



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Παραδοτέο έργου Π1.3. Έκθεση αξιολόγησης του βαθμού ανθεκτικότητας των ευρεθέντων ειδών εντόμων στα συνήθη χρησιμοποιούμενα εντομοκτόνα.

Τύπος: Έκθεση

Υπο-παραδοτέο Π1.3.2. «Ανασκόπηση - σχεδιασμός πρωτοκόλλων για την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας στα ευρεθέντα είδη εντόμων»



DiatomiteThem

DiatomiteThem

Τίτλος Έργου:

**Προστασία των αποθηκευμένων δημητριακών με τη
χρήση γης διατόμων**

«Το έργο αυτό υλοποιείται στο πλαίσιο της Δράσης ΕΡΕΥΝΩ-ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ-ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ και συγχρηματοδοτήθηκε από το Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης (ΕΤΠΑ) της Ευρωπαϊκής Ένωσης και εθνικούς πόρους μέσω του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα & Καινοτομία (ΕΠΑνΕΚ) (κωδικός έργου: Τ2ΕΔΚ-03532)»



ΕΠΑνΕΚ 2014-2020
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγικά στοιχεία	3
2. Ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα επαφής	6
3. Ανθεκτικότητα στην φωσφίνη	8
4. Βιβλιογραφία	13



1. Εισαγωγικά στοιχεία

Η αποτυχία των εντομοκτόνων να καταπολεμήσουν πλήρως έναν εντομολογικό εχθρό μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, που μπορεί να μην έχουν σχέση με την ύπαρξη ανθεκτικότητας. Για τον λόγο αυτό, η εξέταση με σκοπό την επιβεβαίωση της παρουσίας ανθεκτικών ατόμων ενός πληθυσμού εντόμων είναι απαραίτητη για την εφαρμογή εναλλακτικών πρακτικών απεντόμωσης έπειτα από μια αναποτελεσματική εφαρμογή ενός εντομοκτόνου σκευάσματος. Σε γενικές περιπτώσεις, η ύπαρξη ανθεκτικότητας είναι εμφανής, αφού έντομα εξακολουθούν να υπάρχουν στον χώρο και το προϊόν μετά την (ορθή) εφαρμογή του εντομοκτόνου παράγοντα, και μπορεί να αποδειχθεί σχετικά απλά, με σύγκριση της θνησιμότητας μεταξύ των πληθυσμών προς εξέταση με έναν γνωστό ευαίσθητο πληθυσμό του ίδιου είδους. Ωστόσο αυτή η μέθοδος δεν είναι πάντα αποτελεσματική, καθώς δεν μπορεί να ανιχνεύσει χαμηλά επίπεδα ανθεκτικότητας ή μπορεί να υποδείξει λανθασμένα ποσοστά ανθεκτικότητας, εξαιτίας των μεγάλων διαφορών στα ποσοστά θνησιμότητας μεταξύ των ατόμων ενός πληθυσμού.

Δεδομένου ότι η έκφραση ανθεκτικότητας περιλαμβάνει την αλλαγή της ανοχής ενός εντόμου σε μια συγκεκριμένη δόση εντομοκτόνου, μπορεί να ανιχνευθεί και να μετρηθεί είτε με την αξιολόγηση της θνησιμότητας διαφορετικών πληθυσμών στην ίδια δόση του εντομοκτόνου, είτε με την αξιολόγηση διαφορετικών δόσεων με σκοπό να επιτευχθεί ένα συγκεκριμένο ποσοστό θνησιμότητας στα έντομα. Τέτοιες μέθοδοι είναι σχετικά απλές και μπορούν να πραγματοποιηθούν στο εργαστήριο, αφού βιοδοκιμές γίνονται κάτω από ελεγχόμενο περιβάλλον, και συνεπώς όλοι οι βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες που επηρεάζουν την θνησιμότητα των εντόμων είναι γνωστοί και συγκρίσιμοι. Ωστόσο, παρόλο που προτιμάται η αξιολόγηση ανθεκτικότητας σε εργαστηριακό επίπεδο, κάποιος δεν μπορεί ποτέ να προσομοιάσει εξ' ολοκλήρου μια απεντόμωση σε πραγματική κλίμακα, όπως δηλαδή γίνεται σε μια αποθήκη. Συνεπώς, θα πρέπει πάντα να πραγματοποιούνται δειγματοληψίες πριν και μετά την εφαρμογή των εντομοκτόνων σε πραγματικές συνθήκες απεντόμωσης, εφόσον πληρούνται όλα τα απαραίτητα μέτρα για την σωστή εφαρμογή του εκάστοτε εντομοκτόνου παράγοντα σε κάθε απεντόμωση.



Δυστυχώς, έχει παρατηρηθεί ότι τα στοιχεία που προκύπτουν από εργαστηριακές βιοδοκιμές δεν συμβαδίζουν πάντα με την κατάσταση που επικρατεί στην αποθήκη. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες. Ένας από τους βασικότερους αφορά το δείγμα εντόμων που συλλέχθηκε από την αποθήκη με σκοπό την μετέπειτα εργαστηριακή μελέτη ανθεκτικότητας. Καθότι κάθε άτομο ενός πληθυσμού παρουσιάζει διαφορετικά ποσοστά ανοχής στον ίδιο τοξικό παράγοντα, το γενικό σύνολο που προκύπτει από τις βιοδοκιμές (δηλαδή η αντίδραση που παρουσιάζει ο μέσος όρος του πληθυσμού) μπορεί να μην αντιστοιχεί στα πραγματικά δεδομένα. Αυτό είναι πολύ σημαντικό, δεδομένου ότι η απεντόμωση στοχεύει στην καταπολέμηση όλων των εντόμων που βρίσκονται σε δεδομένο χώρο και άρα τα άτομα που δεν μπορούν να καταπολεμηθούν αποτελούν το βασικό στοιχείο για την ύπαρξη ανθεκτικότητας, μιας και θα την κληροδοτήσουν και στις επόμενες γενεές. Συνεπώς, η ύπαρξη και η αναπαραγωγή τέτοιων ατόμων μέσα στην αποθήκη σε συνδυασμό με την αδυναμία των κοινών πρακτικών απεντόμωσης που εφαρμόζονται στην αποθήκη για να τα καταπολεμήσουν, δίνουν συνήθως το πλεονέκτημα των ανθεκτικών φυλών να υπερισχύσουν αριθμητικά μέσα στον εκάστοτε χώρο. Η συνύπαρξη των διαφόρων ειδών εντόμων είναι κρίσιμη, καθώς η ίδια μέθοδος θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί για πολλά είδη ταυτόχρονα, το οποίο συνήθως δεν λαμβάνει χώρα στην περίπτωση των ειδών εντόμων στον αγρό.

Συνοπτικά, οι μέθοδοι αξιολόγησης της ανθεκτικότητας πρέπει να είναι σε θέση να:

1. δίνουν έγκυρες πληροφορίες για την ύπαρξη ανθεκτικότητας,
2. εξάγουν γρήγορα αποτελέσματα,
3. μπορούν να ανιχνεύσουν τα επίπεδα αυτής,
4. είναι εύκολες στην εφαρμογή τους και
5. απαιτούν φθινό και μη-εξειδικευμένο εξοπλισμό.

Ιδανικά, θα πρέπει να δίνουν γρήγορα αλλά και έγκυρα αποτελέσματα ώστε να υπάρχει χρόνος για τον σχεδιασμό και την υλοποίηση αντιμετώπισης της ανθεκτικότητας που μπορεί να βρεθεί. Ταυτόχρονα, οι μέθοδοι θα πρέπει να μπορούν να εφαρμοστούν σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων την ίδια χρονική περίοδο, απαιτώντας ταυτόχρονα ελάχιστο προσωπικό και εξοπλισμό για την εφαρμογή τους. Στην περίπτωση του προσωπικού,



ιδανικά θα πρέπει να μπορούν να τις εφαρμόσουν και σχετικά ανειδίκευτοι εργάτες με ελάχιστη εκπαίδευση χρησιμοποιώντας σχετικά φθηνά εργαλεία.

Άλλη μια σημαντική παράμετρος είναι η ικανότητα της μεθόδου να μπορεί να αξιολογήσει δείγματα διαφορετικών μεγεθών, όπως για παράδειγμα ένα ή δυο έντομα. Ειδικά στις περιπτώσεις όπου η παρουσία ανθεκτικών εντόμων μέσα σε έναν πληθυσμό είναι ακόμα σε χαμηλά επίπεδα, ελάχιστα άτομα θα επιβιώσουν μετά την αρχική εξέταση του πληθυσμού, άτομα στα οποία θα πρέπει να γίνουν επιπλέον μελέτες για την περαιτέρω αξιολόγηση της ανθεκτικότητας ή της ύπαρξης ανθεκτικότητας και σε άλλες δραστικές ουσίες. Εάν επιλεγεί μια μέθοδος που φέρει περιορισμούς ως προς τον αριθμό των εντόμων προς εξέταση, η πιθανότητα ανίχνευσης χαμηλών ποσοστών ανθεκτικότητας μέσα στον πληθυσμό είναι μικρή και άρα μειώνεται και η αξιοπιστία της μεθόδου.

Διάφοροι παράγοντες πρέπει να ληφθούν υπόψη για την επιλογή και εφαρμογή μιας μεθόδου ανίχνευσης ανθεκτικότητας. Για αρχή θα πρέπει να γίνει προσεκτική επιλογή εντόμων κατάλληλου σταδίου ανάπτυξης ως δείγμα προς εξέταση με σκοπό την λήψη αντιπροσωπευτικών αποτελεσμάτων σχετικά με την ανοχή του συγκεκριμένου είδους στο εντομοκτόνο, λαμβάνοντας ταυτόχρονα και υπόψη τα στάδια στα όποια στοχεύει η πρακτική εφαρμογή του εντομοκτόνου στην αποθήκη. Συνήθως, οι μέθοδοι ανίχνευσης στοχεύουν στην αξιολόγηση των ακμαίων ατόμων ενός πληθυσμού, με βασική προϋπόθεση ότι ο τρόπος δράσης του εντομοκτόνου να στοχεύει σε αυτό το στάδιο. Η χρήση των ακμαίων ατόμων, εκτός από την ευκολία εύρεσής τους στον χώρο, συνήθως επιφέρει και μεγαλύτερη ομοιομορφία στα εξαγόμενα αποτελέσματα. Επιπροσθέτως, στην περίπτωση των κολεοπτέρων, τα ακμαία είναι συνήθως το λιγότερο ευαίσθητο στάδιο ανάπτυξης και συνεπώς η θνησιμότητα των ακμαίων καταδεικνύει και την ευαισθησία των προνυμφών.

Παράλληλα, θα πρέπει να επιλεγεί ένας κατάλληλος τύπος δοκιμών που να ανταποκρίνεται στις πραγματικές συνθήκες των εκάστοτε πρακτικών απεντόμωσης που χρησιμοποιούνται, να υπάρχουν ή να μπορούν εύκολα να δημιουργηθούν βάσεις πληροφοριών σχετικά με την απόκριση ευαίσθητων πληθυσμών των ειδών εντόμων προς αξιολόγηση στις διάφορες δραστικές ουσίες, με σκοπό την σύγκρισή τους με τους



συλλεχθέντες πληθυσμούς των ίδιων ειδών, να υπάρχει η επιλογή αξιολόγησης διαφορετικών δόσεων της ίδιας δραστικής ουσίας σε δεδομένο πληθυσμό με σκοπό την περαιτέρω αξιολόγηση των επιπέδων ανθεκτικότητας στα άτομα που επιβίωσαν, να είναι εφικτή η δυνατότητα αξιολόγησης πιθανής ανθεκτικότητας σε περισσότερες από μια δραστικές ουσίες από τα ίδια άτομα, να μπορεί να γίνει συσχέτιση των αποτελεσμάτων με βάση διάφορους παράγοντες που συμβάλλουν στην έκφραση της ανθεκτικότητας από τα έντομα όπως για παράδειγμα η ανταπόκριση των διαφορετικών σταδίων ή της ηλικίας των ανθεκτικών εντόμων στις διάφορες δόσεις μιας δραστικής κ.α.

2. Ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα επαφής

Σε γενικές γραμμές, τα υπάρχοντα πρωτόκολλα για την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας είναι **ειδικά σχεδιασμένα** στα εκάστοτε εντομοκτόνα προς εξέταση, δεδομένου ότι απαιτούνται διαφορετικές διαδικασίες για την εφαρμογή των καπνιστικών εντομοκτόνων (φωσφίνη) και των ψεκασμών με εντομοκτόνα επαφής (πυρεθρινοειδή, οργανοφωσφορικά κ.α.). Διαφορετικές μέθοδοι υπάρχουν για την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα επαφής. Η πιο κοινή αφορά την έκθεση του πληθυσμού σε συγκεκριμένες (συνιστώμενες) δόσεις ενός εντομοκτόνου επαφής, που θεωρητικά θα θανατώνονται τα έντομα αυτά. Έπειτα από την έκθεση των εντόμων, καταγράφεται η αντίδραση του πληθυσμού κατά 99.9%, ποσοστό που μεταφράζεται ως θνησιμότητα. Αν το 99.9% του πληθυσμού δεν έχει θανατωθεί έπειτα από συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, θεωρείται ότι ο πληθυσμός είναι ανθεκτικός και θα πρέπει να γίνουν περαιτέρω έρευνες για την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας, τόσο στα συλλεχθέντα ακμαία όσο και στους απογόνους τους. Το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την θανάτωση του πληθυσμού είναι συγκεκριμένο και γνωστό, αφού έχει πρωτίστως οριστεί με βάση το χρονικό διάστημα που απαιτεί η συγκεκριμένη δραστική ουσία και δόση για να θανατώσει έναν ευαίσθητο πληθυσμό του ίδιου είδους εντόμων. Ωστόσο, η συγκεκριμένη μέθοδος δεν μπορεί να προσομοιώσει ακριβώς την εφαρμογή σε πραγματικές συνθήκες. Όταν χρησιμοποιούνται πολλές δόσεις, η μέθοδος αυτή αναφέρεται ως βιοδοκιμή- απόκρισης δόσης (dose response bioassay) και είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη.



Η έκθεση των εντόμων στην δραστική ουσία μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους. Για παράδειγμα, εφαρμογή της δραστικής μπορεί να γίνει σε απορροφητικό χαρτί και έπειτα να αφηθούν τα έντομα να κινηθούν πάνω σε αυτό (Kumar and Morrison 1963, Champ and Campbell Brown 1970). Παρομοίως, εφαρμογή της δραστικής μπορεί να γίνει και σε άλλες επιφάνειες, όπως ξύλο, ατσάλι, τσιμέντο, πλακάκι κ.α., επιφάνειες που προσομοιάζουν την εφαρμογή εντομοκτόνων σε άδειους αποθηκευτικούς χώρους. Τέτοιες μέθοδοι ακολουθούνται όταν πρόκειται να εξετασθούν βαδιστικά έντομα όπως κολεόπτερα ή προνύμφες λεπιδοπτέρων, ακάρεα ή ψωκόπτερα, δεδομένου ότι το άτομο πρέπει να περπατήσει πάνω στην ψεκασμένη επιφάνεια για να έρθει σε επαφή με το εντομοκτόνο (La Hue 1969; Armstrong and Soderstrom 1975, Wilkin et al. 1975). Από την άλλη πλευρά, εφαρμογή της δραστικής μπορεί να γίνει και απευθείας σε προϊόν όπως σπόροι δημητριακών ή σε υλικά συσκευασίας προϊόντων, όπως πλαστικό, λινάτσα κ.α. Αυτές οι μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν και όταν πρόκειται για ακμαία άτομα λεπιδοπτέρων.

Ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (UN/FAO) πραγματοποίησε την πρώτη συνεδρίαση για την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας των εντόμων στην Ρώμη το 1965, όπου και περιέγραψε τις αρχές που διέπουν την ανίχνευση και μέτρηση της ανθεκτικότητας των αρθροπόδων στα εντομοκτόνα και υποστήριξε, μεταξύ άλλων, τη σκοπιμότητα χρήσης τυποποιημένων μεθόδων δοκιμής. Εκείνη την περίοδο, τα είδη του γένους *Tribolium* spp. ήταν τα μοναδικά που είχαν προταθεί ως εχθροί των αποθηκευμένων προϊόντων και τροφίμων για αξιολόγηση στις δοκιμές ανθεκτικότητας με τα έως τότε χρησιμοποιούμενα εντομοκτόνα (Champ και Highley, 1986).

Η παρακολούθηση της ανθεκτικότητας ακμαίων ατόμων του *Tribolium castaneum* στις δραστικές malathion, lindane, carbaryl και σε πυρεθρινοειδή δημοσιεύθηκε το 1970 (Anon. 1970). Η μέθοδος βασίστηκε στην έκθεση των εντόμων σε εμποτισμένο με την δραστική ουσία διηθητικό χαρτί. Η μέθοδος ήταν απόρροια της σύνθεσης δοκιμασμένων και αποδεδειγμένων τεχνικών που είχαν χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε εργαστήρια για τουλάχιστον 25 χρόνια, και είχε προταθεί με βάση τη δυνατότητα εφαρμογής στα σκαθάρια των αποθηκευμένων προϊόντων που κατά κανόνα είναι μικρού μεγέθους. Στη συνέχεια, ως αποτέλεσμα της συλλογικής έρευνας από διάφορα ερευνητικά εργαστήρια,



πανεπιστήμια και εταιρίες, η μέθοδος τροποποιήθηκε ώστε να περιλαμβάνει και την παρακολούθηση ανθεκτικότητας στα malathion και lindane, αλλά και τα υποκαπνιστικά methyl bromide και φωσφίνη στα *T. castaneum*, *T. confusum*, *Sitophilus oryzae*, *S. zeamais*, *Rhyzopertha dominica*, *Oryzaephilus surinamensis* και *O. mercator*. Τα παραπάνω είδη, αντιπροσώπευαν τα πιο κοινά είδη εντόμων εχθρών των αποθηκευμένων προϊόντων και τροφίμων, με ευρύ κύκλο τροφικών προτιμήσεων, και συνεπώς ήταν και τα πιο πιθανά να αναπτύξουν αξιοσημείωτη ανθεκτικότητα (Anon. 1975).

Στα επόμενα χρόνια, οι μελέτες οδήγησαν στην περαιτέρω ανάπτυξη των μεθόδων προσδιορισμού ανθεκτικότητας, εμπειρικλείοντας συνδυασμούς περισσότερων ειδών εντόμων και δραστικών ουσιών. Ενδεικτικά, εξετάστηκαν τα *S. oryzae*, *R. dominica* και *T. castaneum* στις δραστικές pirimiphos methyl, bioresmethrin, dichlorvos και fenitrothion, τα *Latheticus oryzae* και *Cryptolestes ferrugineus* στο malathion κ.α. (Champ and Turner 1980; Champ 1984, Attia 1984). Επιπλέον, μέθοδοι ανίχνευσης ανθεκτικότητας στην φωσφίνη προτάθηκαν για το *C. ferrugineus* (Mills 1983) και για τα *S. oryzae*, *S. granarius*, *R. dominica*, *T. confusum*, και *O. surinamensis* στα ethylene, dibromide, ethylene dichloride, carbon tetrachloride και methyl chloroform (Anon. 1981). Τέλος, το 1980 η μέθοδος επεκτάθηκε και σε ακμαία και προνύμφες λεπιδοπτέρων όπως τα *Plodia interpunctella*, *Ephestia cautella* και *Sitotroga cerealella* σε διάφορες δραστικές όπως τα πυρεθρινοειδή (Busvine 1980). Παρομοίως, μέθοδοι ανίχνευσης ανθεκτικότητας προτάθηκαν και για ακάρεα όπως τα *Acarus siro* και *Glycophagus destructor* (Anon. 1981).

3. Ανθεκτικότητα στη φωσφίνη

Η ανίχνευση, και ιδίως η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας στη φωσφίνη σε πληθυσμούς εντόμων αποθηκών δεν είναι εύκολη υπόθεση και απαιτεί λίαν εξειδικευμένα πρωτόκολλα ποσοτικοποίησης (Nayak et al. 2020). Η γνώση του επιπέδου ανθεκτικότητας στη φωσφίνη έχει οδηγήσει στην δημιουργία διαφορετικών πρωτοκόλλων για την ανίχνευσή της. Ο προσδιορισμός της ανθεκτικότητας στην φωσφίνη ξεκίνησε στα έντομα αποθηκευμένων προϊόντων με την δημιουργία



διαγνωστικών προσδιορισμού δόσης από τον FAO (FAO 1975). Οι Champ and Dyte (1976) χρησιμοποιώντας το λεγόμενο πρωτόκολλο του FAO, πραγματοποίησαν μια παγκόσμια έρευνα που παρείχε ένα σημείο εκκίνησης σχετικά με την ανθεκτικότητα στη φωσφίνη. Το πρωτόκολλο του FAO καθορίζει την παρουσία ανθεκτικότητας σε ένα πληθυσμό βάση της επιβίωσης των εντόμων μετά από έκθεση των εντόμων σε συγκεκριμένη συγκέντρωση σε εργαστηριακές συνθήκες. Η συνιστώμενη δόση για την εκτίμηση της ανθεκτικότητας στη φωσφίνη είναι η δόση που θα θανατώσει το LD99 ενός ευαίσθητου πληθυσμού ακολουθώντας από μια επιβεβαιωμένη θνησιμότητα 14 ημέρες μετά (καθυστερημένη θνησιμότητα) (FAO 1975). Ειδικότερα, 20 ακμαία συγκεκριμένης ηλικίας τοποθετούνται σε ένα αεροστεγές κλεισμένο γυάλινο βάζο του 1 λίτρου. Έπειτα, χρησιμοποιώντας σύριγγα, συγκεκριμένη δόση φωσφίνης για κάθε είδος εντόμου προς εξέταση, λαμβάνεται από την επιτόπου παραγόμενη πηγή φωσφίνης και εγχέεται μέσω αεροστεγούς ελαστικού σωλήνα στο γυάλινο βάζο με τα έντομα. Τα έντομα εκτίθεται στην συγκεκριμένη δόση φωσφίνης για ορισμένο χρονικό διάστημα. Μετά το πέρας της έκθεσης τα ακμαία καταμετρούνται ως δραστήρια (δηλαδή που φαίνεται καθαρά η κίνησή τους μέσα στην σύριγγα), ναρκωμένα (ακινητοποιημένα αλλά ζωντανά ακμαία) και νεκρά (χωρίς δηλ. εμφανή κίνηση) και μεταφέρονται σε ένα καθαρό τρυβλίο Petri, με τροφή για 7 ή και 14 ημέρες στους 25 °C και 55% σχετική υγρασία. Μετά το τέλος αυτής της περιόδου υπολογίζεται η συνολική θνησιμότητα, δηλ. η λεγόμενη «καθυστερημένη θνησιμότητα», που είναι γνωστή διεθνώς ως *delayed mortality*.

Παραδείγματα συγκεντρώσεων σε έντομα αποθηκών είναι: 20 ppm για *R. dominica* και 50 ppm για *S. granarius*. Η επιβίωση σε αυτό το διάστημα θεωρείται ως ένδειξη ανθεκτικότητας. Με τον χαρακτηρισμό των επιπέδων ανθεκτικότητας στο πρωτόκολλο του FAO (ευαίσθητος και ανθεκτικός πληθυσμός), έγινε τροποποίηση του πρωτοκόλλου από διάφορες ερευνητικές ομάδες, τόσο ως προς τη συγκέντρωση όσο και ως προς το χρόνο έκθεσης. Προτάθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις και διαστήματα έκθεσης για την διάγνωση της λεγόμενης «μέτριας» ανθεκτικότητας. Για παράδειγμα για την διάγνωση της μέτριας και υψηλής ανθεκτικότητας στο *R. dominica* προτάθηκαν τα 20 ppm για 20 ώρες και τα 180 ppm για 48 ώρες αντίστοιχα, ενώ για το *S. oryzae* 30 ppm και 180 ppm για 20 ώρες και για το *T. castaneum* 20 και 180 ppm για 20 ώρες (Holloway



et al. 2016, Collins et al. 2017, Nayak et al. 2017). Αυτές οι συγκεντρώσεις μπορούν να αξιοποιηθούν περαιτέρω και για το διαχωρισμό μεγάλου αριθμού πληθυσμών των ως άνω ειδών, και είναι γνωστές ως συγκεντρώσεις-διάκρισης (discrimination doses).

Το βασικό μειονέκτημα για το πρωτόκολλο του FAO είναι το μεγάλο χρονικό διάστημα για την καταμέτρηση της καθυστερημένης θνησιμότητας για τον χαρακτηρισμό του επιπέδου ανθεκτικότητας ενός πληθυσμού. Για τον λόγο αυτό, προτάθηκαν γρήγορα τεστ, της ίδιας ημέρας βασιζόμενα στην μελέτη της χρονικής νάρκωσης των ευαίσθητων εντόμων. Συγκεκριμένα από τις μελέτες προτείνεται το κριτήριο της νάρκωσης το οποίο υποδηλώνει αδυναμία κίνησης των εντόμων με συντονισμένο τρόπο. Με βάση την νάρκωση αναπτύχθηκαν διάφορα διαγνωστικά τεστ γρήγορης αξιολόγησης της φωσφίνης σε διάφορα έντομα αποθηκών όπως το *T. castaneum*, *R. dominica*, *S. oryzae*, *Lasioderma serricorne* και *S. granarius* (Reichmuth 1991, Bell 1994, Mills and Athie 1999, Steuerwald et al. 2016). Το διαγνωστικό κιτ από τους Steuerwald et al. (2006) βασίζεται σε διαστήματα έκθεσης που είναι συνήθως περί τα 9 με 14 λεπτά, σε συγκεντρώσεις πολύ υψηλές, συνήθως στα 3000 ppm. Αυτό το διαγνωστικό ποσοτικοποιεί την νάρκωση ως δείκτη ευαισθησίας στη φωσφίνη και όχι τη θνησιμότητα, όπως στην περίπτωση των προηγούμενων διαγνωστικών. Επιπλέον, οι Nayak et al. (2013) ανέπτυξαν ένα γρήγορα τεστ για το *C. ferrugineus* το οποίο ανιχνεύει την μέτρια και υψηλή ανθεκτικότητα μέσα σε χρονικό διάστημα 5 ωρών σε έκθεση των εντόμων στα 1440 ppm. Βάσει αυτού του τεστ αναπτύχθηκε κάτι ανάλογο για το *S. oryzae* που χρειάζεται 3 ώρες στα 1440 ppm ή 1.5 ώρα στα 3.600 ppm (Nayak et al. 2019). Τα γρήγορα τεστ δίνουν την δυνατότητα ταχείας διάγνωσης της φωσφίνης σε μία μόλις ημέρα. Τα γρήγορα αυτά διαγνωστικά έχουν σήμερα επεκταθεί και σε άλλα είδη κολεοπτέρων αποθηκευμένων γεωργικών προϊόντων και τροφίμων (Athanassiou et al. 2019).

Η καπνοβιομηχανία έχει θεσπίσει ένα επιπρόσθετο πρωτόκολλο για την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας στη φωσφίνη για το *L. serricorne*, καθώς και για το *Ephestia elutella* (Hübner), που αποτελούν και τα σημαντικότερα είδη στον αποθηκευμένο καπνό (Arbogast 1991). Αυτό το πρωτόκολλο αναπτύχθηκε από ερευνητές του CORESTA, που αποτελεί τον ερευνητικό οργανισμό της βιομηχανίας καπνού, γνωστό ευρέως ως το πρωτόκολλο CORESTA (CORESTA 2019). Στην περίπτωση του *L. serricorne*, το



πρωτόκολλο CORESTA βασίζεται στην έκθεση στα 200 ppm για 4 ημέρες, όταν η θερμοκρασία είναι μεγαλύτερη από 20 °C, ενώ για πληθυσμούς που επιβιώνουν στις συνθήκες αυτές, προτείνεται η έκθεση στα 700 ppm για 10 ημέρες, στους 20 – 25 ° C. Επί του παρόντος, το πρωτόκολλο CORESTA έχει υιοθετηθεί και χρησιμοποιηθεί ευρέως από τη βιομηχανία καπνού και η αξιολόγησή του έχει δείξει την ύπαρξη ανθεκτικών πληθυσμών του *L. serricorne*, που επιβιώνουν ακόμα και στα 700 ppm μετά από 10 ημέρες (Saglam et al. 2015).

Ένα από τα γρήγορα διαγνωστικά τεστ που χρησιμοποιούνται αυτή τη στιγμή είναι το Detia Degesch Phosphine Tolerance Test Kit (DDPTTK), διαθέσιμο σήμερα εμπορικά ως Phosphine Tolerance Test (PTT), το οποίο αναπτύχθηκε από την Detia Degesch GmbH (Laudenbach, Γερμανία). Το DDPTTK αποτελεί μια μέθοδο ταχείας αξιολόγησης για την ανθεκτικότητα στη φωσφίνη, όπου τα έντομα εκτίθενται σε σύριγγες που περιέχουν υψηλή συγκέντρωση φωσφίνης, με την παραγωγή της συγκέντρωσης να γίνεται επιτόπου από προσθήκη δισκίων σε πλαστικό κάνιστρο (Steuerwald et al., 2006; Aulicky et al., 2015). Το τεστ DDPTTK, καθώς και το παραπλήσιο των Nayak et al. (2013), χρησιμοποιούν τις αποκλίσεις από την κανονική κινητικότητα του εκτιθέμενου πληθυσμού ως δείκτες ευαισθησίας στην φωσφίνη. Ειδικότερα, 20 ακμαία άτομα τοποθετούνται σε ειδική σύριγγα των 100 ml και εκτίθενται σε συγκεκριμένη δόση φωσφίνης που αντιστοιχεί στα 3000 ppm για χρονικό διάστημα 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60 και 90 λεπτών. Αν με το πέρας των 90 λεπτών παρατηρηθούν δραστήρια ακμαία, τότε το χρονικό διάστημα έκθεσης επεκτείνεται στα 270 λεπτά, με ενδιάμεσες παρατηρήσεις νάρκωσης των εντόμων κάθε 30 λεπτά. Μετά και τα 270 λεπτά έκθεσης, καταμετράται το ποσοστό των δραστήριων, των ναρκωμένων και των νεκρών εντόμων μέσα στην σύριγγα. Τα πλεονεκτήματα του τεστ DDPTTK έγκειται στο ότι μπορεί να εφαρμοστεί επί τόπου από μη εξειδικευμένο προσωπικό (χωρίς την απαίτηση συγκεκριμένης άδειας χρήσης), χρησιμοποιώντας φθινό εξοπλισμό, ενώ ταυτόχρονα παρέχει γρήγορα αρχικές πληροφορίες σχετικά με την κατάσταση ανθεκτικότητας σε έναν πληθυσμό (Aulicky et al., 2015).

Τέλος, οι Schlipalius et al. (2012) εντόπισαν τις μεταλλάξεις στο γονιδίωμα που είναι υπεύθυνες και για τους δύο τύπους ανθεκτικότητας στην φωσφίνη («ισχυρή» ή «ασθενής»), μεταλλάξεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν με επιτυχία για τη μοριακή



διάγνωση της ανθεκτικότητας σε πληθυσμούς. Οι Chen et al. (2015) παρουσίασαν επίσης ένα μοριακό διαγνωστικό πρωτόκολλο βασισμένο σε συγκεκριμένους δείκτες για τα *T. castaneum* και *R. dominica*. Ωστόσο, τα μοριακά διαγνωστικά τεστ είναι γενικά επίπονα και απαιτούν εξειδικευμένη εκπαίδευση και εξοπλισμό. Την ίδια στιγμή, αυτά τα πρωτόκολλα έχουν σχεδιαστεί για συγκεκριμένα είδη αποθηκευμένων προϊόντων και επομένως, δεν μπορούν να εφαρμοστούν σε άλλα είδη. Παρά το γεγονός ότι οι μεταλλάξεις είναι γνωστές για κάποια από τα είδη κολεοπτέρων αποθηκών, φαίνεται, από τη μέχρι τώρα διαθέσιμη βιβλιογραφία, ότι υπάρχουν και άλλες μεταλλάξεις για κάποια είδη κολεοπτέρων, γεγονός που υποδηλώνει τη, μέχρι στιγμής, αδυναμία εφαρμογής μια γενικής βιοδοκιμής για πολλά είδη ταυτόχρονα, πέραν της PTT.



4. Βιβλιογραφία

Armstrong J.W., Soderstrom E.L. (1975). Malathion resistance in some populations of the Indian meal moth infesting dried fruits and tree nuts in California. *Journal of Economic Entomology*, 68: 505-507.

Attia E. (1984a). Insecticide and fumigant resistance in insects of grain and stored products in Australia. In: *Proceedings of the 3rd International Working Conference on Stored Product Entomology*, 1983, Manhattan, Kansas, U.S.A., 196-208.

Attia E. (1984b). Multiple and cross-resistance characteristics in phosphine-resistant strains of *Rhyzopertha dominica* and *Tribolium castaneum*. In: Ripp, B.E. et al., ed. *Controlled atmosphere and fumigation in grain storages*. Amsterdam, Elsevier, 49-53.

Anonymous (1970a). Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides. Tentative method for adults of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst). *FAO Method No. 6*. *FAO Plant Protection Bulletin*, 18, 107-113.

Anonymous (1975). Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides, tentative method for adults of some major beetle pests of stored cereals with methyl bromide and phosphine. *FAO Method No. 16*. *FAO Plant Protection Bulletin*, 23, 12-25

Anonymous (1981). Resistance tests for liquid fumigants. *Ibid*, 52: 53.

Anonymous (1980). Resistance in storage mites. *Storage Pests*, 45: 46.

Aulicky R., Stejskal V., Frydova B., Athanassiou C.G. (2015). Susceptibility of two strains of the confused flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae) following phosphine structural mill fumigation: effects of concentration, temperature, and flour deposits. *Journal of Economic Entomology*, 186: 2823-2830.

Busvine J.R. (1980). Recommended methods for measurement of pest resistance to pesticides. Method for lepidopterous larval pests of stored products and tentative method for detecting resistance in adults of stored-product lepidopterous pests. *FAO Method No. 22*. *FAO Plant Production & Protection Paper No. 21*. Rome, FAO, pp. 123-127.



Champ B.R. (1984a). Pesticide resistance in stored product insects. In: Champ, B.R., and Highley, E., cd. Proceedings of the Australian Development Assistance Course on the Preservation of Stored Cereals. Canberra, CSIRO Division of Entomology, 681-696.

Champ B.R. (1984b). Methods for detecting pesticide resistance in storage pests. *Ibid*, 691-719.

Champ B.R., Campbell-Brown M.J. (1970a). Insecticide resistance in Australian *Tribolium castaneum* (Herbst) - I. A test method for detecting insecticide resistance. *Journal of Stored Products Research*, 6: 53-70.

Champ B.R., Campbell-Brown M.J. (1970b). Insecticide resistance in Australian *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). H. Malathion resistance in eastern Australia. *Journal of Stored Products Research*, 6: 111-13.

Champ B.R., Highley E. (1986). Pesticides and humid tropical grain storage systems: proceedings of an international seminar, Manila, Philippines, 27-30 May 1985. ACIAR Proceedings No. 14, pp. 364

Champ B.R., Turner P.M. (1980a). Pesticide resistance in storage pests. Biotropical Training Course on Pests of Stored Products, Bogor, Indonesia.

Champ B.R., Turner P.M. (1980b). Monitoring of insecticide resistance. *Ibid*, pp. 29.

Chen Z., Schlipalius D., Opit G., Subramanyam B., Phillips T.W. (2015). Diagnostic molecular markers for phosphine resistance in U.S. populations of *Tribolium castaneum* and *Rhyzopertha dominica*. *PLoS One*, 10: 0121343.

Kumar V., Morrison E.O. (1963). The susceptibility levels of certain stored product pest populations to chemicals used for their control. *Phytoprotection*, 44: 101-105.

La Hue D.W. (1969). Control of malathion-resistant Indian meal moths *Plodia interpunctella* (Hubner) with dichlorvos resin strips. Proceedings of the North Central Branch of the Entomological Society of America, 24: 117-119.



Mills K.A. (1983). Resistance to the fumigant hydrogen phosphide in some stored product species associated with repeated inadequate treatments. *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft Allgemeine Angewandte Entomologie*, 4: 98-101.

Nayak M.K., Collins P.J., Holloway J.K., Emery R.N., Pavic H., Bartlett J., (2013). Strong resistance to phosphine in the rusty grain beetle, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) (Coleoptera: Laemophloeidae): its characterization, a rapid assay for diagnosis and its distribution in Australia. *Pest Management Science*, 69: 48-53.

Steuerwald R., Dierks-Lange H., Schmitt S. (2006). Rapid bioassay for determining the phosphine tolerance. In: Lorini, I., Bacaltchuk, B., Beckel, H., Deckers, D., Sundfeld, E., dos Santos, J.P., Biagi, J.D., Celaro, J.C., Faroni, L.R.D.'A., Bortolini, L.deO.F., Sartori, M.R., Elias, M.C., Guedes, R.N.C., da Fonseca, R.G., Scussel, V.M. (Eds.), *Proceedings of the 9th International Working Conference on Stored-product Protection*, 15-18 October 1994, , pp. 306-311. Campinas. ABRAPOS, Brazil.

Schlupalius D.I., Valmas N., Tuck A.G., Jagadeesan R., Ma L., Kaur R., Goldinger A., Anderson C., Kuang G., Zuryn S., Mau Y.S., Cheng Q., Collins P.J., Nayak M.K., Schirra H.J., Hillard M.A., Ebert P.R. (2012). A core metabolic enzyme mediates resistance to phosphine gas. *Science*, 338: 807-810.

Wilkin D.R, Pragnell L. (1975). Incidence of resistance in the United Kingdom. *Mites. Pest Infestation Control Laboratory Report*, 86: 1971-73.