



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Σχολή Γεωπονικών Επιστημών

Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΦΥΤΙΑΤΡΙΚΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΣΥΜΒΟΛΗ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΑΣ ΤΑΧΕΙΑΣ ΔΟΚΙΜΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΗ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΟΛΕΟΠΤΕΡΩΝ ΑΠΟΘΗΚΩΝ
ΣΤΗΝ ΦΩΣΦΙΝΗ.**

Λαμπίρη Ευαγγελία

Βόλος, 2020

**«Συμβολή στην ανάπτυξη μιας ταχείας δοκιμής για την επισήμανση της
ανθεκτικότητας κολεοπτέρων αποθηκών στη φωσφίνη»**

Λαμπίρη Ευαγγελία

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Αθανασίου Χρήστος

Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Παπαδόπουλος Νικόλαος

Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τσιρόπουλος Νικόλαος

Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Copyright © ΛΑΜΠΙΡΗ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ, 2020.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας διατριβής, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης.

Η έγκριση της Μεταπτυχιακής Διατριβής Ειδίκευσης από το Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δε δηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Αθανασίου Χρήστου. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά για την ανάθεση του θέματος, τη συνεχή υποστήριξη και καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου εργασίας, για τις σημαντικές συμβουλές που μου έδωσε καθώς και για την ευκαιρία να εντρυφήσω περισσότερο στο συγκεκριμένο γνωστικό αντικείμενο.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Καθηγητές κ. Παπαδόπουλο Νικόλαο και κ. Τσιρόπουλο Νικόλαο, μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής που συμμετείχαν στην αξιολόγηση της συγκεκριμένης εργασίας.

Θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα του εργαστηρίου Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Αγραφιώτη Παρασκευή για τη σημαντική βοήθεια της κατά την εκτέλεση του πειράματος και τη συνεχή εμπύχωση της και τις νέες γνώσεις που μου προσέφερε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την αδερφή μου, Βίκυ και την καρδιακή μου φίλη και ξαδέρφη, Πόπη που είναι πάντα δίπλα μου σε ότι τις χρειάζομαι.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου και ειδικότερα τη μητέρα μου που δε έπαψε ποτέ να πιστεύει σε μένα και στις δυνατότητες μου.

Περίληψη

Σε σειρά εργαστηριακών δοκιμών εξετάστηκε η κινητικότητα των εντόμων, μετά από συγκεκριμένα διαστήματα έκθεσης στη φωσφίνη, σε επιλεγμένα είδη εντόμων αποθηκών καθώς και η πιθανότητα εμφάνισης του λεγόμενου «sweet spot». Τα είδη που εξετάστηκαν ήταν τα: *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae), *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) και *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae) με πληθυσμούς που είχαν διαφορετικό επίπεδο ανθεκτικότητας στη φωσφίνη. Η αξιολόγηση έγινε με τη χρήση του πρωτοκόλλου ανθεκτικότητας Detia Degesch Phosphine Tolerance Test Kit (DDPTTK), με έκθεση των ενηλίκων για 15, 30, 60, 90, 150 και 300 λεπτά σε 3000 ppm. Μετά το πέρας των διαστημάτων αυτών (ξεχωριστές βιοδοκιμές για κάθε χρονικό διάστημα) τα έντομα μεταφέρθηκαν σε τρυβλία petri, στα οποία καταγράφηκε η ανάνηψη σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (2 ώρες, 1, 2 και 7 ημέρες). Η πλειονότητα των ευαίσθητων πληθυσμών όλων των ειδών ακινητοποιήθηκαν άμεσα ακόμα και στη μικρότερη περίοδο εφαρμογής (15 λεπτά) σε αντίθεση με τους ανθεκτικούς πληθυσμούς, που ήταν δραστήριοι ακόμη και μετά το πέρας των 300 λεπτών. Μετά το πέρας της έκθεσης στη φωσφίνη, το είδος και ο χρόνος έκθεσης επηρέασε τη θνησιμότητα των ευαίσθητων πληθυσμών, ενώ οι ανθεκτικοί πληθυσμοί επανήλθαν ανεξάρτητα από το είδος και το διάστημα έκθεσης. Οι βιοδοκιμές στις συγκεντρώσεις 500, 1000, 2000 και 3000 ppm για 1, 3, 5, 20, 30 και 40 ώρες έδειξαν την παρουσία του «sweet spot», δηλ. τη μείωση της θνησιμότητας με την αύξηση της συγκέντρωσης. Μάλιστα, στα περισσότερα είδη εντόμων που εξετάστηκαν, το «sweet spot» εμφανίζεται στα 1000 και 2000 ppm για χρόνο έκθεσης 5 ωρών. Η παρατήρηση αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική, τόσο υπό την έννοια της αξιολόγησης της ανθεκτικότητας, όσο και στο πλαίσιο της δημιουργίας ανθεκτικών πληθυσμών σε υψηλές συγκεντρώσεις φωσφίνης.

Abstract

In a series of bioassays insect mortality after specific exposure intervals to phosphine in selected insect species was examined, as well as the appearance of the so called "sweet spot". The insects that were tested were: *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae), *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) and *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae) with populations that had different levels of phosphine resistance. Evaluation was conducted by using the Detia Degesch Phosphine Tolerance Test Kit (DDPTTK), with exposure of the adult's stage for 15, 30, 60, 90, 150 and 300 minutes at 3000 ppm. At the end of these intervals (separate bioassays for each time interval) the insects were transferred to petri dishes, in which recovery was recorded at different time intervals (2 hours, 1, 2 and 7 days). The majority of susceptible populations of all species were instantly immobilized even in the shortest exposure period (15 minutes) in contrast with resistant populations, that were active even after 300 minutes. After exposure to phosphine, populations and exposure time affected mortality of susceptible populations, whereas resistant populations recovered regardless of species and exposure time. The bioassays at concentrations of 500, 1000, 2000 and 3000 ppm for 1, 3, 5, 20, 30 and 40 hours showed the presence of the "sweet spot", i.e., decrease of mortality with increase of concentration. In fact, for most of the tested species, the "sweet spot" appeared in 1000 and 2000 ppm at a 5-hour exposure time. This observation is particularly important both in terms of the assessment of resistance and in the context of non-linear recovery at elevated concentrations.

Εγώ, η Λαμπίρη Ευαγγελία, είμαι ο συγγραφέας αυτής της Μ.Δ.Ε. Αυτή η Μ.Δ.Ε. αντικατοπτρίζει την έρευνα που έγινε από εμένα και δεν έχει υποβληθεί (εξ ολοκλήρου ή μέρος της) σαν προπτυχιακή διατριβή ή Μ.Δ.Ε. ή ως μέρος Διδακτορικής Διατριβής σε αυτό ή άλλο Προπτυχιακό ή Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών Ιδρυμάτων Τριτοβάθμιας Εκπαίδευσης του εσωτερικού ή εξωτερικού. Όποια συνεργασία καθώς και το μέγεθος αυτής δηλώνονται επακριβώς στο αντίστοιχο πεδίο αυτής της διατριβής. Επίσης έχω διαβάσει όλες τις βιβλιογραφικές αναφορές που παρατίθενται στο τέλος.»

«Ως επιβλέπων της έρευνας που περιγράφεται σε αυτή τη διατριβή, δηλώνω ότι όλοι οι όροι του Εσωτερικού Κανονισμού του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος έχουν τηρηθεί από την κα Λαμπίρη Ευαγγελία».

Περιεχόμενα

| | |
|---|----|
| 1. Εισαγωγή | 10 |
| 1.1 Φωσφίνη | 10 |
| 1.2 Τρόπος δράσης και επιπτώσεις έκθεσης στην φωσφίνη | 11 |
| 1.3 Μορφές φωσφίνης | 12 |
| 1.3.1 Γυμνές μορφές | 12 |
| 1.3.2 Καλυμμένες μορφές | 14 |
| 1.3.3 Προϊόντα φωσφίνης..... | 16 |
| 1.4 Οδηγίες για σωστή εφαρμογή της φωσφίνης και μέτρα προστασίας | 16 |
| 1.5 Ανθεκτικότητα στην φωσφίνη | 22 |
| 1.5.1 Πρωτόκολλα αξιολόγησης ανθεκτικότητας στην φωσφίνη..... | 24 |
| 1.6 Σχέση χρόνου έκθεσης και συγκέντρωσης φωσφίνης | 26 |
| 1.7 Κυριότερα είδη εντόμων αποθηκευμένων προϊόντων | 27 |
| 1.8 Σκοπός της παρούσας μελέτης..... | 31 |
| 2. Υλικά και Μέθοδοι | 32 |
| 2.1 Έντομα..... | 32 |
| 2.2 Βιοδοκιμή ¹ : Σχέση μεταξύ «ακινητοποίησης» και «ανάληψης» | 32 |
| 2.3 Βιοδοκιμή ² : Αναζήτηση του «sweet spot»..... | 34 |
| 2.4 Στατιστική ανάλυση..... | 36 |
| 3. Αποτελέσματα..... | 37 |
| 3.1 Σχέση μεταξύ ακινητοποίησης και ανάληψης | 37 |
| 3.2 Εύρεση του «sweet spot»..... | 54 |
| 4. Συζήτηση..... | 71 |
| 5. Συμπεράσματα | 74 |
| 6. Βιβλιογραφία | 75 |

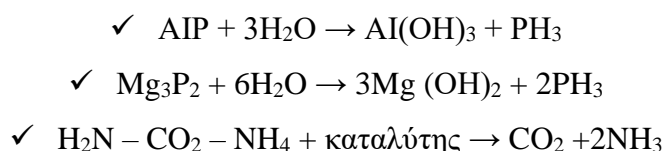
1.Εισαγωγή

1.1 Φωσφίνη

Η φωσφίνη ή φωσφορούχο υδρογόνο είναι αέριο με μοριακό τύπο PH_3 , μοριακό βάρος 34.04 και ειδικό βάρος 1.214, παρόμοιο με αυτό του αέρα, γεγονός στο οποίο οφείλεται η ταχύτατη και ομοιόμορφη κατανομή του αερίου στο χώρο αλλά και στα προς απεντόμωση προϊόντα (Phillips et al., 2012; Σταμόπουλος, 2013). Είναι άχρωμο με οσμή που προσομοιάζει σε αυτή της «ασετιλίνης» ή του σκόρδου ή ψαριών σε αποσύνθεση (Phillips et al., 2012; Σταμόπουλος, 2013; Abdollahi and Mehrpour, 2014). Έχει υψηλή τάση ατμών 3.6 MPa στους 20 °C (Bettermann et al., 2000) και αποτελεί το κατεξοχήν υποκαπνιστικό απεντομωτικό μέσο με εφαρμογή τόσο στα ίδια τα προϊόντα όπως στις περιπτώσεις των σπόρων δημητριακών, των ελαιούχων σπόρων και των αποξηραμένων φρούτων αλλά και σε εγκαταστάσεις αποθήκευσης ή μεταφοράς τροφίμων (Bell, 2000; Chaundry, 2000; Sousa et al., 2009; Nayak et al., 2013; Jagadeesan et al., 2015).

Κάποια από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά της φωσφίνης που την έχουν αναδείξει ως κύριο εκπρόσωπο των υποκαπνιστικών εντομοκτόνων στην αγορά για πάνω από 50 χρόνια είναι η υψηλή αποτελεσματικότητά της έναντι ευρέως φάσματος εντόμων, ακάρεων και τρωκτικών όλων των σταδίων καθώς και η ευκολία και το χαμηλό κόστος εφαρμογής της (Price and Mills, 1988; Hagstrum et al., 1999; Wilkin et al., 1999; Benhalima et al. 2004; Nayak and Collins, 2008). Επιπρόσθετα, αφήνει μηδενικά υπολείμματα στο προϊόν, έχει αμελητέα υπολειμματική δράση και δε οδηγεί σε αλλοίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των προς απεντόμωση προϊόντων (Price and Mills 1988; Chaundry, 2000; Benhalima et al. 2004; Nayak and Collins, 2008).

Ωστόσο, η φωσφίνη είναι ένα αέριο με υψηλή αναφλεξιμότητα όταν απαντάται στην καθαρή της μορφή ή όταν η συγκέντρωσή της στον περιβάλλοντα χώρο φτάσει τα 18.000 ppm, δηλαδή όταν καταληφθεί το 1.8% του αέρα της ατμόσφαιρας κατ' όγκο με το αέριο (Phillips et al., 2012; Σταμόπουλος, 2013). Η περίπτωση αυτή είναι σπάνια αλλά όχι αδύνατη καθώς έχουν σημειωθεί εκρήξεις είτε από πλημμελείς εφαρμογές του αερίου είτε σε μικρούς αποθηκευτικούς χώρους όταν η ποσότητα των σφαιριδίων ή δισκίων υπερβεί την συνιστώμενη δόση (Phillips et al., 2012). Βέβαια, το πρόβλημα αυτό έχει εξαλειφτεί με την τυποποίηση της φωσφίνης ως μίγμα φωσφορούχου αργιλίου (AIP) ή φωσφορούχου μαγνησίου (Mg_3P_2) με καρβαμιδική αμμωνία. Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα υπό την επίδραση της υγρασίας της ατμόσφαιρας είναι οι εξής:



Όπως παρατηρούμε, το φωσφορούχο αργίλιο και το φωσφορούχο μαγνήσιο διασπώνται σε φωσφίνη ενώ η καρβαμιδική αμμωνία σε διοξείδιο του άνθρακα και αμμωνία, τα οποία μετριάζουν την ανάφλεξη της φωσφίνης (Ζιώγας and Μαρκόγλου, 2010). Σύμφωνα με τις παραπάνω αντιδράσεις, διπλάσια ποσότητα φωσφίνης παράγεται από το φωσφορούχο μαγνήσιο ενώ ο ρυθμός και των δύο αντιδράσεων εξαρτάται από την θερμοκρασία και την υγρασία του χώρου απεντόμωσης (Phillips et al., 2012).

Ένας ακόμη παράγοντας που μπορεί να περιορίσει την εφαρμογή της φωσφίνης σε ορισμένες εγκαταστάσεις είναι ότι πρόκειται για ισχυρά διαβρωτικό αέριο έναντι διαφόρων μετάλλων όπως ο χρυσός, το ασήμι, ο χαλκός αλλά και κράματα αυτών (Nayak and Collins, 2008; Phillips et al., 2012; Athanassiou et al., 2019). Για αυτό το λόγο, εργοστάσια και βιομηχανίες που είναι κατεξοχήν χώροι με ηλεκτρονικές συσκευές, ηλεκτρονικούς πίνακες και εξοπλισμό, φωτισμούς, υπολογιστές κ.α. σε περίπτωση υποκαπνισμού με φωσφίνη διατρέχουν σοβαρό κίνδυνο καταστροφής ή βλάβης όλων των παραπάνω (Phillips et al., 2012).

1.2 Τρόπος δράσης και επιπτώσεις έκθεσης στην φωσφίνη

Ο τρόπος δράσης της φωσφίνης δεν έχει διασαφηνιστεί πλήρως (Rajendran and Gunasekaran, 2002; Phillips et al., 2012). Γενικότερα, θεωρείται ότι η φωσφίνη παρεμβάλλεται στο μεταβολισμό του οξυγόνου αναστέλλοντας την δράση της κυτοχρωμικής οξειδάσης (Phillips et al., 2012) και μεταβάλλοντας το σθένος της αίμης, που αποτελεί συστατικό της αιμογλοβίνης (Abdollahi and Mehrpour, 2014). Για αυτό το λόγο, απουσία οξυγόνου η φωσφίνη δε δύναται να είναι τοξική και επομένως εφαρμογή της φωσφίνης σε συνδυασμό με ελεγχόμενες ατμόσφαιρες χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου, θα είχε σαν συνέπεια την μείωση της αποτελεσματικότητας του αερίου και την αποτυχία της απεντόμωσης (Bond et al., 1967, 1969; Sato et al., 1973; Chefurka et al., 1976; Phillips et al., 2012; Athanassiou et al., 2016).

Άμεση συνέπεια της τοξικότητας της φωσφίνης είναι το οξειδωτικό στρες που προκαλεί αύξηση της εξωμιτοχονδριακής απελευθέρωσης ελεύθερων ριζών οξυγόνου οδηγώντας έτσι στην υπεροξειδωση και μετουσίωση των λιπιδίων και της πρωτεΐνης της κυτταρικής μεμβράνης, αντίστοιχα, σε διάφορα όργανα. Επίσης, η φωσφίνη επιδρά στην

ομαλή λειτουργία και εκδήλωση μίας εκ των κυριότερων γραμμών αντιοξειδωτικής άμυνας, της γλουταθειόνης μειώνοντας σημαντικά τα επίπεδά της στον οργανισμό που έχει εκτεθεί στο αέριο (Abdollahi and Mehrpour, 2014). Ακόμη, δύναται να προκαλέσει αλλαγές στο μεταβολισμό της γλυκόζης, στην σύνθεση των πρωτεϊνών και στην ενζυματική δραστηριότητα, ειδικότερα στα μιτοχόνδρια των πνευμόνων και των καρδιακών κυττάρων, με αποτέλεσμα την διακοπή μεταφοράς ηλεκτρονίων στην αλυσίδα μεταφοράς μιτοχονδριακών ηλεκτρονίων (Chefurka et al., 1976; Price and Bell, 1981; Abdollahi and Mehrpour, 2014). Τέλος, η φωσφίνη μπορεί να οδηγήσει σε μετουσίωση διαφόρων ενζύμων και του μορίου της οξυαιμογλοβίνης, ενώ θεωρείται υπεύθυνη για επιπλοκές στην κυτταρική αναπνοή (Abdollahi and Mehrpour, 2014).

Η επίδραση της φωσφίνης στον άνθρωπο και σε τρωκτικά που έχουν εισπνεύσει το τοξικό αέριο έχει να κάνει με μία σειρά αντιδράσεων που συμβαίνουν εντός του εκάστοτε οργανισμού. Αρχικά, φωσφίνη παράγεται όταν τα άλατα φωσφιδίου έλθουν σε επαφή με το υδροχλωρικό οξύ του στομάχου και από εκεί κατανέμεται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος σε όλα τα όργανα του σώματος. Τα άλατα του φωσφιδίου αντιδρούν με ελεύθερη αιμογλοβίνη και αιμογλοβίνη σε ακέραια ερυθροκύτταρα παράγοντας το αιχιχρόμο. Επιπλέον, όταν η συγκέντρωση του φωσφιδίου *in vitro* ξεπεράσει το όριο των $1.25 \mu\text{g ml}^{-1}$ δημιουργούνται τα σώματα Heinz, που αποτελούν μετουσιωμένα συσσωματώματα αιμογλοβίνης, που οδηγούν σε ενδοαγγειακές επιπλοκές, όπως η αιμόλυση και η μεθεμογλοβιναιμία, οι οποίες αυξάνουν την συμβολή των ερυθροκυττάρων στη βιομετατροπή της φωσφίνης στους ανθρώπους. Η φωσφίνη απεκκρίνεται στα ούρα υπό μορφή υποφωσφορώδους άλατος και εκπνέεται επίσης στην αμετάβλητη της μορφή (Abdollahi and Mehrpour, 2014).

Τα δεδομένα που υπάρχουν στην βιβλιογραφία σχετικά με την επίδραση της φωσφίνης σε ορισμένους οργανισμούς μη - στόχους είναι ιδιαίτερα περιορισμένα. Σε πείραμα που έχει διεξαχθεί σε δύο είδη πουλερικών (γαλοπούλες και κόττες), ολική θνησιμότητα επιτεύχθηκε ύστερα από την έκθεση τους σε 211 και 224 mg m^{-3} φωσφίνης για διάρκεια 74 και 59 λεπτών, αντίστοιχα (Σταμόπουλος, 2013).

1.3 Μορφές φωσφίνης

1.3.1 Γυμνές μορφές

Το φωσφορούχο υδρογόνο είναι εμπορικά διαθέσιμο σε διάφορες μορφές, οι οποίες ποικίλλουν ανάλογα με την χρήση τους σε χώρο ή προϊόν αλλά και την επιθυμητή

ταχύτητα απεντόμωσης. Έτσι διατίθενται σε δισκία (tablets) (Εικόνα 1) διαμέτρου 2 cm και βάρους 3 g, από τα οποία εκλύεται 1 g φωσφίνης, ενώ εμπεριέχεται 57% καθαρό φωσφορούχο αργίλιο. Εφαρμόζονται τόσο σε κενούς χώρους όσο και σε χύμα προϊόν μέσω ενός ειδικού εξαρτήματος της καλούμενης «σόντας». Αυτό το είδος σκευάσματος, αφήνει μη τοξικά υπολείμματα στο προϊόν (Σταμόπουλος, 2013).



Εικόνα 1: Tablets φωσφίνης.

<https://www.barrettineenv.co.uk/uploads/assets/products/Fumigants/Fumigation-Tablets-P/fumigation-tablets-p.jpg>

Μία άλλη μορφή στην οποία απαντάται η φωσφίνη είναι αυτή των σφαιριδίων (pellets) (Εικόνα 2) η χρήση των οποίων είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη σε εγκαταστάσεις μεγάλου όγκου, όπως σε σιλό, αλευρόμυλους, εμπορευματοκιβώτια, αμπάρια πλοίων κ.α. Έχουν διάμετρο 9 mm, βάρος 0.6 g και προσφέρουν 0.2 g φωσφίνης. Σκευάσματα αυτής της μορφής κυκλοφορούν στο εμπόριο έχοντας ως βάση τόσο φωσφορούχο αργίλιο όσο και φωσφορούχο μαγνήσιο. Η χρήση δισκίων που έχουν σαν δραστική ουσία φωσφορούχο μαγνήσιο έχουν ως αποτέλεσμα την άμεση παραγωγή φωσφίνης και την αμελητέα εναπόθεση υπολειμμάτων στο χώρο και στο προϊόν. Ιδιαίτερα διαδεδομένη είναι η εφαρμογή των σφαιριδίων αυτών σε σιλό με την χρήση ειδικού κυκλοφορητή του αερίου που καλείται «recirculation system» (Σταμόπουλος, 2013).



Εικόνα 2: Pellets φωσφίνης.

<http://www.uky.edu/Ag/Entomology/PSEP/images/phospellets.jpg>

1.3.2 Καλυμμένες μορφές

Για ρυθμιζόμενη απελευθέρωση του αερίου και επομένως μεγαλύτερη διάρκεια απεντόμωσης σε σχέση με τις προαναφερθείσες μορφές συνίσταται η χρήση φακέλων ή σακιδίων (fumigation bags) (Εικόνα 3). Σε αυτές τις μορφές, σκεύασμα 34 g βρίσκεται εσώκλειστο εντός χάρτινου περιβλήματος και η συνολική ποσότητα φωσφίνης που εκλύεται ανέρχεται στα 11.3 g. Επομένως, τα υπολείμματα που τυχόν παράγονται παραμένουν εντός των φακέλων, παρέχοντας μεγαλύτερη ασφάλεια στην εφαρμογή τους (Σταμόπουλος, 2013).



Εικόνα 3: Σακίδια ή φάκελοι φωσφίνης.

[\(http://www.apolimantikilttd.gr/english/Products/Fumigants/\)](http://www.apolimantikilttd.gr/english/Products/Fumigants/)

Μία παραλλαγή των σακιδίων αποτελούν οι κουβέρτες (bag blanket) (Εικόνα 4), οι οποίες είναι δύο ειδικά χάρτινα φύλλα μήκους 4.5 m, πλάτους 20 cm εντός των οποίων περιέχονται 100 σακίδια με 3.5 kg σκευάσματος που απελευθερώνει 1.2 kg φωσφίνης. Οι κουβέρτες χρησιμοποιούνται για απεντόμωση μεγάλων αποθηκευτικών χώρων και αμπαριών πλοίων κατά την διάρκεια της μεταφοράς του προϊόντων, ενώ εφαρμογή τους μπορεί να γίνει και εντός του σωρού σπόρων δημητριακών. Απαραίτητη προϋπόθεση στην περίπτωση των κουβερτών είναι η άριστη κάλυψη των χώρων που προορίζονται για απεντόμωση με αδιαπέραστο πλαστικό κάλυμμα για την αποφυγή τυχόν διαρροών του αερίου. Επίσης, επιτακτικό μέτρο για την προστασία και ασφάλεια του προσωπικού αποτελεί η τακτική επιθεώρηση του αερίου (κάθε 6 ώρες) για πιθανές διαρροές μέσω ειδικών ανιχνευτών (Σταμόπουλος, 2013).



Εικόνα 4: Σκεύασμα φωσφίνης σε μορφή κουβέρτας.

<https://catalogue.killgerm.com/insect-control/grain-fumigation>

Ακόμη, τα πλακίδια (plates) και οι ταινίες (strips) (Εικόνα 5) αποτελούν συχνά εμφανιζόμενες μορφές σκευασμάτων σε μεγάλες αποθήκες με ή χωρίς προϊόντα. Πολυαιθυλένιο διαστάσεων 28X17 cm, το οποίο περιέχει φωσφορούχο μαγνήσιο συνιστά τα πλακίδια και συνολικά αποδίδουν 33 g τοξικού αερίου, ενώ 20 πλακίδια ενωμένα μεταξύ τους τα οποία δίδουν 660 g φωσφίνης αποτελούν τις ταινίες. Στις δύο αυτές μορφές η πλήρης έλκυση του αερίου υπό κανονικές συνθήκες καπνισμού είναι στις 3 ημέρες (Σταμόπουλος, 2013).



A



B

Εικόνα 5: Φωσφίνη σε πλακίδια και ταινίες.

A: (Από προσωπική συλλογή Υποψήφιας Διδάκτορα Αγραφιώτη Παρασκευής)

B: (<http://www.apolimantikiltd.gr/english/Products/Fumigants/>)

1.3.3 Προϊόντα φωσφίνης

Βέβαια, η φωσφίνη δύναται να διοχετευτεί στο χώρο αποθήκευσης των προϊόντων και απευθείας ως αέριο είτε μέσω μιας γεννήτριας φωσφίνης είτε από κυλίνδρους αερίων όπου η φωσφίνη διατηρείται υπό πίεση (Εικόνα 6). Η διάταξη της γεννήτριας είναι απλή καθώς απαιτείται ένα μόνο δοχείο αντίδρασης, εντός του οποίου και κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες λαμβάνει χώρα η αντίδραση του φωσφορούχου αργιλίου ή μαγνησίου με το νερό και στην συνέχεια η φωσφίνη διοχετεύεται στο χώρο ή το προϊόν. Από την άλλη πλευρά, στους κυλίνδρους αερίων η φωσφίνη μπορεί να εμπεριέχεται είτε ως μίγμα με 2% διοξείδιο του άνθρακα ή ως σχεδόν καθαρή φωσφίνη. Στην πρώτη περίπτωση το μίγμα διοχετεύεται απευθείας στο προς απεντόμωση χώρο ενώ στην δεύτερη θα πρέπει να προηγηθεί άμεση ανάμειξη της φωσφίνης με τον αέρα ή με φιάλη διοξειδίου και στην συνέχεια να γίνει η εφαρμογή (Phillips et al., 2012).



Εικόνα 6: Μίγμα φωσφίνης με διοξείδιο του άνθρακα ή άζωτο υπό πίεση σε κύλινδρο.

(Από προσωπική συλλογή)

1.4 Οδηγίες για σωστή εφαρμογή της φωσφίνης και μέτρα προστασίας

Η αποτελεσματικότητα του υποκαπνισμού με φωσφίνη εξαρτάται από μια πληθώρα παραγόντων, όπως η θερμοκρασία του χώρου ή του προϊόντος, η συγκέντρωση του αερίου καθώς και η χρονική διάρκεια που το αέριο παραμένει στην επιθυμητή για την

απεντόμωση συγκέντρωση. Έχει αποδεχτεί ότι μεταβολή ενός εκ των παραπάνω παραγόντων ή συνδυασμός αυτών, δύναται να επιφέρει αλλαγές στην αποτελεσματικότητα της φωσφίνης (Lindgren and Vincent, 1966; Bell, 1976; Hole et al., 1976; Bond, 1984; Nayak and Collins, 2008; Phillips et al., 2012).

Στην περίπτωση που γίνεται εφαρμογή της φωσφίνης σε χύδην προϊόν θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η θερμοκρασία του προϊόντος, διαφορετικά η θερμοκρασία του αποθηκευτικού χώρου θα πρέπει να υπολογίζεται εκ των προτέρων (Σταμόπουλος, 2013). Σύμφωνα με τις οδηγίες, η θερμοκρασία περιβάλλοντος θα πρέπει να υπερβαίνει τους 40° F και να μην ξεπερνά τους 80 με 90° F, ενώ η σχετική υγρασία θα πρέπει να κυμαίνεται στο 70% ή και παραπάνω (Phillips et al., 2012). Όταν το προϊόν που προορίζεται προς απεντόμωση είναι ο καπνός, τότε η θερμοκρασία του χώρου έχει πρωταρχική σημασία (CORESTA Guide N°2, 2013).

Ωστόσο, για να επιτευχθούν υψηλά ποσοστά επιτυχίας αλλά και να εξασφαλιστεί η ασφάλεια του προσωπικού θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι απαραίτητες οδηγίες εφαρμογής. Σε αυτές περιλαμβάνονται η απασχόληση μόνο καταρτισμένου προσωπικού που θα διεξάγει την απεντόμωση και θα τηρεί όλες τις συνιστώμενες προφυλάξεις καθώς και η χρήση των κατάλληλων υλικών κάλυψης των προϊόντων (π.χ. tarpaulins) (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Κάλυψη προϊόντων με ειδικά καλύμματα πολύ (tarpaulins).

<http://shaktipolytarp.com/Tarpaulins.html>

Ακόμα, θα πρέπει να γίνεται επιμελές σφράγισμα των ανοιγμάτων του χώρου που προορίζεται για απεντόμωση (π.χ. πόρτες, παράθυρα, αεραγωγοί κτλ.) με ειδικά υλικά κάλυψης, προκειμένου να αποφευχθούν τυχόν διαρροές σε γειτονικούς χώρους (Εικόνα 8). Ιδιαίτερη σημασία θα πρέπει να δίνεται και σε επιφάνειες ή όργανα που είναι

κατασκευασμένα από μέταλλα όπως το ασήμι, ο χαλκός ή κράματα αυτών καθώς αυτά θα πρέπει να καλύπτονται με ειδικό πλαστικό ή όταν πρόκειται για επιφάνειες μικρών διαστάσεων με παραφίνη.



Εικόνα 8: Σφράγισμα των ανοιγμάτων του χώρου. (Από διαφάνειες διαλέξεων Καθηγητή Χ. Γ. Αθανασίου)

Πρωτίστης σημασίας κρίνεται επίσης και η ενημέρωση όλων των εργαζομένων ή κατοίκων που διαμένουν κοντά στην περιοχή που θα διεξαχθεί η απεντόμωση σχετικά με την ημερομηνία και το χρονικό διάστημα που θα διαρκέσει η όλη διαδικασία ενώ δε θα πρέπει να παραληφθεί η τοποθέτηση σημάνσεων και πινακίδων που θα απαγορεύουν την είσοδο στο χώρο υποκαπνισμού για όλο την διάρκεια, αυτού (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Σημάνσεις κινδύνου έξω από το χώρο απεντόμωσης.

<https://i.ytimg.com/vi/BUmckOEIXKQ/maxresdefault.jpg>

Αφού ολοκληρωθεί η απεντόμωση, το εκπαιδευμένο προσωπικό με τον κατάλληλο εξοπλισμό που περιλαμβάνει μάσκες με ειδικά φίλτρα τεσσάρων χρωμάτων

και ανιχνευτές φωσφίνης, προβαίνει αρχικά σε αποσφράγιση της εισόδου του χώρου υποκαπνισμού και έπειτα σε αερισμό του χώρου ανοίγοντας πόρτες, παράθυρα και το σύστημα εξαερισμού. Θα πρέπει, βέβαια να τονισθεί πως τα ειδικά φίλτρα παρέχουν προστασία σε συγκέντρωση φωσφίνης στον αέρα έως 0.5%, διαφορετικά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις επιβάλλεται η χρήση αυτόνομων αναπνευστικών συσκευών από τους εφαρμοστές (Εικόνα 10). Έπειτα, απομακρύνονται τα ειδικά καλύμματα και ο χώρος αερίζεται έως ότου οι ενδείξεις των γυάλινων ανιχνευτών δείξουν επίπεδα φωσφίνης κάτω του επιτρεπτού ορίου. Ως μέγιστα επιτρεπτά όρια υπολειμμάτων φωσφίνης θεωρούνται για την περίπτωση των σπόρων τα 0.1 ppm, ενώ για την περίπτωση τροφίμων και προϊόντων τα 0.01 ppm. Στα όρια αυτά ωστόσο, παρατηρούνται αυξομειώσεις ανάλογα με το νομοθετικό πλαίσιο της κάθε χώρας (Σταμόπουλος, 2013).



A



B

Εικόνα 10: Μάσκα και ειδικό φίλτρο (αριστερά) και αυτόνομη αναπνευστική συσκευή (δεξιά).

A: (<https://detia-degesch.de/produkt/geraete-und-zubehoer/>)

B: (Από διαφάνειες διαλέξεων Καθηγητή Χ. Γ. Αθανασίου)

Οι ανιχνευτές αυτοί συνήθως είναι γυάλινοι σωλήνες (Εικόνα 11), οι οποίοι μπορούν να ανιχνεύσουν συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 20 έως 800 ppm (χρήση κατά την διάρκεια της απεντόμωσης) ή 1 έως 4 ppm (χρήση μετά το πέρας της απεντόμωσης). Στο εμπόριο κυκλοφορούν και ηλεκτρονικοί ανιχνευτές, φορητοί ή σταθεροί, η χρήση των οποίων προορίζεται για μεγάλες εγκαταστάσεις όπου διεξάγονται εντατικοί υποκαπνισμοί με φωσφίνη (Εικόνα 12) (Σταμόπουλος, 2013).



A

B

Γ

Εικόνα 11: Γυάλινοι σωληνίσκοι ανίχνευσης φωσφίνης.

A: (Από προσωπική συλλογή)

B: (<http://gms-instruments.com/product/gas-detector-tubes/>)

Γ: (Από προσωπική συλλογή Υποψήφιας Διδάκτορα Αγραφιώτη Παρασκευής)



Α

Β

Γ



Δ

Ε

Εικόνα 12: Ηλεκτρονικοί ανιχνευτές φωσφίνης.

Α, Δ, Ε: (Από προσωπική συλλογή Υποψήφιας Διδάκτορα Αγραφιώτη Παρασκευής)

Β: (Από προσωπική συλλογή)

Γ: (<https://gastech.com/SiloChek>)

Είναι γνωστό πως η φωσφίνη δε αφήνει υπολείμματα στα προϊόντα, παρόλα αυτά υπάρχει η πιθανότητα μικρό ποσοστό του σκευάσματος να μην αντιδράσει με την υγρασία της ατμόσφαιρας και έτσι να παραμείνει AIP ή Mg_3P_2 στα προϊόντα ή στις συσκευασίες αυτών. Τέτοιου είδους υπολείμματα θα πρέπει να απομακρύνονται από το χώρο με αναρρόφηση. Γενικότερα, μετά την απεντόμωση για την καταστροφή των υπολειμμάτων φωσφίνης, η σκόνη του φωσφιδίου που προκύπτει τοποθετείται σε βαρέλι ή δοχείο με

νερό και 2% απορρυπαντικό και μετά το τέλος της αντίδρασης του σκευάσματος που απέμεινε (παραγωγή φυσαλίδων), απομακρύνεται το παραγόμενο μίγμα σε αγωγό λυμάτων ή θάβεται στο έδαφος ή καίγεται ανάλογα τις ισχύουσες διατάξεις κάθε χώρας. Οι διαφόρων μορφών συσκευασίες του σκευάσματος απομακρύνονται σε ειδικούς κάδους αποβλήτων ενώ από την εταιρεία Detia Degesch GbmH (Γερμανία) κυκλοφορεί μία ειδική συσκευή απορρόφησης της φωσφίνης από το χώρο μετά το τέλος του υποκαπνισμού. Βέβαια, η συσκευή αυτή δύναται να χρησιμοποιηθεί μόνο σε περιπτώσεις μεγάλων μονάδων αποθήκευσης ή επεξεργασίας τροφίμων και προϊόντων (Σταμόπουλος, 2013).

1.5 Ανθεκτικότητα στην φωσφίνη

Παρά την πληθώρα των θετικών χαρακτηριστικών και επιδράσεων που προσφέρει ο υποκαπνισμός με φωσφίνη, η αυξημένη και αλόγιστη χρήση της σε συνδυασμό με την ατελή και πλημμελή πολλές φορές εφαρμογή της, οδήγησε στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας των εντόμων που εκτίθενται στο αέριο (Bengston et al., 1999; Chaudhry, 2000; Collins et al., 2002, Daghli, 2004; Nayak et al., 2015; Agrafioti et al., 2019). Η ανθεκτικότητα εντόμων στην φωσφίνη είναι ένα παγκόσμιο πρόβλημα που έχει λάβει ανησυχητικές διαστάσεις, καθώς ανθεκτικοί πληθυσμοί εντόμων αποθηκευμένων προϊόντων έχουν ανιχνευτεί στα περισσότερα μέρη του κόσμου και τουλάχιστον σε 11 είδη (Chaudhry et al., 2000; Benhalima et al., 2004; Wang et al., 2006; Nayak et al., 2012; Opit et al., 2012; Kaur et al., 2015; Cato et al., 2017; Agrafioti et al., 2019; Athanassiou et al., 2019).

Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής πολλές έρευνες αποδεικνύουν την ύπαρξη ανθεκτικότητας στην φωσφίνη σε πολλά είδη εντόμων (Opit et al., 2012; Chen et al., 2015; Saglam et al., 2015; Cato et al., 2017; Afful et al., 2018). Για παράδειγμα, οι Opit et al. (2012) εξέτασαν 9 διαφορετικούς πληθυσμούς του *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) και 5 διαφορετικούς πληθυσμούς του *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae), οι οποίοι συλλέχθηκαν από διαφορετικές τοποθεσίες της Οκλαχόμα και κατέληξαν στο ότι 8 από τους 9 πληθυσμούς του *T. castaneum* και όλοι οι πληθυσμοί του *R. dominica* ήταν ανθεκτικοί στην φωσφίνη.

Στην Αυστραλία, το φαινόμενο της ανθεκτικότητας είναι εντονότερο καθώς έχουν ανιχνευθεί πληθυσμοί με ισχυρή ανθεκτικότητα για διάφορα είδη, όπως το *R. dominica* (Collins et al., 2005), το *Liposcelis bostrychophila* Badonnel (Psocoptera: Liposcelidae)

(Nayak and Collins, 2008), το *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) (Holloway et al., 2016), το *T. castaneum* (Jagadeesan et al., 2012) και το *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) (Coleoptera: Laemophloeidae) (Nayak et al., 2013).

Αντίστοιχα, στην Βραζιλία σε πείραμα που διεξήχθη από τους Pimentel et al. (2009) καταγράφηκαν 20 ανθεκτικοί πληθυσμοί του *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) εκ των 22 που εξετάστηκαν, ενώ έχουν διαπιστωθεί ανθεκτικά στελέχη των *T. castaneum* και *O. surinamensis* (Pimentel et al., 2010), καθώς και ισχυρή ανθεκτικότητα στο *R. dominica* (Lorini et al., 2007; Pimentel et al., 2010).

Στην Τσεχία σύμφωνα με τους Aulicky et al. (2019) έγινε πρόσφατα η πρώτη καταγραφή ανθεκτικών πληθυσμών των *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) και *T. castaneum*. Αντίστοιχα, οι Agrafioti et al. (2019), σε τεστ ανθεκτικότητας που διεξήγαγαν σε πληθυσμούς εντόμων πεδίου από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας συμπέραναν ότι 2 από τους 4 πληθυσμούς του *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae), 4 από τους 6 του *S. oryzae*, 21 από τους 27 του *Tribolium confusum* Jacquelin du Val (Coleoptera: Tenebrionidae), 2 από τους 2 του *C. ferrugineus*, 5 από τους 5 του *T. castaneum* και 8 από τους 8 του *R. dominica* ήταν ανθεκτικοί. Υπάρχουν και άλλες καταγραφές σε χώρες όπως η Κίνα (Song et al., 2011), η Ινδία (Rajendran and Narasimhan, 1994; Kaur et al., 2015), το Μαρόκκο (Benhalima et al., 2004) και το Πακιστάν (Alam et al., 1999; Ahmad et al., 2013).

Προκειμένου να βρεθούν αποτελεσματικοί τρόποι περιορισμού ή εξάλειψης του φαινομένου αυτού, αρχικά θα πρέπει να μελετηθεί ο μηχανισμός ανθεκτικότητας των εντόμων στην φωσφίνη, γεγονός ιδιαίτερα πολύπλοκο καθώς η βιοχημική του βάση δε έχει σαφηνιστεί επακριβώς (Bell, 2000; Chaudhry, 2000; Zettler and Arthur, 2000). Ο μειωμένος ρυθμός αναπνοής και μεταβολισμού της φωσφίνης από τα ανθεκτικά άτομα είναι ο μηχανισμός ανθεκτικότητας στην φωσφίνη, που οι περισσότερες έρευνες θεωρούν αποδεκτό (Bond and Monro, 1967; Bond et al., 1969; Monro et al., 1972; Pimentel et al., 2007; Ramzan et al., 2018). Ωστόσο σύμφωνα με τον Chaundry (2000), η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στην φωσφίνη ορισμένων πληθυσμών εντόμων είναι αποτέλεσμα είτε της αποτοξικοποίησης μεγάλης ποσότητας φωσφίνης που αυτά προσλαμβάνουν μέσω της αναπνοής είτε δομικής αλλαγής της θέσης-στόχου της φωσφίνης, καθιστώντας την μη συμβατή με αυτή.

1.5.1 Πρωτόκολλα αξιολόγησης ανθεκτικότητας στην φωσφίνη

Για την ανίχνευση της ανθεκτικότητας εντόμων στην φωσφίνη έχουν δημιουργηθεί διάφορα πρωτόκολλα με πολλές παραλλαγές (Nayak et al., 2012; Chen et al., 2015; Collins et al., 2017; Agrafioti et al., 2019). Βέβαια, τα αποτελέσματα των πρωτοκόλλων διαφέρουν, ενώ αυτά που προσδίδουν την μεγαλύτερη ακρίβεια είναι τα εργαστηριακά, τα οποία θεωρούνται ιδιαίτερα χρονοβόρα και κοστοβόρα (Athanassiou et al., 2019). Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται με την μεγαλύτερη συχνότητα είναι αυτό του Food and Agriculture Organization (FAO), σύμφωνα με το οποίο τα έντομα που θέλουμε να εξετάσουμε για ανάπτυξη ανθεκτικότητας τοποθετούνται σε γυάλινα βάζα και εκτίθενται για 20 ώρες στα 30 ppm φωσφίνης (FAO, 1975; Pimentel et al., 2009, 2010; Opit et al., 2012; Chen et al., 2015).

Ωστόσο, τροποποιήσεις του FAO εφαρμόζονται συχνά σε διάφορες έρευνες (Benhalima et al., 2004; Holloway et al., 2016; Cato et al., 2017; Nayak et al., 2017; Agrafioti et al., 2019). Συγκεκριμένα, στην εργασία των Benhalima et al. (2004), προκειμένου να διαπιστωθεί το επίπεδο ανθεκτικότητας στην φωσφίνη πληθυσμών τριών ειδών εντόμων που συλλέχθηκαν από διάφορες εγκαταστάσεις στο Μαρόκο, ακολουθήθηκε το τροποποιημένο πρωτόκολλο του FAO, εκθέτοντας τα έντομα στα 1.8 g m⁻³ φωσφίνης για 20 h ή στα 0.18 g m⁻³ για 5 ημέρες. Επίσης, οι Holloway et al. (2016) διατήρησαν το χρόνο έκθεσης που προτείνει το πρωτόκολλο του FAO, διαφοροποιώντας την συγκέντρωση φωσφίνης στα 0.04 mg L⁻¹ και 0.25 mg L⁻¹ για τον προσδιορισμό ήπιας και ισχυρής ανθεκτικότητας αντίστοιχα, σε πληθυσμούς *S. oryzae* στην Αυστραλία. Ωστόσο, το πρωτόκολλο του FAO είναι μια εργαστηριακή μέθοδος που απαιτεί ειδικό εξοπλισμό για την διεκπεραίωσή του και αποτελέσματα υφίστανται μετά από χρονικό διάστημα 7 ή 14 ημερών από την εφαρμογή της φωσφίνης (Opit et al., 2012; Cato et al., 2017). Επομένως είναι ευκόλως εννοούμενο ότι μια τέτοια μέθοδος βρίσκει πρακτική εφαρμογή σε εργαστηριακές έρευνες και όχι στην βιομηχανία (Athanassiou et al., 2019).

Για το λόγο αυτό, μια ταχεία μέθοδος επισημάνσης της ανθεκτικότητας φωσφίνης σε έντομα αποθηκευμένων προϊόντων που έχει αναπτυχθεί από την εταιρεία Detia Degesch GmbH (Laudenbach, Germany) είναι το Detia Degesch Phosphine Tolerance Test Kit (DDPTTK) (Steuerwald et al., 2006). Σύμφωνα με αυτό, τα έντομα τοποθετούνται σε πλαστικές σύριγγες χωρητικότητας 100 ml, στις οποίες διοχετεύονται 3000 ppm φωσφίνης και μέσα σε διάστημα 15 λεπτών από την εφαρμογή είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε την ύπαρξη ανθεκτικότητας στον υπό εξέταση πληθυσμό εντόμων. Σημαντικό σε αυτή τη περίπτωση είναι ότι παράγοντας εκτίμησης της ανθεκτικότητας

φωσφίνης είναι η ακινητοποίηση των εντόμων και όχι η θνησιμότητα (Steuerwald et al., 2006). Βέβαια στην μέθοδο αυτή υπάρχουν ορισμένες τροποποιήσεις που αφορούν κυρίως την συγκέντρωση φωσφίνης. Για παράδειγμα, οι Athanassiou et al. (2018) χρησιμοποίησαν το DDPTTK εισάγοντας στις σύριγγες 3000 και 1000 ppm φωσφίνης σε ευαίσθητα και ανθεκτικά άτομα του *T. castaneum*, έτσι ώστε να παρακολουθήσουν την κινητικότητα των εντόμων ανά 15 λεπτά σε ένα συνολικό χρόνο έκθεσης 90 λεπτών.

Ένα εναλλακτικό γρήγορο τεστ διάγνωσης ήπιας ή ισχυρής ανθεκτικότητας των εντόμων στην φωσφίνη έχουν προτείνει οι Nayak et al. (2013), σύμφωνα με το οποίο τα έντομα εκτίθενται για 5 ώρες στα 2 mg L⁻¹ και ως κριτήριο ανθεκτικότητας θεωρείται ο χρόνος που απαιτείται για την εκδήλωση της ακινητοποίησης των εντόμων. Παράλληλα, κυκλοφορούν και πρωτόκολλα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας στην φωσφίνη που εξειδικεύονται σε συγκεκριμένα έντομα αποθηκευμένων προϊόντων όπως το πρωτόκολλο CORESTA, το οποίο αφορά τα έντομα που προσβάλλουν αποθηκευμένο καπνό (CORESTA Guide N° 2, 2013). Τέτοια έντομα είναι το *Lasioderma serricorne* (F.) (Coleoptera: Anobidae) (cigarette beetle), κν. «σκαθάρι του καπνού» και το *Ephestia elutella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) (tobacco moth), κν. «πεταλούδα του καπνού», για τα οποία έχουν θεσπιστεί συγκεκριμένοι συνδυασμοί χρόνου έκθεσης και συγκέντρωσης φωσφίνης για μία επιτυχημένη απεντόμωση λαμβάνοντας υπόψιν αρχικά την θερμοκρασία τόσο του χώρου αποθήκευσης του καπνού όσο και του ίδιου του καπνού αλλά και του επιπέδου ανθεκτικότητας στην φωσφίνη των εντόμων που προορίζονται για υποκαπνισμό (Εικόνες 13, 14) (CORESTA Guide N° 2, 2013).

| Tobacco Temperature (°C) (°F) | | Phosphine Concentration at the Bale/Case Centre (ppm) | Minimum Exposure-Time (days) |
|---|-------|---|------------------------------------|
| 16-20 | 61-68 | 300 | 6 |
| > 20 | > 68 | 200 | 4 |

Note: The tobacco temperature must be checked before the start of the fumigation.

Εικόνα 13: Ελάχιστος χρόνος έκθεσης στην φωσφίνη για την επίτευξη 100% ελέγχου όλων των σταδίων ανάπτυξης του *Ephestia elutella* και του *Lasioderma serricorne* στα 200 ή 300 ppm φωσφίνης στο κέντρο του καπνού, για μη ανθεκτικούς πληθυσμούς (CORESTA Guide N° 2, 2013).

| Tobacco Temperature (°C) (°F) | | Phosphine Concentration at the Bale/Case Centre (ppm) | Minimum Exposure-Time (days) |
|---|-------|---|------------------------------------|
| 16-20 | 61-68 | 300 | 12 |
| 20-25 | 68-77 | 300 700 | 12 10 |
| > 25 | > 77 | 300 600 | 12 6 |

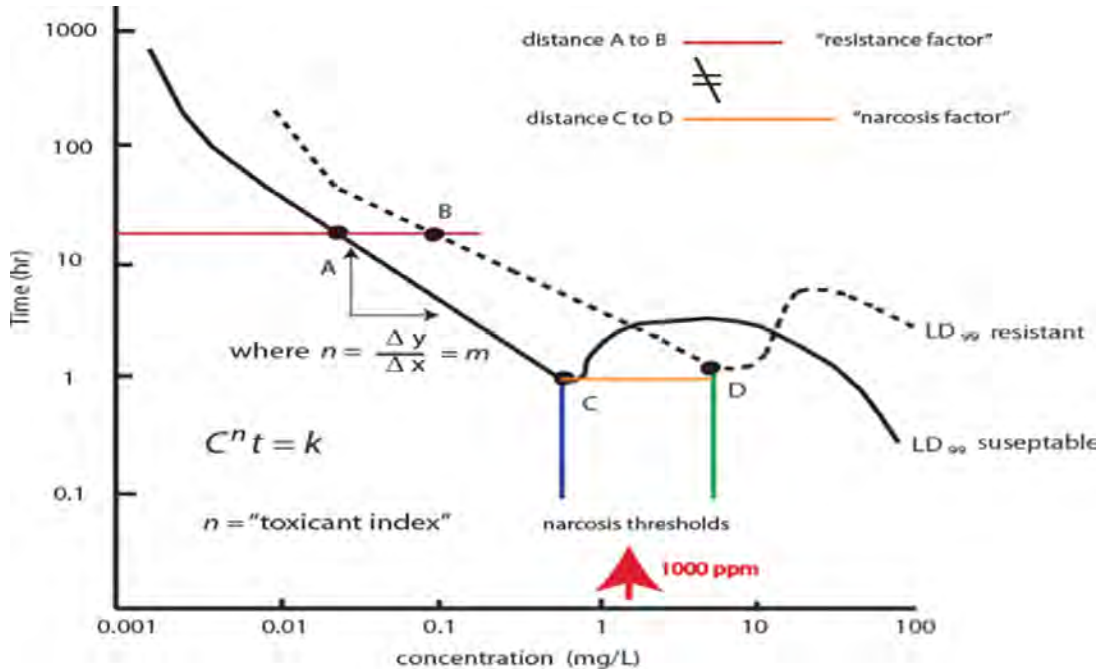
Εικόνα 14: Ελάχιστος χρόνος έκθεσης στην φωσφίνη για την επίτευξη 100% ελέγχου όλων των σταδίων ανάπτυξης ανθεκτικών πληθυσμών του *Lasioderma serricorne* στα 300, 600 ή 700 ppm φωσφίνης στο κέντρο του καπνού (CORESTA Guide N° 2, 2013).

1.6 Σχέση χρόνου έκθεσης και συγκέντρωσης φωσφίνης

Σε αντίθεση με άλλα κοινά εντομοκτόνα όπου η αποτελεσματικότητα τους εξαρτάται από την δόση εφαρμογής, στην περίπτωση της φωσφίνης η αποτελεσματικότητα της είναι συνάρτηση δύο παραγόντων: του χρόνου έκθεσης και της συγκέντρωσης. Αυτή η σχέση ως επί των πλείστον ακολουθεί ένα γραμμικό μοντέλο, δηλαδή αύξηση του χρόνου έκθεσης και της συγκέντρωσης φωσφίνης οδηγεί σε αύξηση της θνησιμότητας των εντόμων. Για παράδειγμα, στην έρευνα των Nayak et al. (2012) εκτέθηκαν τρεις πληθυσμοί του *C. ferrugineus* (εργαστηριακός, ήπιας ανθεκτικότητας και ισχυρής ανθεκτικότητας) στα 2 mg L⁻¹ φωσφίνης προκειμένου να εκτιμηθεί ο χρόνος που απαιτείται για την εκδήλωση της κατάστασης «knock-down» (ακινητοποίησης). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αύξηση του χρόνου έκθεσης στην φωσφίνη αυξάνει το ποσοστό των ακινητοποιημένων εντόμων, ενώ μεγαλύτερο χρόνο για την ακινητοποίηση 100% των εντόμων απαιτεί ο πληθυσμός *C. ferrugineus* με την ισχυρή ανθεκτικότητα.

Έχει παρατηρηθεί ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις ότι η σχέση χρόνου έκθεσης και συγκέντρωσης φωσφίνης είναι γραμμική μέχρι ενός συγκεκριμένου ορίου πέρα από το οποίο περαιτέρω αύξηση του χρόνου έκθεσης των εντόμων στην φωσφίνη ή περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης φωσφίνης επιφέρει μείωση του ποσοστού ακινητοποιημένων εντόμων (Winks, 1984, 1985) (Διάγραμμα 1). Επομένως, σε αυξημένες συγκεντρώσεις φωσφίνης παρατηρείται ένα ιδιαίτερο και παράδοξο φαινόμενο, αυτό του «γλυκού σημείου» ή «sweet spot» (Athanassiou et al., 2019), το οποίο εκδηλώνεται ανεξάρτητα του επιπέδου ανθεκτικότητας του πληθυσμού (Διάγραμμα 1). Για παράδειγμα, στις εργασίες του Winks (1984) και Winks and Waterford (1986) το φαινόμενο αυτό διαπιστώνεται τόσο σε ανθεκτικό πληθυσμό (CTC₄₇₅) όσο και σε ευαίσθητο (CTC₄) του *T. castaneum* όταν εκτίθενται σε μεγάλο εύρος υψηλών συγκεντρώσεων φωσφίνης, αφού

στις συγκεντρώσεις αυτές ο χρόνος που είναι ικανός να επιφέρει 100% θνησιμότητα των εντόμων είναι μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο σε μικρότερες συγκεντρώσεις (Διάγραμμα 1).



Διάγραμμα 1: Η σχέση μεταξύ του LD₉₉ ενηλίκων ατόμων ενός ανθεκτικού (CTC₄₇₅) και ενός ευαίσθητου πληθυσμού (CTC₄) του *T. castaneum*, οι οποίοι εκτέθηκαν σε ένα εύρος προκαθορισμένων συγκεντρώσεων φωσφίνης (τροποποιημένο από Winks, 1984).

1.7 Κυριότερα είδη εντόμων αποθηκευμένων προϊόντων

Ορισμένα από τα κυριότερα έντομα αποθηκών, τα οποία εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη, είναι τα *O. surinamensis*, *T. castaneum*, *S. oryzae*, και *R. dominica*. Το *O. surinamensis* (saw toothed grain beetle) κν. «ψείρα του σιταριού» ανήκει στην οικογένεια Silvanidae της τάξης Coleoptera (Εικόνα 15). Έχει μικρό μήκος σώματος (2.5-3 mm), είναι πεπλατυσμένο, καστανής απόχρωσης και διαθέτει θώρακα με 6 χαρακτηριστικές ακανθώδεις αποφύσεις σε κάθε πλευρά (Σταμόπουλος, 2013). Οι προνύμφες του είναι λευκές, επιμήκεις, πεπλατυσμένες και μήκους 4-5 mm.

Δύο είναι τα πιο κοινά είδη του γένους *Oryzaephilus*, το *O. surinamensis* και το *Oryzaephilus mercator* (Fauvel) (Coleoptera: Silvanidae) τα οποία είναι παρόμοια μορφολογικά αλλά διαφέρουν σημαντικά βιολογικά. Έχει παρατηρηθεί ότι το *O. surinamensis* αποτελεί περισσότερο κοσμοπολίτικο είδος σε αντίθεση με το *O. mercator* που προτιμά τις πιο θερμές περιοχές. Το *O. surinamensis* είναι ένα σημαντικό έντομο των

σιτηρών, ενώ το *O. mercator* απαντάται πιο συχνά στους ελαιούχους σπόρους, και λιγότερο συχνά στα δημητριακά. Και τα δύο είδη μπορούν να βρεθούν σε μπαχαρικά και ξηρούς καρπούς.

Το *O. surinamensis* επικρατεί στο άσπρο ρύζι σε σχέση με το *O. mercator* που εντοπίζεται στο καστανό ρύζι και σε πίτουρο ρυζιού (Haines, 1991). Επίσης, οι Trematerra et al., (2000) αναφέρουν για το *O. surinamensis* ότι το σιτάρι που έχει προηγουμένως μολυνθεί από *Tribolium* spp. αποτελεί πιο ελκυστική τροφή από ότι οι μηχανικά σπασμένοι κόκκοι σιταριού. Όταν πηγή τροφής για το *O. surinamensis* αποτελεί το σιτάρι η διάρκεια ζωής του ορίζεται περίπου στις 20 έως 80 μέρες σε ένα εύρος θερμοκρασιών 17.5-37.5°C και 10-90% σχετική υγρασία (ΣΥ), αντίστοιχα. Οι ιδανικές συνθήκες για την βέλτιστη ανάπτυξη είναι 30 – 35°C και 70-90% ΣΥ. Γενικά, έχει αποδειχθεί ότι τα ενήλικα άτομα του *O. surinamensis* είναι πιο ανεκτικά σε ακραίες θερμοκρασίες και υγρασίες σε σχέση με το *O. mercator* (Howe, 1956).



Εικόνα 15: Ενήλικο *O. surinamensis*

[http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/eafrinet/maize_pests/key/maize_pests/Media/Html/Oryzaephilus_surinamensis_\(Linnaeus_1758\)_-Saw-toothed_Grain_Beetle.htm](http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/eafrinet/maize_pests/key/maize_pests/Media/Html/Oryzaephilus_surinamensis_(Linnaeus_1758)_-Saw-toothed_Grain_Beetle.htm)

Το *T. castaneum* (red flour beetle) ανήκει στην οικογένεια Tenebrionidae και στην τάξη Coleoptera (Εικόνα 16). Το ενήλικο του έχει μήκος που δε ξεπερνά τα 2.5-4.5 mm και χρώμα ερυθροκαστανό (Ogendo et al., 2012). Συχνά, συγχέεται με το παρόμοιο και συγγενικό του είδος *T. confusum* διαφέρουν όμως στο γεγονός ότι το *T. castaneum* έχει περισσότερο πεπλατυσμένα τα 3 τελευταία άκρα των κεραιών του σε σχέση με το *T. confusum* και έχει την ικανότητα πτήσης (Bousquet, 1990). Οι προνύμφες έχουν μήκος σώματος 3 έως 16 mm και στα αρχικά στάδια έχουν υπόλευκο χρωματισμό, ενώ οι πλήρους ανάπτυξης είναι κιτρινωπές. Το τελευταίο κοιλιακό μεταμερές τους καταλήγει σε δύο μαύρα σιφώνια (Kumar et al., 2018).

Τα ωά που γεννούν τα θηλυκά είναι μικρά, άσπρα και πολλές φορές φέρουν υπολείμματα αλεύρων στην επιφάνεια τους. Ο αριθμός τους κυμαίνεται από 2.5 με 11 αυγά ανά θηλυκό ανά ημέρα στους 25 και 32.5 °C, αντίστοιχα (Haines, 1990). Οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης είναι στους 27 °C με 60-80% ΣΥ (Kumar et al., 2018). Για την ολοκλήρωση του βιολογικού του κύκλου απαιτούνται περίπου 7-12 εβδομάδες (Ogendo et al., 2012). Σύμφωνα με το Walter (1990), το *T. castaneum* είναι μακρόβιο έντομο και τα ενήλικα μπορούν να ξεπεράσουν τα 3 χρόνια ζωής.

Το συγκεκριμένο είδος εντόμου προσβάλλει αποθηκευμένα προϊόντα όπως αλεύρι, σιτάρι, σιμιγδάλι, δημητριακά, ζυμαρικά, ξηρούς καρπούς και αποξηραμένα φρούτα, σοκολάτα, ακόμη και μουσειακά εκθέματα (Weston and Rattlingourd, 2000). Έρευνες δείχνουν ότι παρά τους μεγάλους πληθυσμούς του εντόμου που συναντάμε σε αποθηκευμένα προϊόντα που έχουν ήδη προσβληθεί από κάποιο πρωτεύον είδος ή η μάζα τους αποτελείται από σπόρους μηχανικά σπασμένους, το *T. castaneum* είναι μη ικανό να προσβάλλει ακέραιους και μη προσβεβλημένους σπόρους (Walter, 1990).



Εικόνα 16: Ενήλικο *T. castaneum*

[https://keys.lucidcentral.org/keys/v3/eafrinet/maize_pests/key/maize_pests/Media/Html/Tribolium_castaneum_\(Herbst_1797\)_-Red_Flour_Beetle.htm](https://keys.lucidcentral.org/keys/v3/eafrinet/maize_pests/key/maize_pests/Media/Html/Tribolium_castaneum_(Herbst_1797)_-Red_Flour_Beetle.htm)

Το *S. oryzae* (rice weevil) συγκαταλέγεται στην οικογένεια Curculionidae της τάξης των Κολεοπτέρων (Εικόνα 17). Το ενήλικο έχει μέγεθος 2.5 – 4 mm και διαθέτει έλυτρα με αυλακώσεις και 4 ερυθροκαστανές κηλίδες. Όλα τα στάδια ανάπτυξης του εντόμου, πλην του ενηλίκου, τρέφονται και αναπτύσσονται στο εσωτερικό των σπόρων του προϊόντος σε βοθρία- σήραγγες, και σπάνια είναι ορατά (Haines, 1991).

Το είδος αυτό είναι σχετικά μακρόβιο αφού ζει περίπου για 8 μήνες. Κάθε θηλυκό μπορεί να εναποθέσει έως και 150 αυγά σε μικρές κοιλότητες, που το ίδιο ανοίγει και σφραγίζει, σε σπόρους σιτηρών. Τα ποσοστά ωοτοκίας είναι σημαντικά χαμηλά σε θερμοκρασίες κάτω των 20 και πάνω από 32°C (βέλτιστη θερμοκρασία 25°C) και

ποσοστό περιεχόμενης υγρασίας των σπόρων κάτω από 12%. Τα χρονικά διαστήματα για πλήρη ενηλικίωση κυμαίνονται στις 35 ημέρες σε ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης και 110 ημέρες σε αντίξοες (Birch, 1944).

Το *S. oryzae* προσβάλλει ποικιλία αποθηκευμένων δημητριακών όπως σιτάρι, κριθάρι, ρύζι, σόργο κ.α., σε υποτροπικές, τροπικές και εύκρατες περιοχές (Σταμόπουλος, 2013). Το ενήλικο έχει την ικανότητα να πετά, σε αντίθεση με το συγγενικό του είδος *S. granarius*, γεγονός που εξηγεί την προσβολή των προϊόντων από τον αγρό.



Εικόνα 17: Ενήλικο *S. oryzae*

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/80/Sitophilus_oryzae_%28Linn%C3%A9%2C_1763%29_%283546202126%29.jpg

Το *R. dominica* (lesser grain borer) ή αλλιώς «σκαθάρι του ρυζιού» είναι ξυλοφάγο έντομο και ανήκει στην οικογένεια Bostrychidae, στην τάξη Coleoptera (Εικόνα 18). Το ενήλικο είναι μικρό σε μέγεθος (2.5-3 mm), διαθέτει κυλινδρικό σώμα και η κεφαλή του είναι στραμμένη προς τον προθώρακα με αποτελέσματα να μην είναι εμφανής όταν κάποιος παρατηρεί το έντομο από το πάνω (νωτιαίο) μέρος. Το πρόνωτο περιβάλλεται από εξογκώματα που μοιάζουν με μικρά δόντια ή άγκιστρα (Ogendo et al., 2012). Είναι έντομο που αναπαράγεται με αργούς ρυθμούς και έχει πιο έντονη πληθυσμιακή αύξηση όταν οι σπόροι, με τους οποίους τρέφεται παραμείνουν αδιατάρακτοι για αρκετό χρονικό διάστημα (Σταμόπουλος, 2013). Ανάλογα με την θερμοκρασία του περιβάλλοντος, τα θηλυκά γεννούν το καθένα 244 με 418 αυγά, στους 25°C και 34°C, αντίστοιχα (Haines, 1991). Η ανάπτυξη του *R. dominica* γίνεται στο εσωτερικό των σπόρων, όμως οι προνύμφες έχουν την ικανότητα να μετακινούνται από τον ένα σπόρο στον άλλο (NRI, 2001). Έχει εντοπιστεί κυρίως σε περιοχές με θερμό και ξηρό κλίμα (NRI, 2001). Αποτελεί πρωτεύον έντομο και διαθέτει μια ευρεία γκάμα τροφικών προτιμήσεων που περιλαμβάνει σπόρους σιταριού, ρύζι και παραπροϊόντα αυτού καθώς και ελαιούχους πλακούντες (Σταμόπουλος, 2013).



Εικόνα 18: Ενήλικο *R. dominica*

[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/89/CSIRO_ScienceImage_10792_Rhyzopertha_dom
inca_Lesser_Grain_Borer.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/89/CSIRO_ScienceImage_10792_Rhyzopertha_dom
inca_Lesser_Grain_Borer.jpg)

1.8 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Η αποτελεσματικότητα της φωσφίνης είναι συνάρτηση δύο κύριων παραγόντων του χρόνου έκθεσης και της συγκέντρωσης. Αύξηση του χρόνου έκθεσης και της συγκέντρωσης φωσφίνης προκαλεί μία γραμμική αύξηση της θνησιμότητας των εντόμων. Έχει εντοπιστεί ωστόσο ότι σε αυξημένες συγκεντρώσεις φωσφίνης λαμβάνει χώρα το φαινόμενο του «sweet spot», όπου αύξηση του χρόνου έκθεσης των εντόμων στην φωσφίνη οδηγεί σε μείωση της ακινητοποίησής τους καθώς και της αντίστοιχης θνησιμότητας. Επιπροσθέτως, τα πρωτόκολλα που βασίζονται στην ακινητοποίηση, ως δείκτη χαρακτηρισμού της ανθεκτικότητας, χρήζουν περαιτέρω έρευνας, ιδιαίτερα στην περίπτωση της ακινητοποίησης ή της ανάνηψης και μετά την έκθεση. Επομένως, σκοποί της παρούσας εργασίας είναι:

- 1) Η αξιολόγηση της χρονικής σχέσης μεταξύ ακινητοποίησης και ανάνηψης στα εξετασθέντα είδη εντόμων αποθηκών
- 2) Ο έλεγχος της εμφάνισης του «sweet spot» αλλά και η αλληλεπίδρασή του στην ευαισθησία των εντόμων στην φωσφίνη

Ουσιαστικά, η εκπόνηση της συγκεκριμένης μελέτης έδωσε απάντηση σε δύο κύρια ερωτήματα που αφορούν την αποτελεσματικότητα της φωσφίνης. Αυτά είναι :

- 1) Πόσο γραμμική είναι η σχέση του χρόνου έκθεσης και συγκέντρωσης φωσφίνης σε έντομα αποθηκευμένων προϊόντων που έχουν εκτεθεί στην φωσφίνη και,
- 2) Σε ποιο χρόνο έκθεσης και συγκέντρωσης κάνει την εμφάνιση του το «sweet spot».

2. Υλικά και Μέθοδοι

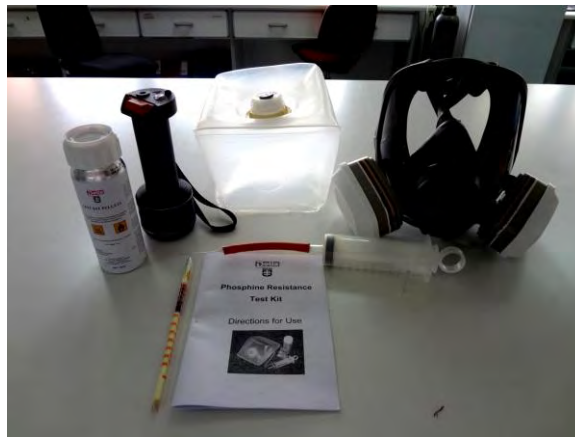
2.1 Έντομα

Οι εργαστηριακοί πληθυσμοί εντόμων που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραματικών διαδικασιών ήταν αυτοί των *T. castaneum*, *R. dominica*, *S. oryzae* και *O. surinamensis*. Όλοι οι εργαστηριακοί πληθυσμοί έχουν χαρακτηριστεί ως ευαίσθητοι στην φωσφίνη σύμφωνα με προηγούμενες δοκιμές (Agrafioti et al., 2019). Οι ανθεκτικοί στην φωσφίνη πληθυσμοί των *R. dominica* (GA6) και *O. surinamensis* (ASC11) συλλέχθηκαν από διαφορετικές εγκαταστάσεις σε διάφορες περιοχές σε όλη την Ελλάδα, ενώ αυτοί των *T. castaneum* (BTS) και *S. oryzae* (3TAB) προήλθαν από την Σερβία και Γερμανία, αντίστοιχα. Για τα τέσσερα είδη εντόμων που αναλύθηκαν παραπάνω (ευαίσθητοι και ανθεκτικοί στην φωσφίνη πληθυσμοί), έλαβαν χώρα εκτροφές σε θαλάμους, στους 25 °C και 65% ΣΥ σε συνεχές σκότος, στο εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Από τα ανωτέρω είδη, τα *S. oryzae* και *R. dominica* εξετράφησαν σε σπόρους σιταριού, το *O. surinamensis* σε νιφάδες βρώμης και το *T. confusum* σε λευκό αλεύρι σίτου. Τα ενήλικα άτομα συλλέχθηκαν με κοσκίνισμα (κόσκινο 3 mm), ώστε να γίνει διαχωρισμός από τα ανήλικα στάδια και από το υπόστρωμα εκτροφής. Τα ενήλικα παρέμειναν στην επιφάνεια του κόσκινου και παρελήφθησαν άμεσα για τον πειραματισμό.

2.2 Βιοδοκιμή¹⁾: Σχέση μεταξύ «ακινητοποίησης» και «ανάνηψης»

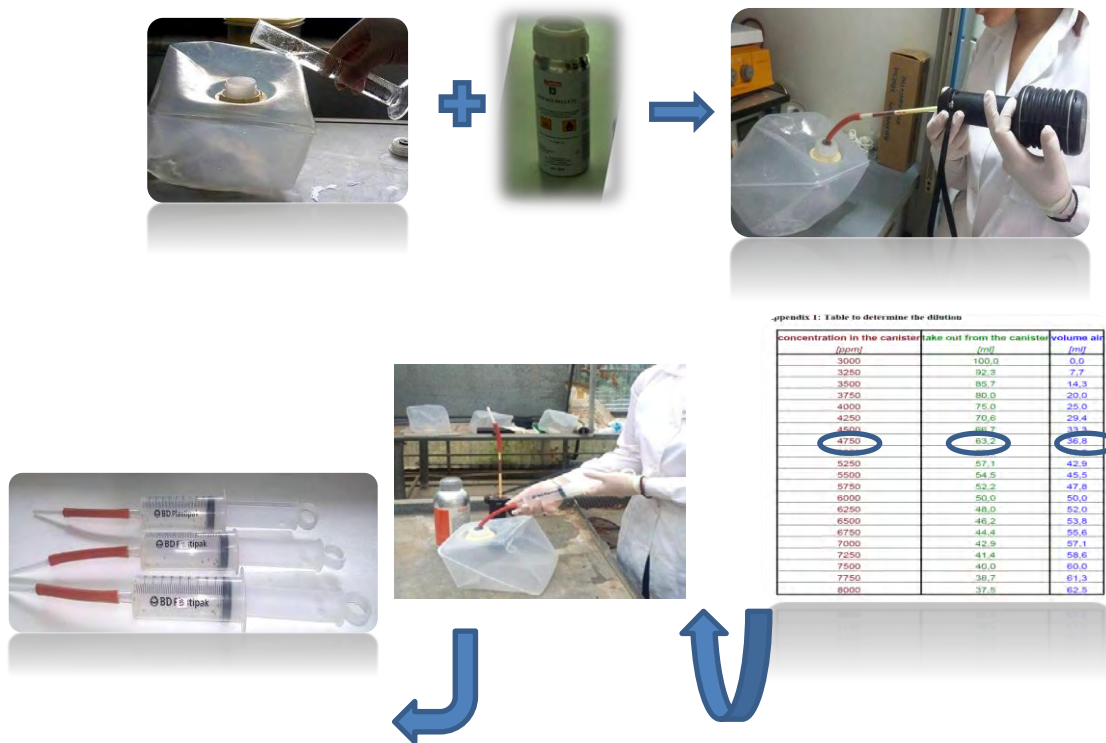
Για την διενέργεια της πρώτης βιοδοκιμής χρησιμοποιήθηκε το Detia Degesch Phosphine Tolerance Test Kit (DDPTTK) (Εικόνα 19), σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης όπως αυτές περιγράφονται στο σχετικό φυλλάδιο της εταιρείας. Αρχικά, 10 ενήλικα άτομα από τον εκάστοτε εξεταζόμενο πληθυσμό τοποθετήθηκαν σε πλαστικές σύριγγες των 100 ml του kit. Η παραγωγή του αερίου της φωσφίνης έλαβε χώρα εντός πλαστικού κάνιστρου χωρητικότητας 5 l, προσθέτοντας 50 ml νερό και 2 ταμπλέτες φωσφορούχου αργιλίου που περιλαμβάνονται στο kit. Η συγκέντρωση της φωσφίνης μετρήθηκε με γυάλινους σωληνίσκους και μια συγκεκριμένη ποσότητα αερίου, σύμφωνα με τον πίνακα συγκεντρώσεων που αναφέρεται στο φυλλάδιο με τις οδηγίες χρήσης της εταιρείας Detia Degesch, αφαιρέθηκε από το κάνιστρο με στόχο την επίτευξη των 3000 ppm μέσα στην σύριγγα. Τα έντομα εκτέθηκαν στην φωσφίνη για διαφορετικά χρονικά διαστήματα, τα οποία ήταν τα 15, 30, 60, 90, 150 και 300 λεπτά (διαφορετικές βιοδοκιμές για

διαφορετικούς χρόνους έκθεσης) και μετά το πέρας των διαστημάτων αυτών, τα έντομα παραλήφθηκαν από τις σύριγγες και μεταφέρθηκαν σε δισκία petri με τροφή και έγινε η καταγραφή της ανάνηψής τους σε διαφορετικούς χρονικά διαστήματα (2 ώρες, 1, 2 και 7 ημέρες από το τέλος της έκθεσης) (Εικόνα 20). Παράλληλα, μαζί με την ανάνηψη των εντόμων καταγράφηκε και η καθυστερημένη θνησιμότητα αυτών (Εικόνα 21). Πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις με τρεις υποεπαναλήψεις για κάθε συνδυασμό χρόνου έκθεσης και πληθυσμού εντόμων (3 X 3 = 9 επαναλήψεις).



Εικόνα 19: Detia Degesch Phosphine Tolerance Test Kit (DDPTTK).

(Από προσωπική συλλογή)



Εικόνα 20: Πορεία της πειραματικής διαδικασίας, χρησιμοποιώντας το DDPTTK.

(Από προσωπική συλλογή)



Εικόνα 21: Καταγραφή θνησιμότητας μετά από 7 ημέρες.

(Από προσωπική συλλογή)

2.3 Βιοδοκιμή 2^η: Αναζήτηση του «sweet spot»

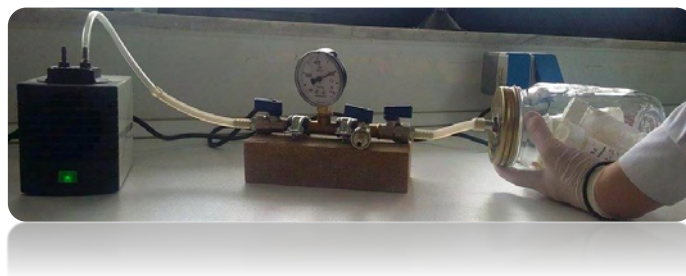
Για την εξερεύνηση του «sweet spot» το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτό του FAO (FAO, 1975) ελαφρώς τροποποιημένο ενσωματώνοντας διαφορετικούς χρόνους έκθεσης, δηλ. 1, 3, 5, 20, 30 και 40 ώρες και διαφορετικές συγκεντρώσεις, δηλ. 500, 1000, 2000 και 3000 ppm. Για το σκοπό αυτό, 10 ενήλικα του εκάστοτε

εξεταζόμενου πληθυσμού τοποθετήθηκαν σε κυλινδρικά φιαλίδια (διαμέτρου 2.5 cm, ύψους 9 cm) με μικρή ποσότητα τροφής, των οποίων η κορυφή και ο πάτος καλύπτονταν από λεπτό τούλι, για την αποτελεσματικότερη εισχώρηση του αερίου. Στην συνέχεια, τα φιαλίδια αυτά μεταφέρθηκαν σε γυάλινα βάζα χωρητικότητας 1 l (Εικόνα 22), τα οποία σφραγίστηκαν και ελέγχθηκαν για τυχόν διαρροές πιέσεων μέσω μανόμετρου (Εικόνα 23) και εκτέθηκαν για τα χρονικά διαστήματα και τις συγκεντρώσεις που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Σε αυτή την περίπτωση, για την παραγωγή της φωσφίνης μέσα στο κάνιστρο προστίθεται 1 σφαιρίδιο φωσφορούχου μαγνησίου και 50 ml νερό. Με τον τερματισμό των διαφορετικών χρόνων έκθεσης, τα έντομα όπως και προηγουμένως απομακρύνθηκαν από τα φιαλίδια και τοποθετήθηκαν σε δισκία petri με τροφή, όπου καταγράφηκε η δραστηριότητα και η ακινητοποίηση ή θνησιμότητα των εντόμων (Εικόνα 24). Επίσης, η καθυστερημένη θνησιμότητα μετρήθηκε μετά από 7 ημέρες. Για κάθε συνδυασμό χρόνου έκθεσης- συγκέντρωσης έλαβαν χώρα δυο επαναλήψεις με τρεις υποεπαναλήψεις ($2 \times 3 = 6$ επαναλήψεις).



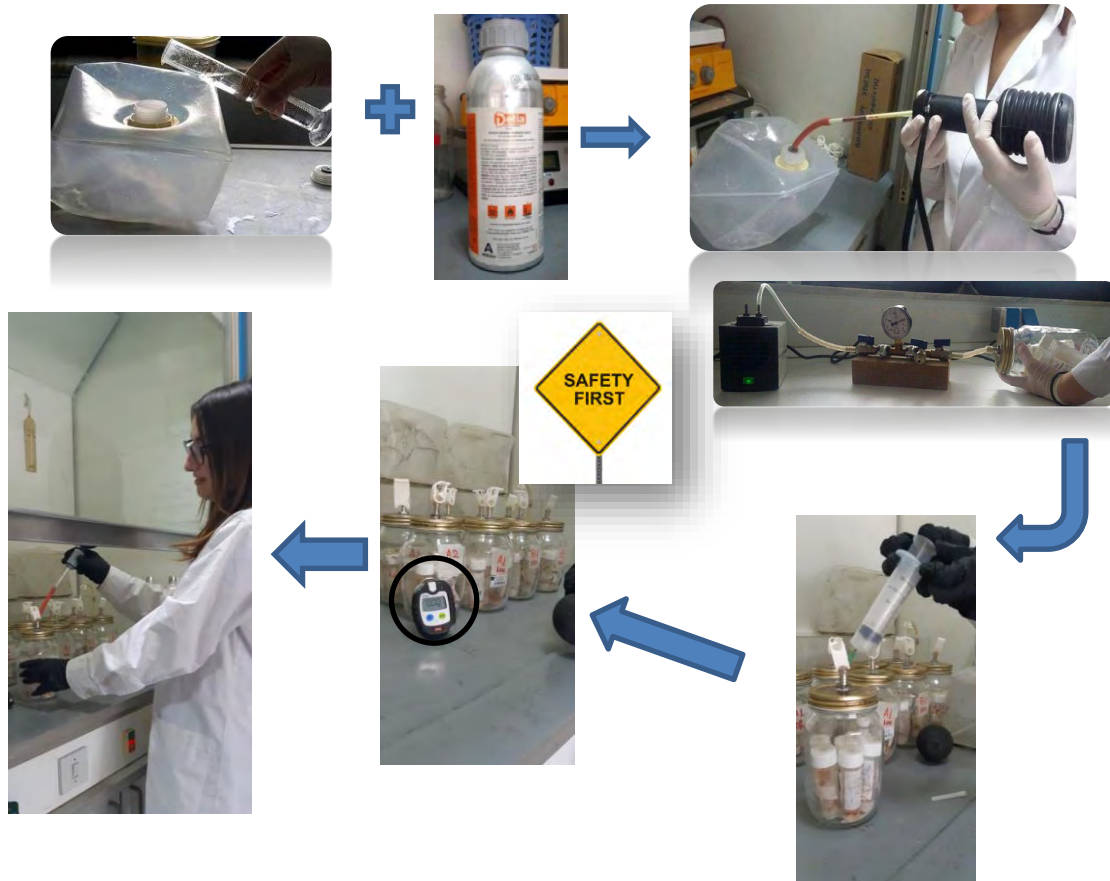
Εικόνα 22: Γυάλινα βάζα 1 l, τα οποία σφραγίστηκαν και εξετάστηκαν για διαρροές.

(Από προσωπική συλλογή)



Εικόνα 23: Έλεγχος για διαρροές μέσω μανόμετρου.

(Από προσωπική συλλογή)



Εικόνα 24: Περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας, ακολουθώντας το τροποποιημένο πρωτόκολλο του FAO.

(Από προσωπική συλλογή)

2.4 Στατιστική ανάλυση

Η θνησιμότητα στους μάρτυρες δεν ξεπέρασε το 5 % και γι' αυτό τον λόγο κρίθηκε απαραίτητο να μην γίνει καμία διόρθωση.

Όσο αφορά την πρώτη βιοδοκιμή, με την χρήση του SPSS version 25.0 software (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) αναλύθηκε το ποσοστό θνησιμότητας των ακινητοποιημένων ατόμων για κάθε χρονικό διάστημα έκθεσης για κάθε πληθυσμό χρησιμοποιώντας το t-test, μεταξύ ανθεκτικού και ευαίσθητου πληθυσμού. Έπειτα, οι μέσοι όροι των ακινητοποιημένων ατομων αναλύθηκαν με το ίδιο λογισμικό με το χρονικό διάστημα μετά την έκθεση για κάθε χρόνο έκθεσης, ως κύριο παράγοντα. Οι μέσοι όροι διαχωρίστηκαν με το Tukey-Kramer HSD test σε 0.05 (Sokal and Rohlf, 1995).

Όσον αφορά τη δεύτερη βιοδοκιμή, χρησιμοποιήθηκε Probit Regression Analysis, ώστε να γίνει εκτίμηση του LT_{50} , LT_{95} και LT_{99} για κάθε πληθυσμό και για κάθε

συγκέντρωση. Η θνησιμότητα των ευαίσθητων και ανθεκτικών πληθυσμών αναλύθηκε με τη χρήση της Ανάλυσης της Διασποράς (ANOVA) για κάθε χρόνο έκθεσης (άμεση επίδραση) αλλά και για την καθυστερημένη επίδραση (μετά από 7 ημέρες), με την συγκέντρωση και το χρόνο έκθεσης ως παράγοντες. Οι μέσοι όροι διαχωρίστηκαν με το Tukey-Kramer HSD test σε 0.05.

3. Αποτελέσματα

3.1 Σχέση μεταξύ ακινητοποίησης και ανάνηψης

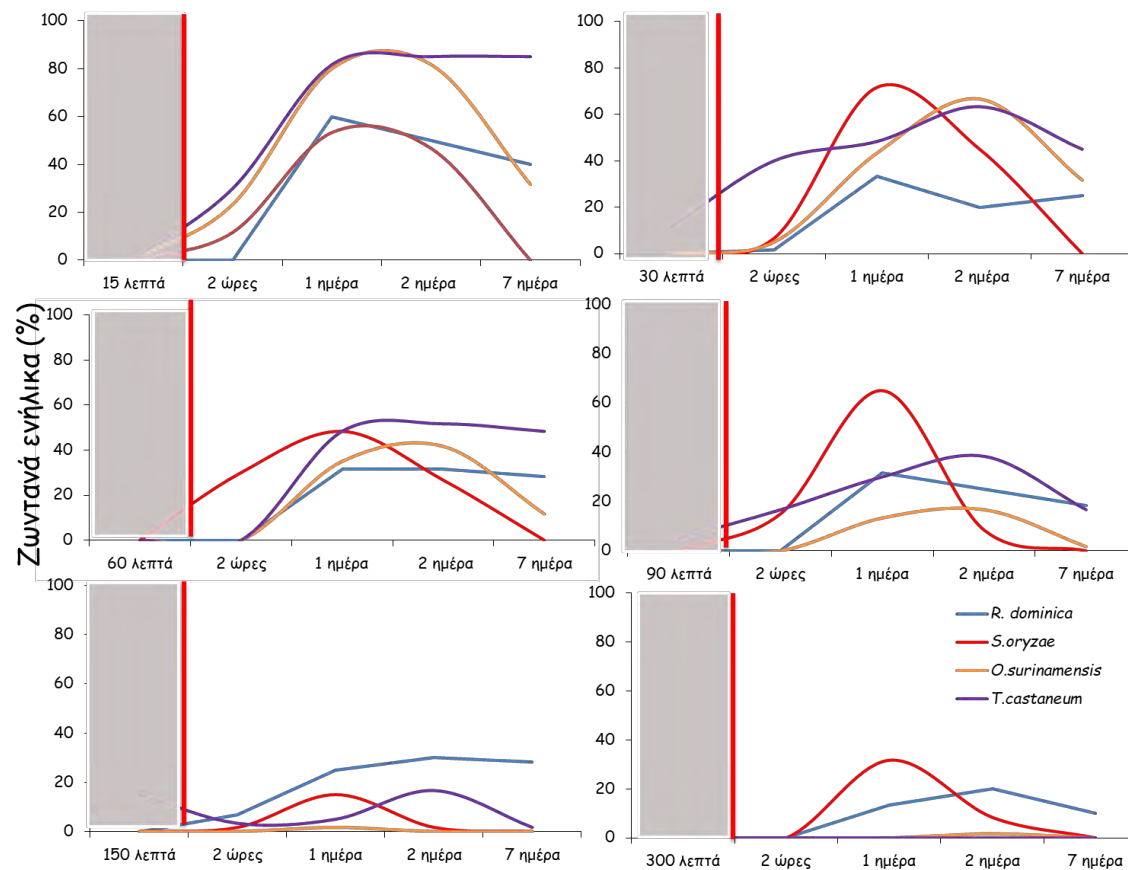
Οι πληθυσμοί εντόμων που εξετάστηκαν στο πείραμά μας παρατηρούμε ότι δεν αντιδρούν το ίδιο στα διαφορετικά χρονικά διαστήματα έκθεσης στην φωσφίνη (15, 30, 60, 90, 150 και 300 λεπτά) (Πίνακας 1) (Διάγραμμα 2, 3). Συγκρίνοντας τον ευαίσθητο με τον ανθεκτικό πληθυσμό κάθε είδους στα διάφορα χρονικά διαστήματα έκθεσης, παρατηρούμε πως στις περισσότερες των περιπτώσεων υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Πίνακας 1), με εξαίρεση το *S. oryzae*, όπου ο ευαίσθητος και ανθεκτικός πληθυσμός (3TAB *S. oryzae*) δεν διαφέρουν μεταξύ τους σε κανένα χρονικό διάστημα έκθεσης και τα 15 λεπτά έκθεσης, όπου σε όλα τα είδη εντόμων που εξετάστηκαν δεν εντοπίστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές (Πίνακας 1). Όσο αφορά τους ευαίσθητους πληθυσμούς 100% ακινητοποίηση όλων των ειδών εντόμων διαπιστώνεται ακόμη και στους μικρότερους χρόνους έκθεσης, ενώ στους ανθεκτικούς πληθυσμούς GA6 *R. dominica* και BTS *T. castaneum* λαμβάνει χώρα ένα μη αναμενόμενο φαινόμενο όπου αύξηση του χρόνου έκθεσης οδηγεί σε μείωση του ποσοστού των ακινητοποιημένων εντόμων (Πίνακας 1) (Διάγραμμα 2, 3).

Μετά την έκθεση των εντόμων στα διαφορετικά διαστήματα έκθεσης παρατηρείται ανάνηψη ορισμένου ποσοστού ατόμων σε όλα τα είδη, τόσο στους ευαίσθητους όσο και στους ανθεκτικούς πληθυσμούς (Πίνακες 2, 3) (Διάγραμμα 2, 3). Η ανάνηψη αυτή αποτελεί ένα παροδικό φαινόμενο, καθώς στα χρονικά διαστήματα μετά το πέρας της έκθεσης στην φωσφίνη (2 ώρες, 1, 2 και 7 ημέρες) τα ποσοστά ακινητοποιημένων ατόμων μεταβάλλονται (Πίνακες 2, 3) (Διάγραμμα 2, 3). Μεγαλύτερα ποσοστά ανάνηψης παρατηρούνται στους ευαίσθητους και στους ανθεκτικούς πληθυσμούς την 1^η και 2^η ημέρα από το πέρας της έκθεσης στην φωσφίνη, που δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους για τα διάφορα είδη και χρονικά διαστήματα έκθεσης (15, 30, 60, 90, 150 και 300 λεπτά) (Πίνακας 2, 3). Βέβαια, 7 ημέρες αργότερα παρατηρούμε ότι τα ποσοστά ακινητοποίησης αυξάνονται για όλα τα είδη,

πληθυσμούς (ευαίσθητους και ανθεκτικούς) και χρονικά διαστήματα, με πιο έντονη την αύξηση αυτή στους ευαίσθητους πληθυσμούς (Πίνακες 2, 3) (Διάγραμμα 2). Η καθυστερημένη ακινητοποίηση των εντόμων που παρατηρείται την 7^η ημέρα, είναι στην πραγματικότητα καθυστερημένη θνησιμότητα. Παρόλα αυτά, στατιστικώς σημαντικές διαφορές παρατηρούνται σε όλα τα είδη εντόμων μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων πληθυσμών για όλα τα χρονικά διαστήματα μετά την έκθεση στην φωσφίνη σε κάθε χρονικό διάστημα έκθεσης (Πίνακας 4).

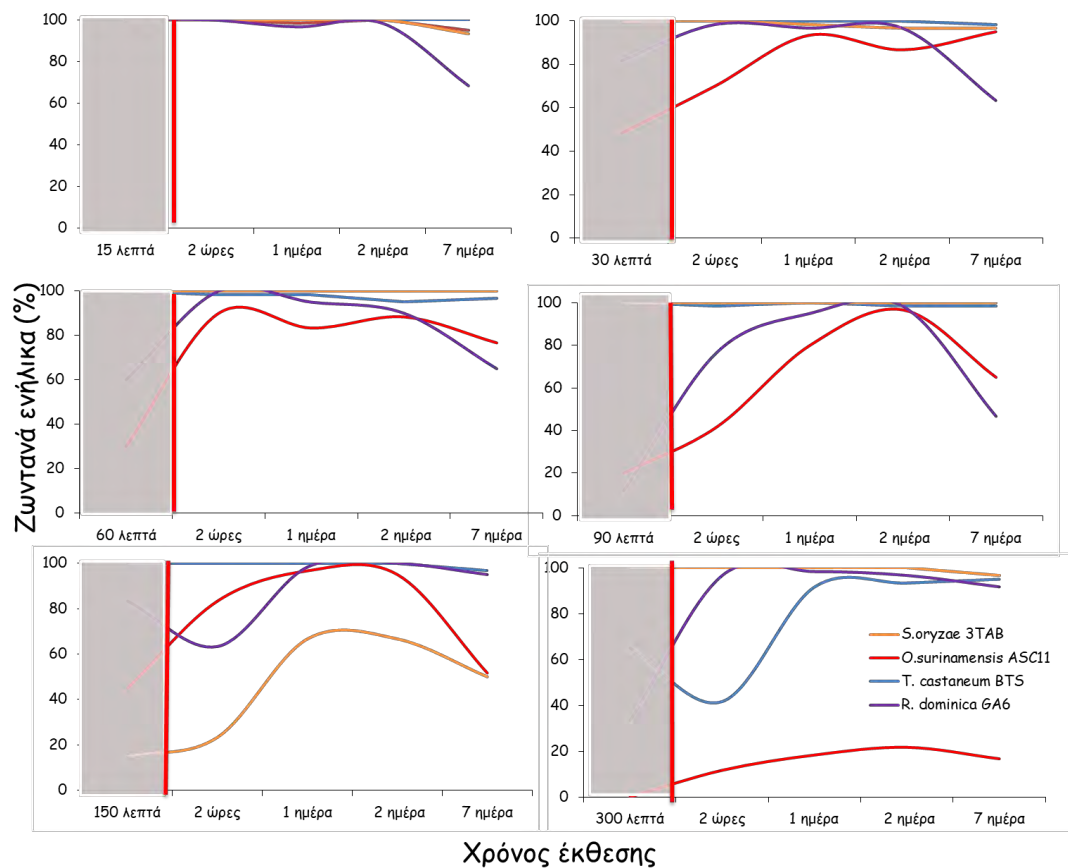
Πίνακας 1: Άμεση αντίδραση στην έκθεση σε 3000 ppm φωσφίνης σε δύο πληθυσμούς κάθε είδους (ευαίσθητο και ανθεκτικό στην φωσφίνη) εκτιμώμενο ως ποσοστό ακινητοποιημένων ενηλίκων \pm τυπικό σφάλμα για κάθε χρονικό διάστημα έκθεσης 15, 30, 60, 90, 150 και 300 λεπτά. Μεταξύ της ίδιας αντίδρασης και έκθεσης, ο αστερίσκος υποδηλώνει στατικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο πληθυσμών. Σε όλες τις περιπτώσεις $df = 10$; two-tailed t -test σε $P = 0.05$.

| Είδη | Πληθυσμοί | Χρόνος έκθεσης (λεπτά) | | | | | |
|------------------------|-----------|------------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|
| | | 15 | 30 | 60 | 90 | 150 | 300 |
| <i>R. dominica</i> | Ευαίσθητο | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| | Ανθεκτικό | 0.0 \pm 0.0 | 18.3 \pm 14.7* | 40.0 \pm 16.9* | 88.3 \pm 6.5 | 55.0 \pm 14.7* | 66.6 \pm 14.5* |
| | <i>T</i> | - | 5.5 | 3.5 | 1.7 | 3.0 | 2.2 |
| | <i>P</i> | - | <0.05 | <0.05 | 0.10 | <0.05 | <0.05 |
| <i>S. oryzae</i> | Ευαίσθητο | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| | Ανθεκτικό | 0.0 \pm 0.0 | 0.0 \pm 0.0 | 0.0 \pm 0.0 | 0.0 \pm 0.0 | 0.0 \pm 0.0 | 0.0 \pm 0.0 |
| | <i>T</i> | - | - | - | - | - | - |
| | <i>P</i> | - | - | - | - | - | - |
| <i>O. surinamensis</i> | Ευαίσθητο | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| | Ανθεκτικό | 0.0 \pm 0.0 | 51.6 \pm 14.9* | 70.0 \pm 10.9* | 80.0 \pm 6.8* | 85.0 \pm 7.1 | 100.0 \pm 0.0 |
| | <i>T</i> | - | 3.2 | 2.7 | 2.9 | 2.0 | - |
| | <i>P</i> | - | <0.05 | <0.05 | <0.05 | 0.06 | - |
| <i>T. castaneum</i> | Ευαίσθητο | 100.0 \pm 0.0 | 88.3 \pm 11.6 | 100.0 \pm 0.0 | 95.0 \pm 3.4 | 85.0 \pm 15.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| | Ανθεκτικό | 0.0 \pm 0.0 | 0.0 \pm 0.0* | 0.0 \pm 0.0 | 0.0 \pm 0.0* | 16.6 \pm 9.8* | 35.0 \pm 8.4* |
| | <i>T</i> | - | 7.5 | - | 27.8 | 3.8 | 7.6 |
| | <i>P</i> | - | <0.05 | - | <0.05 | <0.05 | <0.05 |



Χρόνος έκθεσης

Διάγραμμα 2: Ποσοστό ζωντανών ατόμων ευαίσθητων πληθυσμών εντόμων που εκτέθηκαν στα 3000 ppm φωσφίνης (άμεση αντίδραση) για διαφορετικούς χρόνους έκθεσης (15, 30, 60, 90, 150 και 300 λεπτά) (θαμπό πλαίσιο). Για κάθε χρόνο έκθεσης το ποσοστό ζωντανών ατόμων παρουσιάζεται και μετά το πέρας της έκθεσης (2 ώρες, 1, 2 και 7 ημέρες από το πέρας της έκθεσης) (καθυστερημένη αντίδραση).



Διάγραμμα 3: Ποσοστό ζωντανών ατόμων ανθεκτικών πληθυσμών εντόμων που εκτέθηκαν στα 3000 ppm φωσφίνης (άμεση αντίδραση) για διαφορετικούς χρόνους έκθεσης (15, 30, 60, 90, 150 και 300 λεπτά) (θαμπό πλαίσιο). Για κάθε χρόνο έκθεσης το ποσοστό ζωντανών ατόμων παρουσιάζεται και μετά το πέρας της έκθεσης (2 ώρες, 1, 2 και 7 ημέρες από το πέρας της έκθεσης) (καθυστερημένη αντίδραση).

Πίνακας 2: Μέσο ποσοστό ακινητοποιημένων ατόμων (% \pm τυπικό σφάλμα) των ευαίσθητων πληθυσμών, με τη χρήση της Ανάλυσης Διασποράς (ANOVA) που εξετάστηκαν για κάθε χρονικό διάστημα μετά την έκθεση (2ώρες, 1, 2 και 7 ημέρες) και κάθε διαφορετικό χρόνο έκθεσης (15, 30, 60, 90, 150 και 300 λεπτά) στα 3000 ppm φωσφίνης. Οι μέσοι όροι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα μέσα στο ίδιο χρόνο έκθεσης και συγκέντρωση, δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους σύμφωνα με το κριτήριο Tukey-Kramer HSD test σε 0.05. Όπου δεν υπάρχουν γράμματα, δεν σημειώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά.

| Χρόνος έκθεσης | Χρόνος μετά την έκθεση | <i>R. dominica</i> | <i>S. oryzae</i> | <i>O. surinamensis</i> | <i>T. castaneum</i> |
|----------------|------------------------|--------------------|-------------------|------------------------|---------------------|
| 15 λεπτά | 2ώρες | 100.0 \pm 0.0b | 88.3 \pm 11.6bc | 76.6 \pm 5.5b | 70.0 \pm 10.3b |
| | 1ημέρα | 40.0 \pm 8.1a | 46.6 \pm 10.5a | 20.0 \pm 6.8a | 18.3 \pm 6.5a |
| | 2ημέρα | 50.0 \pm 12.6a | 53.3 \pm 11.1ab | 18.3 \pm 7.0a | 15.0 \pm 6.1a |
| | 7ημέρα | 60.0 \pm 10.6a | 100.0 \pm 0.0c | 68.3 \pm 11.0b | 15.0 \pm 4.2a |
| | F | 8.1 | 7.3 | 15.3 | 14.1 |
| | P | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 |
| 30 λεπτά | 2ώρες | 98.3 \pm 1.6b | 93.3 \pm 3.3c | 95.0 \pm 2.2c | 60.0 \pm 5.1a |
| | 1ημέρα | 66.6 \pm 7.1a | 28.3 \pm 9.4a | 56.6 \pm 5.5ab | 51.6 \pm 10.7a |
| | 2ημέρα | 80.0 \pm 7.3ab | 55.0 \pm 7.6b | 33.3 \pm 10.2a | 36.6 \pm 8.8a |
| | 7ημέρα | 75.0 \pm 5.6a | 98.3 \pm 1.6c | 68.3 \pm 7.9bc | 55.0 \pm 3.4a |
| | F | 5.1 | 7.3 | 12.9 | 1.7 |
| | P | <0.05 | <0.05 | <0.05 | 0.10 |
| 60 λεπτά | 2ώρες | 100.0 \pm 0.0b | 70.0 \pm 5.1ab | 100.0 \pm 0.0b | 100.0 \pm 0.0b |
| | 1ημέρα | 68.3 \pm 4.0a | 51.6 \pm 11.6a | 65.0 \pm 5.6a | 51.6 \pm 10.1a |

| | | | | | |
|-----------|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 2ημέρα | 68.3 ± 4.0a | 73.3 ± 9.5ab | 58.3 ± 8.7a | 48.3 ± 7.0a |
| | 7ημέρα | 71.6 ± 3.0a | 100.0 ± 0.0b | 88.3 ± 3.0b | 51.6 ± 7.9a |
| | F | 22.6 | 6.2 | 13.0 | 11.4 |
| | P | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 |
| 90 λεπτά | 2ώρες | 100.0 ± 0.0b | 85.0 ± 4.2b | 100.0 ± 0.0c | 83.3 ± 8.0a |
| | 1ημέρα | 68.3 ± 7.9a | 35.5 ± 6.0a | 86.6 ± 6.1ab | 70.0 ± 12.1a |
| | 2ημέρα | 75.0 ± 4.2a | 91.6 ± 3.0b | 83.3 ± 5.5a | 61.6 ± 17.5a |
| | 7ημέρα | 81.6 ± 4.7ab | 100.0 ± 0.0b | 98.3 ± 1.6bc | 83.3 ± 7.6a |
| | F | 7.1 | 57.6 | 3.8 | 0.7 |
| | P | <0.05 | <0.05 | <0.05 | 0.5 |
| 150 λεπτά | 2ώρες | 93.3 ± 6.6a | 98.3 ± 1.6b | 100.0 ± 0.0 | 96.6 ± 2.1ab |
| | 1ημέρα | 75.0 ± 8.8a | 85.0 ± 5.0a | 100.0 ± 0.0 | 95.0 ± 2.2ab |
| | 2ημέρα | 70.0 ± 8.1a | 98.3 ± 1.6b | 100.0 ± 0.0 | 83.3 ± 7.6a |
| | 7ημέρα | 71.6 ± 7.0a | 100.0 ± 0.0b | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0b |
| | F | 1.9 | 6.3 | - | 3.1 |
| | P | 0.10 | <0.05 | - | <0.05 |
| 300 λεπτά | 2ώρες | 100.0 ± 0.0b | 100 ± 0.0b | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |
| | 1ημέρα | 86.6 ± 4.2ab | 68.3 ± 6.5a | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |
| | 2ημέρα | 80.0 ± 6.8a | 91.6 ± 4.0b | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |
| | 7ημέρα | 90.0 ± 5.1ab | 100.0 ± 0.0b | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |

| | | | | |
|----------|------|-------|---|---|
| <i>F</i> | 3.0 | 15.2 | - | - |
| <i>P</i> | 0.05 | <0.05 | - | - |

Πίνακας 3: Μέσο ποσοστό ακινητοποιημένων ατόμων ($\% \pm$ τυπικό σφάλμα) των ανθεκτικών πληθυσμών, με τη χρήση της Ανάλυσης Διασποράς (ANOVA) που εξετάστηκαν για κάθε χρονικό διάστημα μετά την έκθεση (2ώρες, 1, 2 και 7 ημέρες) και κάθε διαφορετικό χρόνο έκθεσης (15, 30, 60, 90, 150 και 300 λεπτά) στα 3000 ppm φωσφίνης. Οι μέσοι όροι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα μέσα στο ίδιο χρόνο έκθεσης και συγκέντρωση, δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους σύμφωνα με το κριτήριο Tukey-Kramer HSD test σε 0.05. Όπου δεν υπάρχουν γράμματα, δεν σημειώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά.

| Χρόνος έκθεσης | Χρόνος μετά την έκθεση | <i>R. dominica</i> | <i>S. oryzae</i> | <i>O. surinamensis</i> | <i>T. castaneum</i> |
|----------------|------------------------|--------------------|------------------|------------------------|---------------------|
| 15 λεπτά | 2ώρες | 0.0 ± 0.0a | 0.0 ± 0.0a | 0.0 ± 0.0a | 0.0 ± 0.0 |
| | 1ημέρα | 3.3 ± 2.1a | 0.0 ± 0.0a | 1.6 ± 1.6a | 0.0 ± 0.0 |
| | 2ημέρα | 1.6 ± 1.6a | 0.0 ± 0.0a | 0.0 ± 0.0a | 0.0 ± 0.0 |
| | 7ημέρα | 31.6 ± 9.0b | 6.6 ± 3.3b | 5.0 ± 3.4a | 0.0 ± 0.0 |
| | F | 10.0 | 4.0 | 1.5 | - |
| | P | <0.05 | <0.05 | 0.23 | - |
| 30 λεπτά | 2ώρες | 1.6 ± 1.6a | 0.0 ± 0.0a | 30 ± 12.9a | 0.0 ± 0.0a |
| | 1ημέρα | 3.3 ± 3.3a | 0.0 ± 0.0a | 6.6 ± 4.9a | 1.6 ± 1.6a |
| | 2ημέρα | 3.3 ± 3.3a | 0.0 ± 0.0a | 13.3 ± 6.6a | 3.3 ± 2.1a |
| | 7ημέρα | 36.6 ± 9.1b | 2.0 ± 2.0a | 5.0 ± 3.4a | 3.3 ± 2.1a |
| | F | 10.5 | 1.2 | 2.1 | 0.8 |
| | P | <0.05 | 0.32 | 0.13 | 0.47 |
| 60 λεπτά | 2ώρες | 0.0 ± 0.0a | 0.0 ± 0.0 | 10.0 ± 5.1a | 1.6 ± 1.6a |
| | 1ημέρα | 5.0 ± 2.2ab | 0.0 ± 0.0 | 16.6 ± 4.9a | 1.6 ± 1.6a |

| | | | | | |
|-----------|-----------|-------------|---------------|--------------|-------------|
| | 2ημέρα | 10.0 ± 2.5b | 0.0 ± 0.0 | 11.6 ± 6a | 5.0 ± 2.2a |
| | 7ημέρα | 35.0 ± 3.4c | 0.0 ± 0.0 | 23.3 ± 7.6a | 3.3 ± 2.1a |
| | F | 41.4 | - | 0.9 | 0.6 |
| | P | <0.05 | - | 0.41 | 0.57 |
| 90 λεπτά | 2ώρες | 25.0 ± 3.4b | 0.0 ± 0.0 | 58.3 ± 8.3c | 1.6 ± 1.6a |
| | 1ημέρα | 5.0 ± 2.2ab | 0.0 ± 0.0 | 20.0 ± 2.5ab | 0.0 ± 0.0a |
| | 2ημέρα | 1.6 ± 1.6a | 0.0 ± 0.0 | 3.3 ± 3.3a | 1.6 ± 1.6a |
| | 7ημέρα | 53.3 ± 9.5c | 0.0 ± 0.0 | 35.0 ± 2.2b | 1.6 ± 1.6a |
| | F | 20.3 | - | 23.6 | 0.3 |
| | P | <0.05 | - | <0.05 | 0.80 |
| | 150 λεπτά | 2ώρες | 16.6 ± 14.7ab | 0.0 ± 0.0a | 76.6 ± 8b |
| 1ημέρα | | 3.3 ± 2.1a | 0.0 ± 0.0a | 33.3 ± 5.5a | 1.6 ± 1.6a |
| 2ημέρα | | 5.0 ± 3.4a | 0.0 ± 0.0a | 35.0 ± 4.2a | 0.0 ± 0.0a |
| 7ημέρα | | 48.3 ± 9.0b | 13.3 ± 9.5a | 50.0 ± 7.7a | 5.0 ± 3.4a |
| F | | 5.4 | 1.9 | 9.2 | 10.1 |
| P | | <0.05 | 0.15 | <0.05 | <0.05 |
| 300 λεπτά | | 2ώρες | 3.3 ± 2.1a | 0.0 ± 0.0a | 88.3 ± 4.0a |
| | 1ημέρα | 1.6 ± 1.6a | 0.0 ± 0.0a | 81.6 ± 4.0a | 8.3 ± 4.0a |
| | 2ημέρα | 3.3 ± 2.1a | 0.0 ± 0.0a | 78.3 ± 4.7a | 6.6 ± 3.3a |
| | 7ημέρα | 8.3 ± 3.0a | 5.0 ± 2.2b | 83.3 ± 4.9a | 5.0 ± 2.2a |

| | | | | |
|----------|------|-------|------|-------|
| <i>F</i> | 1.5 | 5.0 | 0.8 | 32.7 |
| <i>P</i> | 0.22 | <0.05 | 0.47 | <0.05 |

Πίνακας 4: Καθυστερημένη αντίδραση στην έκθεση σε 3000 ppm φωσφίνης σε δύο πληθυσμούς κάθε είδους (ευαίσθητο και ανθεκτικό στην φωσφίνη) εκτιμώμενο ως ποσοστό ακινητοποιημένων ενηλίκων \pm τυπικό σφάλμα για κάθε χρονικό διάστημα έκθεσης (15, 30, 60, 90, 150 και 300 λεπτά). Μέσα στην ίδια αντίδραση και έκθεση, ο αστερίσκος υποδηλώνει στατικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο πληθυσμών. Σε όλες τις περιπτώσεις $df = 10$; two-tailed t -test σε $P = 0.05$.

| | | Χρονικό διάστημα έκθεσης | | | | |
|----------------------------|------------------------|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Άμεση αντίδραση (λεπτά) | Είδη | Πληθυσμοί | 2ώρες | 1ημέρα | 2ημέρα | 7ημέρα |
| 15 | <i>R. dominica</i> | Ευαίσθητο | 100.0 \pm 0.0 | 40.0 \pm 8.1 | 50.0 \pm 12.6 | 60.0 \pm 10.6 |
| | | Ανθεκτικό | 0.0 \pm 0.0 | 3.3 \pm 2.1* | 1.6 \pm 1.6* | 31.6 \pm 9.0 |
| | | <i>t</i> | - | 4.3 | 3.7 | 2.0 |
| | | <i>P</i> | - | <0.05 | <0.05 | 0.07 |
| | <i>S. oryzae</i> | Ευαίσθητο | 88.3 \pm 11.6 | 46.6 \pm 10.5 | 53.3 \pm 11.1 | 100.0 \pm 0.0 |
| | | Ανθεκτικό | 0.0 \pm 0.0* | 0.0 \pm 0.0* | 0.0 \pm 0.0* | 6.6 \pm 3.3* |
| | | <i>t</i> | 7.5 | 4.4 | 4.7 | 28.0 |
| | | <i>P</i> | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 |
| | <i>O. surinamensis</i> | Ευαίσθητο | 76.6 \pm 5.5 | 20.0 \pm 6.8 | 18.3 \pm 7.0 | 68.3 \pm 11.0 |
| | | Ανθεκτικό | 0.0 \pm 0.0* | 1.6 \pm 1.6* | 0.0 \pm 0.0* | 5.0 \pm 3.4* |
| | | <i>t</i> | 13.7 | 2.6 | 2.6 | 5.4 |
| | | <i>P</i> | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 |
| <i>T. castaneum</i> | Ευαίσθητο | 70.0 \pm 10.3 | 18.3 \pm 6.5 | 15.0 \pm 6.1 | 15.0 \pm 4.2 | |

| | | | | | | |
|----|------------------------|-----------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| | | Ανθεκτικό | 0.0 ± 0.0* | 0.0 ± 0.0* | 0.0 ± 0.0* | 0.0 ± 0.0* |
| | | <i>t</i> | 6.7 | 2.8 | 2.4 | 3.5 |
| | | <i>P</i> | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 |
| 30 | <i>R. dominica</i> | Ευαίσθητο | 98.3 ± 1.6 | 66.6 ± 7.1 | 80.0 ± 7.3 | 75.0 ± 5.6 |
| | | Ανθεκτικό | 1.6 ± 1.6 * | 3.3 ± 3.3 * | 3.3 ± 3.3* | 36.6 ± 9.1* |
| | | <i>t</i> | 41.0 | 8.0 | 9.5 | 3.5 |
| | | <i>P</i> | < 0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 |
| | <i>S. oryzae</i> | Ευαίσθητο | 93.3 ± 3.3 | 28.3 ± 9.4 | 55.0 ± 7.6 | 98.3 ± 1.6 |
| | | Ανθεκτικό | 0.0 ± 0.0* | 0.0 ± 0.0* | 0.0 ± 0.0* | 1.6 ± 1.6* |
| | | <i>t</i> | 28.0 | 2.9 | 7.2 | 41.0 |
| | | <i>P</i> | < 0.05 | < 0.05 | < 0.05 | < 0.05 |
| | <i>O. surinamensis</i> | Ευαίσθητο | 95.0 ± 2.2 | 56.6 ± 5.5 | 33.3 ± 10.2 | 68.3 ± 7.9 |
| | | Ανθεκτικό | 30.0 ± 12.9* | 6.6 ± 4.9* | 13.3 ± 6.6 | 5.0 ± 3.4* |
| | | <i>t</i> | 4.9 | 6.7 | 1.6 | 7.3 |
| | | <i>P</i> | <0.05 | <0.05 | 0.13 | <0.05 |
| | <i>T. castaneum</i> | Ευαίσθητο | 60.0 ± 5.1 | 51.6 ± 10.7 | 36.6 ± 8.8 | 55.0 ± 3.4 |
| | | Ανθεκτικό | 0.0 ± 0.0* | 1.6 ± 1.6* | 3.3 ± 2.1* | 3.3 ± 2.1* |
| | | <i>t</i> | 11.6 | 4.5 | 3.6 | 12.8 |
| | | <i>P</i> | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 |
| 60 | <i>R. dominica</i> | Ευαίσθητο | 100.0 ± 0.0 | 68.3 ± 4.0 | 68.3 ± 4.0 | 71.6 ± 3.0 |

| | | | | | | |
|----|------------------------|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | Ανθεκτικό | 0.0 ± 0.0 | 5.0 ± 2.2* | 10.0 ± 2.5* | 35.0 ± 3.4* |
| | | <i>t</i> | - | 13.7 | 12.2 | 7.9 |
| | | <i>P</i> | - | <0.05 | <0.05 | <0.05 |
| | <i>S. oryzae</i> | Ευαίσθητο | 70.0 ± 5.1 | 51.6 ± 11.6 | 73.3 ± 9.5 | 100.0 ± 0.0 |
| | | Ανθεκτικό | 0.0 ± 0.0* | 0.0 ± 0.0* | 0.0 ± 0.0* | 0.0 ± 0.0 |
| | | <i>t</i> | 13.5 | 4.4 | 7.6 | - |
| | | <i>P</i> | <0.05 | <0.05 | <0.05 | - |
| | <i>O. surinamensis</i> | Ευαίσθητο | 100.0 ± 0.0 | 65.0 ± 5.6 | 58.3 ± 8.7 | 88.3 ± 3 |
| | | Ανθεκτικό | 10.0 ± 5.1* | 16.6 ± 4.9* | 11.6 ± 6* | 23.3 ± 7.6* |
| | | <i>t</i> | 17.4 | 6.4 | 4.4 | 7.9 |
| | | <i>P</i> | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 |
| | <i>T. castaneum</i> | Ευαίσθητο | 100.0 ± 0.0 | 51.6 ± 10.1 | 48.3 ± 7.0 | 51.6 ± 7.9 |
| | | Ανθεκτικό | 1.6 ± 1.6* | 1.6 ± 1.6* | 5.0 ± 2.2* | 3.3 ± 2.1* |
| | | <i>t</i> | 59.0 | 4.8 | 5.8 | 5.8 |
| | | <i>P</i> | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 |
| 90 | <i>R. dominica</i> | Ευαίσθητο | 100.0 ± 0.0 | 68.3 ± 7.9 | 75.0 ± 4.2 | 81.6 ± 4.7 |
| | | Ανθεκτικό | 25.0 ± 3.4* | 5.0 ± 2.2* | 1.6 ± 1.6* | 53.3 ± 9.5* |
| | | <i>t</i> | 21.9 | 7.6 | 15.9 | 2.6 |
| | | <i>P</i> | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 |
| | <i>S. oryzae</i> | Ευαίσθητο | 85.0 ± 4.2 | 35.0 ± 5.6 | 91.6 ± 3.0 | 100.0 ± 0.0 |

| | | | | | | |
|-----|------------------------|-----------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| | | Ανθεκτικό | 0.0 ± 0.0* | 0.0 ± 0.0* | 0.0 ± 0.0* | 0.0 ± 0.0 |
| | | <i>t</i> | 19.8 | 6.2 | 29.8 | - |
| | | <i>P</i> | <0.05 | <0.05 | <0.05 | - |
| | <i>O. surinamensis</i> | Ευαίσθητο | 100.0 ± 0.0 | 86.6 ± 6.1 | 83.3 ± 5.5 | 98.3 ± 1.6 |
| | | Ανθεκτικό | 58.3 ± 8.3* | 20.0 ± 2.5* | 3.3 ± 3.3* | 35 ± 2.2* |
| | | <i>t</i> | 5.0 | 10.0 | 12.3 | 22.7 |
| | | <i>P</i> | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 |
| | <i>T. castaneum</i> | Ευαίσθητο | 83.3 ± 8.0 | 70.0 ± 12.1 | 61.6 ± 17.5 | 83.3 ± 7.6 |
| | | Ανθεκτικό | 1.6 ± 1.6* | 0.0 ± 0.0* | 1.6 ± 1.6* | 1.6 ± 1.6* |
| | | <i>t</i> | 9.9 | 5.7 | 3.3 | 10.4 |
| | | <i>P</i> | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 |
| 150 | <i>R. dominica</i> | Ευαίσθητο | 93.3 ± 6.6 | 75.0 ± 8.8 | 70.0 ± 8.1 | 71.6 ± 7.0 |
| | | Ανθεκτικό | 16.6 ± 14.7* | 3.3 ± 2.1* | 5.0 ± 3.4* | 48.3 ± 9.0 |
| | | <i>t</i> | 4.7 | 7.8 | 7.3 | 2.0 |
| | | <i>P</i> | <0.05 | <0.05 | <0.05 | 0.07 |
| | <i>S. oryzae</i> | Ευαίσθητο | 98.3 ± 1.6 | 85.0 ± 5.0 | 98.3 ± 1.6 | 100.0 ± 0.0 |
| | | Ανθεκτικό | 0.0 ± 0.0* | 0.0 ± 0.0* | 0.0 ± 0.0* | 3.3 ± 2.1* |
| | | <i>t</i> | 59.0 | 17.0 | 59.0 | 45.8 |
| | | <i>P</i> | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 |
| | <i>O. surinamensis</i> | Ευαίσθητο | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |

| | | | | | | |
|-----|------------------------|-----------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| | | Ανθεκτικό | 76.6 ± 8.0* | 33.3 ± 5.5* | 35.0 ± 4.2* | 50.0 ± 7.7* |
| | | <i>t</i> | 2.9 | 11.9 | 15.1 | 6.4 |
| | | <i>P</i> | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 |
| | <i>T. castaneum</i> | Ευαίσθητο | 96.6 ± 2.1 | 95.0 ± 2.2 | 83.3 ± 7.6 | 100.0 ± 0.0 |
| | | Ανθεκτικό | 36.6 ± 10.2* | 1.6 ± 1.6* | 0.0 ± 0.0* | 5.0 ± 3.4* |
| | | <i>t</i> | 5.7 | 33.4 | 10.9 | 27.8 |
| | | <i>P</i> | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 |
| 300 | <i>R. dominica</i> | Ευαίσθητο | 100.0 ± 0.0 | 86.6 ± 4.2 | 80.0 ± 6.8 | 90.0 ± 5.1 |
| | | Ανθεκτικό | 3.3 ± 2.1* | 1.6 ± 1.6* | 3.3 ± 2.1* | 8.3 ± 3.0* |
| | | <i>t</i> | 45.8 | 18.7 | 10.7 | 13.5 |
| | | <i>P</i> | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 |
| | <i>S. oryzae</i> | Ευαίσθητο | 100.0 ± 0.0 | 68.3 ± 6.5 | 91.6 ± 4 | 100.0 ± 0.0 |
| | | Ανθεκτικό | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0* | 0.0 ± 0.0* | 3.3 ± 2.1* |
| | | <i>t</i> | - | 10.4 | 22.8 | 45.8 |
| | | <i>P</i> | - | <0.05 | <0.05 | <0.05 |
| | <i>O. surinamensis</i> | Ευαίσθητο | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |
| | | Ανθεκτικό | 88.3 ± 4.0* | 81.6 ± 4.0* | 78.3 ± 4.7* | 83.3 ± 4.9* |
| | | <i>t</i> | 2.9 | 4.5 | 4.5 | 3.3 |
| | | <i>P</i> | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 |
| | <i>T. castaneum</i> | Ευαίσθητο | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |

| | | | | |
|-----------|-------------|------------|------------|------------|
| Ανθεκτικό | 58.3 ± 7.0* | 8.3 ± 4.0* | 6.6 ± 3.3* | 5.0 ± 2.2* |
| <i>t</i> | 5.9 | 22.8 | 28.0 | 42.4 |
| <i>P</i> | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 |

3.2 Εύρεση του «sweet spot»

Αύξηση του χρόνου έκθεσης στην φωσφίνη αυξάνει την ακινητοποίηση των εντόμων. Πιο συγκεκριμένα, η έκθεση όλων των εργαστηριακών πληθυσμών στα 500 ppm φωσφίνης επέφερε 100% ακινητοποίηση των ενηλίκων, ακόμη και με την 1 ώρα έκθεσης (Διάγραμμα 4), με μόνη εξαίρεση τον εργαστηριακό πληθυσμό του *R. dominica*, όπου παρόμοιο αποτέλεσμα επιτεύχθηκε στις 5 ώρες με το 97.5% των ατόμων να έχουν ακινητοποιηθεί (Πίνακας 6). Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται εντονότερα και στους ανθεκτικούς πληθυσμούς στην ίδια συγκέντρωση φωσφίνης (Πίνακας 7), διαφέροντας όμως σημαντικά, όσο αφορά τον απαιτούμενο χρόνο για την ακινητοποίηση του 99% του πληθυσμού (Πίνακας 5). Για παράδειγμα, ο εργαστηριακός πληθυσμός *R. dominica* απαιτεί 6.9 ώρες, σε αντίθεση με τον ανθεκτικό πληθυσμό (GA6 *R. dominica*) που χρειάζεται 28.3 ώρες για να ακινητοποιηθεί.

Στην περίπτωση των 1000 ppm, η σχέση αυτή είναι γραμμική μέχρι ενός σημείου, πέρα από το οποίο περαιτέρω αύξηση του χρόνου έκθεσης οδηγεί σε μείωση του ποσοστού ακινητοποίησης (Διάγραμμα 4). Αυτό το σημείο φαίνεται να είναι στις 5 ώρες έκθεσης στα 1000 ppm φωσφίνης και είναι ανεξάρτητο του είδους του εντόμου (Διάγραμμα 4). Αυτό το ανεξήγητο φαινόμενο είναι που αποκαλείται χαρακτηριστικά ως «sweet spot». Για παράδειγμα, στο BTS *T. castaneum* παρατηρήθηκε ότι στις 3 ώρες έκθεσης στα 1000 ppm φωσφίνης το ποσοστό των ακινητοποιημένων ενηλίκων ανέρχεται στο 67.5% και με 2 επιπλέον ώρες έκθεσης όλα τα άτομα ήταν ζωντανά, ενώ στην συνέχεια στις 20 ώρες το ποσοστό φτάνει στο 100% (Πίνακας 7)(Διάγραμμα 4). Η ίδια κατάσταση παρατηρείται και στο ASC11 *O. surinamensis* (Πίνακας 7) (Διάγραμμα 4) και στο εργαστηριακό πληθυσμό *R. dominica* (Πίνακας 6) (Διάγραμμα 4).

Στα 2000 ppm, το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται σε όλους τους ανθεκτικούς πληθυσμούς στις 5 ώρες έκθεσης (Διάγραμμα 5). Χαρακτηριστικά, καταγράφηκε ότι το 3TAB *S. oryzae* στις 3 ώρες έκθεσης στα 2000 ppm έχει ποσοστό ακινητοποιημένων ενηλίκων 22.5%, ενώ στις 5 ώρες έκθεσης το ποσοστό αυτό μειώνεται στο 5% (Πίνακας 7) (Διάγραμμα 5).

Στα 3000 ppm φωσφίνης, όλοι οι εργαστηριακοί πληθυσμοί έχουν 100% ακινητοποιημένα άτομα και σε αντίθεση με τα 1000 και 2000 ppm, ενώ βλέπουμε ότι τα αποτελέσματά μας εδώ προσομοιάζουν με αυτά των 500 ppm, όπου η σχέση χρόνου έκθεσης και συγκέντρωσης ακολουθεί την κλασική γραμμική της πορεία (Πίνακες 6, 7)

(Διάγραμμα 5). Επομένως, αντιλαμβανόμαστε ότι το «sweet spot» κάνει την εμφάνιση του σε συγκεκριμένους χρόνους έκθεσης και συγκεκριμένες συγκεντρώσεις φωσφίνης.

Μετά από 7 ημέρες, το «sweet spot» συνεχίζει να υφίσταται στις 5 ώρες τόσο στα 1000 όσο και στα 2000 ppm (Διάγραμμα 6, 7). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν, ο εργαστηριακός πληθυσμός *S. oryzae* όπου στις 3 ώρες έκθεσης στα 1000 ppm έχει ποσοστό θνησιμότητας 95%, ενώ έκθεση στις 5 ώρες στην ίδια συγκέντρωση έχει προκαλέσει 35% θνησιμότητα (Πίνακας 8) (Διάγραμμα 6). Από την άλλη πλευρά, το 3TAB *S. oryzae* στις 3 ώρες έκθεσης στα 2000 ppm έχει ποσοστό νεκρών ατόμων 25% και με 2 επιπλέον ώρες έκθεσης το ποσοστό αυτό μειώνεται κατά το ήμισυ (Πίνακας 9) (Διάγραμμα 7). Συνεπώς, το «sweet spot» δε σχετίζεται μόνο με την ακινητοποίηση των εντόμων αλλά και με την θνησιμότητά τους.

Πίνακας 5: Ανάλυση Probit για LT₅₀, LT₉₅ και LT₉₉ (διαστήματα εμπιστοσύνης) διαφορετικών πληθυσμών των ειδών εντόμων που εξετάστηκαν μετά την έκθεσή τους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις φωσφίνης (500, 1000, 2000 και 3000 ppm), εκφρασμένο σε ώρες έως την ακινητοποίηση. Με την ένδειξη Lab αναφερόμαστε σε εργαστηριακούς πληθυσμούς.

| Συγκέντρωση (ppm) | Πληθυσμός(κωδικός, είδος) | LT ₅₀ | LT ₉₅ | LT ₉₉ | Slope ± SE | X ² | P |
|-------------------|------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------|----------------|-------|
| 500 | Lab <i>R. dominica</i> | 0.91 ^a | 5.2 (4.1-7.8) | 6.9 (5.4-11.0) | 4.2 ± 0.0 | 16.0 | 0.81 |
| | Lab <i>S. oryzae</i> | b | b | b | b | b | b |
| | Lab <i>O. surinamensis</i> | b | b | b | b | b | b |
| | Lab <i>T. castaneum</i> | b | b | b | b | b | b |
| | GA6 <i>R.dominica</i> | 14.2 (12.3-16.3) | 24.1 (21.4-28.0) | 28.3 (24.9-33.1) | 9.3 ± 0.0 | 20.3 | 0.55 |
| | 3TAB <i>S. oryzae</i> | 17.1 ^a | 28.5 ^a | 33.3 ^a | 9.9 ± 0.0 | 788.1 | <0.05 |
| | ASC11 <i>O. surinamensis</i> | 0.8 ^a | 4.6 (3.6-7.1) | 6.2 (4.8-10.3) | 3.9 ± 0.1 | 25.5 | 0.27 |
| | BTS <i>T. castaneum</i> | 4.0 (3.7-4.4) | 5.4 (5.0-6.1) | 5.9 (5.4-6.9) | 6.4 ± 0.1 | 11.7 | 0.96 |
| 1000 | Lab <i>R. dominica</i> | 3.2 ^a | 19.3 (13.2-41.5) | 25.9 (17.5-57.8) | 5.4 ± 0.0 | 53.2 | <0.05 |
| | Lab <i>S. oryzae</i> | b | 10.5 (5.4-33.5) | 23.0 (14.2-90.4) | 2.4 ± 0.0 | 29.2 | 0.13 |
| | Lab <i>O. surinamensis</i> | b | b | b | b | b | b |

| | | | | | | | |
|------|------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------|------|-------|
| | Lab <i>T. castaneum</i> | b | b | b | b | b | b |
| | GA6 <i>R. dominica</i> | 13.5 (11.7-15.6) | 22.7 (20.0-26.5) | 26.5 (23.3-31.2) | 9.1 ± 0.0 | 17.4 | 0.73 |
| | 3TAB <i>S. oryzae</i> | 16.4 ^a | 21.4 ^a | 23.5 ^a | 1.1 ± 0.2 | 6.2 | 0.99 |
| | ASC11 <i>O. surinamensis</i> | 0.6 ^a | 10.2 (7.0-28.6) | 14.2 (9.4-42.5) | 2.7 ± 0.0 | 30.9 | 0.09 |
| | BTS <i>T. castaneum</i> | 7.3 (4.4-17.9) | 16.7 (10.9-52.7) | 20.7 (13.3-67.5) | 5.5 ± 0.0 | 84.7 | <0.05 |
| 2000 | Lab <i>R. dominica</i> | 1.4 (0.7-2.0) | 4.4 (3.7-5.8) | 5.7 (4.7-7.7) | 5.5 ± 0.0 | 25.2 | 0.28 |
| | Lab <i>S. oryzae</i> | b | b | b | b | b | b |
| | Lab <i>O. surinamensis</i> | b | b | b | b | b | b |
| | Lab <i>T. castaneum</i> | b | b | b | b | b | b |
| | GA6 <i>R. dominica</i> | 9.6 (7.6-13.8) | 15.9 (12.3-24.3) | 18.5 (14.2-28.7) | 4.7 ± 0.0 | 19.3 | 0.62 |
| | 3TAB <i>S. oryzae</i> | 4.9 (4.3-6.0) | 8.2 (6.8-11.4) | 9.5 (7.8-13.7) | 4.6 ± 0.1 | 8.3 | 0.99 |
| | ASC11 <i>O. surinamensis</i> | b | 9.7 ^a | 15.6 ^a | 2.3 ± 0.0 | 63.3 | <0.05 |
| | BTS <i>T. castaneum</i> | 4.0 (3.6-4.3) | 5.3 (4.9-6.0) | 5.8 (5.3-6.7) | 6.6 ± 0.1 | 8.2 | 0.99 |
| 3000 | Lab <i>R. dominica</i> | b | 1.2 ^a | 2.0 ^a | 1.0 ± 0.7 | 4.0 | 0.99 |
| | Lab <i>S. oryzae</i> | b | b | b | b | b | b |
| | Lab <i>O. surinamensis</i> | b | b | b | b | b | b |

| | | | | | | |
|------------------------------|---------------|------------------|------------------|-----------|------|------|
| Lab <i>T. castaneum</i> | b | b | b | b | b | b |
| GA6 <i>R. dominica</i> | 5.8 (4.9-8.4) | 10.0 (7.8-17.3) | 11.8 (8.9-21.1) | 3.6 ± 0.1 | 28.0 | 0.17 |
| 3TAB <i>S. oryzae</i> | 5.7 (5.1-7.6) | 7.9 (6.6-13.2) | 8.9 (7.2-15.6) | 3.2 ± 0.2 | 11.7 | 0.96 |
| ASC11 <i>O. surinamensis</i> | b | 2.9 (1.6-13.1) | 5.1 (3.4-39.8) | 2.1 ± 0.1 | 12.9 | 0.93 |
| BTS <i>T. castaneum</i> | b | 1.3 ^a | 2.1 ^a | 1.1 ± 0.8 | 2.2 | 0.26 |

a Δεν μπορούν να εκτιμηθούν τα διαστήματα εμπιστοσύνης.

b Δεν μπορεί να εκτιμηθεί ο χρόνος για την ακινητοποίηση.

Πίνακας 6: Μέσο ποσοστό ακινητοποίησης (% \pm τυπικό σφάλμα) των ευαίσθητων πληθυσμών, με τη χρήση της Ανάλυσης Διασποράς (ANOVA) που εξετάστηκαν, για κάθε χρόνοέκθεσης (1, 3, 5, 20, 30 και 40 ώρες) και διαφορετική συγκέντρωση (500, 1000, 2000 και 3000 ppm) φωσφίνης. Οι μέσοι όροι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα μέσα στο ίδιο χρόνο έκθεσης για κάθε ευαίσθητο πληθυσμό, δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους σύμφωνα με το κριτήριο Tukey-Kramer HSD test σε 0.05. Όπου δεν υπάρχουν γράμματα, δεν σημειώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά.

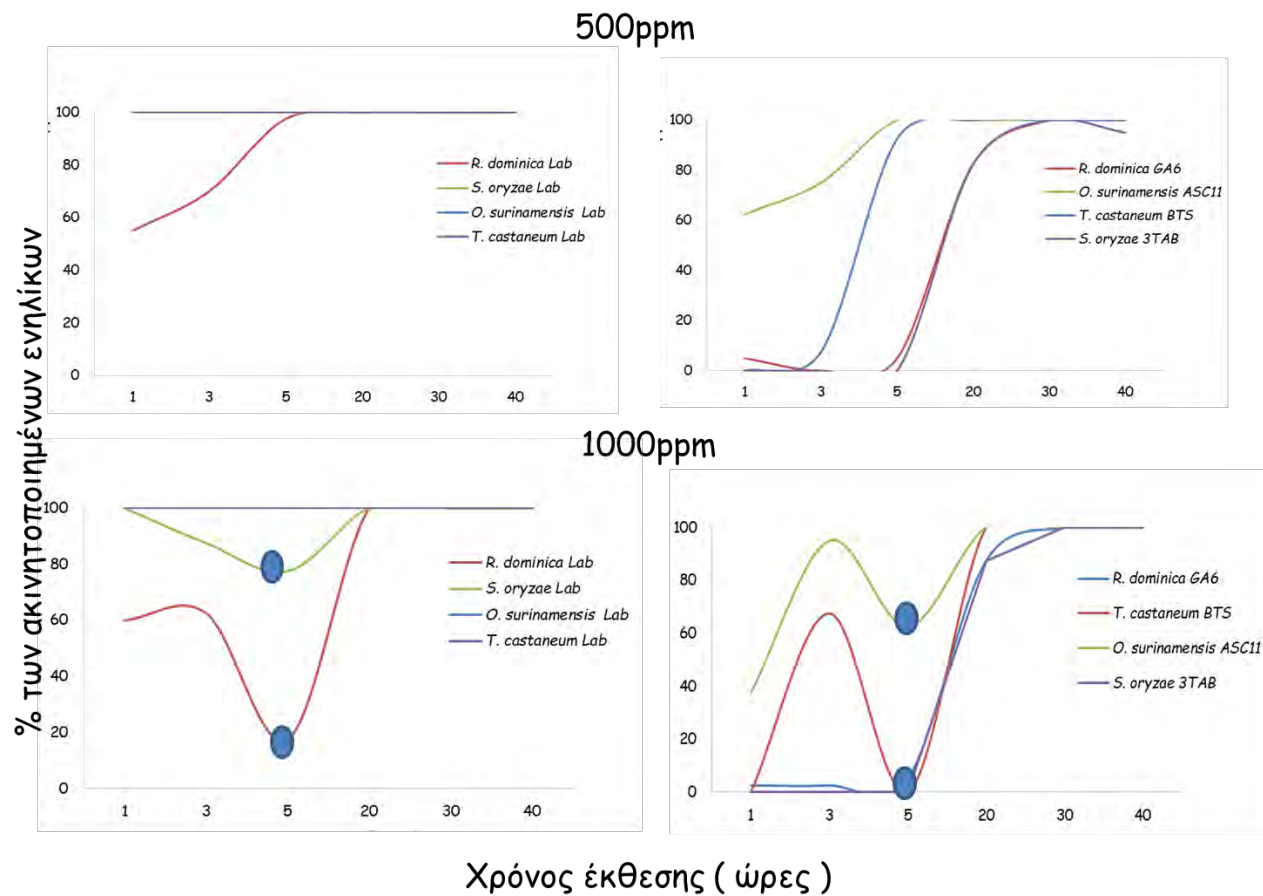
| | | Χρόνος έκθεσης (ώρες) | | | | | |
|-------------------|----------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Συγκέντρωση (ppm) | Πληθυσμός(Κωδικός, είδος) | 1 | 3 | 5 | 20 | 30 | 40 |
| 500 | Lab <i>R. dominica</i> | 55.0 \pm 8.6 a | 70.0 \pm 10.8 | 97.5 \pm 2.5 b | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| | Lab <i>S. oryzae</i> | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 b | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| | Lab <i>O. surinamensis</i> | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| | Lab <i>T. castaneum</i> | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| 1000 | Lab <i>R. dominica</i> | 60.0 \pm 8.1 a | 62.5 \pm 15.4 | 17.5 \pm 6.2 a | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| | Lab <i>S. oryzae</i> | 100.0 \pm 0.0 | 87.5 \pm 4.7 a | 82.5 \pm 8.5 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| | Lab <i>O. surinamensis</i> | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| | Lab <i>T. castaneum</i> | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |

| | | | | | | | |
|------|----------------------------|---------------|---------------|---------------|-------------|-------------|-------------|
| 2000 | Lab <i>R. dominica</i> | 32.5 ± 11.0 a | 92.5 ± 2.5 | 92.5 ± 4.7 b | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |
| | Lab <i>S. oryzae</i> | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 b | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |
| | Lab <i>O. surinamensis</i> | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |
| | Lab <i>T. castaneum</i> | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |
| 3000 | Lab <i>R. dominica</i> | 92.5 ± 4.7 b | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 b | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |
| | Lab <i>S. oryzae</i> | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0b | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |
| | Lab <i>O. surinamensis</i> | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |
| | Lab <i>T. castaneum</i> | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |

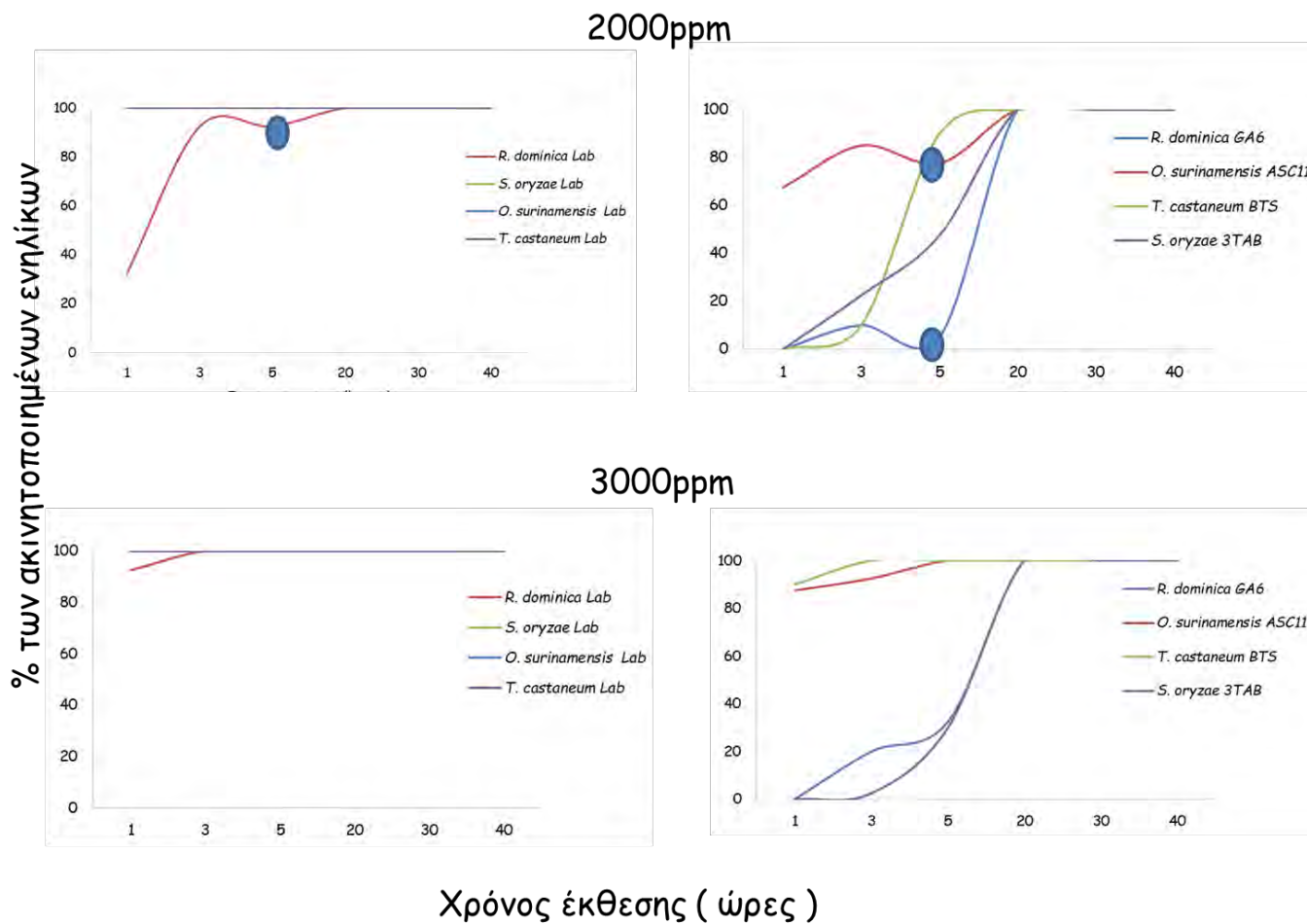
Πίνακας 7: Μέσο ποσοστό ακινητοποίησης ($\% \pm$ τυπικό σφάλμα) των ανθεκτικών πληθυσμών, με τη χρήση της Ανάλυσης Διασποράς (ANOVA) που εξετάστηκαν, για κάθε χρόνο έκθεσης (1, 3, 5, 20, 30 και 40 ώρες) και διαφορετική συγκέντρωση (500, 1000, 2000 και 3000 ppm) φωσφίνης. Οι μέσοι όροι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα μέσα στο ίδιο χρόνο έκθεσης για κάθε ευαίσθητο πληθυσμό, δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους σύμφωνα με το κριτήριο Tukey-Kramer HSD test σε 0.05. Όπου δεν υπάρχουν γράμματα, δεν σημειώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά.

| Συγκέντρωση (ppm) | Πληθυσμός(Κωδικός, είδος) | Χρόνος έκθεσης (ώρες) | | | | | |
|-------------------|------------------------------|-----------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | 1 | 3 | 5 | 20 | 30 | 40 |
| 500 | GA6 <i>R. dominica</i> | 5.0 \pm 2.8* | 0.0 \pm 0.0* | 5.0 \pm 2.8* | 82.5 \pm 8.5 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| | 3TAB <i>S. oryzae</i> | 0.0 \pm 0.0 | 0.0 \pm 0.0a | 0.0 \pm 0.0a | 82.5 \pm 8.5 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| | ASC11 <i>O. surinamensis</i> | 62.5 \pm 18.8a | 75.0 \pm 6.4 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| | BTS <i>T. castaneum</i> | 0.0 \pm 0.0a | 7.5 \pm 7.5a* | 92.5 \pm 4.7b | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| 1000 | GA6 <i>R. dominica</i> | 2.5 \pm 2.5* | 2.5 \pm 2.5* | 5.0 \pm 2.8 | 87.5 \pm 7.5 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| | 3TAB <i>S. oryzae</i> | 0.0 \pm 0.0 | 0.0 \pm 0.0a* | 0.0 \pm 0.0a* | 87.5 \pm 7.5 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| | ASC11 <i>O. surinamensis</i> | 37.5 \pm 6.2a* | 95.0 \pm 2.9 | 62.5 \pm 8.5 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| | BTS <i>T. castaneum</i> | 0.0 \pm 0.0a | 67.5 \pm 12.5b* | 0.0 \pm 0.0a | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| 2000 | GA6 <i>R. dominica</i> | 0.0 \pm 0.0* | 10.0 \pm 5.7* | 5.0 \pm 5.0* | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |

| | | | | | | | |
|------|------------------------------|--------------|--------------|---------------|-------------|-------------|-------------|
| 3000 | 3TAB <i>S. oryzae</i> | 0.0 ± 0.0 | 22.5 ± 0.0b* | 5.0 ± 5.0a* | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |
| | ASC11 <i>O. surinamensis</i> | 67.5 ± 4.7a* | 85.0 ± 5.0 | 77.5 ± 22.5 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |
| | BTS <i>T. castaneum</i> | 0.0 ± 0.0a | 100.0 ± 0.0a | 90.0 ± 7.0b | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |
| | GA6 <i>R. dominica</i> | 0.0 ± 0.0* | 20.0 ± 12.2* | 32.5 ± 13.1* | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |
| | 3TAB <i>S. oryzae</i> | 0.0 ± 0.0 | 2.5 ± 2.5a* | 30.0 ± 12.2b* | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |
| | ASC11 <i>O. surinamensis</i> | 87.5 ± 7.5b | 92.5 ± 4.7 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |
| | BTS <i>T. castaneum</i> | 90.0 ± 4.0b* | 100.0 ± 0.0c | 100.0 ± 0.0b | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |



Διάγραμμα 4: Μέσο ποσοστό ακινητοποιημένων ατόμων ευαίσθητων (αριστερά) και ανθεκτικών (δεξιά) πληθυσμών εντόμων που εκτέθηκαν για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (1, 3, 5, 20, 30 και 40 ώρες) σε 500 (πάνω) και 1000 ppm (κάτω) φωσφίνης. Το μπλε κυκλικό σημείο υποδηλώνει την ύπαρξη του «sweet spot».



Διάγραμμα 5: Μέσο ποσοστό ακινητοποιημένων ατόμων ευαίσθητων (αριστερά) και ανθεκτικών (δεξιά) πληθυσμών εντόμων που εκτέθηκαν για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (1, 3, 5, 20, 30 και 40 ώρες) σε 2000 (πάνω) και 3000 ppm (κάτω) φωσφίνης. Το μπλε κυκλικό σημείο υποδηλώνει την ύπαρξη του «sweet spot».

Πίνακας 8: Μέσο ποσοστό ακινητοποίησης (% \pm τυπικό σφάλμα) των ευαίσθητων πληθυσμών, με την χρήση της Ανάλυσης Διασποράς (ANOVA) που εξετάστηκαν, για κάθε χρόνο έκθεσης (1, 3, 5, 20, 30, 40 ώρες) και διαφορετική συγκέντρωση (500, 1000, 2000 και 3000 ppm) φωσφίνης μετά από 7 ημέρες από την έκθεση στην φωσφίνη. Οι μέσοι όροι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα μέσα στο ίδιο χρόνο έκθεσης και συγκέντρωσης, δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους σύμφωνα με το κριτήριο Tukey-Kramer HSD test σε 0.05. Όπου δεν υπάρχουν γράμματα, δεν σημειώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά.

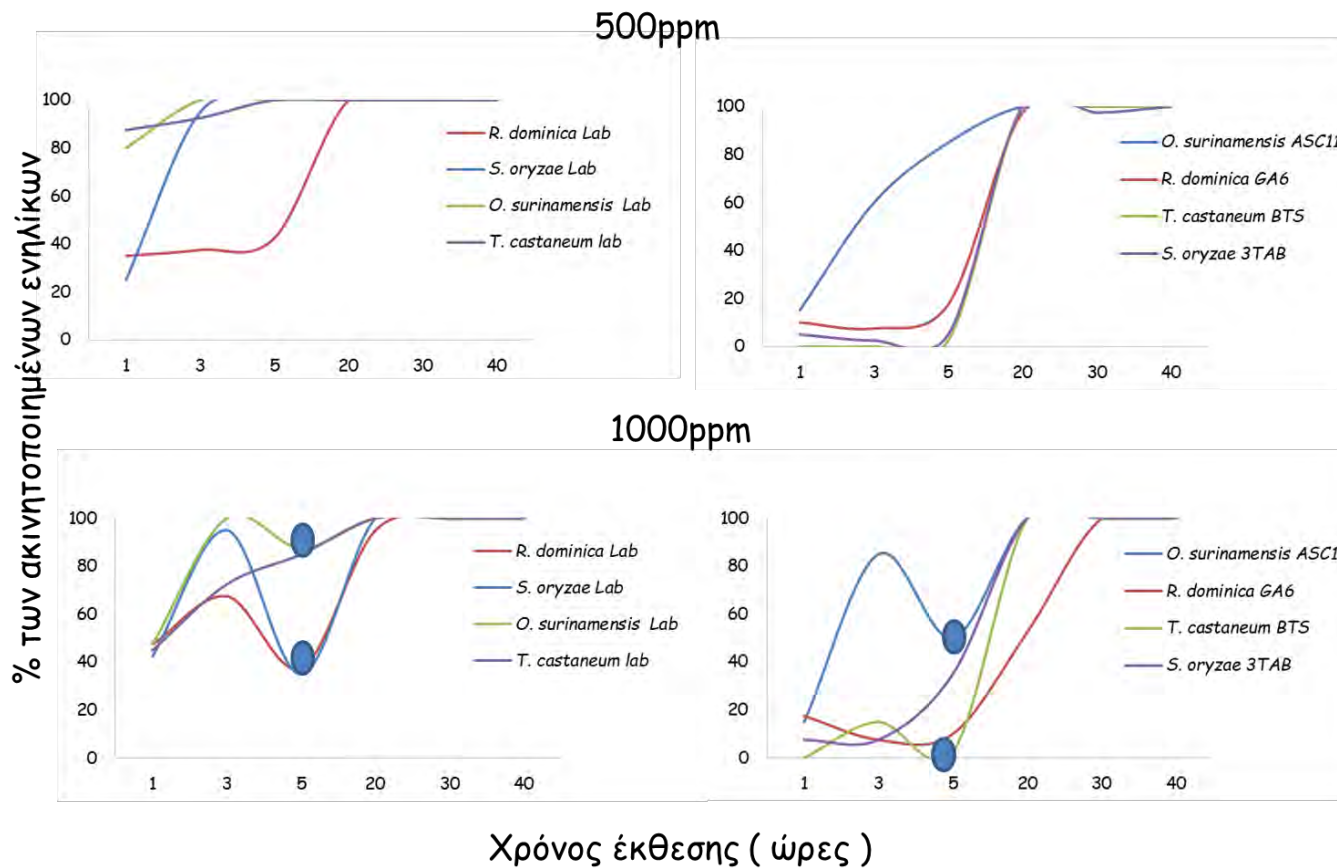
| Συγκέντρωση (ppm) | Πληθυσμός (κωδικός, είδος) | Χρόνος έκθεσης (ώρες) | | | | | |
|-------------------|----------------------------|-----------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|
| | | 1 | 3 | 5 | 20 | 30 | 40 |
| 500 | Lab <i>R. dominica</i> | 35.0 \pm 9.5a | 37.5 \pm 12.5a | 42.5 \pm 6.2a | 100.0 \pm 0.0a | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| | Lab <i>S. oryzae</i> | 25.0 \pm 5.0a | 95.0 \pm 2.8ab | 100.0 \pm 0.0b | 100.0 \pm 0.0b | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| | Lab <i>O. surinamensis</i> | 80.0 \pm 7.0ab | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0a | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| | Lab <i>T. castaneum</i> | 87.5 \pm 4.7b | 92.5 \pm 4.7b | 100.0 \pm 0.0a | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| 1000 | Lab <i>R. dominica</i> | 47.5 \pm 11.8a | 67.5 \pm 4.7ab | 37.5 \pm 4.7a | 95.0 \pm 2.8a | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| | Lab <i>S. oryzae</i> | 42.5 \pm 11.0a | 95.0 \pm 2.8ab | 35.0 \pm 5.0a | 100.0 \pm 0.0b | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| | Lab <i>O. surinamensis</i> | 47.5 \pm 6.9a | 100.0 \pm 0.0 | 87.5 \pm 7.5a | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| | Lab <i>T. castaneum</i> | 45.0 \pm 6.4a | 72.5 \pm 6.2ab | 85.0 \pm 8.6a | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| 2000 | Lab <i>R. dominica</i> | 35.0 \pm 13.2a | 52.5 \pm 11.0a | 70.0 \pm 4.0b | 100.0 \pm 0.0a | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| | Lab <i>S. oryzae</i> | 27.5 \pm 4.7a | 82.5 \pm 4.7a | 100.0 \pm 0.0b | 90.0 \pm 4.0a | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| | Lab <i>O. surinamensis</i> | 62.5 \pm 13.7a | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0a | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| | Lab <i>T. castaneum</i> | 97.5 \pm 2.5b | 97.5 \pm 2.5b | 75.0 \pm 9.5a | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |

| | | | | | | | |
|------|----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|
| 3000 | Lab <i>R. dominica</i> | 75.0 ± 6.4a | 100.0 ± 0.0b | 97.5 ± 2.5c | 100.0 ± 0.0a | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |
| | Lab <i>S. oryzae</i> | 85.0 ± 2.8b | 100.0 ± 0.0b | 100.0 ± 0.0b | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |
| | Lab <i>O. surinamensis</i> | 100.0 ± 0.0b | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0a | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |
| | Lab <i>T. castaneum</i> | 100.0 ± 0.0b | 65.0 ± 8.6a | 100.0 ± 0.0a | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |

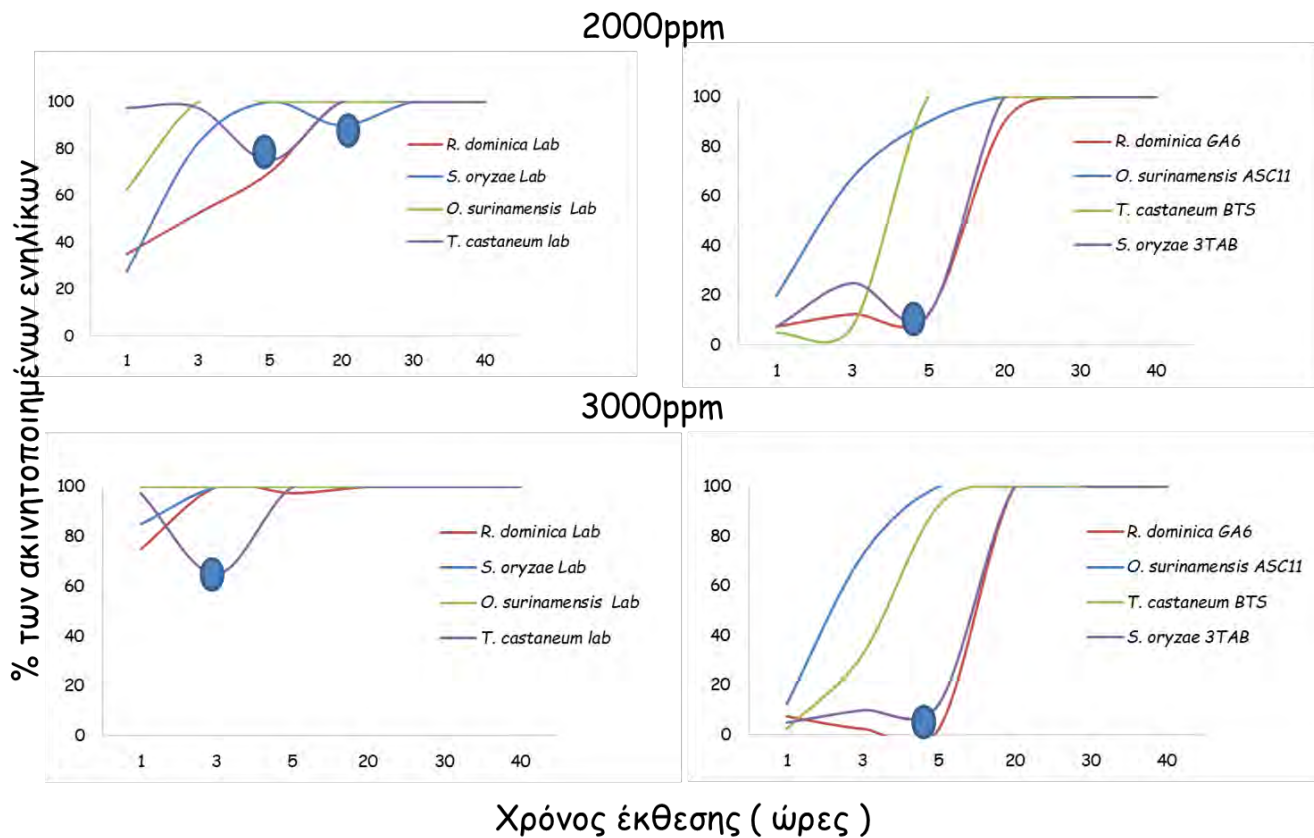
Πίνακας 9: Μέσο ποσοστό ακινητοποίησης (% \pm τυπικό σφάλμα) των ανθεκτικών πληθυσμών, με την χρήση της Ανάλυσης Διασποράς (ANOVA) που εξετάστηκαν για κάθε χρόνο έκθεσης (1, 3, 5, 20, 30, 40 ώρες) και διαφορετική συγκέντρωση (500, 1000, 2000 και 3000 ppm) φωσφίνης μετά από 7 ημέρες από την έκθεση στην φωσφίνη. Οι μέσοι όροι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα μέσα στο ίδιο χρόνο έκθεσης και συγκέντρωση, δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους σύμφωνα με το κριτήριο Tukey-Kramer HSD test σε 0.05. Όπου δεν υπάρχουν γράμματα, δεν σημειώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά.

| Συγκέντρωση (ppm) | Πληθυσμός(κωδικός, είδος) | Χρόνος έκθεσης (ώρες) | | | | | |
|-------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|
| | | 1 | 3 | 5 | 20 | 30 | 40 |
| 500 | GA6 <i>R. dominica</i> | 10.0 \pm 5.7a | 7.5 \pm 4.7a | 17.5 \pm 7.5a | 97.5 \pm 2.5b | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| | 3TAB <i>S. oryzae</i> | 5.0 \pm 2.8a | 2.5 \pm 2.5a | 5.0 \pm 5.0a | 100.0 \pm 0.0 | 97.5 \pm 2.5a | 100.0 \pm 0.0 |
| | ASC11 <i>O. surinamensis</i> | 15.0 \pm 6.4a | 60.0 \pm 7.0a | 85.0 \pm 5.0b | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| | BTS <i>T. castaneum</i> | 0.0 \pm 0.0a | 0.0 \pm 0.0a | 2.5 \pm 2.5a | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| 1000 | GA6 <i>R. dominica</i> | 17.5 \pm 6.2a | 7.5 \pm 4.7a | 10.0 \pm 4.0a | 52.5 \pm 13.7a | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| | 3TAB <i>S. oryzae</i> | 7.5 \pm 4.7a | 7.5 \pm 4.7a | 35.0 \pm 6.4b | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0a | 100.0 \pm 0.0 |
| | ASC11 <i>O. surinamensis</i> | 15.0 \pm 6.4a | 85.0 \pm 6.4a | 50.0 \pm 5.7a | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| | BTS <i>T. castaneum</i> | 0.0 \pm 0.0a | 15.0 \pm 6.4a | 2.5 \pm 2.5a | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| 2000 | GA6 <i>R. dominica</i> | 7.5 \pm 4.7a | 12.5 \pm 6.2a | 12.5 \pm 4.7a | 90.0 \pm 4.0b | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| | 3TAB <i>S. oryzae</i> | 7.5 \pm 2.5a | 25.0 \pm 8.6a | 12.5 \pm 2.5ab | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0a | 100.0 \pm 0.0 |
| | ASC11 <i>O. surinamensis</i> | 20.0 \pm 8.1a | 67.5 \pm 4.7a | 90.0 \pm 4.0b | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| | BTS <i>T. castaneum</i> | 5.0 \pm 2.8a | 7.5 \pm 2.5a | 0.0 \pm 0.0a | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |

| | | | | | | | |
|------|------------------------------|-------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|
| 3000 | GA6 <i>R. dominica</i> | 7.5 ± 4.7a | 2.5 ± 2.5a | 2.5 ± 2.5a | 92.5 ± 2.5b | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |
| | 3TAB <i>S. oryzae</i> | 5.0 ± 2.8a | 10.0 ± 5.7a | 12.5 ± 9.4ab | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0a | 100.0 ± 0.0 |
| | ASC11 <i>O. surinamensis</i> | 12.5 ± 2.5a | 72.5 ± 8.5a | 92.5 ± 2.5b | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |
| | BTS <i>T. castaneum</i> | 2.5 ± 2.5a | 32.5 ± 2.5b | 92.5 ± 2.5b | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |



Διάγραμμα 6: Μέσο ποσοστό ακινητοποιημένων ατόμων ευαίσθητων (αριστερά) και ανθεκτικών (δεξιά) πληθυσμών εντόμων που εκτέθηκαν για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (1, 3, 5, 20, 30 και 40 ώρες) σε 500 (πάνω) και 1000 ppm (κάτω) φωσφίνης μετά από 7 ημέρες από το πέρας της έκθεσης. Το μπλε κυκλικό σημείο υποδηλώνει την ύπαρξη του «sweet spot».



Διάγραμμα 7: Μέσο ποσοστό ακινητοποιημένων ατόμων ευαίσθητων (αριστερά) και ανθεκτικών (δεξιά) πληθυσμών εντόμων που εκτέθηκαν για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (1, 3, 5, 20, 30 και 40 ώρες) σε 2000 (πάνω) και 3000 ppm (κάτω) φωσφίνης μετά από 7 ημέρες από το πέρας της έκθεσης. Το μπλε κυκλικό σημείο υποδηλώνει την ύπαρξη του «sweet spot».

4. Συζήτηση

Με βάση την κριτική επισκόπηση της σχετικής βιβλιογραφίας, η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη έρευνα που έχει διεξαχθεί για την διεύρεση του φαινομένου «sweet spot» σε εφαρμογές φωσφίνης σε έντομα αποθηκευμένων προϊόντων. Παράλληλα με αυτό, εξετάστηκε και η γραμμικότητα της σχέσης χρόνου έκθεσης και συγκέντρωσης φωσφίνης σε έντομα που έχουν εκτεθεί σε φωσφίνη. Το συγκεκριμένο υποκαπνιστικό εντομοκτόνο έχει απασχολήσει εντονότερα την επιστημονική κοινότητα τα τελευταία 40 χρόνια ως προς την ανάπτυξη ανθεκτικότητας των εντόμων σε αυτό (Champ and Dyte, 1976; Nayak et al., 2020).

Στην πρώτη βιοδοκιμή του πειράματός μας η ανάνηψη των ατόμων που είχαν εκτεθεί στα 3000 ppm φωσφίνης παρατηρήθηκε μετά το πέρας της έκθεσης (2 ώρες, 1, 2 και 7 ημέρες) ανεξαρτήτως του είδους και του επιπέδου ανθεκτικότητας του πληθυσμού των εντόμων που εξετάστηκαν. Μεγαλύτερα ποσοστά ανάνηψης διαπιστώθηκαν στους ανθεκτικούς πληθυσμούς κατά την 1^η και 2^η μέρα από το πέρας της έκθεσης, τα οποία διέφεραν στατιστικώς σημαντικά από τα αντίστοιχα των ευαίσθητων πληθυσμών. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της καθυστερημένης αντίδρασης τα ποσοστά των ακινητοποιημένων ατόμων και των ατόμων που είχαν ανανήψει εμφάνισαν μεταβολές, γεγονός που χαρακτηρίζει την ανάνηψη των εντόμων που εκτέθηκαν στην φωσφίνη ως ένα παροδικό φαινόμενο. Όλα τα παραπάνω ευρήματα της έρευνας μας συνάδουν με αυτά των Athanassiou et al. (2019), οι οποίοι εφάρμοσαν 1000 και 3000 ppm φωσφίνης σε ένα ανθεκτικό και ένα ευαίσθητο πληθυσμό του *T. castaneum* για συνολικό διάστημα 90 λεπτών και στη συνέχεια εξέτασαν την αντίδραση τους μετά το πέρας της έκθεσης για χρονικά διαστήματα παραπλήσια (2 ώρες, 1, 2, 3 και 7 ημέρες) των δικών μας. Ανάνηψη των ατόμων παρατηρήθηκε και στις 2 συγκεντρώσεις με μεγαλύτερα ποσοστά να επιτυγχάνονται στα 1000 ppm στο ανθεκτικό στέλεχος.

Την τελευταία μέρα της περιόδου παρατήρησης (7^η μέρα), τα ποσοστά ακινητοποιημένων εντόμων αυξήθηκαν τόσο στους ευαίσθητους όσο και στους ανθεκτικούς πληθυσμούς διαφέροντας όμως σημαντικά μεταξύ τους για όλα τα χρονικά διαστήματα έκθεσης (15, 30, 60, 90, 150 και 300 λεπτά). Όσον αφορά τους ευαίσθητους πληθυσμούς, το ποσοστό των ακινητοποιημένων εντόμων στους μεγαλύτερους χρόνους έκθεσης στη φωσφίνη για τα περισσότερα είδη εντόμων δεν διέφερε στατιστικώς σημαντικά μεταξύ των χρονικών διαστημάτων μετά το πέρας της έκθεσης (2 ώρες, 1, 2 και 7 ημέρες). Επομένως, τα υψηλά ποσοστά ακινητοποιημένων εντόμων που

καταγράφηκαν σε όλη την περίοδο παρατήρησης στα ευαίσθητα στελέχη, κατά την 7^η ημέρα αφορούν ποσοστά θνησιμότητας. Με άλλα λόγια, σε αρκετές περιπτώσεις, με βάση την ακινητοποίηση μπορεί να προβλεφθεί και η επερχόμενη θνησιμότητα, και εμμέσως και το επίπεδο ανθεκτικότητας (Athanassiou et al., 2019).

Από την άλλη πλευρά, όσο αφορά την αντίδραση των ατόμων των ανθεκτικών πληθυσμών, μετά τα υψηλά ποσοστά ακινητοποίησης που καταγράφηκαν στην αρχή της περιόδου παρατήρησης μετά το πέρας της έκθεσης στην φωσφίνη (2 ώρες), κυρίως στα μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα έκθεσης (90, 150 και 300 λεπτά), ακολούθησε η ανάνηψη μεγάλου ποσοστού αυτών. Στα μικρότερα χρονικά διαστήματα έκθεσης (15, 30 και 60 λεπτά) η ακινητοποίηση των εντόμων στις περισσότερες των περιπτώσεων δεν εκδηλώνεται παρά μόνο κατά την 7^η ημέρα από το πέρας της έκθεσης στην φωσφίνη. Έτσι, από τα στοιχεία του πειράματος μπορούμε να εξάγουμε το συμπέρασμα ότι η γρήγορη ακινητοποίηση των εντόμων οδηγεί σε μειωμένη ανάνηψη ή μηδενική ανάνηψη, ενώ η καθυστερημένη εκδήλωση της ακινητοποίησης προκαλεί ταχεία ανάνηψη των ατόμων. Άρα, η ακινητοποίηση δεν σημαίνει σε όλες τις περιπτώσεις απαραίτητα, θνησιμότητα (π.χ. ανθεκτικοί πληθυσμοί), όμως επιφέρει θνησιμότητα στους ευαίσθητους πληθυσμούς (Athanassiou et al., 2019).

Στην δεύτερη βιοδοκιμή, στα 500 και 3000 ppm φωσφίνης η σχέση χρόνου έκθεσης και ακινητοποίησης των εντόμων ακολουθεί το κλασσικό γραμμικό μοντέλο, όπου αύξηση του χρόνου έκθεσης επιφέρει αύξηση της ακινητοποίησης, και στις πιο πολλές περιπτώσεις, αύξηση της επερχόμενης (καθυστερημένης) θνησιμότητας. Στα 1000 ppm η σχέση αυτή καταγράφηκε να είναι γραμμική μέχρι ενός συγκεκριμένου ορίου, το οποίο είναι οι 5 ώρες έκθεσης. Παραπάνω ώρες έκθεσης των εντόμων στην φωσφίνη οδηγούν σε μείωση της ακινητοποίησής τους και αύξηση του απαραίτητου χρόνου για την θνησιμότητα του 99% του πληθυσμού (LT₉₉). Το φαινόμενο αυτό έχει πρόσφατα ονομαστεί «γλυκό σημείο» ή διεθνώς «sweet spot» και όπως φαίνεται από το δεδομένα της παρούσας έρευνας είναι ανεξάρτητο του είδους των εντόμων. Στα 2000 ppm φωσφίνης παρατηρήθηκε «sweet spot» στο ίδιο χρονικό διάστημα έκθεσης (5 ώρες) για τους ανθεκτικούς πληθυσμούς. Άρα, το «sweet spot» εμφανίζεται σε συγκεκριμένες υψηλές συγκεντρώσεις φωσφίνης και σε συγκεκριμένους χρόνους έκθεσης. Στην έρευνα του Winks (1984), χρησιμοποιήθηκε ένα ευαίσθητο στέλεχος *T. castaneum*, το οποίο εκτέθηκε σε ένα σύνολο συγκεντρώσεων φωσφίνης που κυμαινόταν από 0.2 έως 0.51 mg/l και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την έρευνα αυτή αναδεικνύουν ως όριο συγκέντρωσης τα 0.5 mg/l (357.09 ppm), πέρα από το οποίο αύξηση της συγκέντρωσης

φωσφίνης οδηγεί σε μείωση της θνησιμότητας των ατόμων. Τα δεδομένα αυτά συγκρίνονται με τα αποτελέσματα της έρευνάς μας καθώς οι συγκεντρώσεις εμφάνισης του «sweet spot» είναι τα 1000 και 2000 ppm, τα οποία υπερβαίνουν το κατώτερο όριο των 0.5 mg/l. Ο Winks (1984) επίσης αναφέρει στην συγκεκριμένη έρευνα, ότι σε τέτοιες υψηλές συγκεντρώσεις φωσφίνης (>0.5 mg/l) τα άτομα του *T. castaneum*, αυξάνουν την αντίστασή τους στην επίδραση της φωσφίνης μέσω της ακινητοποίησής τους. Συγκεκριμένα, ανακάλυψε ότι αύξηση της συγκέντρωσης από 0.54 (385.6 ppm) έως 51 mg/l (36423.1 ppm), είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση του LD₅₀ έως 20 φορές, ενώ του LD₉₉ έως 64 φορές. Απόκλιση της σχέσης χρόνου έκθεσης και της συγκέντρωσης φωσφίνης από το γραμμικό μοτίβο σε υψηλές συγκεντρώσεις φωσφίνης έχει εντοπιστεί και σε άλλα είδη εντόμων (Monro et al., 1973; Bell, 1979).

Μετά από 7 ημέρες από το πέρας της έκθεσης στην φωσφίνη, στις συγκεντρώσεις των 1000 και 2000 ppm στις 5 ώρες έκθεσης το «sweet spot» συνεχίζει να υφίσταται και σε εργαστηριακούς (ευαίσθητους) και ανθεκτικούς πληθυσμούς. Δηλαδή, το «sweet spot» δε σχετίζεται μόνο με την ακινητοποίηση των εντόμων αλλά αφορά και την θνησιμότητα. Γενικότερα, έχει αποδειχθεί ότι η φωσφίνη δρα στο αναπνευστικό σύστημα των εντόμων αναστέλλοντας την αναπνοή και ότι ο ρυθμός και ο βαθμός αναστολής εξαρτάται από τη συγκέντρωση φωσφίνης (Bang and Telford, 1966; Nakakita et al., 1974; Nakakita and Winks, 1981). Με αυτόν τον τρόπο φαίνεται ότι τα έντομα δύναται να επιβιώσουν στην έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις φωσφίνης, μειώνοντας τον ρυθμό απορρόφησης φωσφίνης και αυξάνοντας τον χρόνο για εμφάνιση της ακινητοποίησης (Winks, 1984). Σύμφωνα με τους Bang and Telford (1966) και Bond et al. (1969) ο χρόνος που απαιτείται για την εμφάνιση της ακινητοποίησης μεταβάλλεται ανάλογα με τη συγκέντρωση της φωσφίνης, ενώ ο Winks (1984) αναφέρει ότι ο ρυθμός πρόσληψης της φωσφίνης σε μικρές συγκεντρώσεις (<0.5 mg/l) είναι ανεξάρτητος των επιπέδων της φωσφίνης, προσδίδοντας στη σχέση χρόνου έκθεσης και συγκέντρωσης το τυπικό γραμμικό μοντέλο.

Τα παραπάνω καταδεικνύουν και μια ακόμα διάσταση: το γεγονός ότι η εμφάνιση του «sweet spot» έλαβε χώρα σχεδόν σε όλους τους πληθυσμούς που εξετάστηκαν, επιβεβαιώνοντας την υπόθεση ότι αποτελεί ένα ευρύτερο φαινόμενο που δεν σχετίζεται άμεσα με τον πληθυσμό ως προς την εμφάνισή του (Winks, 1984). Επιπροσθέτως, το «sweet spot» παρουσιάζει έντονη πλαστικότητα, δηλ. κινείται «καθ' ύψος» καθώς και «κατά πλάτος», ανάλογα με τον πληθυσμό και το επίπεδο ανθεκτικότητάς του στη φωσφίνη. Ενδιαφέρον ωστόσο είναι το γεγονός ότι το φαινόμενο, με βάση τα δεδομένα μας, έχει την ίδια ένταση σε πληθυσμούς με διαφορετικά επίπεδα ανθεκτικότητας,

ιδιαίτερα σε σύντομους χρόνους έκθεσης. Η μειωμένη θνησιμότητα όμως σε υψηλές συγκεντρώσεις, είναι πιθανό να έχει ιδιαίτερα μεγάλη σημασία και στην περίπτωση της ανθεκτικότητας. Έτσι, ενώ οι μέχρι τώρα αναφορές συνδέουν την εμφάνιση της ανθεκτικότητας με την έκθεση σε υποθανατηφόρες συγκεντρώσεις (Nayak et al., 2020), τα δεδομένα μας δείχνουν ότι είναι δυνατόν η ανθεκτικότητα να «χτιστεί» και σε υψηλές συγκεντρώσεις και ενδεχομένως ταχύτερα σε σχέση με την έκθεση σε χαμηλές. Οι υψηλές συγκεντρώσεις φωσφίνης είναι σύνηθες φαινόμενο σε κοινές εφαρμογές, όπως για παράδειγμα τα εμπορευματοκιβώτια (containers) (Agrafioti et al., 2018).

5. Συμπεράσματα

Το φαινόμενο του «sweet spot» είναι έντονο και συστηματικό σε εκθέσεις εντόμων σε υψηλές συγκεντρώσεις φωσφίνης. Στο πείραμα μας εκδηλώνεται σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις και χρονικό διάστημα έκθεσης, οι οποίες είναι τα 1000 και 2000 ppm στις 5 ώρες έκθεσης και εκτός της ακινητοποίησης των εντόμων αφορά και την θνησιμότητά τους, αφού το «sweet spot» συνεχίζει να υφίσταται και στην καθυστερημένη αντίδραση (7 ημέρες μετά το πέρας της έκθεσης) τόσο στις ίδιες συγκεντρώσεις όσο και στο ίδιο χρονικό διάστημα. Ανάνηψη των πληθυσμών εντόμων αποθηκευμένων προϊόντων που εξετάστηκαν στην παρούσα έρευνα παρατηρήθηκε μετά το πέρας της έκθεσης στην φωσφίνη και εντονότερα μεταξύ της 1^{ης} και 2^{ης} ημέρας από την έκθεση. Ωστόσο, η ανάνηψη αυτή αποτελεί παροδικό φαινόμενο καθώς η φωσφίνη προκαλεί στα έντομα μια σημαντική καθυστερημένη θνησιμότητα. Εφόσον η ύπαρξη του «sweet spot» αποτελεί γεγονός, περισσότερη έρευνα κρίνεται αναγκαία προκειμένου να εξεταστούν άλλα είδη και πληθυσμοί εντόμων αποθηκευμένων προϊόντων. Ενδιαφέρουσες προτάσεις θα ήταν τα *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae), *L. serricorne*, *C. ferrugineus*, *T. confusum*, *S. granarius*, *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrychidae) και *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Chrysomelidae).

6. Βιβλιογραφία

- Abdollahi, M., Mehrpour, O., 2014. Aluminum phosphide. Encyclopedia of toxicology: Third edition (pp. 164-166).
- Afful, E., Elliot, B., Nayak, M.K., Phillips, T.W., 2018. Phosphine resistance in North American of the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae). J. Econ. Entomol. 111, 463-469.
- Agrafioti, P., Athanassiou, C.G., Nayak, M.K., 2019. Detection of phosphine resistance in major stored-product insects in Greece and evaluation of a field resistance test kit. J. Stored Prod. Res. 82, 40-47.
- Ahmad, A., Ahmed, M., Ali, Q.M., Abbas, M., Arif, S., 2013. Monitoring of resistance against phosphine in stored grain insect pests in Sindh. Middle East J. Sci. Res. 16, 1501-1507.
- Alam, M.S., Shaukat, S.S., Ahmed, M., Iqbal, S., Ahmad, A., 1999. A survey of resistance to phosphine in some coleopterous pests of stored wheat and rice grain in Pakistan. J. Biol. Sci. 2, 623-626.
- Athanassiou, C.G., Kavallieratos, N.G., Brabec, D.L., Agrafioti, P., Sakka, M., Campbell, J.F., 2019. Using immobilization as a quick diagnostic indicator for resistance to phosphine. J. Stored Prod. Res. 82, 17-26.
- Athanassiou, G.G., Kavallieratos, N.G., Brabec, D.L., Oppert, B., Guedes, R.N.C., Campbell, J.F., 2019. From immobilization to recovery: towards the development of a rapid diagnostic indicator for phosphine resistance. J. Stored Prod. Res. 80, 28-33.
- Athanassiou, C.G., Rumbos, C.I., Sakka, M., Sotiroudas, V., 2016. Insecticidal efficacy of phosphine fumigation at low pressure against major stored-product insect species in a commercial dried fig processing facility. Crop Protect. 90, 177-185.
- Aulicky, R., Stejskal, V., Frydova, B., 2019. Field Validation of Phosphine Efficacy on the First Recorded Resistant Strains of *Sitophilus granarius* and *Tribolium castaneum* from the Czech Republic. J. Stored Prod. Res. 81, 107-113.
- Bang, Y.H., Telford, H.S., 1966. Effect of sublethal doses of fumigants on stored-grain insects. Washington Agricultural Experiment Station, Tech. Bull. 50.
- Bell, C.H., 1976. The tolerance of developmental stages of four stored product moths to phosphine. J. Stored Prod. Res. 12, 77-86.

- Bell, C.H., 1979. The efficiency of phosphine against diapausing larvae of *Ephestia elutella* (Lepidoptera) over a wide range of concentrations and exposure times. *J. stored Prod. Res.* 15, 53-58.
- Bell, C.H., 2000. Fumigation in the 21st century. *Crop Protect.* 19, 563-569.
- Bengston, M., Collins, P.J., Darglish, G.J., Hallman, V.L., Kopittke, R., Pavic, H., 1999. Inheritance of phosphine resistance in *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Econ. Entomol.* 92, 17-20.
- Benhalima, H., Chaudhry, M.Q., Mills, K.A., Price, N.R., 2004. Phosphine resistance in stored-product insects collected from various grain storage facilities in Morocco. *J. Stored Prod. Res.* 40, 241-249.
- Bettermann, G., Krause, W., Riess, G., Hofmann, T., 2002. Phosphorus Compounds, Inorganic. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 27, 1-17. Weinheim: Wiley-VCH.
- Birch, L.C. 1944. Two strains of *Calandra oryzae* L. (Coleoptera). *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 22, 271-275.
- Bond, E.J., 1984. *Manual of fumigation for insect control*. FAO Plant Production and Protection Paper No. 54, FAO, Rome
- Bond, E. J., Monro, H. A. U., 1967. The role of oxygen in the toxicity of fumigants to insects. *J. Stored Prod. Res.* 3, 295-310.
- Bond, E.J., Monro, H.A.U., Buckland, C.T., 1967. The influence of oxygen on the toxicity of fumigants to *Sitophilus granarius* (L). *J. Stored Prod. Res.* 3, 289-294.
- Bond, E.J., Robinson, J.R., Buckland, C.T., 1969. The toxic action of phosphine-absorption and symptoms of poisoning in insects. *J. stored Prod. Res.* 5, 289-298.
- Cato, A.J., Elliott, B., Nayak, M.K., Phillips, T.W., 2017. Geographic variation in phosphine resistance among North American populations of the red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Econ. Entomol.* 110, 1359-1365.
- Champ, B.R., Dyte, C.E., 1976. *Report of the FAO Global Survey of Pesticide Susceptibility of Stored Grain Pests*. FAO Plant Production and Protection Series N 5. FAO, Rome.
- Chaudhry, M.Q., 2000. Phosphine resistance. *Pestic. Outlook* 11, 88-91.
- Chefurka, W., Kashi, K.P., Bond, E.J., 1976. The effect of phosphine on electron transport in mitochondria. *Pestic. Biochem. Physiol.* 6, 65-84.

- 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 (3) e0121343.
- Collins, P.J., Daghli, G.J., Bengston, M., Lambkin, T.M., Pavic, H., 2002. Genetics of resistance to phosphine in *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). J. Econ. Entomol. 95, 862–869.
- Collins, P.J., Daghli, G.J., Pavic, H., Kopitkee, R.A., 2005. Response of mixed-age cultures of phosphine-resistant and susceptible populations of lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*, to phosphine at a range of concentration and exposure periods. J. Stored Prod. Res. 41, 373-385.
- Collins, P.J., Falk, M.G., Nayak, M.K., Emery, R.N., 2017. Monitoring resistance to phosphine in the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*, in Australia: a national analysis of trends, storage types and geography in relation to resistance detections. J. Stored Prod. Res. 70, 25-36.
- CORESTA Guide No 2., 2013. Phosphine Fumigation Parameters for the Control of Cigarette Beetle and Tobacco Moth, p. 4
- Daghli, G.J., 2004. Effect of exposure period on degree of dominance of phosphine resistance in adults of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrychidae) and *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). Pest Manag. Sci. 60, 822-826.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 1975. Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides. Tentative method for adults of some major pest species of stored cereals, with methyl bromide and phosphine. FAO method no. 16. Plant Protect. Bull. 23, 12-25.
- Hagstrum, D.W., Reed, C., Kenkel, P., 1999. Management of stored wheat insect pests in the USA. Integrated Pest Manag. Rev. 4, 127-142.
- Haines, C.P., 1991. Insects and Arachnids of Tropical Stored Products: Their Biology and Identification (A Training Manual), NRI, 2, pp. 246
- Hole, B.D., Bell, C.H., Mills, K.A., Goodship, G., 1976. The toxicity of phosphine to all developmental stages of thirteen species of stored product beetles. J. Stored Prod. Res. 12, 235–244.
- Holloway, J.C., Falk, M.G., Emery, R.N., Collins, P.J., Nayak, M.K., 2016. Resistance to phosphine in *Sitophilus oryzae* in Australia: a national analysis to trends and frequencies over time and geographical spread. J. Stored Prod. Res. 69, 129-137.

- Howe, R.W. 1956. The Biology of the two common storage species of *Oryzaephilus* (Coleoptera, Cucujidae). *Ann. Appl. Biol.* 44, 341-355.
- Jagadeesan, R., Collins, P.J., Daghli, G.J., Ebert, P.R., Schlipalius, D.I., 2012. Phosphine resistance in the rust red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae): Inheritance, gene interactions and fitness costs. *PLoS One* 7 (2), e31582.
- Jagadeesan, R., Nayak, M.K., Pavic, H., Chandra, K., Collins, P., 2015. Susceptibility to sulfuryl fluoride and lack of cross-resistance to phosphine in developmental stages of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Pest Manag. Sci.* 71, 1379-1386.
- Kaur, R., Subbarayalu, M., Jagadeesan, R., Daghli, G.J., Nayak, M.K., Naik, H.R., Ramasamy, S., Subramaniam, C., Ebert, P.R., Schlipalius, D.I., 2015. Phosphine resistance in India is characterised by a dihydrolipoamide dehydrogenase variant that is otherwise unobserved in eukaryotes. *Heredity* 115, 188-194.
- Kumar, H., Panigrahi, M., Chhotaray, S., Bhanuprakash, V., Shandilya, R., Sonwane, A., Bhushan, B., 2018. Red flour beetle (*Tribolium castaneum*): From population genetics to functional genomics, *Veterinary World*, 11, 1043-1046.
- Lindgren, D.L., Vincent, L.E., 1966. Relative toxicity of hydrogen phosphide to various stored-product insects. *J. Stored Prod. Res.* 2, 141-146.
- Lorini, I., Collins, P.J., Daghli, G.J., Nayak, M.K., Pavic, H., 2007. Detection and characterization of strong resistance to phosphine in Brazilian *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae). *Pest Manag. Sci.* 63, 358-364.
- Monro, H.A.U., Upitis, E., Bond, E.J., 1972. Resistance of a laboratory strain of *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera, Curculionidae) to phosphine. *J. stored Prod. Res.* 8, 199-207.
- Nakakita, H., Saito, T., Iyatomi, K., 1974. Effect of phosphine on the respiration of adult *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera, Curculionidae). *J. stored Prod. Res.* 10, 138-143.
- Nakakita, H., Winks, R.G., 1981. Phosphine resistance in immature stages of a laboratory selected strain of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Stored Prod. Res.* 17, 43-52.
- Natural Research Institute (NRI) 2001. Course 2: Biodeterioration Factors and Their Control. Grain Storage Management PGDip/MSc. Natural Research Institute, Chatham.

- Nayak, M., Collins, P.J., 2008. Influence of concentration, temperature and humidity on the toxicity of phosphine to the strongly phosphine-resistant psocid *Liposcelis bostrychophila* Badonnel (Psocoptera: Liscelididae). *Pest Manag. Sci.* 64, 971-976.
- Nayak, M.K., Collins, P.J., Holloway, J.K., Emery, R.N., Pavic, H., Bartlet, 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 Manag. Sci.* 69, 48e53.
- Nayak, M.K., Daghish, G.J., Phillips, T.W., 2015. Managing resistance to chemical treatments in stored products pests. *Stewart Postharvest Rev.* 1, 3.
- Nayak, M.K., Daghish, G.J., Phillips, T.W., Ebert, P.R., 2020. Resistance to the fumigant phosphine and its management in insect pests of stored products: A global perspective. *Annu. Rev. Entomol.* 65, 333-350.
- Nayak, M.K., Falk, M.G., Emery, R.N., Collins, P.J., Holloway, J.C., 2017. An analysis of trends, frequencies and factors influencing the development of resistance to phosphine in the red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst) in Australia. *J. Stored Prod. Res.* 72, 35-48.
- Nayak, M.K., Holloway, J.C., Emery, R.N., Pavic, H., Bartlet, J., Collins, P.J., 2012. Strong resistance to phosphine in the rusty grain beetle, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) (Coleoptera: Laemophloeidae): its characterisation, a rapid assay for diagnosis and its distribution in Australia. *Pest Manag. Sci.* 69, 48-53.
- Ogendo, J.O., Deng, A.L., Birech, R.J., Bett, K.P., 2012. Plant-Based Products as Control Agents of Stored-Product Insect Pests in the Tropics. *Progress in Food Preservation*, 27, 583-599
- Opit, G.P., Phillips, T.W., Aikins, M.J., Hasan, M.M., 2012. Phosphine resistance in *Tribolium castaneum* and *Rhyzopertha dominica* from stored wheat in Oklahoma. *J. Econ. Entomol.* 105, 1107-1114.
- Phillips, T.W., Thoms, E.M., DeMark, J., Spencer, W., 2012. Fumigation. In: Hagstrum, D.W., Phillips, T.W., Cuperus, G. (Eds.), *Stored Product Protection*. Kansas State University, Manhattan, KS, pp. 157-177.
- Pimentel, M.A.G., Faroni, L.R.D.'A., Guedes, R.N.C., Sousa, A.H., Totola, M.R., 2009. Phosphine resistance in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *J. Stored Prod. Res.* 45, 71-74.

- Pimentel, M.A.G., Faroni, L.R.D.'A., Totola, M.R., Guedes, R.N.C., 2007. Phosphine resistance, respiration rate and fitness consequences in stored-product insects. *Pest Manag. Sci.* 63, 876-881.
- Pimentel, M.A.G., Guedes, R.N.C., 2010. Spread of phosphine among Brazilian populations of three species of stored products insects. *Neotrop. Entomol.* 39, 101-107.
- Price, N.R., Bell, C.H., 1981. Structure and development of embryos of *Ephestia cautella* (walker) during anoxia and phosphine treatment. *Invertebr. Reprod. Dev.* 3, 17-25.
- Price, L.A., Mills, K.A., 1988. The toxicity of phosphine to the immature stages of resistant and susceptible strains of some common stored product beetles, and implications for their control. *J. Stored Prod. Res.* 24, 51–59.
- Rajendran, S., Gunasekaran, N., 2002. The response of phosphine-resistant lesser grain borer *Rhyzopertha dominica* and rice weevil *Sitophilus oryzae* in mixed-age cultures to varying concentrations of phosphine. *Pest Manag. Sci.* 58, 277-281.
- Rajendran, S., Narasimhan, K.S., 1994. Phosphine resistance in the cigarette beetle *Lasioderma serricornis* (Coleoptera: Anobiidae) and overcoming control failures during fumigation of stored tobacco. *Int. J. Pest Manag.* 40, 207-210.
- Saglam, O., Edde, P.A., Phillips, T.W., 2015. Resistance of *Lasioderma serricornis* (Coleoptera: Anobiidae) to fumigation with phosphine. *J. Econ. Entomol.* 108, 2489-2485.
- Ramzan, U., Jabeen, A., Tahir, M.R., 2018. Study of Different Resistance Mechanisms in Stored Product Insects: A Review. *IJSRP*, 8, 275- 281.
- Sato, K., Higuchi, Y., Suwanai M., 1973. Studies on the characteristics of action of fumigants. I. The fifty percent knock down dose of hydrogen phosphide to the azuki bean weevil, *Cullosobruchus chinensis* L., calculated from the uptake amounts of oxygen by the weevil. *Botyu-kagaku* 38, 22-25.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1995. *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research.* *Stony Brook University*
- Song, X., Wang, P., Zhang, H., 2011. Phosphine resistance in *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae) from different geographical populations in China. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 16367-16373.
- Sousa, A.H., Faroni, L.R.D.A., Pimentel, M.A.G., Guedes, R.N.C., 2009. Developmental and population growth rates of phosphine-resistant and susceptible populations of stored-product insect pests. *J. Stored Prod. Res.* 45, 241-246.

- 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, 15e18 October 1994. Campinas. ABRAPOS, Brasil, pp. 306-311.
- Trematerra, P., Sciarreta, A., Tamasi, E., 2000. Behavioural responses of *Oryzaephilus surinamensis*, *Tribolium castaneum* and *Tribolium confusum* to naturally and artificially damaged durum wheat kernels. Entomol. Exp. Appl. 94, 195-200.
- Walter VE. 1990. Stored product pests. In Handbook of Pest Control Story K, Moreland D. (editors). Franzak & Foster Co., Cleveland, OH. pp. 526-529
- Wang, D.X., Collins, P.J., Gao, X.W., 2006. Optimising indoor phosphine fumigation of paddy rice bag-stacks under sheeting for control of resistant insects. J. Stored Prod. Res. 42, 207-217.
- Weston, P.A., Rattlingourd, P.L., 2000. Progeny production by *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) on maize previously infested by *Sitotroga cerealla* (Lepidoptera: Gelechiidae). J. Econ. Entom., 93, 533-536.
- Wilkin, D.R., Chakrabarti, B., Watson, C., Rogerson, J., Clayton Bailey, I., 1999. The control of mites with fumigation. In: Proceedings of the 7th International Working Conference on Stored-product Protection, 14-19 October 1998. Beijing. Sichuan Publishing House of Science and Technology, China, pp. 444-453.
- Winks, R.G., 1984. The toxicity of phosphine to adults of *Tribolium castaneum* (Herbst): time as a dosage factor. J. Stored Prod. Res. 20, 45-56.
- Winks, R.G., 1985. The toxicity of phosphine to adults of *Tribolium castaneum* (Herbst): phosphine-induced narcosis. J. Stored Prod. Res. 21, 25-29.
- Winks, R.G., Waterford, C.J., 1986. The relationship between concentration and time in the toxicity of phoshine to adults of a resistant strain of *Tribolium castaneum* (Herbst). J. Stored Prod. Res. 22, 85-92.
- Zettler, J.L., Arthur, F.H., 2000. Chemical control of stored product insects with fumigants and residual treatments. Crop Protect. 19, 577-582.

Ζιώγας Β., Μαρκόγλου Α., 2010. Γεωργική Φαρμακολογία, Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί Δράσης και Χρήσεις των Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων, 2^η Έκδοση.

Σταμόπουλος, Δ.Κ., 2013. Εχθροί αποθηκευμένων προϊόντων, μουσείων και κατοικιών.