αποτοξικοποίησης ή μεταλλάξεις που προκαλούν αλλαγή στους μηχανισμούς του στόχου δράσης του εντομοκτόνου. Η μελέτη των μηχανισμών ανθεκτικότητας μπορούν να προσδιοριστούν με πειράματα in vitro και in vivo ενώ ενδείκνυται και η μελέτη της γενετικής βάσης της ανθεκτικότητας. Οι γενετικοί παράγοντες που επηρεάζουν την επιλογή ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα, είναι κληρονομήσιμα χαρακτηριστικά και περιλαμβάνουν την συχνότητα των ανθεκτικών (R) αλληλομόρφων, τον αριθμό και την κυριαρχία των R αλληλομόρφων. Άλλοι γενετικοί παράγοντες αφορούν την έκφραση και την αλληλεπίδραση των R αλληλομόρφων, την προηγούμενη επιλογή σε άλλα εντομοκτόνα, καθώς και την ενσωμάτωση των R γονιδίων και προσαρμογή τους (Georgiou et al. 1986).

Επιπλέον, από την αξιολόγηση του κόστους προσαρμοστικότητας (fitness cost), μπορούν να συλλεχθούν τα απαραίτητα στοιχεία για την ανάπτυξη ενός προγράμματος διαχείρισης της ανθεκτικότητας. Ο όρος "κόστος προσαρμοστικότητας" προσδιορίζει τις επιπτώσεις των γονιδίων της ανθεκτικότητας στη βιολογία των ατόμων που είναι ανθεκτικά. Παράλληλα με τη μελέτη του κόστους προσαρμοστικότητας προσδιορίζονται πολυμορφισμοί ουδέτερων επιλεκτικά γενετικών τόπων και η κατανομή αυτών. Επιπλέον από την μελέτη του κόστους προσαρμοστικότητας ενός είδους, προσδιορίζεται το μέγεθος της γενετικής τους διαφοροποίησης.

Η αναγνώριση των μηχανισμών ανθεκτικότητας επιτρέπει την λήψη μέτρων όπως είναι η επιλογή χρήσης εναλλακτικών εντομοκτόνων, στον καθορισμό του φάσματος της διασταυρούμενης ανθεκτικότητας ενώ παράλληλα επιτρέπει τη χαρτογράφηση των τοποθεσιών στα οποία το έντομο έχει παρουσιάσει ανθεκτικότητα. Η διασταυρούμενη ανθεκτικότητα αναφέρεται σε περιπτώσεις εντόμων που είναι ανθεκτικά σε ποικιλία συγγενών η μη συγγενών εντομοκτόνων. Η γνώση των μηχανισμών ανθεκτικότητας μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για τη διαχείριση προγραμμάτων που θα έχουν σαν στόχο την λήψη κατάλληλων μέτρων για την ελαχιστοποίηση της ανάπτυξής της. Στις περιπτώσεις που οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας έχουν χαρακτηρισθεί σε βιοχημικό ή μοριακό επίπεδο, αναπτύσσονται απλές τεχνικές (διαγνωστικά τεστ ενζυμικής δραστικότητας ή διαγνωστικό PCR), που αναγνωρίζουν με ταχύτητα και ασφάλεια τις μεταλλαγές ανθεκτικότητας, ακόμη κι αν αυτές είναι σε πολύ μικρές συχνότητες, με αποτέλεσμα τη δυνατότητα εφαρμογής διορθωτικών κινήσεων στην στρατηγική φυτοπροστασίας (Βόντας κ.α. 2007).

2.5.3.1 Κόστος προσαρμοστικότητας

Η προσαρμοστικότητα του εντόμου στις υψηλές συγκεντρώσεις επηρεάζει βασικά χαρακτηριστικά της Δαρβινικής προσαρμογής. Στα χαρακτηριστικά αυτά συγκαταλέγεται ο **εγγενής ρυθμός αύξησης r** (the intrinsic rate of increase). Ο εγγενής ρυθμός αύξησης είναι ο ρυθμός αύξησης (σε μέγεθος) ενός πληθυσμού εάν δεν υπάρχουν πυκνο-εξαρτώμενες δυνάμεις που ρυθμίζουν τον πληθυσμό. Επίσης ο **πεπερασμένος ρυθμός αύξησης λ** (the finite rate of increase), **ο καθαρός ρυθμός αναπαραγωγής R_o** (the net reproduction rate) ο οποίος απεικονίζει το μέσο αριθμό θυγατέρων που θα γεννηθούν από ένα θηλυκό (ή μια ομάδα θηλυκών) αν περάσει τη ζωή του σύμφωνα με τα ποσοστά γονιμότητας και θνησιμότητας κάθε ηλικιακού σταδίου για συγκεκριμένο έτος είναι κάποια από τα χαρακτηριστικά που αλλάζουν κατά την προσαρμογή αυτή. Ο καθαρός ρυθμός αναπαραγωγής R_o όσο χαμηλότερη τιμή φέρει τόσο χαμηλότερη γονιμότητα και εκκόλαψη φανερώνει. Στα χαρακτηριστικά που αξιολογούνται ανήκει ο **ακαθάριστος ρυθμός αναπαραγωγής GRR** (the gross reproductive rate) ο οποίος είναι παρόμοιος με τον R_o αλλά με τη διαφορά ότι δεν λαμβάνει υπόψη, σε αντίθεση με τον R_o, ότι κάποια θηλυκά θα πεθάνουν πριν τεκνοποιήσουν. Η τιμή GRR ενός πληθυσμού υποδηλώνει ότι κάθε γενιά μητέρων έχει ακριβώς αρκετές κόρες για να αντικατασταθούν μέσα στον πληθυσμό. Αν η τιμή GRR είναι μικρότερη του ενός αυτό υποδηλώνει ότι οι αναπαραγωγικές επιδόσεις του πληθυσμού είναι κάτω από το επίπεδο αντικατάστασης. Άλλη παράμετρος είναι **ο μέσος χρόνος παραγωγής T** (the mean generation time), ο οποίος είναι ο μέσος χρόνος που απαιτείται για να αυξηθεί ο πληθυσμός με συντελεστή του το καθαρό ποσοστό αναπαραγωγής. Ο χρόνος παραγωγής ορίζεται ως ο χρόνος ανανέωσης του πληθυσμού, ο χρόνος ανάπτυξης

από το στάδιο του ωού έως την ενηλικίωση. Στον Πίν. 8 παρατίθενται οι τύποι για τον υπολογισμό κάθε παραμέτρου.

- ***Ο εγγενής ρυθμός αύξησης r (the intrinsic rate of increase)***

$$\frac{dN}{dt}\frac{1}{N} = r$$

dN/dt= ο ρυθμός αύξησης του πληθυσμού, N= το μέγεθος του πληθυσμού.

$$\sum_{x=0}^{\infty} e^{-r(x+1)} l_x m_x = 1$$

l_x , m_x ο ρυθμός επιβίωσης και η γονιμότητα συγκεκριμένης ηλικίας αντίστοιχα.

- ***Ο πεπερασμένος ρυθμός αύξησης λ (the finite rate of increase)***

$$\lambda = e^r$$

- ***Ο καθαρός ρυθμός αναπαραγωγής R_o (the net reproduction rate)***

$$R_0 = \sum_{x=0}^{\infty} l_x m_x$$

- ***Ο ακαθάριστος ρυθμός αναπαραγωγής GRR (the gross reproductive rate)***

$$GRR = \sum m_x$$

- ***Ο μέσος χρόνος παραγωγής T (the mean generation time)***

$$T = (\ln R_0)/r, \quad R_0 = \sum_{x=0}^{\infty} l_x m_x$$

Πίνακας 8 Παράγοντες μελέτης του κόστους προσαρμοστικότητας

Για την μελέτη του κόστους προσαρμοστικότητας των πληθυσμών, εκτός των παραπάνω χαρακτηριστικών μπορούν να αξιολογηθούν :

- ✓ το ποσοστό αναπαραγωγής,
- ✓ η γονιμότητα (αριθμός ωαρίων ανά θηλυκό),
- ✓ η διάρκεια περιόδου ωοτοκίας,
- ✓ ο χρόνος εκκόλαψης,
- ✓ ο μέσος σχετικός ρυθμός ανάπτυξης των προνυμφών,
- ✓ το ποσοστό επιβίωσης από το L_1 -L_4 στάδιο των προνυμφών και η διάρκεια κάθε σταδίου,
- ✓ το ποσοστό θνησιμότητας από το L_1 -L_4 στάδιο των προνυμφών,

- η μέτρηση βάρους μέσα σε 24h από την έναρξη δημιουργίας του κουκουλιού,
- η αναλογία λόγος φύλου,
- το ποσοστό εμφάνισης υγιών ενηλίκων (emergence rate of adults),
- η μακροζωία θηλυκών & αρσενικών ενηλίκων σε κάθε δοκιμή
- ο συνολικός χρόνος ανάπτυξης

2.5.3.2 Μελέτη της γενετικής της ανθεκτικότητας

Η μελέτη της γενετικής της ανθεκτικότητας περιλαμβάνει διασταυρώσεις διπλής κατευθύνσεως και ανάστροφες διασταυρώσεις (backcrosses). Οι ανάστροφες διασταυρώσεις πραγματοποιούνται για να ερευνηθεί αν η ανθεκτικότητα ελέγχεται από πολλά γονίδια (πολυπαραγοντική) ή από ένα μόνο γονίδιο (μονοπαραγοντική). Η διπλή διασταύρωση πραγματοποιείται μεταξύ των πληθυσμών που αποτελούνται από ομόζυγα ανθεκτικά και ομόζυγα ευαίσθητα άτομα. Από τη διασταύρωση αυτή, καθορίζεται ο βαθμός κυριαρχίας της ανθεκτικότητας. Έπειτα ακολουθεί διασταύρωση της F1 γενιάς. Αν το γονίδιο είναι κυρίαρχο τότε η F1 γενιά διασταυρώνεται με το ευαίσθητο στέλεχος, αντίθετα αν το γονίδιο είναι υπολειπόμενο τότε η F1 γενιά διασταυρώνεται με το ανθεκτικό στέλεχος. Σε κάθε γενιά που προκύπτει από τις προαναφερθείσες διασταυρώσεις πραγματοποιείται τοξικολογική βιοδοκιμή για την εύρεση των επιπέδων θνησιμότητας. Επίσης από την σύγκριση των τιμών LC50 (LC50 η συγκέντρωση της τοξικής ουσίας που σκοτώνει το 50% του πληθυσμού) των πληθυσμών της F1 γενιάς, εξακριβώθηκε αν και οι δυο γονείς συνεισφέρουν εξίσου στο φαινότυπο του *T. absoluta* και δεν βασίζεται ο φαινότυπος στο γονότυπο της μητέρας (maternal effect). Όπως είναι γνωστό στη γενετική, ο φαινότυπος ενός εντόμου και κατ' επέκταση ενός οργανισμού καθορίζεται όχι μόνο από το περιβάλλον και το γονότυπό του αλλά από το περιβάλλον και τον γονότυπο της μητέρας. Αυτό συμβαίνει λόγω της μεταφοράς από την μητέρα, κατά το στάδιο του ωού αγγελιοφόρου RNA και πρωτεϊνών. Τα μητρικά αποτελέσματα όπως τα χαρακτηριστικά μέγεθος, φύλο, συμπεριφορά μπορεί να είναι αποτέλεσμα του περιβάλλοντος της μητέρας (φαινοτυπική πλαστικότητα), ανεξάρτητα γονότυπου. Η μητρική αυτή επίδραση αυξάνει την προσαρμοστικότητα των απογόνων της, ενώ συμβάλλει στην εξέλιξη και στην περιβαλλοντολογική ετερογένεια.

2.6 Σκοπός της Μεταπτυχιακής Εργασίας

Η συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της μεταπτυχιακής διατριβής του μεταπτυχιακού Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας Φυτών του Πανεπιστημίου Κρήτης σε συνεργασία με το εργαστήριο Εντομολογίας του Ελληνικού Γεωργικού Οργανισμού "Δήμητρα" (ΕΛΓΟ).

Η έγκαιρη ανίχνευση της ανθεκτικότητας παίζει σημαντικό ρόλο για τις

οργανωμένες εκστρατείες καταπολέμησης παρασίτων, αλλά και για κάθε καλλιεργητή μεμονωμένα. Η παράλογη χρήση φυτοφαρμάκων επιταχύνει την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα φυτοφάρμακα. Στην παρούσα έρευνα, μελετήθηκε η υψηλή ανθεκτικότητα του εντόμου *T. absoluta* στο υψηλής δράσης εντομοκτόνο indoxacarb. Σε πρώτο πλάνο διερευνήθηκε η γενετική βάση της ανθεκτικότητας μέσω των διασταυρώσεων. Με την μελέτη της γενετικής της ανθεκτικότητας θα διαλευκανθεί ο τρόπος κληρονόμησης του γονιδίου ή των γονιδίων ανθεκτικότητας στο εντομοκτόνο indoxacarb. Στο επόμενο τμήμα της παρούσας μελέτης, ερευνήθηκε το κόστος προσαρμοστικότητας (fitness cost) στο εντομοκτόνο indoxacarb. Χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν ήταν η χρονική διάρκεια κάθε αναπτυξιακού σταδίου από αυγό μέχρι ενήλικο άτομο, το βάρος νύμφης, η βιωσιμότητα θηλυκών και αρσενικών ενηλίκων και τέλος η γονιμότητα των θηλυκών ενήλικων στελεχών.

3 Υλικά & μέθοδοι

3.1 Πειραματικές εγκαταστάσεις

Οι εκτροφές των πληθυσμών, οι βιοδοκιμές και ολόκληρο το ερευνητικό έργο από την αρχή του μέχρι το τέλος του, υλοποιήθηκε στο εργαστήριο Εντομολογίας του Ελληνικού Γεωργικού Οργανισμού (ΕΛ.Γ.Ο.) - Δήμητρα.

3.2 Φυτικό υλικό

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων αλλά και για την εκτροφή των πληθυσμών, αναγκαία ήταν η ύπαρξη φυτών τομάτας (*Solanum lycopersicum*) της ποικιλίας Valuro. Κάθε εβδομάδα γινόταν παραλαβή νεαρών φυτών ηλικίας 2-3 εβδομάδων από συνεργαζόμενο φυτώριο. Στην συνέχεια τα φυτά αυτά, αμέσως μετά την παραλαβή μεταφυτεύονταν σε πλαστικά γλαστράκια 13 cm, 15cm διαμέτρου και ύψους αντίστοιχα. Κατά την μεταφύτευση γινόταν έλεγχος για τυχόν προσβολές από εχθρούς (κυρίως *T. absoluta* και δευτερευόντως από *Thrips sp.* Και *Lyriomyza solani*) αλλά και από ασθένειες. Στην συνέχεια μεταφερόντουσαν σε θερμοκηπιακό χώρο του Ε.Λ.Γ.Ο Δήμητρα και τοποθετούνταν σε ειδικά μικρά μεταλλικά δικτυοκήπια (διαστάσεων: ύψους 95 cm, πλάτους 1,2 m και μήκους από 2-3 m) (Εικ.16), που καλύπτονταν με πολύ πυκνό δίκτυ (πυκνότητα ύφανσης: 16 x 10 νήματα/cm). Τα δικτυοκήπια πριν την μεταφορά των νεαρών φυτών είχαν ψεκαστεί με εντομοκτόνο για προληπτικούς λόγους ενώ στο εσωτερικό τους έφεραν παγίδες προσκόλλησης (Εικ. 17) για την απαλλαγή από έντομα (και κυρίως του *T. absoluta*), εξασφαλίζοντας την παρεμπόδιση της εισόδου εντόμων εντός τους.

Εικόνα 16 Μεταλλικό Δικτυοκήπιο σε θερμοκηπιακό χώρο του ΕΛΓΟ Δήμητρα

Εικόνα 17 Εσωτερικό δικτυοκηπίου, το οποίο φέρει παγίδες προσκόλλησης.

Τα φυτά καθ΄όλη τη διάρκεια παραμονής τους εντός των δικτυοκηπίων ποτιζόντουσαν ανά 2-3 ημέρες ώστε το χώμα να έχει όσο το δυνατό την κατάλληλη υγρασία για την βέλτιστη ανάπτυξη των φυτών τομάτας, λιπαίνονταν ανά 15 μέρες με υδατοδιαλυτό λίπασμα (20-20-20 περίπου 15gr σε 1,5 lt νερό) και γινόταν καθάρισμα και έλεγχος και σε αυτό το σημείο, για τυχόν προσβολές. Μετά το πέρας, χρονικού διαστήματος τουλάχιστον ενός μηνός μετά την τοποθέτηση τους εντός του δικτυοκηπίου (διάστημα απαραίτητο για απαλλαγή από κάθε είδους υπολειμματική δράση ψεκασμών που είχαν προηγηθεί πριν την μεταφύτευσή τους καθώς και ιδανικό για την απόκτηση επαρκών φύλλων), τα φυτά έμπαιναν σε μία μορφής καραντίνα για 4-5 ημέρες, ώστε αν υπήρχε το ενδεχόμενο τυχόν ύπαρξης αυγών *T.absoluta* να υπήρχε το χρονικό περιθώριο εκκόλαψης και απομάκρυνσης τους πριν την χρήση τους.

3.3 Συλλογή πληθυσμών *T. absoluta*

Οι πληθυσμοί εντόμων *T. absoluta* που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την ερευνητική εργασία προέρχονταν από την περιοχή της Πελοποννήσου και της Ιεράπετρας αντίστοιχα (Πίν. 9). Η συλλογή των πληθυσμών είχε πραγματοποιηθεί μέσω δειγματοληψιών από θερμοκηπιακές καλλιέργειες τομάτας. Συγκεκριμένα η συλλογή πληθυσμών είχε πραγματοποιηθεί με την συλλογή προσβεβλημένων φύλλων που περιείχαν στο μεσόφυλλο τους προνύμφες *T.absoluta* σε διάφορα στάδια ανάπτυξης από διάφορα σημεία του θερμοκηπίου (για λόγους ποικιλομορφίας).

Πληθυσμοί	**Περιοχή προέλευσης**	**Ημερομηνία Συλλογής**
Ιεράπετρας	Ιεράπετρα Βαϊνιά	Μάιος 2015
Πελοπόννησος	Greenhouse Πελοποννήσου	Αύγουστος 2010

Πίνακας 9 Πληροφορίες σχετικά με τους πληθυσμούς *T. absoluta* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

Τα δείγματα στην συνέχεια τοποθετήθηκαν σε πλαστικές διαφανείς σακούλες με βρεγμένες στο εσωτερικό τους χαρτοπετσέτες, ώστε να μην μαραθούν. Οι σακούλες σφραγίστηκαν και τρυπήθηκαν σε διάφορα σημεία με βελόνα, για τον ελάχιστο αερισμό αλλά και την αποφυγή της διαφυγής των προνυμφών από την σακούλα. Έπειτα για την μεταφορά των δειγμάτων στο εργαστήριο, τοποθετήθηκαν μέσα σε μικρά φορητά ψυγεία από φελιζόλ, όπου στο εσωτερικό τους υπήρχαν παγοκύστες για την διατήρηση των δειγμάτων σε ευνοϊκές συνθήκες (φυσιολογική σχετική υγρασία και θερμοκρασία από 22-25◦ C.

3.4 Διαχείριση νεομεταφερθέντων πληθυσμών στο εργαστήριο

3.4.1 Καθαρισμός εκτροφής

Ο κάθε πληθυσμός που παραλαμβάνεται στο εργαστήριο περνά από κάποια διαδοχικά στάδια. Το πρώτο διαδοχικό στάδιο περιλαμβάνει τον καθαρισμό της εκτροφής. Οι πληθυσμοί τοποθετούνται ξεχωριστά σε κλωβούς με πυκνό εντομολογικό δίκτυ (πυκνότητα ύφανσης 16x10 νήματα/cm) διαστάσεων 80x50x50, για την έναρξη των εκάστοτε εκτροφών (αρχικές εκτροφές) (Εικ.18). Αξίζει να σημειωθεί ότι για την έναρξη και την γρήγορη ανάπτυξη κάθε πληθυσμού απαραίτητη είναι η ύπαρξη ικανοποιητικού αριθμού προνυμφών (περισσότερες από 300 προνύμφες) καθώς και το μέγεθος των προνυμφών να βρίσκεται σε τελικό στάδιο ανάπτυξης (κυρίως L4). Όσο πιο προχωρημένο είναι το στάδιο των προνυμφών τόσο πιο γρήγορα πραγματοποιείται η ανάπτυξη του πληθυσμού.

Κάθε κλωβός τροφοδοτείται ανά τρεις ημέρες (ή και σε λιγότερο χρονικό διάστημα ανάλογα τις ανάγκες του εκάστοτε πληθυσμού) από καθαρά φυτά τομάτας ποικιλίας Valuro, για το τάϊσμα των προνυμφών και την βέλτιστη ανάπτυξη των πληθυσμών. Αυτοί οι κλωβοί ονομάζονται αρχικοί κλωβοί.

Σε αυτό το σημείο, γίνεται και καθαρισμός του πληθυσμού από φυσικούς εχθρούς ή από άλλα έντομα, που τυχόν μπορεί να περιέχονταν στα δείγματα που συλλέχθηκαν από το θερμοκήπιο, όπως για παράδειγμα τα αρπακτικά *Nesidiocoris tenuis* και *Macrolophus pygmaeus*.

Εικόνα 18 Μπροστινή και πίσω όψη κλωβού

3.4.2 Ανάπτυξη και διατήρηση των πληθυσμών μέσα στον θάλαμο σε σταθερές συνθήκες ανάπτυξης

Μετά το πέρας περίπου 3 εβδομάδων (ανάλογα το αρχικό στάδιο που είχαν οι αρχικές συλλεγμένες προνύμφες) εξέρχονται τα ενήλικα άτομα (F1 γενιά). Τα ενήλικα αφού συλλεχθούν με την βοήθεια δοχείου αναρροφήσεως 100ml μεταφέρονται σε νέο ξύλινο κλωβό από πυκνό εντομολογικό δίκτυ, στο εσωτερικό του οποίου έχουν τοποθετηθεί δυο καθαρά φυτά, απαλλαγμένα από φυτοφάρμακα. Ο κλωβός αυτός μεταφέρεται σε θάλαμο με σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας 26±1 ^{o}C, 65% RH (σχετική υγρασία) και φωτοπερίοδο 16 h φως: 8 h σκοτάδι. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα ο πληθυσμός αυτός εμπλουτίζεται με νέα ενήλικα άτομα προερχόμενα από τον αρχικό κλωβό.

Στον κλωβό αυτό, ανά 2-3 ημέρες ανάλογα την δυναμική του πληθυσμού, παρέχονται φυτά τομάτας για την ωοαποθέτηση των ενηλίκων σε αυτά καθώς και για την διατροφή των προνυμφών. Η διατροφή των ενήλικων ατόμων εξασφαλίζεται μέσω της προσθήκης πλαστικού τρυβλίου στον κλωβό, το οποίο φέρει μία μικρή ποσότητα μελιού καθώς επίσης και τρυβλίου το οποίο έχει εμποτιστεί με μικρή ποσότητα νερού. Τα τρυβλία ανανεώνονταν ανά 2-3 ημέρες.

Παράλληλα με το τάϊσμα, ανά τακτά διαστήματα λόγω της συσσώρευσης αρκετών γλαστρών εντός του κλωβού, τα πλεονάζοντα γλαστράκια στα οποία τα φυτά είχαν φαγωθεί εξολοκλήρου από τις προνύμφες του κλωβού απομακρύνονται. Πριν την απομάκρυνσή τους, προηγείται το κόψιμο των φαγωμένων φυτών. Τα φαγωμένα φυτά δεν απομακρύνονταν από τον κλωβό αλλά παραμένουν στο εσωτερικό του για το λόγο ότι πολλές προνύμφες έχουν νυμφευθεί στα στρουφιγμένα ξερά φύλλα. Οι νύμφες που έχουν νυμφευθεί στο χώμα των γλαστρών τοποθετούνται μέσα στο κλωβό για την αύξηση του ενήλικου πληθυσμού.

3.5 Δημιουργία ελεγχόμενων ωοθεσιών στους πληθυσμούς

Όταν ο πληθυσμός φέρει πολλά σε αριθμό ενήλικα άτομα, αυτά συλλέγονται για την έναρξη ελεγχόμενης ωοθεσίας. Αξίζει να σημειωθεί ότι για την πραγματοποίηση μιας σωστής ωοθεσίας απαιτείται αρκετός αριθμός ενήλικων ατόμων *T.absoluta* (π.χ. 300 ενήλικα άτομα)**.**

Τα ενήλικα άτομα συλλέγονται με δοχείο αναρρόφησης 100 ml, στο πώμα του οποίου στερεώθηκε με θερμόκολλα, tip 1ml και στη βάση δεύτερο tip 1,5ml, καλυμμένο από λεπτή σήτα. Οι άκρες των στομίων ήταν διαμέτρου 0,5cm (Εικ. 19). Τα έντομα μεταφέρονται σε νέο κλωβό, στον οποίο τοποθετούνται δύο φυτά, στα οποία θα εναποθέσουν τα ενήλικα τα ωά τους. Εκτός από τα φυτά στον κλωβό τοποθετούνται τρυβλία τα οποία φέρουν μία μικρή ποσότητα μελιού και μικρής

ποσότητας νερού για το τάϊσμα των ενηλίκων ατόμων *T.absoluta*. Μετά την πάροδο δύο περίπου 24ώρων τα φυτά απομακρύνονται από τον κλωβό και μεταφέρονται σε ένα καθαρό κλωβό με σκοπό την εκκόλαψη των εναποτεθέντων ωών.

Εικόνα 19 Δοχείο αναρροφήσεως

3.6 Τοξικολογική βιοδοκιμή

Για την επίτευξη του πειραματικού έργου, ο ένας από τους δύο πληθυσμούς που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα ερευνητική μελέτη, ο πληθυσμός Ιεράπετρας έπρεπε να φτάσει στο μέγιστο βαθμό ανθεκτικότητας στο εντομοκτόνο indoxacarb ή αλλιώς Steward κατά την εμπορική του ονομασία (Εμπορικό όνομα: Steward 30 gL^{-1} WG εναιωρηματοποιήσιμοι κόκκοι; DuPont, Nambsheim, France). Όταν ο πληθυσμός από την Ιεράπετρα είχε γίνει ομοιόμορφος, έγινε διερεύνησή του ως προς τα επίπεδα ανθεκτικότητας στα οποία βρισκόταν στο εντομοκτόνο αυτό. Η μελέτη των επιπέδων ανθεκτικότητας πραγματοποιήθηκε μέσω τοξικολογικής κλασσικής βιοδοκιμής που πραγματοποιήθηκε με την μεθοδολογία του IRAC N° 022, κατά την οποία χρησιμοποιούνται μόνο προνύμφες σε ηλικία $2^{ου}$ προνυμφικού σταδίου (L_2). Μετά το πέρας 6-7 ημερών οι προνύμφες των φυτών που προέρχονται από ωοθεσία είχαν φτάσει στο επιθυμητό προνυμφικό στάδιο (L2) για την έναρξη της βιοδοκιμής.

Ακολουθώντας το πρωτόκολλο της IRAC Method N° 022, συλλέγονται νωπά φύλλα τομάτας ποικιλίας Valuro, τα οποία είναι απαλλαγμένα από οποιοδήποτε φυτοπροστατευτικό προϊόν. Τα φύλλα τεμαχίζονται με ένα ψαλίδι σε διαστάσεις περίπου 4x4cm το καθένα. Προετοιμάστηκαν διαδοχικές αραιώσεις της υπό δοκιμής δραστικής ουσίας. Στις αρχικές μελέτες χρησιμοποιούνται 6 ευρείες αραιώσεις ή συγκεντρώσεις του εντομοκτόνου, ώστε να επιτευχθεί περίπου από 0-100%

θνησιμότητα (screening). Νερό βρύσης χρησιμοποιήθηκε ως διαβρέκτης, στο οποίο προστέθηκε Triton X-100 200gL^{-1} (0,2 % v/v) για την καλύτερη προσκόλληση του εντομοκτόνου στο φύλλο. Η μία εκ των 6 μεταχειρίσεων περιείχε μόνο νερό βρύσης με Triton X-100, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας (control).

Η διαδικασία περιελάμβανε την κοπή 32/ανά δόση φύλλων τομάτας που είχαν κοπεί σε κομμάτια περίπου 4x4cm το καθένα. Στην συνέχεια ακολούθησε εμβάπτισμα κάθε φύλλου ένα προς ένα ξεχωριστά για πέντε δευτερόλεπτα με την βοήθεια μεταλλικής λαβίδας (Εικ. 20). Οι συγκεντρώσεις φτιάχτηκαν σε φιάλες των 250ml, ενώ η εμβάπτιση πραγματοποιήθηκε σε γυάλινα τρυβλία petri μεγέθους 9cm και όγκου περίπου 30ml, που περιείχαν την κατάλληλη περιεκτικότητα. Η εμβάπτιση ξεκίνησε από τα φύλλα του μάρτυρα (control) και εν συνεχεία από την χαμηλότερη προς την υψηλότερη συγκέντρωση. Το κάθε τεμαχισμένο φύλλο αφέθηκε 5 δευτερόλεπτα μέσα στην εκάστοτε συγκέντρωση. Οι αναλυτικές δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν κυμάνθηκαν από 0,1-3000 ppm. Τα 32/ανά δόση φύλλα αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου να στεγνώσουν πάνω σε διπλό απορροφητικό χαρτί.

Εικόνα 20 Εμβάπτισμα φύλλων σε τοξικολογική βιοδοκιμή

Όταν τα φύλλα στεγνώσουν μπαίνουν σε δίσκους τοξικολογικών βιοδοκιμών 32 θέσεων (Εικ. 21). Οι δίσκοι φέρουν κολλητικά καπάκια τεσσάρων θέσεων (8 καπάκια ανά δίσκο) (Bioserv Rearing Tray RT32W, closed with lids RTCV4). Πριν την τοποθέτηση των 32 φύλλων, σε κάθε κελί τοποθετήθηκαν τέσσερα διπλά φύλλα οικιακού χαρτιού στις διαστάσεις του κάθε κελιού (περίπου 3.5-4 x 3.5-4 cm), τα

οποία εμποτίζονται με 1,5ml απεσταγμένου νερού με την βοήθεια του αυτόματου δοσομετρητή υγρών (Εικ. 22).

Εικόνα 21 Δίσκος τοξικολογικών βιοδοκιμών 32 θέσεων

Το απεσταγμένο νερό, στο οποίο το χαρτί εμποτίζεται, διατηρεί το φύλλο για τα απαιτούμενα τρία 24ωρα που απαιτούνται μέχρι να γίνει η μέτρηση των βιοδοκιμών.

Εικόνα 22 Αυτόματης δοσομετρητής υγρών

Όταν περάσει ένα χρονικό διάστημα και τα φύλλα έχουν στεγνώσει τελείως, τα 32 φύλλα κάθε συγκέντρωσης τοποθετούνται ξεχωριστά ένα προς ένα ανά κελί στους δίσκους των τοξικολογικών βιοδοκιμών. Η τοποθέτηση των φύλλων σε κάθε κελί πραγματοποιείται με την βοήθεια λαβίδας, πρώτα των φύλλων του μάρτυρα (control) και εν συνεχεία, των φύλλων από την χαμηλότερη στην υψηλότερη συγκέντρωση.

Στην συνέχεια, τα προσβεβλημένα φυτά με προνύμφες L2 σταδίου (προερχόμενα από τις ωοθεσίες) τοποθετούνται σε συσκευή διερχόμενου φωτός (Εικ.

23) έτσι ώστε οι προνύμφες να είναι ορατές. Με την βοήθεια πινέλου και νυστεριού απομακρύνονται από το μεσόφυλλο και τοποθετούνται μία προς μία σε κάθε κελί μέχρι να συμπληρωθούν όλοι οι τοξικολογικοί δίσκοι βιοδοκιμών. Η εγκατάσταση των προνυμφών πραγματοποιείται κατά αύξουσα σειρά των συγκεντρώσεων της δραστικής ουσίας, ξεκινώντας από το μάρτυρα. Οι τοξικολογικοί δίσκοι βιοδοκιμών ανά τέσσερα κελιά σφραγίζονται με ειδικό διαφανές αυτοκόλλητο έτσι ώστε να παραμένει η υγρασία στο φύλλο και να προστατεύεται η προνύμφη, ενώ παράλληλα παρέχεται ο απαιτούμενος αερισμός για την διατήρηση των φύλλων και την μη θανάτωση των προνυμφών. Οι δίσκοι βιοδοκιμών τοποθετούνται σε δωμάτιο με ελεγχόμενες-σταθερές συνθήκες (θερμοκρασία 25 ± 0.5 °C και 65 ± 5 % σχετική υγρασία) κάτω από τεχνητό ρυθμιζόμενο φως για τρία 24ωρα μέχρι να γίνει η μέτρηση.

Η αξιολόγηση της θνησιμότητας πραγματοποιείται μετά το πέρας τριών 24ώρων (72ωρών). Σε κάθε δίσκο πραγματοποιήθηκε εξαγωγή κάθε μίας προνύμφης προσεκτικά από τον φυτικό ιστό. Με την βοήθεια ενός λεπτού πινέλου εξετάζεται αν η προνύμφη είναι νεκρή, έτοιμη να πεθάνει ή ζωντανή. Οι προνύμφες που ήταν έτοιμες να πεθάνουν ήταν αυτές που δεν είχαν αυξηθεί πολύ σε μέγεθος ενώ δεχόμενες πίεση με την άκρη του λεπτού πινέλου δεν μπορούσαν να διανύσουν απόσταση ίση με αυτή του σώματός τους. Οι νεκρές προνύμφες δεχόμενες πίεση με το πινέλο δεν κουνούσαν. Συνήθως η διαφορά των ετοιμοθάνατων από τις ζωντανές προνύμφες ήταν στο ότι οι ετοιμοθάνατες, είτε είχαν ξεκινήσει να τρώνε το φύλλο τομάτας και μετά κινούνταν ελάχιστα έως καθόλου είτε δεν είχαν τραφεί καθόλου αλλά δεχόμενες πίεση με το πινέλο η κίνηση τους ήταν περιορισμένη.

3.6.1 Εργαστηριακή επιλογή με το εντομοκτόνο indoxacarb

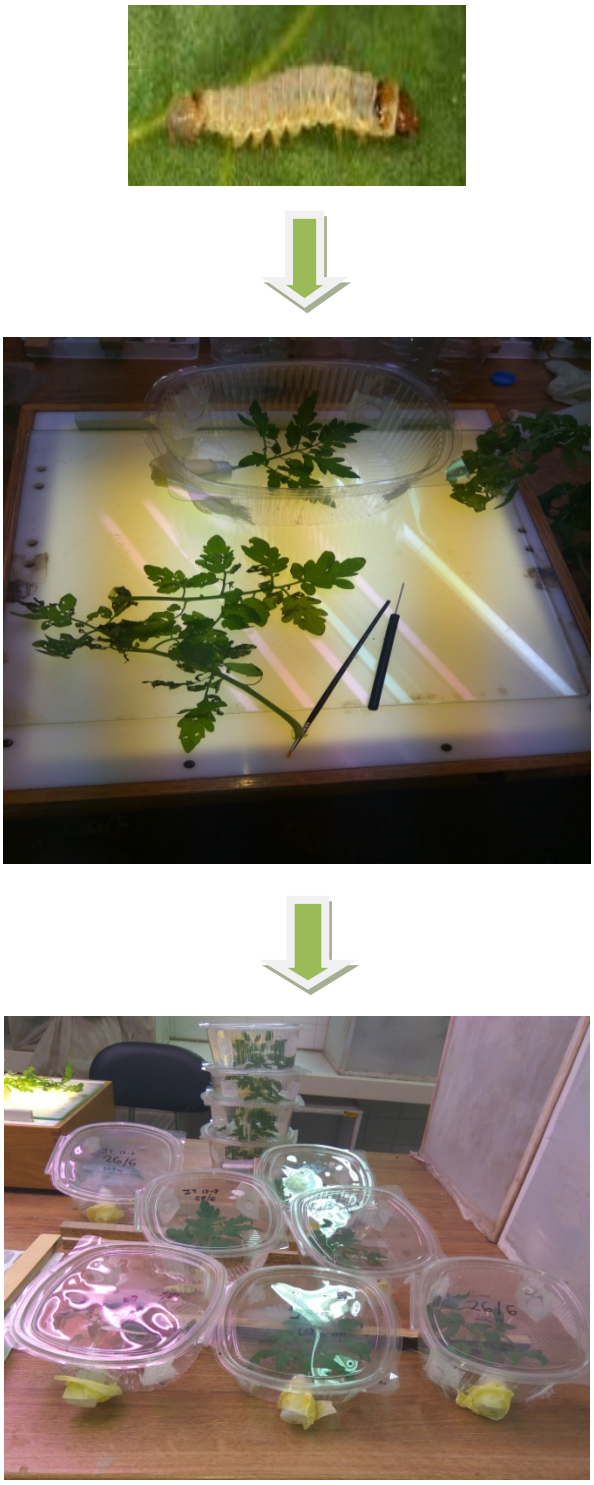
Για την επίτευξη του αρχικού στόχου, την μελέτη της γενετικής της ανθεκτικότητας στο εντομοκτόνο indoxacarb (μελέτη του μηχανισμού ανθεκτικότητας), απαραίτητο κρινόταν να αποκτήσει ο πληθυσμός Ιεράπετρα χαμηλή ετερογένεια ώστε να είναι ομοιόμορφος και να φτάσει στο μέγιστο βαθμό ανθεκτικότητάς του. Για να γίνει αυτό εφικτό, πραγματοποιήθηκε εργαστηριακή επιλογή με την μέθοδο IRAC N° 22 σε προνύμφες L2 σταδίου του πληθυσμού Ιεράπετρα με την δραστική ουσία του indoxacarb.

Στην αρχή της παρούσας ερευνητικής μελέτης ο πληθυσμός Ιεράπετρα δεν

βρισκόταν στο μέγιστο της επιθυμητής ανθεκτικότητας, για τον λόγο αυτό συνεχίστηκε η αύξηση των επιπέδων ανθεκτικότητάς του στο εντομοκτόνο indoxacarb μέσω της μεθοδολογίας της εργαστηριακής επιλογής. Η μεθοδολογία της εργαστηριακής επιλογής στηρίζεται σε αυτή των κλασσικών βιοδοκιμών που προαναφέρθηκε, με τη διαφορά ότι η εμβάπτιση περιλαμβάνει ολόκληρα σύνθετα φύλλα σε προκαθορισμένη συγκέντρωση φαρμάκου indoxacarb. Τα σύνθετα φύλλα τοποθετούνται σε πλαστικό φυαλίδιο με νερό όγκου 20ml για την διατήρηση τους καθ' όλη την διάρκεια της επιλογής. Το φυαλίδιο σφραγίζεται με πάραφιλμ και αφού πραγματοποιηθεί η εμβάπτισή του σε τρυβλίο petri διαστάσεως 14cm, για δέκα δευτερόλεπτα στην προκαθορισμένη συγκέντρωση, τοποθετείται σε απορροφητικό χαρτί, για να στεγνώσουν τα φύλλα για περίπου μία ώρα. Στην συνέχεια, κάθε φυαλίδιο τοποθετείται σε πλαστικό διαφανές δοχείο όπως φαίνεται στην εικόνα 23 και με την βοήθεια της φωτεινής πηγής που χρησιμοποιήθηκε και στην κλασσική βιοδοκιμή, ενός πινέλου και νυστεριού, απομονώνονται προνύμφες δευτέρου σταδίου, οι οποίες τοποθετούνται προσεκτικά πάνω στα φύλλα που είχαν εμβαπτιστεί στο φάρμακο indoxacarb**.** Τα πλαστικά δοχεία τοποθετούνται σε δωμάτιο με ελεγχόμενες-σταθερές συνθήκες (θερμοκρασία 25 ± 0.5 °C και 65 ± 5 % σχετική υγρασία) κάτω από τεχνητό ρυθμιζόμενο φως για τρία 24ωρα μέχρι να γίνει η μέτρηση (Εικ. 23). Μετά από 72 ώρες όσες προνύμφες επιβίωσαν, αφαιρούνται από τα φύλλα και μεταφέρονται με την βοήθεια πλαστικού τρυβλίου, σε ένα καινούργιο ξύλινο κλωβό που περιέχει δύο φυτά, ώστε οι προνύμφες να μεταφερθούν στα φύλλα και να συνεχιστεί η ανάπτυξή τους. Κατά αυτόν τον τρόπο με διαδοχικούς κύκλους επιλογών ο πληθυσμός Ιεράπετρα απέκτησε χαμηλή ετερογένεια ενώ έφτασε στο μέγιστο βαθμό ανθεκτικότητάς του. Τα επίπεδα ανθεκτικότητας μελετήθηκαν μέσω τοξικολογικής βιοδοκιμής που πραγματοποιήθηκε και για τους δυο πληθυσμούς. Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών παρατίθεται στο πίνακα 10. Σε αυτό το σημείο μπορούσε πλέον να μελετηθεί ο μηχανισμός της ανθεκτικότητας του εντόμου *Tuta absoluta* στο εντομοκτόνο indoxacarb.

Πληθυσμός	**LC50**	**LC80**	**x^2 (df)**	**p**
Ιεράπετρα	929,2 (430,6-3017)	6449 (2269-295120	0,03 (2)	0,98
Πελοπόννησος	0,79091 (0,48789-1,1988)	2.6809 (1,7-5)	1,7452490 (3)	0,6269

Πίνακας 10 Αποτελέσματα βιοδοκιμών στο εντομοκτόνο indoxacarb, LC_{50} συγκέντρωση που θανατώνει το 50% του πληθυσμού, LC80 συγκέντρωση που θανατώνει το 80% αντίστοιχα, x^2 και df: x^2 δοκιμής καλής αντιπροσώπευσης από ευθεία και βαθμοί ελευθερίας.



Εικόνα 23 Διαδικασία επιλογής (selection) με το εντομοκτόνο indoxacarb

3.7 Μελέτη της γενετικής βάσης της ανθεκτικότητας

Πριν ξεκινήσει η μελέτη γενετικής της ανθεκτικότητας, μέσω τοξικολογικών βιοδοκιμών με το εντομοκτόνο indoxacarb (Πίνακας 10) διαπιστώθηκε, ότι ο πληθυσμός Ιεράπετρα είχε αποκτήσει χαμηλή ετερογένεια και είχε φτάσει στο επιθυμητό μέγιστο βαθμό ανθεκτικότητάς, ενώ ο πληθυσμός Πελοποννήσου παρέμενε ευαίσθητος στο εντομοκτόνο indoxacarb. Οι δυο πληθυσμοί ήταν την ίδια χρονική στιγμή ομοιόμορφοι ως προς την ευαίσθητη (SS) και ανθεκτική μορφή (RR) αντίστοιχα στο εντομοκτόνο indoxacarb.

Η διαδικασία μελέτης της γενετικής της ανθεκτικότητας μέσω των διασταυρώσεων ξεκίνησε ως εξής: Από κάθε πληθυσμό απομονώθηκαν όλα τα ενήλικα με την βοήθεια του δοχείου αναρροφήσεως. Τα ενήλικα από κάθε πληθυσμό μεταφέρθηκαν σε νέους κλωβούς για ωοθεσία. Οι κλωβοί περιείχαν δύο φυτά ο καθένας, τρυβλία με μέλι και νερό για το τάϊσμα των ενηλίκων. Τα φυτά των ωοθεσιών, μετά το πέρας δυο 24ώρων μεταφέρθηκαν σε νέους καθαρούς κλωβούς και η κάθε ωοθεσία ανανεωνόταν με καινούργια καθαρά φυτά μέλι και νερό. Επίσης κάθε ωοθεσία εμπλουτιζόταν με νέα ενήλικα από τους ομοιογενείς πληθυσμούς. Μετά από χρονικό διάστημα περίπου 3 εβδομάδων από την έναρξη των ωοθεσιών των δυο πληθυσμών, οι προνύμφες των φυτών στους κλωβούς των αρχικών ωοθεσιών, είχαν φτάσει σε στάδιο L4. Τα φυτά που έφεραν προνύμφες L4 σταδίου μετά το πέρας τριών περίπου εβδομάδων εξέρχονταν από τον κλωβό και τα σύνθετα φύλλα με τις προνύμφες μεγάλου σταδίου ανάπτυξης, κοβόταν και τοποθετούνταν σε πλαστικό φυαλίδιο με νερό για την διατήρησή τους. Αν οι προνύμφες στα σύνθετα φύλλα είχαν φάει όλο σχεδόν το φυλλικό ιστό, τότε πριν την δημιουργία του φυαλιδίου, προσθέτονταν στο φυαλίδιο σύνθετα φύλλα από καθαρά φυτά ποικιλίας Valuro μαζί με τα φαγωμένα σύνθετα φύλλα με τις προνύμφες, ώστε να υπάρχει αρκετός φυλλικός ιστός για την θρέψη τους. Η επάνω πλευρά κάθε φυαλιδίου σφραγίζονταν με πάραφιλμ. Στην συνέχεια, σε πλαστικούς στρογγυλούς κεσέδες διαμέτρου 15cm τοποθετούνταν 4 μόνα φύλλα οικιακού χαρτιού (στρογγυλού σχήματος), τα οποία πριν την τοποθέτησή τους, τσαλακωνόντουσαν κατά τέτοιο τρόπο ώστε με την τοποθέτηση τους οι προνύμφες να μπορούσαν να διεισδύσουν ανάμεσα στα φύλλα του οικιακού χαρτιού για να νυμφευθούν. Πάνω από τα φύλλα οικιακού χαρτιού τοποθετούνταν τα φυαλίδια με τα σύνθετα φύλλα. Κάθε κεσές έφερε δυο φυαλίδια στο εσωτερικό του. Η πάνω πλευρά έκλεινε με πυκνό εντομολογικό δίκτυ (πυκνότητα ύφανσης 16x10 νήματα/cm). Η διαδικασία αυτή έγινε ταυτόχρονα και για τους δύο πληθυσμούς ενώ οι κεσέδες κάθε πληθυσμού τοποθετήθηκαν σε ξεχωριστά σημεία μέσα στον θάλαμο όπως φαίνεται στις παρακάτω εικόνες (Εικ. 24).

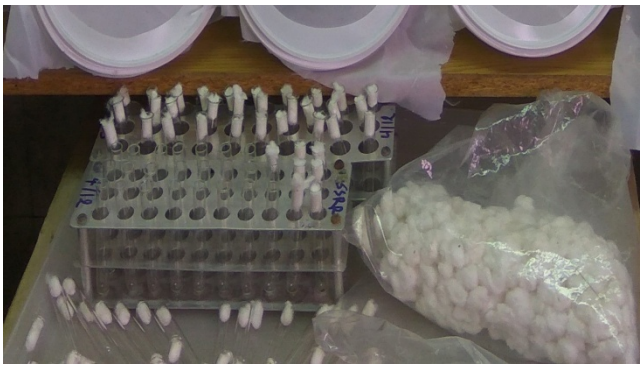
Από την στιγμή της έναρξης δημιουργίας των κεσέδων και για τις επόμενες ημέρες που ακολούθησαν, κάθε κεσές ελεγχόταν για την ύπαρξη νυμφών μέσα στα στρουφιγμένα φύλλα ή πάνω στο βλαστό ή κάτω από τα απορροφητικά φύλλα χαρτιού, ενώ παράλληλα ελεγχόταν και η ύπαρξη φυλλικού ιστού. Σε όσους κεσέδες οι προνύμφες είχαν φάει όλη σχεδόν την φυλλική επιφάνεια το φυαλλίδιο

εμπλουτιζόταν με καθαρά σύνθετα φύλλα. Παράλληλα όσες προνύμφες είχαν νυμφευθεί συλλέγονταν με την βοήθεια ενός πινέλου και με πολύ λεπτούς χειρισμούς, μια προς μία, εισάγονταν σε γυάλινα σωληνάρια (tubes) στα οποία το στόμιο έκλεινε με βαμβάκι (Εικ. 25). Πριν την τοποθέτησή των νυμφών στα σωληνάρια γινόταν η αναγνώριση του φύλου (θηλυκή ή αρσενική νύμφη). Η διαδικασία αυτή ακολουθήθηκε μεμονωμένα και παράλληλα, και για τους δυο πληθυσμούς.

Εικόνα 24 Χρήση πλαστικών κεσέδων που φέρουν 2 φυαλίδια ο καθένας με σύνθετα φύλλα για την πραγματοποίηση της νύμφωσης στο εσωτερικό τους, των πληθυσμού Ιεράπετρας Πελοπόννησου.

Καθημερινά γινόταν έλεγχος κάθε κεσέ για νύμφες με αποτέλεσμα ο αριθμός τους αυξανόταν μέρα με την μέρα και στους δυο πληθυσμούς, ενώ παράλληλα τα ενήλικα άτομα από τις αρχικές νύμφες είχαν κάνει την εμφάνισή τους. Με αυτή τη διαδικασία προέκυπταν παρθένα θηλυκά και από τους δύο πληθυσμούς. Όταν τα

ενήλικα άτομα έκαναν την εμφάνισή τους, γινόταν αναγνώριση φύλου και σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο κάθε ενήλικου εντόμου.



Εικόνα 25 Ενδεικτικά γυάλινα σωληνάρια που φέρουν νύμφες στο εσωτερικό τους, της F1 γενιάς (♀ ευαίσθητα στελέχη x ♂ ανθεκτικά στελέχη)

Μετά το πέρας μίας περίπου εβδομάδας από την συλλογή των πρώτων νυμφών, ξεκίνησαν ωοθεσίες για την πραγματοποίηση διασταυρώσεων διπλής κατευθύνσεως θηλυκών και αρσενικών ενηλίκων, των πληθυσμών Πελοποννήσου Ιεράπετρας με σκοπό τη μελέτη της γενετικής βάσης της ανθεκτικότητας. Οι διασταυρώσεις κάθε κλωβού ήταν οι εξής:

RR ♂ x SS♀
SS ♂ x RR♀

Τα φυτά των ωοθεσιών από τις διασταυρώσεις διπλής κατευθύνσεως (RRSS,SSRR), τοποθετήθηκαν σε καθαρούς κλωβούς. Όταν οι προνύμφες των φυτών αυτών (F1 γενιά), είχαν φτάσει στο L2 αναπτυξιακό στάδιο, πραγματοποιήθηκαν τοξικολογικές βιοδοκιμές. Τα αποτελέσματα των τοξικολογικών βιοδοκιμών παρουσιάζονται στον πίνακα 11.

	LC50	LC80	x^2 (df)	p	b
RRSS	13,2 (7,8-20,8)	74,3 (45,4-143,4)	11,6 (7)	0,11	1,1 ± 0,14
SSRR	4,77 (2,03-8,8)	49,2 (23,7-201,6)	2,7 (3)	0,44	0,83 ± 0,17

Πίνακας 11 Αποτελέσματα ανάλυσης Priprobit σε βιοδοκιμές (72 h) για το εντομοκτόνο indoxacarb σε προνύμφες 2ου σταδίου στους πληθυσμούς *T. absoluta* RRSS, SSRR (F1 γενιά). LC_{50} συγκέντρωση που θανατώνει το 50% του πληθυσμού, LC80 συγκέντρωση που θανατώνει το 80% αντίστοιχα, x^2 και df: x^2 δοκιμής καλής αντιπροσώπευσης από ευθεία και βαθμοί ελευθερίας, b ο συντελεστής παλινδρόμησης..

Μετά το πέρας 3 εβδομάδων, οι προνύμφες των φυτών τις F1 γενιάς είχαν φτάσει σε αναπτυξιακό στάδιο L4. Με τον ίδιο περιγραφέντα τρόπο με τους κεσέδες, συλλέχθηκαν οι νύμφες των πληθυσμών RRSS, SSRR αντίστοιχα και τοποθετήθηκαν ξανά σε γυάλινα σωληνάρια (tubes), αφού είχε προηγηθεί η αναγνώριση του φύλου κάθε νύμφης. Μετά από 7 περίπου ημέρες, βγήκαν τα ενήλικα άτομα και σε δύο

καθαρά κλουβιά αντίστοιχα τοποθετήθηκαν τα θηλυκά μόνο ενήλικα άτομα των πληθυσμών RRSS και SSRR, τα οποία διασταυρώθηκαν με αρσενικά άτομα του αρχικού ανθεκτικού πληθυσμού Ιεράπετρας.

RR♂ x SR♀
RR♂ x RS

Τα φυτά από τις ωοθεσίες των διασταυρώσεων αυτών, τοποθετήθηκαν σε δυο νέα καθαρά κλουβιά. Όταν οι προνύμφες έφτασαν στο L2 αναπτυξιακό στάδιο πραγματοποιήθηκαν τοξικολογικές βιοδοκιμές. Για τις διασταυρώσεις χρησιμοποιήθηκαν περίπου 200 θηλυκά ενήλικα άτομα του πληθυσμού SSRR και 180 του RRSS αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα των τοξικολογικών πληθυσμών παρατίθενται στον πίνακα 12.

	LC50	**LC80**	**x^2 (df)**	**p**	**b**
SRR	25,9 (13,3-47,3)	200,5 (101,8-558,7)	5,17 (7)	0,64	0,95±0,14
RSR	18,95 (8,1-40,2)	326 (135-1312)	6,99 (7)	0,43	0,68±0,11

Πίνακας 12 Αποτελέσματα της ανάλυσης pri-probit σε βιοδοκιμές (72 h) για το εντομοκτόνο indoxacarb σε προνύμφες 2ου σταδίου στους πληθυσμούς *T. absoluta* RSR, SRR. LC_{50} συγκέντρωση που θανατώνει το 50% του πληθυσμού, LC80 συγκέντρωση που θανατώνει το 80% αντίστοιχα, x^2 και df: x^2 δοκιμής καλής αντιπροσώπευσης από ευθεία και βαθμοί ελευθερίας, b ο συντελεστής παλινδρόμησης.

Εικόνα 26 Γυάλινα σωληνάρια (Tubes) τα οποία φέρουν νύμφες στο εσωτερικό τους, σε ορισμένα έχουν κάνει την εμφάνισή τους τα ενήλικα άτομα

Το επόμενο βήμα της παρούσας μελέτης που ακολούθησε ήταν, η μελέτη του κόστους προσαρμοστικότητας του ανθεκτικού πληθυσμού στο εντομοκτόνο indoxacarb. Πριν ξεκινήσει η διερεύνηση του κόστους προσαρμοστικότητας, οι αρχικοί πληθυσμοί (Πελοπόννησος, Ιεράπετρα) χρειάστηκαν κάποιο χρονικό διάστημα για την αύξησή τους σε μέγεθος. Για τον λόγο αυτό οι πληθυσμοί τροφοδοτούνταν με αρκετά καθαρά φυτά 3 φορές την εβδομάδα ή και περισσότερες φορές αν κρινόταν ανάγκη. Ταυτόχρονα συνεχίστηκε η εργαστηριακή επιλογή για τον

πληθυσμό Ιεράπετρας με σκοπό την αποφυγή μείωσης των επιπέδων ανθεκτικότητάς του στην πάροδο του χρόνου.

3.8 Μελέτη του κόστους προσαρμοστικότητας (fitness cost)

Εκτός της μελέτης της γενετικής της ανθεκτικότητας, στο επόμενο στάδιο πραγματοποιήθηκε η μελέτη του κόστους προσαρμοστικότητας. Για την αξιολόγηση του κόστους προσαρμοστικότητας (fitness cost) μεταξύ ευαίσθητου και ανθεκτικού πληθυσμού, πραγματοποιήθηκαν δυο πειράματα:

- **Το πείραμα ανάπτυξης**, στο οποίο υπολογίστηκε η χρονική διάρκεια κάθε σταδίου ανάπτυξης από ένα αριθμό ωών και των δυο πληθυσμών και
- **το πείραμα βιωσιμότητας-γονιμότητας**, στο οποίο υπολογίστηκε η βιωσιμότητα και γονιμότητα των ενηλίκων των δύο πληθυσμών αντίστοιχα.

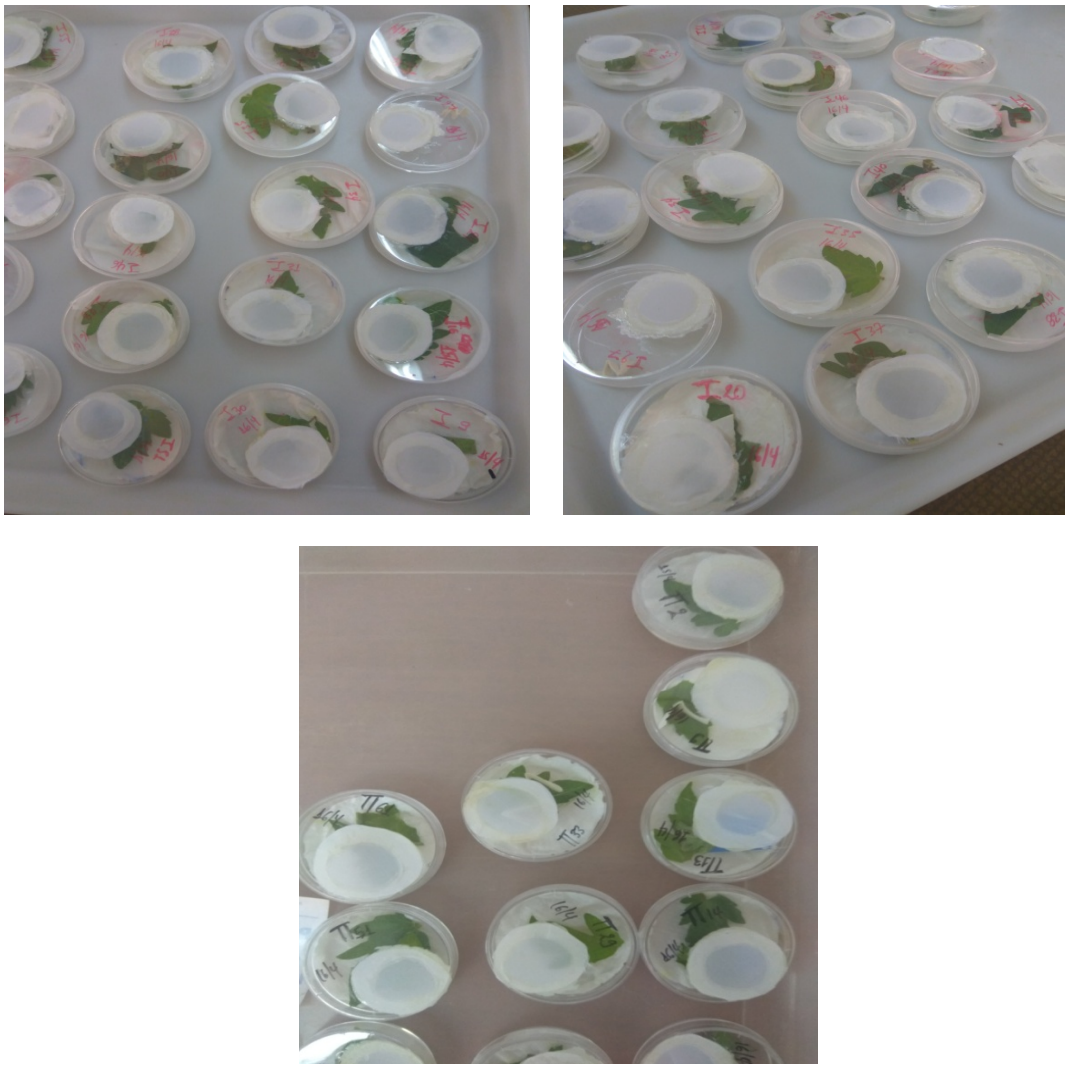
Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω του προγράμματος TWOSEX-MS Chart του Chi υπολογίστηκαν οι παράμετροι, εγγενής ρυθμός αύξησης r (ο ρυθμός αύξησης σε μέγεθος ενός πληθυσμού εάν δεν υπάρχουν πυκνο-εξαρτώμενες δυνάμεις που ρυθμίζουν τον πληθυσμό), ο καθαρός ρυθμός αναπαραγωγής R_o (R_o=μέσος αριθμός θυγατέρων που θα γεννηθούν από ένα θηλυκό ή μια ομάδα θηλυκών αν περάσει τη ζωή σύμφωνα με τα ποσοστά γονιμότητας και θνησιμότητας κάθε ηλικιακού σταδίου για συγκεκριμένο έτος.

3.8.1 Πείραμα ανάπτυξης

Πριν ξεκινήσει η μελέτη του κόστους προσαρμοστικότητας του πληθυσμού Ιεράπετρα, πραγματοποιήθηκαν τοξικολογικές βιοδοκιμές σε προνύμφες L2 σταδίων των πληθυσμών Ιεράπετρας, Πελοποννήσου για να αξιολογηθούν τα επίπεδα ανθεκτικότητας και ευαισθησίας. Από τις τοξικολογικές βιοδοκιμές, διαπιστώθηκε ότι οι προνύμφες L2 σταδίου του ευαίσθητου πληθυσμού σε χαμηλές συγκεντρώσεις εντομοκτόνου θανατώνονταν, ενώ στον ανθεκτικό σε υψηλές συγκεντρώσεις εντομοκτόνου επιζούσαν.

Για την υλοποίηση της μελέτης αυτής, μεταφέρθηκαν την ίδια χρονική στιγμή όλα τα ενήλικα έντομα *T. absoluta* των αρχικών πληθυσμών Ιεράπετρας Πελοποννήσου σε δυο κλωβούς για ωοθεσία. Οι ωοθεσίες διήρκησαν ένα εικοσιτετράωρο. Από τα φυτά των ωοθεσιών, απομονώθηκαν 50 ωά από τον ανθεκτικό στο εντομοκτόνο indoxacarb πληθυσμό και 55 ωά από τον ευαίσθητο πληθυσμό στο εντομοκτόνο indoxacarb. Συγκεκριμένα, από τα φύλλα αυτών των φυτών και με τη χρήση στερεοσκόπιου, πινέλου και νυστεριού, τα οποία

αποστειρώνονταν με καθαρή αιθανόλη πυκνότητας 70%, απομακρύνθηκαν σε κάθε φύλλο τα περιττά ωά ώστε μια μεγάλη φυλλική επιφάνεια να φέρει ένα και μόνο ωό. Έπειτα κάθε φύλλο που έφερε ένα και μόνο ωό τοποθετήθηκε προσεκτικά σε ένα τρυβλίο petri διαστάσεως 5,5cm το οποίο έφερε 4 διπλά φύλλα οικιακού χαρτιού στο εσωτερικό της κάτω επιφάνειάς του, τα οποία είχαν εμποτιστεί με ποσότητα απεσταγμένου νερού από τον αυτόματο δοσομετρητή υγρών. Η πάνω επιφάνεια κάθε τρυβλίου έφερε άνοιγμα (Εικ. 27), το οποίο καλύφθηκε από πυκνό εντομολογικό δίκτυ (πυκνότητα ύφανσης 16x10 νήματα/cm). Τα τρυβλία αριθμήθηκαν και κάθε μέρα γινόταν καταγραφή και έλεγχος του σταδίου ανάπτυξης κάθε ωού των δύο πληθυσμών. Μέρα παρά μέρα ανανεώνονταν τα φύλλα απορροφητικού χαρτιού ενώ κάθε μέρα μαζί με τον έλεγχο του σταδίου ανάπτυξης, γινόταν προσθήκη απεσταγμένου νερού στα φύλλα του οικιακού χαρτιού. Αξίζει να σημειωθεί ότι, καθημερινώς όταν τα ωά είχαν εκκολαφθεί, μαζί με τον έλεγχο των σταδίων ανάπτυξης, γινόταν παράλληλα προσθήκη φυλλικού ιστού ανάλογα τις ανάγκες κάθε προνύμφης. Για να διευκολυνθεί η μεταφορά της προνύμφης από το παλιό φύλλο στο νέο, τα δυο φύλλα ενώνονταν με ένα πλαστικό κομμάτι σε σχήμα ορθογώνιου.



Εικόνα 27 Ενδεικτικά τρυβλία που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη των αναπτυξιακών σταδίων των πληθυσμών Ιεράπετρας, Πελοποννήσου του πειράματος ανάπτυξης

Όταν οι προνύμφες είχαν φτάσει στο στάδιο ανάπτυξης L4, γινόταν τοποθέτηση αναδιπλωμένου χαρτιού μέσα στο εσωτερικό του τρυβλίου για την διευκόλυνση της νύμφευσης. Όταν οι προνύμφες νυμφεύονταν, με την βοήθεια λαβίδας αφαιρούνταν προσεκτικά οι νύμφες από το σημείο νύμφευσής τους και ζυγίζονταν σε ζυγαριά ακριβείας για την καταγραφή του βάρους τους (Εικ. 28). Το βάρος κάθε νύμφης αποτελούσε ένα επιπλέον παράγοντα μελέτης του κόστους προσαρμοστικότητας.

Αμέσως μετά το ζύγισμα, κάθε νύμφη τοποθετήθηκε μέσα σε γυάλινα σωληνάρια (tubes) που έφεραν τον αριθμό του τρυβλίου και γινόταν καταγραφή των ημερών μετάβασής τους στο επόμενο αναπτυξιακό στάδιο, αυτό του ενήλικου σταδίου. Σε αυτό το σημείο γινόταν αναγνώριση του φύλου για κάθε ενήλικο.

Εικόνα 28 Ζυγαριά ακριβείας για το ζύγισμα των νυμφών του πειράματος ανάπτυξης

3.8.2 Πείραμα βιωσιμότητας-γονιμότητας

Η μακροζωία και η γονιμότητα μελετήθηκε σε επόμενο στάδιο ξεχωριστά. Από τους αρχικούς πληθυσμούς Ιεράπετρα, Πελοπόννησο συλλέχθηκαν με την βοήθεια του δοχείου αναρροφήσεως, όλα τα ενήλικα για την δημιουργία επαναλαμβανόμενων ωοθεσιών. Όσες προνύμφες από τα φυτά των επαναλαμβανόμενων ωοθεσιών είχαν φτάσει στο τελευταίο στάδιο ανάπτυξής τους (L4 στάδιο), ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με αυτή των διασταυρώσεων. Για κάθε πληθυσμό, έγινε χρήση κεσέδων για την συλλογή, όπως και στις περιπτώσεις των διασταυρώσεων, των νυμφών κάθε πληθυσμού. Οι νύμφες τοποθετούνταν σε γυάλινα σωληνάρια (tubes) ενώ καθημερινώς γινόταν έλεγχος της εμφάνισης των ενήλικων ατόμων.

Όταν τα ενήλικα άτομα έκαναν την εμφάνισή τους, διαχωρίζονταν με βάση το

φύλο τους με σκοπό την δημιουργία ζευγαριών. Κάθε θηλυκό τοποθετούνταν μαζί με ένα αρσενικό ενήλικο άτομο σε ένα πλαστικό ποτήρι όπως αυτό της εικόνας 29, το οποίο στον πάτο του έφερε κολλημένο πλαστικό φυαλίδιο το οποίο έφερε σύνθετα φύλλα (3 φύλλα). Τα πλαστικά ποτήρια είχαν στην κάτω επιφάνειά τους άνοιγμα από το οποίο διερχόταν φίλτρο. Κάθε ποτήρι έμπαινε μέσα σε ένα δεύτερο ποτήρι το οποίο έφερε ζαχαρόνερο 70% συγκέντρωσης. Μέσω του φίλτρου τα ενήλικα έντομα *T.absoluta* τρέφονταν. Αξίζει να σημειωθεί πως το ζαχαρόνερο ανανεωνόταν καθημερινά. Το πλαστικό ποτήρι έκλεινε στην πάνω επιφάνειά του με τρυβλίο petri, το οποίο έφερε ένα μικρό άνοιγμα το οποίο βοηθούσε την μεταφορά του ενήλικου από το tube στο εσωτερικό του ποτηριού και από ένα πολύ μεγαλύτερο άνοιγμα για να μπαίνει αέρας στο εσωτερικό του, το οποίο καλυπτόταν από λεπτό εντομολογικό δίκτυ.

Κάθε θηλυκό και αρσενικό ενήλικο που αποτελούσε ένα ζευγάρι, τοποθετούνταν σε ένα πλαστικό ποτήρι στο οποίο αναγραφόταν ο πληθυσμός και το νούμερο του ζευγαριού. Συνολικά 27 και 36 ήταν τα ζευγάρια στα οποία μελετήθηκε η βιωσιμότητα θηλυκών και αρσενικών ενηλίκων των πληθυσμών Πελοποννήσου (Εικ. 30) και Ιεράπετρας (Εικ.31) αντίστοιχα.

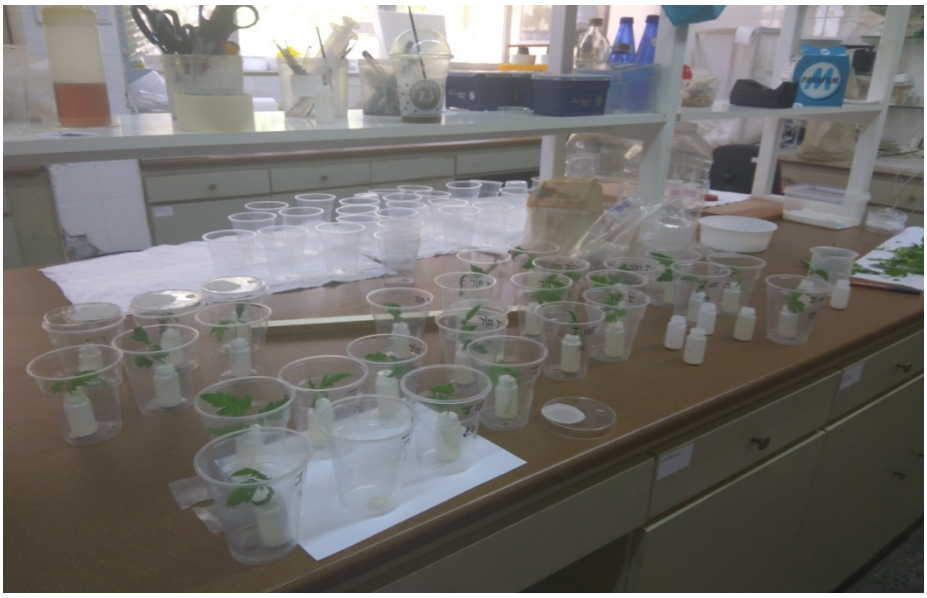
Καθημερινά γινόταν η μεταφορά των ενηλίκων κάθε ζευγαριού σε νέο πλαστικό ποτήρι που έφερε φυαλίδιο με καθαρά σύνθετα φύλλα (Εικ. 32), ενώ στα παλιά με την βοήθεια στερεοσκοπίου γινόταν η μέτρηση των ωών που είχαν εναποθέσει τα θηλυκά ενήλικα των ζευγαριών στα φύλλα και βλαστό. Η εναπόθεση ωών δεν λάμβανε θέση μόνο στην επιφάνεια των φύλλων και βλαστών αλλά και στην εσωτερική επιφάνεια των ποτηριών, στα οποία γινόταν έλεγχος.

Η μεταφορά λάμβανε μέρος σε ξύλινο κλωβό. Στην περίπτωση, κατά την μεταφορά ξέφευγε κάποιο ενήλικο, με την βοήθεια σωλήνα αναρροφήσεως τοποθετούνταν ξανά στο εσωτερικό του ποτηριού.

Εικόνα 29 Προετοιμασία φυαλιδίων για το πείραμα βιωσιμότητας-γονιμότητας

Εικόνα 30 Πλαστικά ποτήρια που το καθένα φέρει στο εσωτερικό του ένα ζευγάρι ενηλίκων από τον πληθυσμό Πελοποννήσου

Εικόνα 31 Πλαστικά ποτήρια που το καθένα φέρει στο εσωτερικό του ένα ζευγάρι ενηλίκων από τον πληθυσμό της Ιεράπετρας



Εικόνα 32 Προετοιμασία πλαστικών ποτηριών που φέρουν στο εσωτερικό τους φυαλίδιο, για την μεταφορά των ζευγαριών σε αυτά

Εκτός από τη καθημερινή καταγραφή του αριθμού των ωών που εναπόθεταν τα θηλυκά ενήλικα, παράλληλα γινόταν έλεγχος της βιωσιμότητάς θηλυκών και αρσενικών ενηλίκων. Σε περίπτωση που κάποιο από τα αρσενικά ενήλικα πέθαινε, αμέσως γινόταν αντικατάστασή του από νέο αρσενικό και συνεχιζόταν η καταμέτρηση της βιωσιμότητας του θηλυκού ενηλίκου και η καταμέτρηση του αριθμού των ωών που ωοαπόθετε. Στην περίπτωση που κάποιο από τα θηλυκά ενήλικα πέθαινε τότε και εκεί γινόταν αντικατάσταση και πλέον μόνο η βιωσιμότητα του αρσενικού ήταν αυτό που απέμενε για να καταγραφεί.

3.8.3 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Τα δεδομένα των πειραμάτων μελέτης του κόστους προσαρμοστικότητας των

πληθυσμών για το έντομο *T. absoluta* στο εντομοκτόνο indoxacarb, αναλύθηκαν μέσω του προγράμματος TWOSEX-MSChart του Chi. Με την προσθήκη των αποτελεσμάτων από τα πειράματα κάθε πληθυσμού ξεχωριστά στο πρόγραμμα TWOSEX-MSChart, υπολογίστηκαν οι αναπαραγωγικές παράμετροι [καθαρός ρυθμός αναπαραγωγής (R_o), μέση διάρκεια μίας γενιάς (T), ο εγγενής ρυθμός αύξησης (r)]. Οι παράμετροι υπολογίστηκαν σε 10.000 επαναλήψεις δείγματος (10.000 bootstrap samples). Τα αποτελέσματα κάθε παραμέτρου σε 10.000 επαναλήψεις δείγματος κάθε πληθυσμού, συγκρίθηκαν μεταξύ τους μέσω τεστ του προγράμματος TWOSEX-MSChart (paired bootstrap test). Για την μελέτη στατιστικών διαφορών ανάμεσα στους πληθυσμούς του *T. absoluta, έγινε χρήση του* προγράμματος IBM SPSS Statistics. Οι παράμετροι που συγκρίθηκαν μέσω του προγράμματος SPSS Statistics ήταν:

- *Ο συνολικός χρόνος ανάπτυξης (total developmental time),*
- *Η χρονική διάρκεια (σε ημέρες) κάθε αναπτυξιακού σταδίου,*
- *Το βάρος (mg) θηλυκών ♀ και αρσενικών ♂ νυμφών*
- *Οι ημέρες ωοτοκίας των θηλυκών ♀ και αρσενικών ♂ ενηλίκων*
- *Η μακροζωία θηλυκών ♀ και αρσενικών ♂ ενηλίκων αντίστοιχα.*

Για τον υπολογισμό των τιμών του LC50 και των άλλων παραμέτρων των τοξικολογικών βιοδοκιμών του πειράματος μελέτης της γενετικής της ανθεκτικότητας, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Priprobit. Τα δεδομένα θνησιμότητας από τις δόσεις απόκρισης των βιοδοκιμών υποβλήθηκαν σε ανάλυση probit, χρησιμοποιώντας το λογισμικό PriProbit 3.4 (Sakuma, 1998). Με την βοήθεια αυτού του λογισμικού παρέχεται η δυνατότητα προσδιορισμού της καμπύλης απόκρισης θνησιμότητας-συγκέντρωσης και αν η καμπύλη αυτή αντιστοιχεί σε ευθεία γραμμή. Ταυτόχρονα το λογισμικό παρέχει πληροφορίες για την κλίση της ευθείας (slope), των θανατηφόρων συγκεντρώσεων (lethal concentrations, LC), του συντελεστή ανθεκτικότητας RR (Resistance Ratio) και των ορίων εμπιστοσύνης (Fiducial limits, FL 95%). Οι αποκρίσεις θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά διαφορετικές όταν το διάστημα εμπιστοσύνης 95% της σχετικής αναλογίας ισχύος δεν περιλάμβανε την τιμή 1.

4 Αποτελέσματα

4.1 Αποτελέσματα του πειράματος Ανάπτυξης, βιωσιμότητας και γονιμότητας

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων Ανάπτυξης, Βιωσιμότητας και Γονιμότητας των δύο πληθυσμών, υπολογίστηκε η διάρκεια (σε ημέρες) κάθε σταδίου ανάπτυξης των δύο πληθυσμών. Τα αποτελέσματα της σύγκρισής τους μέσω του προγράμματος SPSS με επίπεδο σημαντικότητας $p<0,05$, παρατίθενται στον πίνακα 13. Από την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, παρατηρείται μία διαφοροποίηση των σταδίων ωού, L1 και L4 μεταξύ των δύο πληθυσμών. Συγκεκριμένα, στον πληθυσμό Ιεράπετρα η χρονική διάρκεια των σταδίων L1, L4 είναι μεγαλύτερη από αυτή του πληθυσμού Πελοποννήσου, ενώ τα θηλυκά του ευαίσθητου στελέχους γεννούν περισσότερα ωά.

Πληθυσμοί	**Ωό**	**L1 Στάδιο**	**L2 Στάδιο**	**L3 Στάδιο**	**L4 Στάδιο**	**Νύμφη**
Πελοπόννησος	4,93 ± 0,035	1,12 ± 0,04	2,26 ± 0,13	4,27 ± 0,15	6,07 ± 0,18	8,65 ± 0,15
Ιεράπετρα	4,72 ± 0,06	1,48 ± 0,075	2,51 ± 0,19	4,23 ± 0,13	6,56 ± 0,16	8,87 ± 0,22
Στατιστικά αποτελέσματα	F=41,7 p=0,005	F=63,65 p=0	F=0,789 p=0,266	F=1,295 p=0,849	F=3,76 p=0,056	F=0,457 p=0,383

Πίνακας 13 Μέσα (±SE) σε ημέρες της διάρκειας των σταδίων ωού, L1 , L2, L3, L4 και νύμφης του *T. absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) για τους πληθυσμούς Ιεράπετρα και Πελοπόννησο (χρήση του SPSS προγράμματος, $p < 0,05$).

Στην συνέχεια, στον πίνακα 14 συγκρίθηκαν τα παρατηρηθέντα βάρη (mg) των θηλυκών νυμφών των πληθυσμών Ιεράπετρας, Πελοποννήσου ($p<0,05$) και των αρσενικών νυμφών αντίστοιχα. Τα στατιστικά αποτελέσματα, το βάρος των θηλυκών νυμφών εμφανίζει διαφοροποίηση μεταξύ των δύο πληθυσμών. Συγκεκριμένα το βάρος των θηλυκών νυμφών του ευαίσθητου στελέχους στο εντομοκτόνο indoxacarb είναι μεγαλύτερο συγκριτικά με του ανθεκτικού στελέχους.

Πληθυσμοί	**Βάρος (mgr) θηλυκής νύμφης**	**Βάρος (mgr) αρσενικής νύμφης**
Πελοπόννησος	4,3 ± 0,19	3,3 ± 0,1
Ιεράπετρα	3,6 ± 0,18	3,6 ± 0,32
Στατιστικά αποτελέσματα	F=0,286 p=0,01	F=5,817 p=0,226

Πίνακας 14 Μέσο βάρος (±SE) αρσενικών και θηλυκών νυμφών. N=14, N=20 ο αριθμός των θηλυκών και αρσενικών νυμφών αντίστοιχα, στον πληθυσμό Πελοποννήσου. N=13 θηλυκές νύμφες

και N=9 αρσενικές νύμφες αντίστοιχα στον πληθυσμό Ιεράπετρας. Επεξεργασία των στατιστικών αποτελεσμάτων στο SPSS (p<0,05).

Οι μέρες ωοτοκίας, ο συνολικός αριθμός των ωών που εναπόθεσε κάθε θηλυκό ανά ζευγάρι, οι ημέρες βιωσιμότητας θηλυκών και αρσενικών ενηλίκων και ο συνολικός χρόνος ανάπτυξης των ενηλίκων ήταν κάποια από τα χαρακτηριστικά μελέτης και σύγκρισης μεταξύ των δύο πληθυσμών ξεχωριστά για το καθένα. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 15, με επίπεδο σημαντικότητας p<0.05 παρατηρήθηκε διαφορά ως προς την μακροζωία των αρσενικών ενηλίκων μεταξύ των δυο πληθυσμών. Αξίζει να σημειωθεί ότι και στους δυο πληθυσμούς το ποσοστό εκκόλαψης των ωών ήταν 100%.

Πληθυσμοί	**Μέρες ωοτοκίας**	**Ωά ανά θηλυκό**	**Μακροζωία ♀**	**Μακροζωία ♂**	**Συνολικός χρόνος ανάπτυξης**
Πελοπόννησος	13,6 ± 1,45	176 ± 65,2	27 ± 10,5	37,75 ± 1,66	10,52 ± 2,19
Ιεράπετρα	14,14 ± 1,16	137 ± 4,6	25 ± 11,7	28 ± 3,27	10,77 ± 2,24
Στατιστικά αποτελέσματα	F=1,249 p=0,79	F=17,8 p=0,040	F=0,843 p = 0,638	F=0,959 p=0,006	F=0,111 p=0,083

Πίνακας 15 Μέσα (±SE) των ημερών ωοτοκίας κάθε θηλυκού, αριθμού των ωών ανά θηλυκό σε κάθε ζευγάρι, της μακροζωίας θηλυκών και αρσενικών αντίστοιχα για κάθε πληθυσμό και του συνολικού χρόνου ανάπτυξης (SPSS στατιστική ανάλυση, p < 0,05)

Επίσης στο πείραμα ανάπτυξης υπολογίστηκαν τα ποσοστά θνησιμότητας για κάθε στάδιο ανάπτυξης των δύο πληθυσμών και προσδιορίστηκε το συνολικό ποσοστό θνησιμότητας κατά την διάρκεια των σταδίων ανάπτυξης ωό, προνύμφη (L1, L2, L3, L4 σταδίων), νύμφη. Τα αποτελέσματα από τους υπολογισμούς των ποσοστών θνησιμότητας σε κάθε στάδιο για κάθε πληθυσμό παρουσιάζονται στον πίνακα 16. Το συνολικό ποσοστό θνησιμότητας των ανθεκτικών στελεχών του πληθυσμού Ιεράπετρας ήταν αρκετά υψηλό (67.9 %) όπως υψηλό, ήταν και των ευαίσθητων στελεχών στο εντομοκτόνο indoxacarb (49.55 %). Συγκριτικά, το συνολικό ποσοστό θνησιμότητας των στελεχών του ανθεκτικού πληθυσμού ήταν αρκετά πιο υψηλό από αυτό των ευαίσθητων στελεχών.

	Ποσοστά θνησιμότητας (%)						
Πληθυσμοί	**Ωό**	**L1**	**L2**	**L3**	**L4**	**νύμφη**	**Σύνολο Π.Θ**
Ιεράπετρας	0	10	8.9	4.8	12.8	31.4	**67.9**
Πελοπόννησος	0	6	4.25	4.4	9.3	25.6	**49.55**

Πίνακας 16 Το ποσοστό θνησιμότητας (%) του εντόμου *T. absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae), σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο (N=50 Ιεράπετρας, N=55 Πελοπόννησου αρχικός αριθμός ωών)

Τέλος, τα δεδομένα του ιστορικού ζωής για το *T. absoluta* αναλύθηκαν βάσει του ηλικιακού σταδίου, των δύο φύλων σύμφωνα με τους Chi & Liu (1985) και Chi (1988). Με την χρήση του προγράμματος TWOSEX MS Chart σε κάθε πληθυσμό και στην συνέχεια με την εφαρμογή "paired bootstrap test", για κάθε παράμετρο ξεχωριστά διερευνήθηκε η ύπαρξη στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των παραμέτρων. Από την σύγκριση των παραμέτρων των δύο πληθυσμών, όπως

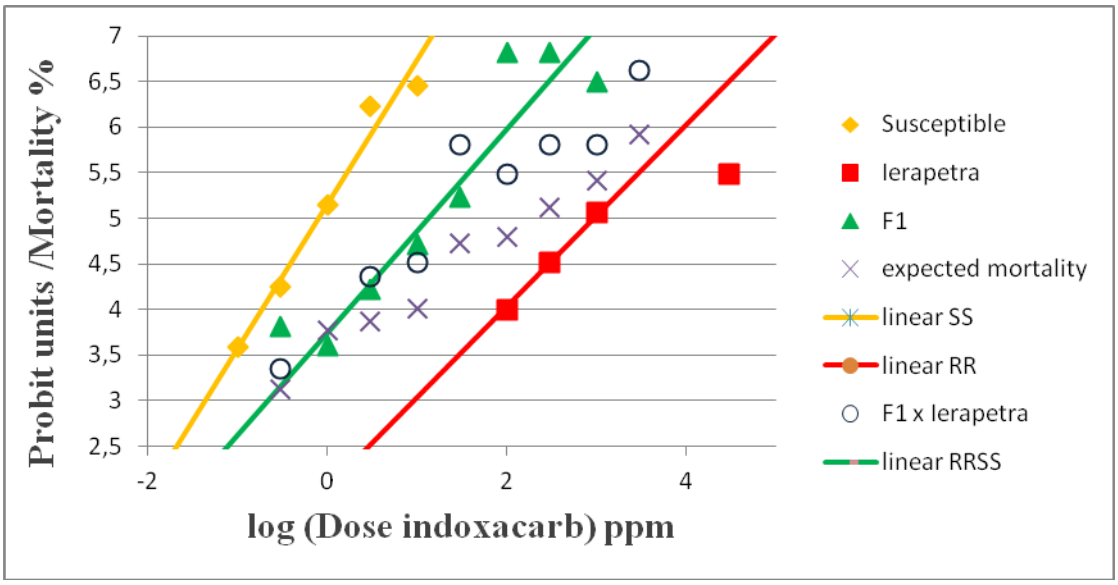
φαίνεται στον πίνακα 17, ο μέσος χρόνος παραγωγής και η μακροζωία διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των δοκιμών (10,000 επαναλήψεις) στους δύο πληθυσμούς.

Πληθυσμοί	r	R_o	T	GRR	Longevity
Πελοπόν.	0,125 ± 0,0089	44,8 ± 11,2	30,5 ± 0,43	73,04 ± 16,6	44,4 ± 2,97
Ιεράπετρα	0,11 ± 0,0078	38,4 ± 8,82	33,3 ± 0,66	86,06 ± 15,2	34,16 ± 2,92
Στατιστικά αποτελέσματα	p=0,2029	p= 0,6397	p=0,001	p=0,5762	p=0,0165

Πίνακας 17 Μέσα (±SE) του καθαρού ρυθμού αναπαραγωγής (R_o), του μέσου χρόνου παραγωγής (T), του εγγενούς ρυθμού αύξησης (r), του ακαθάριστου ρυθμού αναπαραγωγής (GRR), της μακροζωίας του εντόμου *T. absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) μεταξύ των δύο πληθυσμών. Υπολογίστηκαν από δείγματα εκκίνησης (10,000 αντίγραφα)

4.2 Αποτελέσματα του πειράματος μελέτης της γενετικής της ανθεκτικότητας

Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων των τοξικολογικών βιοδοκιμών από τις διασταυρώσεις που πραγματοποιήθηκαν κατά την διάρκεια του πειράματος μελέτης της γενετικής βάσης της ανθεκτικότητας, υπολογίστηκε η αναμενόμενη θνησιμότητα και κατασκευάστηκε το διάγραμμα συγκέντρωσης-θνησιμότητας της εικόνας 31. **Αναμενόμενη θνησιμότητα (%) [c]= 0.5(% θνησιμότητα F1 [c]+% θνησιμότητα αρχικού γονικού ανθεκτικού στελέχους [c])**, c αναφέρεται στην αντίστοιχη συγκέντρωση του εντομοκτόνου indoxacarb.



Εικόνα 33 Διάγραμμα συγκέντρωσης-θνησιμότητας στο εντομοκτόνο indoxacarb σε προνύμφες δευτέρου σταδίου (L2) του *T. absoluta* για τα στελέχη του ευαίσθητου (SS), του ανθεκτικού πληθυσμού (RR), του ετεροζύγωτη F1 γενιάς (♀RR x ♂SS) και των στελεχών που προέκυψαν από την διασταύρωση F1♀ x Ιεράπετρα ♂.

Επίσης από τον προσδιορισμό της τιμής x^2, κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων (x^2 =163,6465047) και του βαθμού ελευθερίας D.f (D.f=8) της F1 γενιάς διερευνήθηκε για p=0.05 ο μηχανισμός της ανθεκτικότητας στο εντομοκτόνο indoxacarb. Συγκεκριμένα από τις τιμές των x^2, D.f προσδιορίστηκε ο αριθμός των γονιδίων που ευθύνονται για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας και διαπιστώθηκε ότι η ανθεκτικότητα δεν οφείλεται σε ένα μόνο γονίδιο για τα στελέχη του πληθυσμού Ιεράπετρας, αυτό επιβεβαιώνεται και από την παρατηρούμενη θνησιμότητα της F2 γενιάς (Πίν. 12).

Επίσης από τον υπολογισμό του βαθμού κυριαρχίας από τον τύπο **D=(2X2-X1-X3)/(X1-X3)** (Stone, 1968), όπου X1, X2, X3 οι τιμές log(LC50) των πληθυσμών Ιεράπετρα (RR), Πελοποννήσου (SS) και των στελεχών της F1 γενιάς (RRSS) που προέκυψαν από την διασταύρωση των δύο προαναφερθέντων αντίστοιχα, η τιμή του είναι **D=-0.203613043,** συμπεραίνοντας ότι εμφανίζεται **ενδιάμεση υποτέλεια (incomplete recessive)**.

Μπορούμε να αναγνωρίσουμε δύο ξεχωριστά συστατικά περιβαλλοντικής μεταβλητότητας: τις συνθήκες που βίωσαν προγεννητικά τα άτομα *T.absoluta* στη μητέρα ("maternal effects", Falconer 1981) και τις συνθήκες που βίωσαν τα άτομα μετά τη γέννηση. Συγκρίνοντας τις τιμές LC50 (Πίνακας 11) από τις τοξικολογικές βιοδοκιμές των πληθυσμών της F1 γενιάς που προέκυψαν από τις διασταυρώσεις διπλής κατευθύνσεως θηλυκών και αρσενικών ενηλίκων των πληθυσμών Πελοποννήσου και Ιεράπετρας, παρατηρείται αλληλοεπικάλυψη στα όρια των τιμών τους. Η αλληλοεπικάλυψη φανερώνει ότι στον φαινότυπο του *T.absoluta* και **οι δυο γονείς συνεισφέρουν εξίσου και δεν βασίζεται ο φαινότυπος στο γονότυπο της μητέρας αλλά στο δικό του (no maternal effect).**

5 Συζήτηση

Η ικανότητα του εντόμου *T. absoluta* να αναπτύσσει μηχανισμούς ανθεκτικότητας σε υψηλές συγκεντρώσεις στο εντομοκτόνο indoxacarb, αποδεικνύεται καθοριστική για την επιβίωσή του, ενώ για τις καλλιέργειες τομάτας τα αποτελέσματα είναι καταστροφικά. Για αυτό το λόγο, η μελέτη των μηχανισμών ανθεκτικότητας στο εντομοκτόνο indoxacarb κρίνεται αναγκαία για την διαλεύκανσή τους.

Από την μελέτη της γενετικής της ανθεκτικότητας διαπιστώθηκε ότι δεν ευθύνεται ένα και μόνο γονίδιο στην ανάπτυξή της, ενώ δεν εμφανίζεται κυριαρχία αλλά ενδιάμεση υποτέλεια (incomplete recessive). Ταυτόχρονα οι δυο γονείς συνεισφέρουν εξίσου και δεν βασίζεται ο φαινότυπος στο γονότυπο της μητέρας αλλά στο δικό του.

Επίσης μέσα από την επεξεργασία και τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων των πειραμάτων ανάπτυξης, βιωσιμότητας και γονιμότητας δεν παρατηρήθηκε κόστος προσαρμοστικότητας του ανθεκτικού πληθυσμού Ιεράπετρας στο εντομοκτόνο indoxacarb συγκριτικά με τον ευαίσθητο πληθυσμό Πελοποννήσου. Ίσως το υψηλό, μη αναμενόμενο ποσοστό θνησιμότητας των στελεχών του

πληθυσμού Ιεράπετρας (πίνακας 17) κατά τα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου *T. absoluta* (ωό, L1, L2, L3, L4, νύμφης) έπαιξε καθοριστικό ρόλο στην μη παρατήρηση του κόστους προσαρμοστικότητας. Στην πράξη το ανθεκτικό στέλεχος φαίνεται να επανέρχεται αργά, στην ευαίσθητη μορφή του (reverse resistance), σε αυτό συμβάλλει η έλλειψη σταθερότητας της ανθεκτικότητας του πληθυσμού Ιεράπετρας. Το αυξημένο ποσοστό θνησιμότητας κατά τα αναπτυξιακά στάδια του *T. absoluta* στα στελέχη του πληθυσμού Ιεράπετρα, μπορεί να θεωρηθεί ως σοβαρή επιβλαβής πλειοτροπική επίδραση που συντελεί στην έλλειψη σταθερότητας. Άλλα χαρακτηριστικά που να συντελούν στην αστάθεια του ανθεκτικού στελέχους δεν βρέθηκαν στην παρούσα μελέτη, σε αυτό μπορεί να οφείλεται το υψηλό μη αναμενόμενο ποσοστό θνησιμότητας. Ίσως η επανάληψη του πειράματος με αρχικό μέγεθος ατόμων μεγαλύτερο από αυτό που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη (N=50 αριθμός ατόμων πληθυσμού Ιεράπετρας και N=55 ο αριθμός ατόμων του πληθυσμού από την Πελοπόννησο) και για τους δύο πληθυσμούς να φανέρωνε την διαφοροποίηση του ανθεκτικού στελέχους.

Τα χαρακτηριστικά που διαφοροποιήθηκαν μεταξύ των δύο πληθυσμών, δεν φανέρωσαν την ύπαρξη κόστους προσαρμοστικότητας του ανθεκτικού πληθυσμού. Στα χαρακτηριστικά αυτά, ανήκει η μικρότερη βιωσιμότητα των αρσενικών ενηλίκων του πληθυσμού Ιεράπετρας συγκριτικά με αυτή της Πελοποννήσου, η τιμή του μέσου χρόνου παραγωγής η οποία στον πληθυσμό Ιεράπετρα είναι μικρότερη συγκριτικά με αυτή της Πελοποννήσου και η μακροβιότητα του κύκλου ζωής σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια διαφέρει στατιστικά σημαντικά. Συγκεκριμένα, τα ανθεκτικά στελέχη στο εντομοκτόνο indoxacarb είχαν μικρότερη μακροβιότητα από τα ευαίσθητα στελέχη. Επίσης τα θηλυκά ενήλικα του ευαίσθητου στο εντομοκτόνο indoxacarb γεννούν μεγαλύτερο αριθμό ωών από τα θηλυκά ενήλικα του ανθεκτικού στελέχους. Επίσης, παρατηρήθηκε διαφορά στην διάρκεια σε ημέρες συγκεκριμένων αναπτυξιακών σταδίων, αλλά με τον υπολογισμό του συνολικού χρόνου ανάπτυξης αποδείχθηκε ότι δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στον συνολικό χρόνο ανάπτυξης μεταξύ των πληθυσμών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων, δεν αποδείχθηκε ότι η πίεση που ασκήθηκε στον πληθυσμό Ιεράπετρα από τις υψηλές συγκεντρώσεις εντομοκτόνου, επηρέασε την πορεία ανάπτυξής του για να μπορεί να επιβιώσει σε αυτές τις υπό πίεση συνθήκες.

Για τον επιτυχή έλεγχο και τη σωστή αντιμετώπιση του φυλλορήκτη της τομάτας *T. absoluta* επιβάλλεται η λήψη προληπτικών μέτρων προστασίας της καλλιέργειας. Η παρακολούθηση της καλλιέργειας ανά τακτά χρονικά διαστήματα δίδει το πλεονέκτημα μελέτης των επιπέδων, του πληθυσμού *T. absoluta* και την εφαρμογή των αρχών ολοκληρωμένης διαχείρισης που απαιτεί ο πληθυσμός την δεδομένη χρονική στιγμή. Η έγκαιρη και ορθή αναγνώριση του εχθρού, μέσω δειγματοληψιών και αναγνώρισης των προσβολών στα φύλλα στα αρχικά στάδια ανάπτυξής του εντόμου *T. absoluta*, επιτρέπει τον επιτυχή έλεγχο του πληθυσμού χωρίς ή την ελάχιστη χρήση εντομοκτόνου. Αν η χρήση των προληπτικών και των προστατευτικών μέτρων δεν αποβεί ικανή για την αντιμετώπιση και τον έλεγχο του εχθρού τότε ακολουθεί η χρήση εντομοκτόνου. Για την αποφυγή ανάπτυξης ανθεκτικότητας κρίνεται απαραίτητη η συνετή χρήση φυτοπροστατευτικών

σκευασμάτων. Συγκεκριμένα, το πλήθος εφαρμογών εντομοκτόνου σε κάθε καλλιεργητική περίοδο δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το αναγραφόμενο αυτό της ετικέτας του εκάστοτε σκευάσματος, η αποφυγή υποδοσολόγησης και υπερδοσολόγησης και της εναλλαγής εντομοκτόνων με ενδείξεις ότι παρουσιάζουν μεταξύ τους διασταυρωτή ανθεκτικότητα. Ο έλεγχος αποτελεσματικότητας του εντομοκτόνου μετά την χρήση, η χρήση εναλλακτικών εντομοκτόνων που είναι εγκεκριμένα για το έντομο *T. absoluta* συμβάλλουν στην πρόληψη εμφάνισης ανθεκτικότητας. Για την πρόληψη η εφαρμογή της στρατηγικής "window approach" του IRAC κρίνεται αναγκαία. Η στρατηγική στηρίζεται στην ορθολογική εναλλαγή ομάδων δράσης (Mode of action), αφήνοντας διάστημα τουλάχιστον 60 ημερών μεταξύ εφαρμογών από την ίδια ομάδα δράσης (Ροδιτάκης κ.ά., 2015).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βόντας Γ., Ροδιτάκης Ε. και Τσαγκαράκου Α. 2007. Η μοριακή βάση της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα: παραδείγματα εντόμων και ακάρεων ελληνικού γεωπονικού ενδιαφέροντος. Γεωτεχνικά Επιστημονικά Θέματα 18(1): 60-68.

Καπετανάκης Ε. 2003. Μέθοδοι αντιμετώπισης φυτοπαράσιτων. Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Κρήτης, 13-61

Ολυμπίου Χ.,2001, Η Τεχνική της Καλλιέργειας των Κηπευτικών στα Θερμοκήπια, Αθήνα, Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, σελ.39-44,52-54,56.

Ολυμπίου Χ., 2015. Η Τεχνική της Καλλιέργειας των Υπαίθριων Κηπευτικών, Αθήνα, Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, σελ. 122

Ροδιτάκης Ε., Βασάκης Ε., Γρίσπου Μ., Σταυρακάκη Μ., Bassi A., Αγγελετάκης Α., Καζαντίδου Α., Nauen R. και Αχείμαστου Κ., 2015. Η αντιμετώπιση του *Tuta absoluta* και ο κίνδυνος ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα διαμίδια. Γεωργία – Κτηνοτροφία, τεύχος 2 σελ. 60–63.

Ροδιτάκης Ε, Βασάκης Ε, Σταυρακάκη Μ και Σίμογλου Κ., 2017. Νεότερα δεδομένα στην αντιμετώπιση του *Tuta absoluta*. Γεωργία – Κτηνοτροφία 2, 46–52.

Τζανακάκης Μ.Ε. 1995. Εντομολογία, 203-242.

Arno´ J, Gabarra R (2011) Side effects of selected insecticides on the Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae) predators Macrolophus pygmaeus and Nesidiocoris tenuis (Hemiptera: Miridae). J Pest Sci 84:513–520

Bahamondes LA, Mallea AR (1969) Biologı´a en Mendoza de Scrobipalpula absoluta (Meyrick) Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae), especie nueva para la Repu´blica Argentina. Rev Fac Cs Agrarias 15:96–104

Bajonero J. G., Parra J. R. P., (2017) Selection and Suitability of an Artificial Diet for Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae) Based on Physical and Chemical Characteristics, Journal of Insect Science, 17(1): 13; 1–8, doi: 10.1093/jisesa/iew105

Barrientos ZR, Apablaza HJ, Norero SA, Estay PP 1998. Temperatura base y constante termica de desarrollo de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). Ciencia e Investigacion Agraria 25:133–137

Bergougnoux, V. (2014). The history of tomato: from domestication to biopharming.

Biotechnol. Adv. 32, 170–189. doi: 10.1016/ j.biotechadv.2013.11.003

Brown, T.M. 1990. Biochemical and genetic mechanisms of insecticide resistance. In: Managing Resistance to Agrochemicals (Eds. M.B. Green, H.M. Le Baron and W.K. Moberg). American Chemical Society, Washington DC, Amc Chem Soc Symp Series., 421: 61-76.

Biondi A., Guedes R., Wan F., 2018. Ecology, worldwide spread, and management of the invasive South American tomato pinworm, Tuta absoluta: past, present, and future. *Annual review of entomology*, *63*, 239-258.

Cáceres, S. 1992. La polilla del tomate en Corrientes. Biología y control. Estación Experimental Agropecuaria Bella Vista, INTA, 19p

Catterall, W.A. (2012) Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. Journal of Physiology, 590, 2577–2589.

Chi H (1988) Life-table analysis incorporating both sexes and variable development rate among individuals. Environ Entomol 17:26–34

Chi H, Liu H (1985) Two new methods for the study of insect population ecology. Bull Inst Zool Academia Sinica 24:225–240

Cifuentes D, Chynoweth R & Bielza P (2011) Genetic study of Mediterranean and South American populations of tomato leafminer Tuta absoluta (Povolny, 1994) (Lepidoptera: Gelechiidae) using ribosomal and mitochondrial markers. Pest Management Science 67, 1155–1162

Cocco A, Serra G, Lentini A, Deliperi S, Delrio G 2014. Spatial distribution and sequential sampling plans for *Tuta absoluta* (Lepidoptera: *Gelechiidae*) in greenhouse tomato crops. Pest Manag Sci 71:1311–1323.

Corbel V., Fonseca D.M., Weetman D., Pinto J., Achee N.L., Chandre F., Coulibaly M.B., Dusfour I., Grieco J., Juntarajumnong W., Lenhart A., Martins A.J., Moyes C., Ng, L.C., Raghavendra K., Vatandoost H., Vontas, J., Muller P., Kasai S., Fouque F., Velayudhan R., Durot C., David J.P., 2017. International workshop on insecticide resistance in vectors of arboviruses, December 2016, Rio de Janeiro, Brazil. Parasites and Vectors 10, 1–16. doi:10.1186/s13071-017-2224-3

Daborn P.J., Yen J.L., Bogwitz M.R., Le Goff G., Feil E., Jeffers S., Tijet N., Perry T., Heckel D., Batterham P., et al. 2002. A Single P450 Allele Associated with

Insecticide Resistance in Drosophila. Science 297, 2253-2256.

Denholm I. and Jespersen J. 1999. Overview of insecticide resistance. Proceedings of a symposium on Combating insecticide resistance. Thessaloniki (Greece), 26-35.

Desneux N., Waynberg E., Wyckhuy, K.A.G., Burgio G., Arpaia S., Narvaez-Vasquez C.A., Gonzalez-Cabrera J., Catalan-Ruescas D., Tabone E., Frandon J., Pizzol J., Poncet C., Cabello T., Urbaneja A., 2010. Biological invasion of European tomato crops by Tuta absoluta: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *Journal of pest science*, *83*(3), 197-215.

Desneux N., Luna M.G., Guillemaud T., Urbaneja A., 2011. The invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new threat to tomato world production. J. Pest Sci. (2004). 84, 403–408. doi:10.1007/s10340-011-0398-6

EPPO. (2005) Datasheet Tuta absoluta datasheet. OEPP/EPPO Bulletin 35: 434-435.CIP (1996)

Estay, P., 2000. Polilla del tomate Tuta absoluta (Meyrick). Instituto de Investigationes Agropecuarias, Centro Regional de Investigacion La Platina, Ministerio de Agricultura Santiago Chile

Falconer, D. S., 1981 Introduction to quantitative genetics. Longman. Harlow, Essex. 340 pp.

Fernandez S & Montagne A (1990) [Biology of the tomato borer, Scrobipalpula absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)]. Boletin de Entomologia Venezolana 5, 89–99 (in Spanish)

Garcia, M. F. and Espul, J. C. 1982. Bioecology of the tomato moth (Scrobipalpula absoluta) in Mendoza, Argentine Republic. Revista de Investigaciones Agropecuarias, 17: 135-146.

Genc. H., The tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae): Pupal Key Characters for Sexing Individuals. *Turkish Journal of Zoology* (in press). 2016.

Georgiou G.P. and Taylor C.E. 1986. Factors influencing the evolution of resistance. In Pesticide Resistance: Strategies and Tacticks for Management. National Academy Press. Washinghton, D.C., 157-169.

Georgiou G.P. 1987. Insecticides and pest resistance: the consequences of abuse. 36

th

Guedes R.N.C., Picanço M.C., 2012. The tomato borer *Tuta absoluta* in South America: Pest status, management and insecticide resistance. EPPO Bull. 42, 211–216. doi:10.1111/epp.2557

Hemingway, J. & Karunaratne, S.H.P.P (1998) Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Medical and Veterinary Entomology*, 12, 1-12.

Herne D. H. C. and Brown A. W. A.. Inheritance and biochemistry of OP-resistance in a New York strain of the two-spotted spider mite. J. Econ. Entomol. 62, 205 (1969).

Imenes SDL, Uchôa-Fernandes MA, Campos TB, Takematsu AP, 1990. Aspectos biológicos ecomportamentais da trata do tomateiro Scrobipalpula absoluta (Meyrick, 1917), (Lepidoptera-Gelechiidae). Arquivos do Instituto Biológico, Sao Paulo, 57(1/2):63-68.

Jenkins, J.A. (1948). The origin of the cultivated tomato. Econ. Bot. 2, 379–392

Jham, G. N., R. T. Friguetto, A. B. Attygalle, E. F. Vilela, A. Svatos, J. Meinwald, M. A. Uchoa-Fernandes, and F. A. Ferrara. 2001. Identificac ¸~ ao, sıntese e avaliac ¸~ ao do feromonio sexual de Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), p. 206. In Vilela, E.F., and Della Lucia, T.M.C. (eds.), Feromonios de Insetos. Biologıa, Quımica E Emprego No Manejo de Pragas. Holos, Riber~ao Preto.

Lang WH., Lorin Brouson, Insect pests of tomatoes, California 1981, Ann. Rev Entomol. 26:345-71

Lee M.S., Albajes R., and Eizaguirre M. 2014. Mating behaviour of female *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae): polyandry increases reproductive output. Journal of Pest Science, 87:429–439.

McCann S.F., Annis G.D., Shapiro R., Piotrowski D.W., Lahm G.P., Long J.K., Lee K.C., Hughes M.M., Myers B.J., Griswold S.M., Reeves B.M., March R.W., Sharpe P.L., Lowder P., Barnette W.E., Wing K.D., 2001. The discovery of indoxacarb: Oxadiazines as a new class of pyrazoline-type insecticides. Pest Manag. Sci. 57, 153–164. doi:10.1002/1526-4998(200102)57:2<153::AID-PS288>3.0.CO;2-O

Melander, A. L., J. Econ. Entomol., 7, 167-72 (1914)

Miranda-Ibarra E. 1999. Fluctuacion poblacional, ritmo diario de vuelo de machos y

eficacia de biopesticidas en polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick) en cultivo del tomate de otoño, bajo invernadero en la zona de Quillota Universidad Iberoamericana de Ciencias y Tecnologia.

Monserrat Delgado A., 2008. La polilla del tomate Tuta absoluta en la region de Murcia : bases para su control. Murcia, Spain: Ministry of Agriculture and Water.

Nayana, B.P., and C.M. Kalleshwaraswamy. 2015. Biology and external morphology of invasive tomato leaf miner, Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Pest Management in Horticultural Ecosystems 21 (2): 169–174

Nehare S., Ghodki B.S., Lande G.K., Pawade V., Thakare A.S., 2010a. Inheritance of resistance and cross resistance pattern in indoxacarb-resistant diamondback moth *Plutella xylostella* L . 40, 18–25. doi:10.1111/j.1748-5967.2009.00261.x

Nilahyane A, Bouharroud R, Hormatallah A, Taadaouit NA (2012). Larvicidal effect of plant extracts on *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). "Working Group Integrated Control in Protected Crops, Mediterranean Climate". IOBC-WRPS Bull. 80: 305-310.

Notz AP (1992) [Distribution of eggs and larvae of Scrobipalpula absoluta in potato plants.] Revista de la Facultad de Agronomía (Maracay) 18 425–432 (in Spanish).

Potting R (2009) Pest risk analysis, Tuta absoluta, tomato leaf miner moth. Plant protection service of the Netherlands, 24 pp

Povolny D., 1975, On three neotropical species of Gnorimoschemini (Lepidoptera, Gelechiidae) mining Solanaceae. Acta Universitatis Agricultarae, 23: 379–393

Reynolds, H.T. 1962. Standardized laboratory detection methods for resistance determination in agricultural arthropod pests. Bull. Ent. Soc. Am., 8: 9-14

Ripa SR, Rojas PS, Velasco G (1995) Releases of biological control agents of insect pests on Easter Island (Pacific Ocean). Entomophaga 40:427–440

Roditakis E., Papachristos D., Roditakis N.E., 2010. Current status of the tomato leafminer *Tuta absoluta* in Greece. EPPO Bull. 40, 163–166. doi:10.1111/j.1365-2338.2009.02367.x

Sakuma, M., 1998. Probit analysis of preference data. Appl. Entomol. Zool. 33, 339-347

Scott J.G. 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance, Insect. Biochem. Mol. Biol. 29 : 757-777

Silver K.S., Song W., Nomura Y., Salgado V.L., Dong K., 2010. Mechanism of action of sodium channel blocker insecticides (SCBIs) on insect sodium channels. Pestic. Biochem. Physiol. 97, 87–92. doi:10.1016/j.pestbp.2009.09.001

Siqueira, H. A. A., R. N. C. Guedes, & M. C. Picanço. 2000. Insecticide resistance in 1643 populations of Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae). Agric. For. Entomol. 2: 147-153.

Smedt C., Damme V.V., Clercq P., Spanoghe P. 2016. Insecticide Effect of Zeolites on the Tomato Leafminer Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae). Insects

Smith, R.F. 1970. Pesticides: their use and limitations in pest management. In: Rabb RL and Guthrie FE (eds). Concepts of Pest Management. Pp.103- 113

Sparks T.C., Nauen R., 2015. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. Pestic. Biochem. Physiol. 121, 122–128. doi:10.1016/j.pestbp.2014.11.014

Stone, B.F., 1968. A formula for determining degree of dominance in cases of monofactorial 721 inheritance of resistance to chemicals. Bull. World Health Organ. 38, 325–326.

Taylor, I.B. 1986. Biosystematics of the tomato. *In* The tomato crop (J.G. Atherton and J. Rudish, eds), pp. 1-34. Chapman and Hall, London.

Tropea Garzia G, Siscaro G, Biondi A, Zappala` L (2012) Tuta absoluta, an exotic invasive pest from South America now in the EPPO region: biology, distribution and damage. EPPO Bull 42:205–210

OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 35, 434–435, 2005

Uchoˆa-Fernandes MA, Della Lucia TMC & Vilela EF (1995) Mating, oviposition and pupation of Scrobipalpula absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Anais da Sociedade Entomologica do Brasil 24, 159–164.

Urbaneja A., Vercher R., Navarro V., Garcia Mari F., Porcuna J.L., 2007. La polilla del tomate, *Tuta absoluta*. Phytoma Espana 16–23.

Urbaneja A., Desneux N., Gabarra R., Arno J., Gonzalez-Cabrera J., Mafra-Neto A., Stoltman L., Pinto A. se S., Parra J.R.P., 2013. Biology, Ecology and Management of the South American Tomato Pinworm, *Tuta absoluta*, in:

Potential Invasive Pests of Agricultural Crops. pp. 98–125. doi:10.1017/CBO9781107415324.004

USDA-APHIS 2011. New pest response guidelines: tomato leafminer (*Tuta absoluta*). *Washington, DC: United States Department of Agriculture*.

Vargas HC 1970. Observaciones sobre la biologıa y enemigos naturales de la polilla del tomate, *Gnorimoschema absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: *Gelechiidae*). Idesia 1:75–110

Vontas J, Small JG, Hemingway J. 2001. Glutathione-S-transferases as antioxidant defense agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. Biochem. J. 357:65–72

Vontas J, Small GJ, Nikou DC, Ranson H, Hemingway J. 2002. Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione-S-transferase involved in insecticide resistance from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. Biochem. J. 362:329–37

Wang X.-L., Su W., Zhang J.-H., Yang Y.-H., Dong K., Wu Y.-D., 2015. Two novel sodium channel mutations associated with resistance to indoxacarb and metaflumizone in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. Insect Sci. 50–58. doi:10.1111/1744-7917.12226

Wing K.D., Sacher M., Kagaya Y., Tsurubuchi Y., Mulderig L., Connair M., Schnee M., 2000. Bioactivation and mode of action of the oxadiazine indoxacarb in insects. Crop Prot. 19, 537–545. doi:10.1016/S0261-2194(00)00070-3

Wing K.D., Schnee M.E., Sacher M., Connair M., 1998. A novel oxadiazine insecticide is bioactivated in lepidopteran larvae. Arch. Insect Biochem. Physiol. 37, 91–103. doi:10.1002/(SICI)1520-6327(1998)37:1<91::AID-ARCH11>3.0.CO;2-5

(http://fluoridealert.org/wp content/pesticides/msds/indoxacarb.technical.bulletin.steward.pdf).

(www.irac-online.org)