

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ
Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής &
Αγροτικού Περιβάλλοντος

Παναγιώτης Ι. Σκούρας

Διδακτορική Διατριβή

**«Μελέτη της βιο-οικολογίας, της γενετικής
πληθυσμών και της ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα
της αφίδας *Myzus persicae* και αρπακτικών της»**

Νέα Ιωνία Μαγνησίας, Ιούνιος 2009

«Μελέτη της βιο-οικολογίας, της γενετικής πληθυσμών και της ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα της αφίδας *Myzus persicae* και αρπακτικών της»

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Ι. Τσιτσιπής Επιβλέπων, Καθηγητής Εντομολογίας Π. Θ.

Ζ. Μαμούρης Καθηγητής Γενετικής Π. Θ.

Ν. Παπαδόπουλος Επίκουρος Καθηγητής Εντομολογίας Π. Θ.

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Ι. Τσιτσιπής Επιβλέπων, Καθηγητής Εντομολογίας Π. Θ. Επιβλέπων

Ζ. Μαμούρης Καθηγητής Γενετικής Π. Θ. Μέλος

Ν. Παπαδόπουλος Επίκουρος Καθηγητής Εντομολογίας Π. Θ. Μέλος

Δ. Λυκουρέσης Καθηγητής Εντομολογίας, Γεωπονικό Παν. Αθηνών. Μέλος

Δ. Προφήτου-Αθανασιάδου Καθηγήτρια Εντομολογίας, Αριστοτέλειο Π. Θ. Μέλος

Α. Φαντινού Επίκουρος Καθηγήτρια Γεωπονικό Παν. Αθηνών. Μέλος

Κ. Μαθιόπουλος Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Π. Θ. Μέλος

Παναγιώτης Ι. Σκούρας

**«Μελέτη της βιο-οικολογίας, της γενετικής πληθυσμών και της
ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα της αφίδας *Myzus persicae* και
αρπακτικών της»**

(Διδακτορική διατριβή)

Περίληψη

Η αντιμετώπιση των επιζήμιων εντόμων στη σύγχρονη φυτοπροστασία, γίνεται στο πλαίσιο της Ολοκληρωμένης Διαχείρισης Εχθρών (IPM) που λαμβάνει υπόψη την υγεία του καταναλωτή και την προστασία του περιβάλλοντος. Ωστόσο, η ανάπτυξη και εφαρμογή τέτοιων συστημάτων προϋποθέτει γνώση σε βασικά σημεία της οικολογίας του εντόμου εχθρού και την παρακολούθηση (monitoring) της ανθεκτικότητας των πληθυσμών του εχθρού στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της γενετικής και της βιολογίας πληθυσμών της αφίδας *Myzus persicae* Sulzer, της ανθεκτικότητάς της σε εντομοκτόνα, με έμφαση στα νεονικοτινοειδή και πυρεθροειδή, καθώς και στην καταγραφή, μελέτη της βιολογίας και της ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα ορισμένων αρπακτικών ειδών, φυσικών εχθρών της αφίδας. Τα δύο υποείδη της αφίδας (*M. persicae nicotianae* και *M. persicae* s.str.) είναι σημαντικοί εχθροί του καπνού, της ροδακινιάς και άλλων ποωδών καλλιεργειών, καθώς προκαλούν σημαντικές άμεσες και έμμεσες ζημιές. Στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκαν βιοδοκιμές με τη μέθοδο της στιγμιαίας εμβάπτισης και της τοπικής εφαρμογής σε δείγματα πληθυσμών του *M. persicae*, που προέρχονταν τόσο από καλλιέργειες ροδακινιάς όσο και καπνού. Έμφαση δόθηκε στη μέθοδο της στιγμιαίας εμβάπτισης στο imidacloprid, ενώ εξετάστηκαν επίσης τα εντομοκτόνα acetamiprid, pirimicarb, methamidophos, bifenthrin deltamethrin και το chloropyrifos methyl. Οι πληθυσμοί που ελέγχθηκαν από την Ελλάδα κάλυψαν ένα κλίμα από βορρά προς νότο. Έμφαση δόθηκε στα νεονικοτινοειδή και τα πυρεθροειδή εντομοκτόνα, διότι είναι γνωστό ότι η αφίδα έχει αναπτύξει ισχυρή ανθεκτικότητα στις άλλες ομάδες εντομοκτόνων. Τα αποτελέσματα της διδακτορικής διατριβής δείχνουν την ανάπτυξη ισχυρής ανθεκτικότητας της αφίδας *M. persicae* σε οργανοφωσφορικά, πυρεθροειδή και καρβαμιδικά εντομοκτόνα, ενώ αντίθετα δεν παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στα νεονικοτινοειδή.

Τα αποτελέσματα αυτά των βιοδοκιμών με τη μέθοδο της στιγμιαίας εμβάπτισης και της τοπικής εφαρμογής επαληθεύτηκαν με βιοχημικές και μοριακές μεθόδους διάγνωσης της ανθεκτικότητας. Το cDNA, που

κωδικοποιεί τις δυο ακετυλχολινεστεράσες (AChE), απομονώθηκε από την αφίδα *M. persicae* και μελετήθηκε για το έλεγχο νέων μεταλλάξεων που προσδίδουν ανθεκτικότητα στο pirimicarb. Ωστόσο, δεν βρέθηκε μετάλλαξη στους ανθεκτικούς στο pirimicarb κλώνους με αποτέλεσμα να χρειάζεται περισσότερη μελέτη.

Στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής μελετήθηκε επίσης η ανθεκτικότητα των φυσικών εχθρών της αφίδας, στο νεονικοτινοειδές εντομοκτόνο imidacloprid με την μέθοδο της τοπικής εφαρμογής. Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στους φυσικούς εχθρούς της αφίδας.

Κατά την διάρκεια των ετών 2005, 2006 και 2007 εξετάστηκε ο βιολογικός κύκλος 967 κλώνων του *M. persicae*, που συλλέχθηκαν από διάφορους ξενιστές και περιοχές της Βόρειας, Κεντρικής και Στερεάς Ελλάδας και Πελοποννήσου ώστε να διαπιστωθεί η στρατηγική διαχείμασης του είδους άλλα και η συσχέτιση του βιολογικού κύκλου με την ανθεκτικότητα. Βρέθηκε μεγάλη γεωγραφική παραλλακτικότητα στην κατηγορία βιολογικού κύκλου στους κλώνους που συλλέχθηκαν από καπνό, που σχετίζεται με την παρουσία του πρωτεύοντος ξενιστή, τη ροδακινιά. Στις περιοχές της Βορείου Ελλάδος, όπου καλλιεργείται εκτεταμένα η ροδακινιά, το ποσοστό των ολοκυκλικών γενότυπων μετρήθηκε πάνω από το 50% και σε ορισμένες περιπτώσεις έφτασε το 100%. Αντίθετα, σε περιοχές όπου δεν καλλιεργείται εκτεταμένα η ροδακινιά, στην Κεντρική και Στερεά Ελλάδα, Πελοπόννησο, κυμάνθηκε από 0% έως 23,5%. Παρατηρήθηκε γεωγραφική παραλλακτικότητα επίσης στο χρώμα των αφίδων, που αποικίζουν τον καπνό, ανάλογη με αυτή του βιολογικού κύκλου. Περισσότεροι κόκκινοι κλώνοι συλλέχθηκαν σε περιοχές όπου επικρατούν μη ολοκυκλικοί γενότυποι. Στον πρωτεύοντα ξενιστή το πλείστο των κλώνων ήταν πράσινου χρώματος.

Τα αρπακτικά έντομα της οικογένειας Coccinellidae θεωρούνται σημαντικοί παράγοντες ελέγχου των πληθυσμών των αφίδων. Πολλά είδη αφιδοφάγων Κολεοπτέρων, όπως τα *Coccinella septempunctata* και *Hippodamia convergens* είναι χαρακτηριστικοί φυσικοί εχθροί σε πολλά αγροοικοσυστήματα. Λιγοστές είναι οι μελέτες για τα είδη αρπακτικών

Κολεοπτέρων, που εμφανίζονται σε σημαντικές καλλιέργειες στην Ελλάδα όπως ο καπνός και η ροδακινιά. Σε δειγματοληψίες στις καλλιέργειες αυτές με σκοπό την καταγραφή των ειδών που επικρατούν στην Ελλάδα, βρέθηκε ότι τα *C. septempunctata*, *Hippodamia undecimnotata*, *H. convergens* και *H. variegata* ήταν τα πιο συχνά εμφανιζόμενα σε σχέση με όλα τα αρπακτικά κολεόπτερα που βρέθηκαν. Η γνώση της ποικιλότητας και της εποχικής εμφάνισης των αρπακτικών, που εμφανίζονται σε μια καλλιέργεια, σε συνδυασμό με άλλα βιολογικά χαρακτηριστικά τους μπορεί να βοηθήσει προς την κατεύθυνση της ανάπτυξης φιλικότερων προς το περιβάλλον, τον παραγωγό και τον καταναλωτή προγραμμάτων καταπολέμησης στα πλαίσια της Ολοκληρωμένης Διαχείρισης των Εχθρών των καλλιεργειών, και ειδικότερα των αφίδων.

Στα είδη *H. variegata*, *H. undecimnotata* και *C. septempunctata* υπολογίστηκε η διάρκεια ανάπτυξης των ατελών σταδίων, η κατανάλωση αφίδων από τις προνύμφες σε πέντε διαφορετικές θερμοκρασίες (17, 20, 23, 26, 29°C, στο *C. septempunctata* μόνο στους 23 °C) και φωτοπερίοδο L16:D8. Ως θήραμα χρησιμοποιήθηκε ένας κόκκινος κλώνος *M. persicae* σε φύλλα καπνού. Στους 23°C καταγράφηκε η διάρκεια ζωής, ο αριθμός ωών που παράγονται και ο υπολογίστηκε ο ενδογενής ρυθμός αύξησης των αρπακτικών. Στο *H. undecimnotata* η θνησιμότητα των ατελών σταδίων έφτασε το 59% στους 17°C, στο *H. variegata* το 62% στους 20°C ενώ στο *C. septempunctata* το 36,6% στους 23°C. Στο *H. variegata* η συνολική διάρκεια ανάπτυξης (ωό - ενήλικο) κυμάνθηκε από 12,4 ημέρες στους 29°C έως 40,6 ημέρες στους 17°C, ενώ στο *H. undecimnotata* η αντίστοιχη διάρκεια ανάπτυξης κυμάνθηκε από 14,4 ημέρες στους 29°C έως 48,5 ημέρες στους 17°C. Στο *C. septempunctata* η συνολική διάρκεια ανάπτυξης (ωό - ενήλικο) ήταν 30,16 ημέρες στους 23°C. Η κατώτερη ουδός ανάπτυξης ήταν 12,5°C και 12,7°C ενώ οι απαραίτητοι ημεροβαθμοί για την ολοκλήρωση των ατελών σταδίων ήταν 211 και 257 ημέρες για το *H. variegata* και *H. undecimnotata*, αντίστοιχα. Τα προνυμφικά στάδια του *H. variegata* κατανάλωσαν συνολικά 84,2 αφίδες με ημερήσιο ρυθμό 8,7 αφίδες στους 26°C. Στην ίδια θερμοκρασία η συνολική και ημερήσια κατανάλωση για το *H. variegata* ήταν 129,1 και 9,4 αφίδες, αντίστοιχα. Η συνολική και ημερήσια κατανάλωση για το

C. septempunctata ήταν 190 και 10,9 αφίδες, αντίστοιχα στους 23°C. Η διάρκεια ζωής και η περίοδος προωτοκίας των ενήλικων θηλυκών του *H. variegata* στους 23°C ήταν 57,6 και 4,8 ημέρες, αντίστοιχα. Οι αντίστοιχες τιμές για το *H. undecimnotata* ήταν 74,4 και 15,75 ημέρες και για το *C. septempunctata* 102,2 και 16,1 ημέρες. Τα θηλυκά *H. variegata* εναπόθεσαν κατά μέσο όρο 882 ωά, του *H. undecimnotata* 664 ωά ενώ αυτά του *C. septempunctata* 586. Η περίοδος ωοτοκίας ήταν 48, 50 και 72 ημέρες για το *H. variegata*, *H. undecimnotata* και *C. septempunctata* αντίστοιχα. Ο ενδογενής ρυθμός αύξησης (r_m , θηλυκό/θηλυκό/ημέρα), η μέση διάρκεια γενιάς (T , ημέρες), ο καθαρός αναπαραγωγικός ρυθμός (R_0 θηλυκό/θηλυκό) και ο χρόνος διπλασιασμού πληθυσμού (DT , ημέρες) για το *H. variegata* ήταν 0,129, 42,4, 241,9 και 5,4, για το *H. undecimnotata* ήταν 0,084, 59,1, 142,7 και 8,3 και για το *C. septempunctata* ήταν 0,061, 69,3, 67,3 και 11,4 αντίστοιχα. Η συνολική κατανάλωση αφίδων από ζεύγος αρσενικού και θηλυκού καθόλη τη διάρκεια της ζωής του ήταν 2381 και 3242 αφίδες για το *H. variegata* και *H. undecimnotata*, αντίστοιχα. Το ζεύγος αρσενικού και θηλυκού *C. septempunctata* κατανάλωσε τις 50 πρώτες ημέρες 3404 αφίδες. Συμπερασματικά και τα τρία είδη αποτελούν αποτελεσματικούς θηρευτές του *M. persicae*, όπως έχει αναφερθεί και για άλλα είδη αφίδων, με το *C. septempunctata* να υπερτερεί ελαφρώς λόγω της μεγαλύτερης κατανάλωσης αφίδων και την χαμηλή θνησιμότητα που βρέθηκε. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης και για τα δύο είδη που ελέχθησαν σε όλες τις θερμοκρασίες ήταν 26°C καθώς παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη κατανάλωση αφίδων, γρήγορη ανάπτυξη και χαμηλή θνησιμότητα.

Για τη βελτίωση προγραμμάτων ολοκληρωμένης καταπολέμησης αποφασιστικό ρόλο παίζουν οι πληροφορίες των εντόμων-εχθρών από μελέτες γενετικής διαφοροποίησης των πληθυσμών. Για αυτό έγινε μια πρώτη προσπάθεια μελέτης της γενετικής πληθυσμών του αρπακτικού κολεοπτέρου, *C. septempunctata* από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, Κύπρου, Ιταλίας και Σερβίας. Τα αποτελέσματα δεν μπόρεσαν να διαχωρίσουν τους πληθυσμούς μεταξύ τους.

Πρόλογος

Η διατριβή αυτή πραγματεύεται την ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα, τη βιο-οικολογία και τη γενετική της αφίδας *Myzus persicae* (Sulzer) καθώς και των φυσικών της έχθρων, σε χωράφια καπνού και οπωρώνες ροδακινιάς σε πολλές περιοχές της Ελλάδας. Η μελέτη υποστηρίζεται από εργαστηριακά πειράματα, που αφορούν σε πεδία της ανθεκτικότητας, βιολογίας και της γενετικής της αφίδας καθώς και σημαντικών φυσικών έχθρων της.

Η διατριβή χωρίζεται σε δυο μέρη. Το γενικό μέρος περιλαμβάνει σε τρεις ενότητες τη βιβλιογραφική ανασκόπηση των αφίδων εν γένει (βιολογία, ανθεκτικότητα) και ιδιαίτερα της αφίδας της ροδακινιάς και του καπνού *M. persicae* καθώς και των φυσικών της εχθρών. Στο ειδικό μέρος παρουσιάζονται σε πέντε ενότητες η πειραματική μεθοδολογία και τα αποτελέσματα της έρευνας, τα οποία αναλύονται και συζητούνται σε σχέση τα βιβλιογραφικά δεδομένα.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον υπεύθυνο επιβλέποντα Καθηγητή Εντομολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Ιωάννη Αθ. Τσιτσιπή για τη δυνατότητα που μου έδωσε για την υπόδειξη του συγκεκριμένου θέματος καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές του σε όλα τα στάδια της διατριβής. Πάνω από όλα όμως θέλω να τον ευχαριστήσω γιατί ήταν εκείνος που μου κίνησε το ενδιαφέρον για την επιστήμη της Εντομολογίας, μιας και υπήρξε Καθηγητής μου σε προπτυχιακό και μεταπτυχιακό επίπεδο.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή Γενετικής Πληθυσμών του Τμήματος Βιοτεχνολογίας και Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Ζήση Μαμούρη και τον Επίκουρο Καθηγητή Εντομολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Νικόλαο Παπαδόπουλο, για τις πολύτιμες διορθώσεις και συμβουλές τους, όσον αφορά τη συγγραφή της παρούσας διατριβής. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Γενετικής πληθυσμών Ζήση Μαμούρη για τις πολύτιμες γνώσεις που μου πρόσφερε σε όλα τα στάδια της διδακτορικής διατριβής.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζονται στο Δρα Ιωάννη Τ. Μαργαριτόπουλο του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την εμπειρία που μου πρόσφερε, την πολύτιμη βοήθεια, και τις συζητήσεις που είχαμε πάνω στο θέμα της διδακτορικής διατριβής αυτά τα χρόνια της συνεργασίας μας. Ακόμη θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τη βοήθεια στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Ευχαριστίες εκφράζονται στο Δρα Κωνσταντίνο Ζάρπα μέλος του Εργαστηρίου Εντομολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την βοήθειά του στη μεθοδολογία πάνω στη μελέτη των δημογραφικών χαρακτηριστικών αρπακτικών της αφίδας *Myzus persicae*. Για τη βοήθεια στο πειραματικό μέρος της διατριβής ευχαριστώ ιδιαίτερα, τους προπτυχιακούς φοιτητές, Αθανάσιο Μπρανιώτη, Ιωάννα Μανωλικάκη, και ιδιαίτερα στον φίλο και αγαπητό συνάδελφο Θανάση Κουρδούμπαλο.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες εκφράζονται στον υποψήφιο Διδάκτορα και μέλος ΙΔΑΧ του τμήματος Βιοτεχνολογίας και Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Κωνσταντίνο Σταμάτη, για την πολύτιμη βοήθειά του στο αρχικό στάδιο του πειραματικού μέρους της διδακτορικής διατριβής καθώς και για τη βοήθειά του στη κατανόηση των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν και στον υποψήφιο Διδάκτορα του τμήματος Βιοτεχνολογίας και Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Κωνσταντίνο Βουδούρη για τη βοήθεια συλλογής των δειγμάτων. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ν. Σεραφείδη για την αποστολή των αρπακτικών Κολεοπτέρων από την Κύπρο, την Andja Vučetić για την αποστολή των αρπακτικών Κολεοπτέρων από την Σερβία και τον καπνικό σταθμό της Battipaglia στη Βόρεια Ιταλία για την αποστολή των αρπακτικών Κολεοπτέρων από την Βόρεια Ιταλία.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Ιωάννη Σκούρα και Κωστούλα Αναπολιωτάκη, που όλα αυτά τα χρόνια με στήριζαν ψυχικά άλλα και οικονομικά και φυσικά δεν θα μπορούσα να τα είχα καταφέρει χωρίς την αμέριστη συμπαράστασή τους. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα αδέρφια μου Σοφία και Μανώλη Σκούρα για την στήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Βασιλική Αντωνοπούλου για τη στήριξη και την αγάπη που μου χαρίζει όλα αυτά τα χρόνια.

Περιεχόμενα

Περίληψη		iv-vii
Πρόλογος		viii
Ευχαριστίες		ix-x
A. Γενικό Μέρος		
Κεφάλαιο 1°	Αφίδες	1
	Η αφίδα <i>Myzus persicae</i> (Sulzer)	11
Κεφάλαιο 2°	Ανθεκτικότητα των εντομών στα εντομοκτόνα	15
	Ανθεκτικότητα και <i>Myzus persicae</i>	26
Κεφάλαιο 3°	Τα αρπακτικά έντομα της οικογένειας Coccinellidae	32
Σκοπός της διατριβής		45
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		
Μέρος I		
	Μελέτη του βιολογικού κύκλου κλώνων του <i>Myzus persicae</i> (Homoptera: Aphididae) από διάφορες περιοχές της Ελλάδας	48
Εισαγωγή		48
Υλικά και Μέθοδοι		50
Αποτελέσματα		52
Συζήτηση		58
Μέρος II		
	Μελέτη της ανθεκτικότητας της αφίδας <i>Myzus persicae</i> και των φυσικών της εχθρών σε εντομοκτόνα.	60
Εισαγωγή		60
Υλικά και Μέθοδοι		63
Αποτελέσματα		75
Συζήτηση		106
Μέρος III		
	Καταγραφή αφιδοφάγων Coccinellidae σε διάφορες καλλιέργειες της Ελλάδας	120
Εισαγωγή		120
Υλικά και Μέθοδοι		122
Αποτελέσματα και Συζήτηση		122
Μέρος IV		
	Μελέτη των αρπακτικών <i>Coccinella septempunctata</i> L., <i>Hippodamia variegata</i> (Goeze) και <i>Hippodamia (Semiadalia) undecimnotata</i> (Schneider) (Coleoptera: Coccinellidae) και της δράσης τους επί της αφίδας <i>Myzus persicae</i> σε συνθήκες εργαστηρίου.	129
Εισαγωγή		129
Υλικά και Μέθοδοι		132
Αποτελέσματα και Συζήτηση		137
Μέρος V		
	Μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας πληθυσμών του αρπακτικού <i>Coccinella septempunctata</i> L.,	156
Εισαγωγή		156
		xī

Υλικά και Μέθοδοι	158
Αποτελέσματα και Συζήτηση	161
Γενική Συζήτηση – Συμπεράσματα	166
Βιβλιογραφία	172
Abstract	196

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1^ο

Αφίδες

Εισαγωγή

Η Aphididae είναι μια από τις τρεις οικογένειες της υπεροικογένειας Aphidoidea, οι δυο άλλες είναι η Adelgidae, ή αλλιώς η τριχωτή αφίδα των κωνοφόρων, και η Phylloxeraeidae, της οποίας τα είδη σχετίζονται με δένδρα αλλά περιλαμβάνουν και την φυλλοξήρα *Viteus* (= *Daktulosphaira*) *vitifoliae*. Η τάξη Hemiptera περιέχει την υπεροικογένεια Aphidoidea που κατατάσσεται μέσα στην υπόταξη Sternorrhyncha, μαζί με τις Coccoidea, Aleyrodoidea, Psylloidea.

Οι αφίδες είναι μικρά έντομα που απομυζούν τους χυμούς των φυτών. Η παρθενογενετική αναπαραγωγή σε συνδυασμό με το μικρό χρόνο κάθε γενιάς, επιτρέπουν στις αφίδες να αυξάνουν το πληθυσμό τους ιδιαίτερα γρήγορα. Υπάρχουν περίπου 4700 είδη στην οικογένεια Aphididae σε όλο τον κόσμο (Remaudière and Remaudière 1997). Από αυτά, περίπου 450 είδη έχουν καταγραφεί σε καλλιεργούμενα φυτά (Blackman & Eastop 2000), αλλά από αυτά, μόνο τα 100 περίπου είδη είναι οικονομικής σημασίας. Τα **οικονομικώς** σημαντικά είδη ανήκουν κυρίως στην υποοικογένεια Aphidinae, όχι μόνο επειδή είναι η μεγαλύτερη υποοικογένεια, αλλά και γιατί περιέχει σε μεγάλη αναλογία αφίδες που τρέφονται σε ποώδη φυτά (Blackman & Eastop 2006). Μερικές άλλες, μεγάλες σχετικά υποοικογένειες αφίδων (πχ Calaphidinae και Lachninae) σχετίζονται σχεδόν αποκλειστικά με τα δέντρα.

Οι αφίδες είναι έντομα μικρού μεγέθους με μαλακό σώμα, με γενικό σχήμα ωοειδές και μήκος μεταξύ 1-10 mm. Τα κυριότερα μορφολογικά χαρακτηριστικά που διακρίνουν τις αφίδες από τα άλλα έντομα είναι: α) η βάση του ρύγχους που βρίσκεται μεταξύ και εμπρός από τα ισχία του πρώτου ζεύγους ποδιών, β) η κεραία αποτελείται από δύο βασικά τμήματα (σκάπος και ποδίσκος) και το σχετικά λεπτό μαστίγιο, που συνήθως έχει τέσσερα άρθρα. Το τελευταίο άρθρο της κεραίας αποτελείται από το βασικό τμήμα, και

την τελική απόληξη, γ) κάτω από κάθε σύνθετο οφθαλμό υπάρχει ένας οπτικός λοβός με τρία οματίδια (τριοματίδιο), δ) ο ταρσός αποτελείται από δυο άρθρα ε) οι πτέρυγες έχουν μόνο ένα χαρακτηριστικό επίμηκες νεύρο, ζ) στη ραχιαία πλευρά του πέμπτου κοιλιακού άρθρου υπάρχει ένα ζεύγος από σιφώνια ή κεράτια (τα σιφώνια είναι εκφορητικοί αγωγοί αδένων που παράγουν φερομόνες συναγερμού) (Dixon 1998).

Τα στοματικά μόρια της αφίδας αποτελούνται από τα λεπτά σιλέτα, τα όποια εσωκλείονται μέσα σε ένα προστατευτικό κάλυμμα. Τα σιλέτα εισχωρούν μεταξύ των κύτταρων του επιφανειακού ιστού του φυτού και μέσα στα κύτταρα του φλοιώματος. Λόγο της σχετικά μικρής συγκέντρωσης σε πρωτεΐνες και σε αλλά απαραίτητα θρεπτικά συστατικά στο φλοιώμα, προσλαμβάνεται μεγάλη ποσότητα και το παραπανίσιο υγρό και σάκχαρα εκκρίνονται ως κολλώδη μελιτώματα. Η ποσότητα του μελιτώδους απεκκρίματος που παράγεται από μια αποικία αφίδων μπορεί να είναι μεγάλη, ρυπαίνοντας έτσι το φυτό και παρέχοντας ιδανικό περιβάλλον για να αυξηθεί ο μύκητας της καπνιάς, προσελκύοντας επιπλέον μυρμήγκια και σφήκες. Σε πολλά είδη έχουν αναπτυχθεί σχέσεις συμβίωσης με μυρμήγκια, τα οποία συλλέγουν τα μελιτώδη απεκκρίματα προστατεύοντας τις αφίδες από διάφορους εχθρούς (Dixon 1973). Τα περισσότερα είδη αφίδων τρέφονται σε νέους τρυφερούς βλαστούς, όπου η παροχή των θρεπτικών στοιχείων είναι μεγάλη. Όταν οι αφίδες τρέφονται με άνθη, βλαστούς και νεαρά φύλλα προκαλούν σε αυτά κατσάρωμα ή παραμόρφωση, ως αποτέλεσμα της φυσικής καταστροφής και της αντίδρασης του φυτού στα συστατικά του σιέλου των αφίδων. Η ευρωστία των φυτών μπορεί να μειωθεί, με αποτέλεσμα την πτώση των ανθέων. Άλλωστε, κατά την διάρκεια διατροφής της αφίδας, παθογόνα των φυτών μπορεί να μεταφέρονται με τα στοματικά μόρια της, μέσα στη σίελο. Επιπλέον οι αφίδες είναι από τους σημαντικότερους φορείς ιώσεων, αφού μεταδίδουν περίπου 275 ιούς που ανήκουν σε 19 από τα 70 αναγνωρισμένα μέχρι σήμερα γένη (Nault 1997). Οι αφίδες είναι ιδιαίτερα προσαρμοσμένες στο να μεταδίδουν ιούς φυτών δεδομένου ότι από ένα σύνολο 228 ειδών εντόμων, που έχουν καταγραφεί ως φορείς ιών τα 200 είδη ανήκουν στην υποοικογένεια Aphidinae. Η υποοικογένεια αυτή περιλαμβάνει τρία κυρίως γένη που περιλαμβάνουν είδη

με μεγάλη αποτελεσματικότητα ως φορείς (*Aphis*, *Myzus*, *Macrosiphum*). Τα περισσότερα είδη της υποοικογένειας έχουν ως ξενιστές διάφορα λαχανοκομικά φυτά ενώ ελάχιστα έχουν ως ξενιστές δέντρα. Στην πραγματικότητα οι ιώσεις των λαχανοκομικών ειδών έχουν μελετηθεί πιο εντατικά από εκείνες των δέντρων. Αυτό μπορεί να εξηγήσει γιατί η υποοικογένεια Arhidinae έχει καταγραφεί ως η πιο πολυάριθμη ομάδα φορέων ιών (Fereres & Collar 2001).

Οι αφίδες είναι άφθονες, κυρίως το Μάιο και Ιούνιο, όπου πολλές ανοιξιάτικες καλλιέργειες είναι σε ευαίσθητο στάδιο ανάπτυξης, και το φθινόπωρο και γενικά σε μετρίως θερμό και υγρό καιρό. Την άνοιξη τα παρθενογενετικά θηλυκά αναπαράγονται ταχύτατα γιατί οι συγκεκριμένες καιρικές συνθήκες και τα άφθονα τρυφερά φύλλα και βλαστοί ευνοούν την ανάπτυξή τους. Σε κλίματα όπως της Ελλάδας, οι θερμοί και ξηροί μήνες του καλοκαιριού δεν ευνοούν τη συνεχή αναπαραγωγή των αφίδων και οι πληθυσμοί τους τότε περιορίζονται σημαντικά. Στην Ελλάδα το μέγιστο του αριθμού των ειδών αφίδων όπως και των πληθυσμών τους παρατηρείται κατά το μήνα Μάιο (Tsitsipis *et al.* 1998).

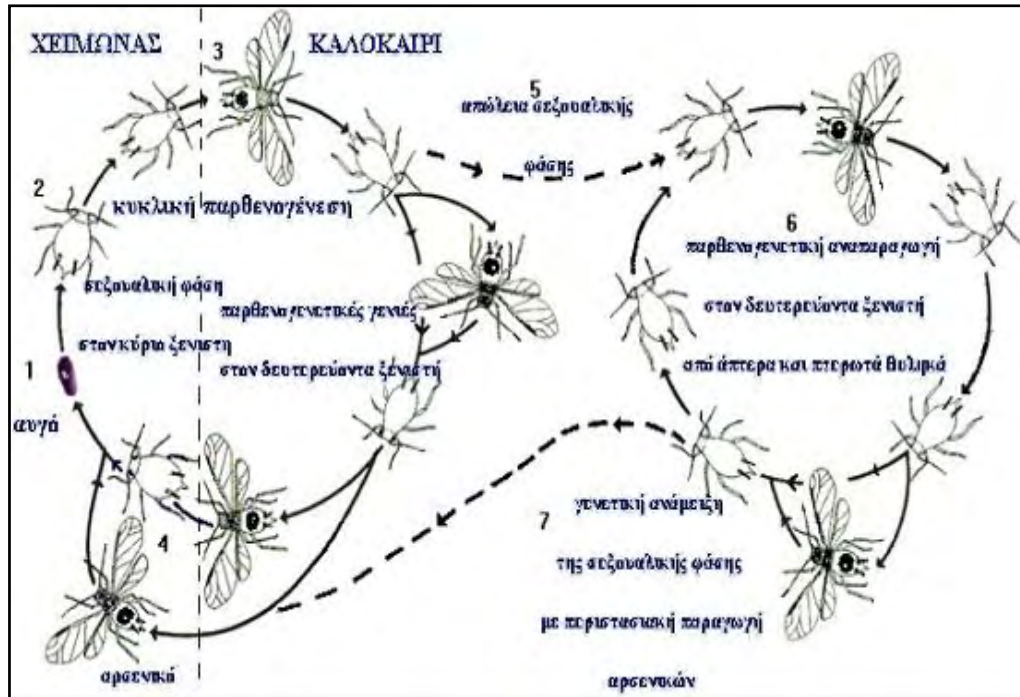
Οι αφίδες έχουν πολλούς φυσικούς εχθρούς από διάφορες τάξεις εντόμων που μπορούν να μειώσουν το ρυθμό αύξησης, ενίοτε δραματικά. Ανάμεσα στους αποτελεσματικούς φυσικούς εχθρούς των αφίδων συγκαταλέγονται τα αρπακτικά Neuroptera των οικογενειών Chrysopidae και Hemerobiidae (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος 1998), αρπακτικά Coleoptera της οικογένειας Coccinellidae, όπως *Coccinella septempunctata* L. και *Hippodamia convergens* Guérin-Méneville (Katsarou *et al.* 2005, Ζάρπας 2006), *Hippodamia undecimnotata* (Schneider) (Σκούρας και συνεργάτες 2007), αρπακτικά Diptera της οικογένειας Syrphidae και παρασιτοειδή Hymenoptera των οικογενειών Braconidae, Chalcididae και Proctotrypidae (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος 1998). Επιπλέον, υπάρχουν είδη που ανήκουν στα αραχνοειδή καθώς και σε taxa μυκήτων, όπως είδη των γενών *Empusa*, *Entomophthora* και *Verticillium*.

Βιολογικός κύκλος των αφίδων

Οι αφίδες είναι γνωστές για το πολύπλοκο βιολογικό τους κύκλο. Κάθε βιολογικός κύκλος χωρίζεται σε διάφορα στάδια, με κάθε στάδιο να χαρακτηρίζεται από μια ή περισσότερες μορφές. Κάθε μια από αυτές τις μορφές έχει μια συγκεκριμένη λειτουργία που είναι υποχρεωτική για την ολοκλήρωση του κάθε σταδίου του βιολογικού κύκλου. Από όλες τις αφίδες που έχει βρεθεί ο βιολογικός τους κύκλος μόνο το 10% έχει ετερόοικο (μεταναστευτικό) βιολογικό κύκλο. Στα ετερόοικα είδη αφίδων συνήθως η σύζευξη λαμβάνει μέρος το φθινόπωρο στον κύριο ξενιστή όπου και εναποθέτουν τα χειμερινά ωά. Την άνοιξη τα ωά εκκολάπτονται και δίνουν άπτερα παρθενογενετικά θηλυκά, που ονομάζονται θεμελιωτικά ή ιδρυτικά άτομα (*fundatrix*). Στην συνέχεια ακολουθούν παρθενογενετικές γενιές με άπτερα (*apterous fundatrigeniae*) που παρουσιάζουν προοδευτική μεταβολή στη μορφολογία τους (Lees 1966). Μετά από ορισμένο αριθμό γενεών γεννιούνται τα πτερωτά παρθενογενετικά θηλυκά (*migrantes* ή *alate fundatrigeniae*), που διασπείρονται σε φυτά του ίδιου είδους με τον κύριο ξενιστή ή μεταναστεύουν στους δευτερεύοντες ποώδεις ξενιστές. Την άνοιξη και το καλοκαίρι στους δευτερεύοντες ξενιστές η μία παρθενογενετική γενιά διαδέχεται την άλλη. Εκτός από άπτερες μορφές παράγονται πτερωτά παρθενογενετικά θηλυκά (*alienicolae*), που μεταναστεύουν σε άλλα φυτά και συνεχίζουν την παρθενογενετική αναπαραγωγή. Το φθινόπωρο, καθώς η διάρκεια της ημέρας μειώνεται, σε είδη ορισμένων οικογενειών, π.χ. στο είδος *Aphis fabae* Scopoli (Aphididae), παράγονται στο δευτερεύοντα ξενιστή θηλυτόκα πτερωτά (*gynoparae*) και αρσενικά που θα μεταναστεύσουν στον κύριο ξενιστή. Εκεί τα θηλυτόκα θα γεννήσουν τα ωτοτόκα θηλυκά (*oviparae*), που εναποθέτουν τα χειμερινά ωά, μετά από σύζευξη με τα αρσενικά.

Στα ετερόοικα είδη άλλων οικογενειών, π.χ. στο είδος *Pemphigus bursarius* (L.) (Pemphiginae), παράγεται στους δευτερεύοντες ξενιστές μόνο μια μεταναστευτική μορφή, τα πτερωτά παρθενογενετικά θηλυκά, και ονομάζονται φυλογόνα (*sexuparae*). Τα φυλογόνα γεννούν στον πρωτεύοντα ξενιστή άπτερα αρσενικά και ωτοτόκα θηλυκά. Τα θηλυκά που επιστρέφουν στον πρωτεύοντα ξενιστή, συχνά παρουσιάζουν μορφολογικές διαφορές από αυτά που μεταναστεύουν την άνοιξη στους δευτερεύοντες ξενιστές (Blackman

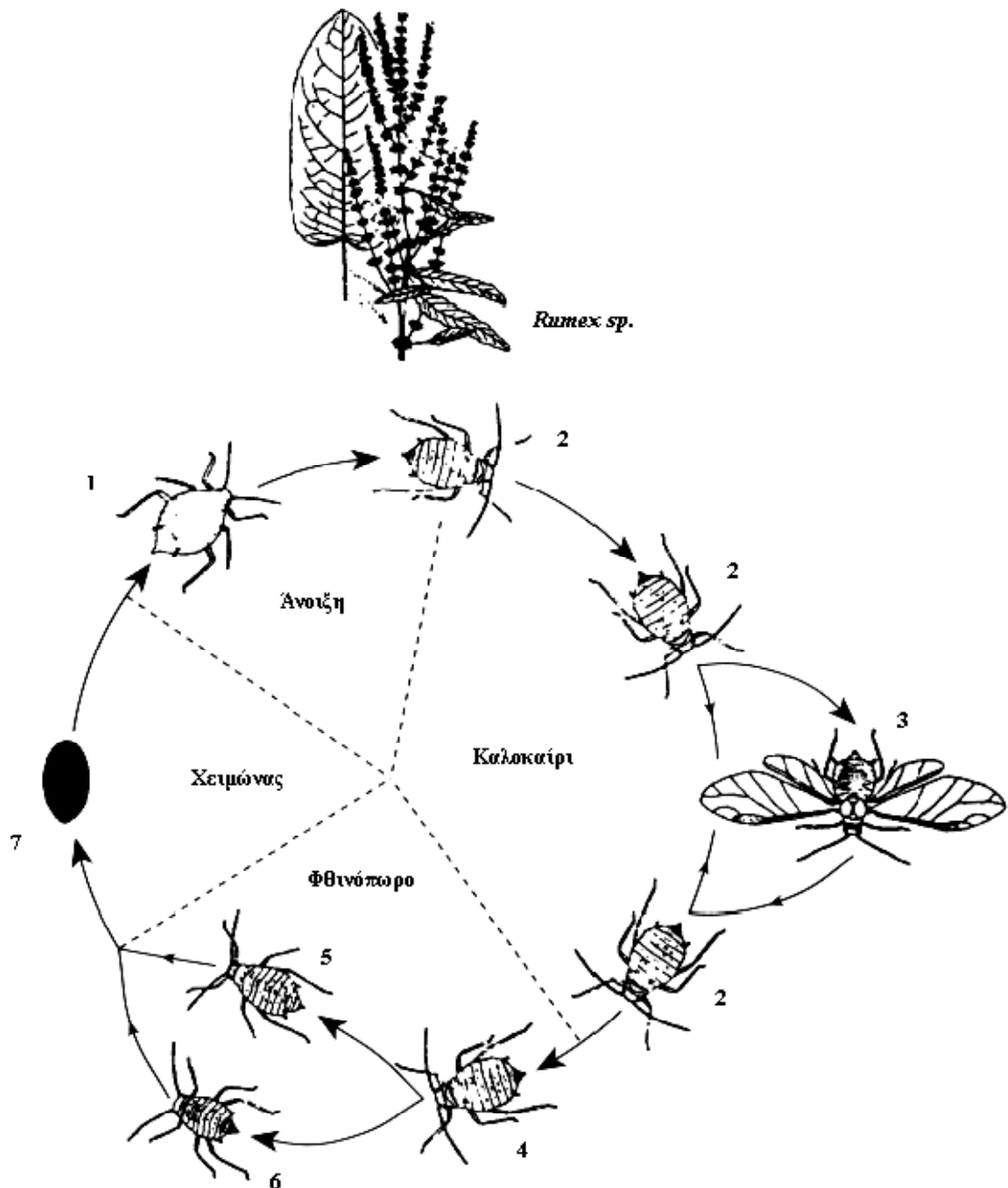
& Eastop 2000). Απεικόνιση αυτών των σταδίων των αφίδων παρουσιάζονται στο Σχήμα 1.



Σχήμα 1. Εναλλαγή ξενιστών και μορφές του *M. persicae* (Τροποποιημένο από Field & Blackman, 2003).

Πολλά μονόοικα (μη μεταναστευτικά) είδη αφίδων ζουν μόνο σε δέντρα που δύσκολα αποτελούν πρόβλημα στην γεωργία. Άλλα είδη, όπως το *Acyrtosiphon pisum* (η αφίδα του μπιζελιού) και *Sitobion avenae* (αφίδα των δημητριακών), ζουν μόνο σε ποώδεις ξενιστές ή γρασίδια και γι αυτό μπορεί να συναντώνται σε καλλιέργειες όλο τον χρόνο. Πολλά από τα μονόοικα είδη, που τώρα ζουν μόνο σε ποώδεις ξενιστές έχουν προέλθει μέσω της εξέλιξης από ετερόοικα είδη, τα οποία δεν χρησιμοποιούν πλέον τον πρωτεύοντα τους ξενιστή. Το Σχήμα 2 περιγράφει τον μονόοικο βιολογικό κύκλο της αφίδας *Aphis rumicis* L. (Hemiptera: Aphididae).

Τα θεμελιωτικά άτομα (fundatrices) στα μονόοικα είδη μοιάζουν περισσότερο με τις άλλες μορφές του είδους, σε αντίθεση με αυτά των ετερόοικων ειδών. Για παράδειγμα, τα θεμελιωτικά άτομα των ετερόοικων



Σχήμα 2. Βιολογικός κύκλος μονόικου είδους *Aphis rumicis* L. 1. Θεμελιωτικό άτομο, 2. άπτερο παρθενογενετικό θηλυκό, 3. Πτερωτό παρθενογενετικό θηλυκό. 4. Φυλογόνο, 5. Ωοτόκο, 6. Αρσενικό, 7. Διαχειμάζον ωό (τροποποιημένο από Jones 1942)

ειδών γενικά είναι πιο κοντόχοντρα και μπορούν να έχουν έως και πέντε φορές περισσότερες ωοθήκες (οναγίολες) από ότι ένα άτομο της επόμενης γενιάς, ενώ στα περισσότερα μονόικα είδη ο αριθμός ωοθηκών και η μορφολογία τους ελάχιστα διαφέρουν μεταξύ των δυο μορφών. Ο μεγάλος

βαθμός εξειδίκευσης των ετερόοικων θεμελιωτικών ατόμων σχετίζεται με την τάση να αποικίζουν τον πρωτεύοντα ξενιστή την άνοιξη. Επιπλέον, τα ανοιξιάτικα μεταναστευτικά άτομα των μονόοικων ειδών μπορούν να παράγονται για περισσότερο χρόνο απ'ότι τα αντίστοιχα της ετερόοικης γενιάς, μιας και ο ξενιστής του μονόοικου είδους είναι ευνοϊκός για αποίκιση για μεγαλύτερη χρονική περίοδο σε σχέση με αυτό των ετερόοικων ειδών (Williams & Dixon 2008).

Στα μονόοικα (μη μεταναστευτικά) είδη αφίδων, ο ετήσιος κύκλος συμπληρώνεται σε έναν ξενιστή, στο ίδιο φυτό ή σε φυτά του ίδιου είδους. Το φθινόπωρο άπτερα παρθενογενετικά θηλυκά (φυλογόνα) θα γεννήσουν ωτόκα και αρσενικά. Τα αρσενικά συνήθως είναι άπτερα, γιατί δεν χρειάζεται να μεταναστεύσουν για να ολοκληρωθεί ο βιολογικός τους κύκλος. Σε ορισμένα είδη παράγονται πτερωτά και άπτερα αρσενικά. Τα περισσότερα μονόοικα είδη σε ποώδη φυτά πιστεύεται ότι εξελίχθηκαν μέσα από την ετεροοικία. Αρκετά μονόοικα είδη, που συμπληρώνουν το βιολογικό τους κύκλο σε έναν ποώδη ξενιστή, παρουσιάζουν μεγάλη συγγένεια με ετερόοικα είδη που χρησιμοποιούν το ίδιο φυτό ως δευτερεύοντα ξενιστή. Το παραπάνω αποτελεί μια ένδειξη, ότι η μονοοικία είναι ένα συχνό και συνεχές φαινόμενο τόσο στην πρόσφατη όσο και στη μακρινή εξελικτική ιστορία των αφίδων (Blackman & Eastop, 2000).

Υπάρχουν μερικές θεωρίες σχετικά με την εξέλιξη της μονοοικίας και της εναλλαγής ξενιστών που έχουν διατυπωθεί. Ο Mordvilko (1928) κατέληξε σε δυο πιθανούς λόγους για την εξέλιξη της εναλλαγής ξενιστών. Αρχικά ότι τα έντομα με πολλές γενιές το έτος, όπως οι αφίδες, μπορούν να εκμεταλλευτούν τη συμπληρωματική ανάπτυξη που παρουσιάζουν οι ποώδεις και δενδρώδεις ξενιστές και επίσης στην εκμετάλλευση των ποωδών φυτών, που αποτελούν υψηλότερης ποιότητας τροφή. Ο Börner (1939) ανέφερε, ότι οι αφίδες αρχικά ήταν πολυφάγες, παρόλο που τώρα παρουσιάζουν αρκετή εξειδίκευση, ώστε οι καλοκαιρινοί και χειμερινοί ξενιστές τους μπορεί να σχετίζονται με την πολυφαγία κατά την διάρκεια του χρόνου. Ο Shaposhnikov (1951, 1956, 1987) πρότεινε ότι οι αλλαγές κατά την εξέλιξη των ξενιστών που προκλήθηκαν από αλλαγές του περιβάλλοντος, εξασθένησαν την εξειδίκευση των αφίδων και έκανε δυνατό τον αποικισμό νέων ξενιστών. Η μικρή θρεπτική

ποιότητα των ξυλωδών ξενιστών κατά το καλοκαίρι μπορεί να οδήγησε τις αφίδες σε νέους ξενιστές. Οι Hille Ris & Lambers (1953) ανέφεραν την άποψη ότι η ετεροοικία δεν πρέπει να θεωρείται ως ένα εξελικτικό αδιέξοδο. Αντίθετα ο Istock (1967) ανέφερε ότι οι πολύπλοκοι βιολογικοί κύκλοι δεν είναι πολύ σταθεροί και τείνουν να τροποποιηθούν σε καταστάσεις, όπως η μονοοικία, που έχουν περισσότερα πλεονεκτήματα. Επικριτές της παραπάνω άποψης είναι οι Slade & Wassersung (1975) και Wilbur (1980), που θεωρούν ότι πολύπλοκοι βιολογικοί κύκλοι προτιμούνται εκεί που αναμένονται, συμπατριικοί, υψηλής ποιότητας εφήμεροι πόροι. Δύο άλλα αίτια της εξέλιξης της εναλλαγής ξενιστών είναι ο ενδοειδικός ανταγωνισμός και η αποφυγή των φυσικών εχθρών. Όσο αυξάνει ο ενδοειδικός ανταγωνισμός σε ένα ξενιστή τόσο μειώνονται οι κίνδυνοι που απορρέουν από τη μετανάστευση. Συνεπώς, ο ανταγωνισμός που υπάρχει στον πρωτεύοντα ξενιστή μπορεί να οδηγήσει τις αφίδες σε εναλλακτικούς καλοκαιρινούς ξενιστές (Dixon 1966). Οι Weed (1896) και Way & Banks (1968) έχουν προτείνει ότι οι φυσικοί εχθροί συνέβαλαν στην εξέλιξη της ετεροοικίας. Η Moran (1983, 1988, 1990) πρότεινε, ότι η ετεροοικία διατηρείται λόγω της ισορροπίας μεταξύ των πλεονεκτημάτων που έχουν οι αφίδες όταν τρέφονται στους ποώδεις ξενιστές και της μεγαλύτερης επιβίωσης το χειμώνα και αναπαραγωγής την άνοιξη στους ξυλώδεις ξενιστές. Όπως οι Mordvilko και Istock το 1967, η Moran (1983, 1988, 1990) θεωρεί την ετεροοικία ως συνέπεια της προσαρμογής και του περιορισμού του θεμελιωτικού ατόμου στον πρωτεύοντα ξενιστή. Επίσης συμφωνεί με τους Mordvilko και Shaposhnikov, ότι η εξέλιξη των αφίδων οδηγεί στη μονοοικία σε ποώδη φυτά. Αντίθετα οι Mackenzie & Dixon (1990), Dixon & Kundu (1994) και Kundu & Dixon (1995) υποστηρίζουν την άποψη, ότι για τα έντομα με πολλές γενιές το έτος, η εναλλαγή ξενιστών είναι ένας τρόπος για να εκμεταλλευτούν καλύτερα φυτά που έχουν συμπληρωματική ανάπτυξη και αλλαγές στην θρεπτική ποιότητα δηλαδή συμφωνούν με την εναλλακτική υπόθεση του Mordvilko.

Σύμφωνα με τους Blackman & Eastop (2000), η κυκλική παρθενογένεση διαχωρίζει τις δύο βασικές λειτουργίες ενός οργανισμού, που είναι απαραίτητες στην εκμετάλλευση των πόρων του περιβάλλοντος: α) την αύξηση της βιομάζας κάθε γενιούπου στο χώρο και στο χρόνο, ώστε να

μεγιστοποιηθούν οι πιθανότητες συνεισφοράς των γονιδίων του στην επόμενη σεξουαλική φάση και β) την εγγενή αναπαραγωγή, που εμπλέκει τον ανασυνδυασμό των γονιδίων και την παραγωγή νέων γενοτύπων. Αποτέλεσμα του διαχωρισμού των παραπάνω λειτουργιών είναι ότι η εξέλιξη τους συμβαίνει ανεξάρτητα, με συνέπεια να αποκλίνει η μορφολογία των σεξουαλικών από αυτή των παρθενογενετικών μορφών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι αφίδες τις υποοικογένειας Pemphiginae, όπου στην πρώτη παρθενογενετική γενιά (fundatrix) οι αφίδες είναι μεγάλωσμες, ζωοτόκες και γενούν πολλούς απογόνους, ενώ τα έμφυλα θηλυκά είναι μικρόσωμα, δεν τρέφονται και γενούν ένα ωό μεγέθους περίπου ίδιο με το δικό τους.

Ένα από τα χαρακτηριστικά των αφίδων είναι η ικανότητα τους να δημιουργούν μεγάλους πληθυσμούς και να εκμεταλλεύονται πόρους, που «χάνονται» στο χώρο και το χρόνο, και η παραγωγή πτερωτών παρθενογενετικών θηλυκών που μεταναστεύουν από φυτό σε φυτό και δημιουργούν καινούριες αποικίες. Επίσης, όσο μεγαλύτερος είναι ένας οργανισμός τόσο αυξάνει ο χρόνος ανάπτυξής του (Bonner 1988), η τηλεσκοπική ανάπτυξη των γενεών έχει ως αποτέλεσμα οι αφίδες να συμπληρώνουν την ανάπτυξη τους σε χρόνο τρεις φορές μικρότερο από άλλα ισομεγέθη έντομα και οι πληθυσμοί τους να επιτυγχάνουν ρυθμούς αύξησης όμοιους με αυτούς μικρότερων οργανισμών όπως π.χ. τα ακάρεα (Dixon 1998). Το χαρακτηριστικό που απέκτησαν οι αφίδες (Aphididae) και τους επιτρέπει να αναπτύσσουν μεγάλους πληθυσμούς είναι η ζωοτοκία. Η ανάπτυξη του εμβρύου αρχίζει πριν γεννηθεί η μητέρα του και με την ενηλικίωσή της το έντομο είναι έτοιμο να γεννηθεί. Συνεπώς παρατηρείται επικάλυψη των γενεών και μείωση της μέσης διάρκειας γενιάς, που οδηγεί στη γρήγορη αύξηση των πληθυσμών των αφίδων.

Συχνό γεγονός στη φυλογένεση του βιολογικού κύκλου των αφίδων είναι η ανολοκυκλικότητα, δηλαδή η αναπαραγωγή συνέχεια παρθενογενετικά. Υπάρχουν είδη από σχεδόν όλες τις κύριες ομάδες των αφίδων, που είναι αποκλειστικά ανολοκυκλικά και αναπαράγονται όλο το έτος παρθενογενετικά. Επίσης, τόσο μονόοικα όσο και ετερόοικα είδη έχουν γίνει μερικώς ανολοκυκλικά, καθώς βρίσκονται ανολοκυκλικοί γενότυποι είτε στην ίδια

περιοχή μαζί με ολοκυκλικούς είτε σε άλλες περιοχές του εύρους εξάπλωσης του είδους (Blackman & Eastop 2000). Αν και οι ανολοκυκλικοί κλώνοι έχουν την ικανότητα να αποκτήσουν ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα, να αποικίσουν ανθεκτικές ποικιλίες και να παρουσιάσουν υψηλότερο ρυθμό αύξησης από ότι οι αντίστοιχοι ολοκυκλικοί, μόνο το 3% των ειδών είναι αποκλειστικά ανολοκυκλικά (Blackman 1980). Φαίνεται, ότι η σεξουαλική αναπαραγωγή προσδίδει σημαντικές δυνατότητες προσαρμογής και επιβίωσης στις αφίδες. Μερικοί από τους λόγους που είναι υπεύθυνοι για τη διατήρηση της εγγενούς αναπαραγωγής στις αφίδες, όπως αναφέρει ο Dixon (1998) είναι η εναπόθεση διαχειμαζόντων ωών, που είναι το πιο ανθεκτικό στάδιο του εντόμου στο ψύχος, που όμως δεν θα πρέπει να θεωρείται ως πλεονέκτημα της εγγενούς αναπαραγωγής αλλά ως μια προσαρμογή στις ψυχρές χειμερινές συνθήκες. Είδη των οικογενειών Adelgidae και Phylloxeridae παράγουν για το ίδιο λόγο ωά χωρίς γονιμοποίηση. Η ετερογένεια του περιβάλλοντος είναι ένας από τους λόγους που διατηρείται η εγγενής αναπαραγωγή. Παράγεται ένα εύρος γενοτύπων και αυξάνεται η πιθανότητα κάποιος από αυτούς να έχει μεγαλύτερη προσαρμογή σε συγκεκριμένο περιβάλλον. Επίσης, με την παραγωγή διαφορετικών γενοτύπων μειώνεται ο ενδοειδικός ανταγωνισμός, καθώς κάθε ένας από αυτούς έχει διαφορετικές ανάγκες και εκμεταλλεύονται διαφορετικούς πόρους. Η έλλειψη ετερογένειας στις καλλιέργειες εξηγεί γιατί οι αφίδες, που τις προσβάλλουν, έχουν την τάση να αναπαράγονται παρθενογενετικά όλο το έτος ακόμη και σε περιοχές με ψυχρούς χειμώνες. Ένα άλλο στοιχείο, που πιθανώς είναι υπεύθυνο για την επιλογή της εγγενούς αναπαραγωγής, είναι ότι στις παρθενογενετικές σειρές συσσωρεύονται θανατηφόρα ή μη λειτουργικά αλληλόμορφα και δεν υπάρχει τρόπος να μειωθούν. Με την εγγενή αναπαραγωγή και τον ανασυνδυασμό των γονιδίων το παραπάνω μπορεί να αποφευχθεί. Τέλος, η εγγενής αναπαραγωγή συνδέεται με τα είδη που παρουσιάζουν εξειδικευμένη στρατηγική αναπαραγωγής σχετική με την εποχή. Αντίθετα λείπει ή είναι μειωμένη από τα είδη που ζουν σε περιβάλλοντα χωρίς εποχικότητα.

Οι αφίδες λοιπόν, είναι μια εξαιρετικά πολύπλοκη κατηγορία εντόμων κυρίως λόγω του βιολογικού τους κύκλου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να παρουσιάζουν συνήθως μεγάλη γενετική παραλλακτικότητα στους

πληθυσμούς τους, σε σχέση βέβαια και με άλλους παράγοντες. Η γενετική παραλλακτικότητα αποτελεί καθοριστικό παράγοντα και σε άλλες ικανότητες των συγκεκριμένων εντόμων, όπως για παράδειγμα η ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε διάφορες μορφές εντομοκτόνων. Η μεγάλη σημασία καθώς και η σύνδεση που υπάρχει μεταξύ αυτών των δυο καταστάσεων αναλύεται στην επόμενη ενότητα.

Η αφίδα *Myzus persicae* (Sulzer)

Η αφίδα *Myzus persicae* είναι ένα κοσμοπολίτικο είδος, εξαιρετικά πολυφάγο. Έχει μεγάλη ικανότητα μετάδοσης φυτικών ιών και αρκετούς γενετικούς παράγοντες που σχετίζονται με το χρώμα, το βιολογικό της κύκλο, τη σχέση φυτού ξενιστή και τις μεθόδους ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα. Ενήλικα άπτερα παρθενογενετικά θηλυκά της αφίδας *M. persicae* έχουν μικρό προς μεσαίο σώμα που κυμαίνεται από 1,2 έως 2,3 mm. Το άπτερο έχει ομοιόμορφο χρωματισμό με διάφορες αποχρώσεις του πράσινου και του κόκκινου (πράσινο, ανοικτό κιτρινοπράσινο, πρασινοκίτρινο, κίτρινο, κόκκινο ή ρόδινο). Τα πτερωτά θηλυκά είναι πράσινου χρώματος και φέρουν μια μαύρη περιοχή επί του νωπιαίου μέρους της κοιλιάς. Τα ενήλικα ωτοτόκα θηλυκά έχουν συνήθως πορφυρό κόκκινο χρώμα (πιο σκούρα απόχρωση στους κόκκινους κλώνους) και διακρίνεται ένα σκούρο τμήμα στη ραχιαία περιοχή της κοιλιάς. Τα αρσενικά είναι κίτρινου χρώματος ή κιτρινοπράσινου. Στα θηλυτόκα των πράσινων κλώνων, τα ανήλικα στάδια έχουν πράσινη απόχρωση, που συνήθως προοδευτικά γίνεται ρόδινη. Στους κόκκινους ή ρόδινους κλώνους το χρώμα παραμένει το ίδιο (Blackman & Eastop 2007)

Η σεξουαλική φάση της αφίδας *M. persicae* λαμβάνει χώρα κυρίως στη ροδακινιά *Prunus persicae* (συμπεριλαμβάνοντας και τη νεκταρινιά *Prunus persicae* v. *nectarina*), εκτός από μέρη στην βορειοανατολική Αμερική και περιοχές στον ανατολικό Καναδά, όπου το *Prunus nigra* είναι ο κύριος πρωτεύων ξενιστής (Shands *et al.* 1969). Εναλλαγή ξενιστών συμβαίνει στις εύκρατες περιοχές σε όλες τις ηπείρους, όπουδήποτε υπάρχουν ροδακινιές και οι φθινοπωρινές θερμοκρασίες είναι τόσο χαμηλές, ώστε να επιτρέψουν την παραγωγή των σεξουαλικών μορφών (Blackman 1974). Ο πληθυσμός της αφίδας την άνοιξη στη ροδακινιά γίνεται πολύ πυκνός, όπου ακολουθεί κουλούριασμα των φύλλων. Σε αντίθεση με τον εξαιρετικά ειδικευμένο

πρωτεύοντα ξενιστή, ο δευτερεύων ξενιστής μπορεί να ανήκει σε περισσότερες από 40 οικογένειες φυτών. Οι οικογένειες αυτές περιλαμβάνουν πολλά οικονομικής σημασίας φυτά, όπου στα περισσότερα ο πληθυσμός τους διασκορπίζεται και αυξάνεται εύκολα ενώ μεμονωμένα άτομα μπορεί να βρεθούν σε γηραιότερα φύλλα. Σημαντική είναι και η ικανότητα της αφίδας *M. persicae* να μεταδίδει φυτικούς ιούς. Μεταδίδει περισσότερους από 100 ιούς, συμπεριλαμβανομένων των έμμονων: α) καρούλιασμα φύλλων πατάτας, β) αφιδομεταδιδόμενος ίκτερος κολοκυνθοειδών και γ) παραμόρφωση νεύρων καπνού. Η σχέση της *M. persicae* με το PLRV θεωρείται ιδιαίτερη και έχει μελετηθεί ιδιαίτερα (Ponsen 1972, Eskanderi *et al.* 1979). Η αφίδα *M. persicae* είναι επίσης πολύ αποτελεσματικός φορέας μη έμμονων ιών όπως *Cucumber Mosaic Virus*, (CMV, μωσαϊκό της αγγουριάς), *Bean yellow mosaic virus* (ιός του κίτρινου μωσαϊκού της φασολιάς) στην Δυτική Αυστραλία (Bwye *et al.* 1997), ιό Υ της πατάτας PVY.

Όπως είναι γνωστό, ο πρωτεύων ξενιστής κατάγεται από την Κίνα, έτσι μια λογική υπόθεση είναι ότι από εκεί είναι η καταγωγή της αφίδας *M. persicae*. Η υπόθεση αυτή όμως αντιμετωπίζει κάποια προβλήματα. Αρχικά, η προσδοκία ήταν να βρεθούν τα συγγενικά είδη της αφίδας στην Κίνα. Μέχρι τώρα τα είδη που φαίνονται να είναι πιο κοντά με το *M. persicae*, είναι το *Myzus certus* και το *Myzus myosotidis*, και τα δυο των οποίων η καταγωγή να είναι από την Ευρώπη. Επίσης δεν υπάρχει καμία ένδειξη με βάση τη βιολογία του, μιας και όλα τα είδη *Myzus* στο υπογένος *Nectarosiphon* εκτός από το *M. persicae* έχουν <χάσει> τον αρχικό πρωτεύοντα ξενιστή και ζουν όλο το χρόνο στον ποώδη ξενιστή τους. Επιπλέον, ένα ακόμα πρόβλημα της υπόθεσης αυτής αφορά τη σχέση του *M. persicae* με τον φυτικό ιό PLRV, η όποια φαίνεται να είναι πολύ στενή και συνεπώς μακροχρόνια, αλλά αυτό έρχεται σε αντίθεση με την καταγωγή του ιού σε σχέση με το *M. persicae*. Είναι όμως πιθανόν, ωστόσο, ο PLRV να βρίσκεται σε μια άγνωστη ή χωρίς συμπτώματα μορφή, σε κάποιο Ασιατικό μέλος των Σολανωδών.

Για πολλά χρόνια υπήρχε η άποψη ότι οι πληθυσμοί της αφίδας *M. persicae* στον καπνό (η αφίδα του καπνού) είναι διαφορετικοί από αυτούς άλλων φυτών (de Jong 1929, Brain 1942, Møller 1958, Takada 1986). Η αφίδα που προσβάλλει εμπορικές ποικιλίες του *Nicotiana tabacum*, είναι μεγαλύτερη σε μέγεθος, σχηματίζει πυκνές αποικίες, κυρίως στα νεαρά

φύλλα, και είναι εύκολο να αποφύγει ή είναι ανθεκτική στα εκκρίματα από το αδενώδες τρίχωμα των φύλλων, το οποίο δεν είναι μόνο κολλώδες αλλά περιέχει και απωθητικά ή τοξικά χημικά (Georgiava, 1998; Wang *et al.* 2001). Ο Blackman (1987) απέδειξε ότι δείγματα αφίδων από καπνό, από διάφορα μέρη του κόσμου, μπορούν να διαφοροποιηθούν από την *M. persicae* από άλλα φυτά, αποδεικνύοντας ότι ο πληθυσμός της αφίδας στον καπνό παγκοσμίως απαρτίζεται από μια μονοφυλετική σειρά, που πρότεινε για ονομασία το *Myzus nicotianae*. Τα περισσότερα από τα δείγματα που ανέλυσε ο Blackman (1987) ήταν από περιοχές που οι πληθυσμοί ήταν μόνιμα παρθενογενετικοί, αλλά οι Margaritoroulos *et al.* (2000) βρήκαν ότι ολοκυκλικοί πληθυσμοί της αφίδας του καπνού στην Ελλάδα μπορούν επίσης να διαχωριστούν από αυτούς άλλων φυτών και από ροδακινιά μακριά από περιοχές καλλιέργειας του καπνού. Οι Clements *et al.* (2000) είχαν αναφέρει ότι αυτές οι μορφολογικές διαφορές μπορεί να οφείλονται στη φαινοτυπική πλαστικότητα. Ωστόσο, είναι ξεκάθαρο ότι οι διαφορές αυτές είναι γενετικής φύσεως, μιας και όλα τα δείγματα των Margaritoroulos *et al.* (2000) τράφηκαν με τον ίδιο ξενιστή και στις ίδιες ελεγχόμενες συνθήκες. Οι κλώνοι από ροδακινιές σε περιοχές όπου συνυπάρχει και ο καπνός δεν είχαν ποτέ έρθει σε επαφή με φυτά καπνού.

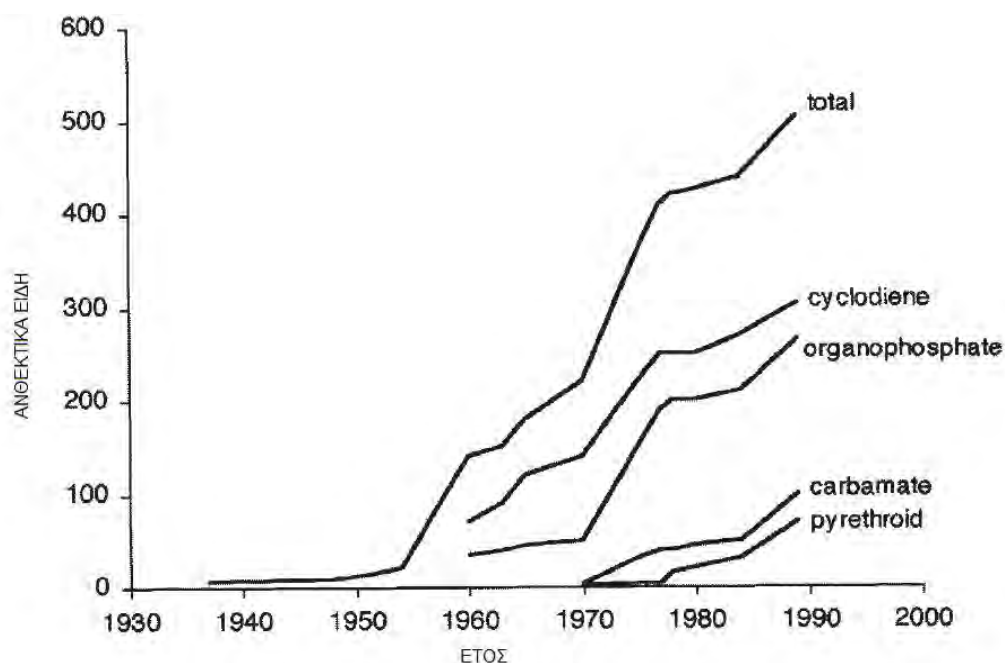
Η γενετική απομόνωση μεταξύ της προσαρμοσμένης στον καπνό μορφής και της μη προσαρμοσμένης, δεν είναι ολοκληρωτική, μιας και τα γονίδια E4 και FE4, είναι ίδια και στις δυο μορφές (Field *et al.* 1994). Ωστόσο, στα γονίδια αυτά έχει διαρκέσει πολλά χρόνια η μεταφορά των γονιδίων από την αφίδα της ροδακινιάς στην αφίδα του καπνού. Για παράδειγμα, ολοκυκλικοί πληθυσμοί από ροδακινιές του *M. persicae* στην νότια Ευρώπη, ήταν ανθεκτικοί στα οργανοφωσφορικά από το 1962, ενώ τέτοια ανθεκτικότητα στην αφίδα του καπνού αναφέρθηκε για πρώτη φορά σε ολοκυκλικό πληθυσμό της βόρειου Ελλάδας στα μέσα του 1980 (Blackman & Eastop 2007). Τότε, πιθανότατα έγινε η εισχώρηση των παραπάνω γονιδίων στους προσαρμοσμένους στον καπνό γενοτύπους και στη συνέχεια μέσω της επιλογής γονιδίων, γρήγορα πέρασαν τα γονίδια αυτά σε άλλους πληθυσμούς. Η απουσία της πλήρους αναπαραγωγικής απομόνωσης μεταξύ των δυο μορφών ίσως να συνδέεται με την πολύ πρόσφατη καταγωγή της μορφής προσαρμοσμένης στον καπνό και να εξηγεί την αποτυχία να βρεθεί

σταθερός διαγνωστικός γενετικός δείκτης (Fenton *et al.* 1998; Margaritopoulos *et al.* 1998; Clements *et al.* 2000a,b) ή η απόσταση μεταξύ της αλληλουχίας των γονιδίων, όπως θα περιμέναμε να βρεθεί μεταξύ διαφορετικών ειδών (Clements *et al.* 2000b). Ωστόσο, ο βαθμός της απομόνωσης πρέπει να είναι επαρκής ώστε να διατηρήσει την ακεραιότητα του γονιδιώματος, της μορφής προσαρμοσμένης στον καπνό, για 15-20 χρόνια το λιγότερο και έτσι δεν θα είναι συνετό να θεωρούμε την μορφή αυτή συνώνυμη με τη *M. persicae* όπως προτείνουν ο Clements *et al.* (2000a,b). Τελικά, οι Eastop και Blackman (2005) πρότειναν ότι η αφίδα του καπνού πρέπει να ονομαστεί *M. persicae nicotianae* μιας και συμφωνεί με τα κριτήρια της κατηγορίας του υποείδους, όπως πρότεινε ο Müller (1986).

Κεφάλαιο 2°

Ανθεκτικότητα των εντόμων στα εντομοκτόνα

Το φαινόμενο της ανθεκτικότητας των εντόμων στα εντομοκτόνα αντανακλά γενετική προσαρμογή καθιστώντας τα αρθρόποδα ικανά να επιζούν, όταν εκθέτονται σε δόσεις εντομοκτόνου που έπρεπε να είναι θανατηφόρες (Denholm & Devine 2001). Παρόλο που είναι σχετικά πρόσφατο φαινόμενο (ανθεκτικότητα στο πρώτο συνθετικό εντομοκτόνο, το DDT, αρχικά αναφέρθηκε το 1940), η ανθεκτικότητα των εντόμων στα εντομοκτόνα είναι ευρέως διαδεδομένη. Το Σχήμα 3 δείχνει ότι οι αναφορές για ανθεκτικά είδη αρθρόποδα αυξάνουν σχεδόν εκθετικά από το 1950 έως το 1980, ακολουθώντας την επιτυχή εισαγωγή διαφορετικών κατηγοριών ή ομάδα συνθετικών εντομοκτόνων. Το 1990, περισσότερα από 500 είδη είχαν αναφερθεί να είναι ανθεκτικά σε μια ομάδα τουλάχιστον εντομοκτόνου, ενώ αρκετά από αυτά ήταν ανθεκτικά σε αρκετές κλάσεις ταυτόχρονα.



Σχήμα 3. Αύξηση του αριθμού των ειδών αρθροπόδων που έχει αναφερθεί ανθεκτικότητα στον χρόνο, συνολικά, και ξεχωριστά για τις τέσσερις πιο ευρέως διαδεδομένες τάξεις εντομοκτόνων (από Denholm & Devine 2001).

Περίπου το 40% αυτών των ειδών είναι είδη υγειονομικού και κτηνιατρικού ενδιαφέροντος και το υπόλοιπο 60% αφορά σε έντομα γεωργικών καλλιεργειών (Denholm *et al.* 1998). Από τα είδη των αρθροπόδων για τα οποία έχει αναφερθεί ανθεκτικότητα το 88 % είναι έντομα (κλάση Insecta) και το 12 % είναι ακάρεα και αραχνίδια (κλάση Arachnida, τάξη Acarina). Το 92 % των ανθεκτικών ειδών εντόμων ανήκουν στις εξής τέσσερις τάξεις εντόμων: Coleoptera, Diptera, Hemiptera και Lepidoptera. Το υπόλοιπο ποσοστό περιλαμβάνει κατσαρίδες, θρίπες, ψείρες και ψύλλους.

Αν και πρακτικώς όλα τα εντομοκτόνα επηρεάζονται από την ανθεκτικότητα, ο βαθμός και η εξάπλωσή της ποικίλει ανάμεσα στα είδη. Για μερικά έντομα η ανθεκτικότητα εκτείνεται σε λίγες συγγενείς ουσίες της ίδιας ομάδας και μπορεί να είναι μικρή και περιορισμένη σε μια μικρή γεωγραφικά περιοχή. Στο άλλο άκρο, κάποια πολύ επιζήμια για τις καλλιέργειες έντομα, όπως η *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae), ο δορυφόρος της πατάτας, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae), η αφίδα της ροδακινιάς, *M. persicae*, ο αλευρώδης του βαμβακιού, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) είναι ανθεκτικά σε πάρα πολλά ή σχεδόν σε όλα τα διαθέσιμα εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμησή τους.

Αν και από την ανθεκτικότητα επηρεάζονται περισσότερο τα παλαιότερα και πιο διαδεδομένα εντομοκτόνα, υπάρχει μια ανησυχητική αύξηση της ανθεκτικότητας και στα πιο καινούρια.

Προέλευση της ανθεκτικότητας

Μιας και τα εντομοκτόνα δεν έχουν μεταλλαξιγόνο δράση κατά την εφαρμογή τους στον αγρό, είναι φανερό ότι οι μεταλλάξεις που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα έντομα συμβαίνουν ανεξάρτητα από την έκθεση τους σε αυτά, ενώ υπάρχουν οι μεταλλάξεις αυτές στον πληθυσμό πριν το εντομοκτόνο εισήχθη στην αγορά. Έτσι, η ανθεκτικότητα είναι ένα προπροσαρμοσμένο φαινόμενο αντανακλώντας την επιλογή ξεχωριστών

κύριων κληρονομήσιμων γενετικών χαρακτηριστικών που συμβάλλουν θετικά στην επιβίωση ή αναπαραγωγή σε περιβάλλον εκτεθειμένο σε εντομοκτόνα.

Μηχανισμοί ανθεκτικότητας

Οι πιο σημαντικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας αφορούν είτε την αυξημένη ικανότητα των εντόμων να αποτοξινώνουν τα εντομοκτόνα, είτε στη δομική μεταβολή των στόχων που δρουν τα εντομοκτόνα στο έντομο. Άλλοι πιθανοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν μειωμένη διείσδυση των εντομοκτόνων μέσω της επιδερμίδας των εντόμων και ιδιαιτερότητα συμπεριφοράς, που καθιστούν ικανούς τους εχθρούς να μειώνουν ή να αποφεύγουν την έκθεση σε τοξικές ουσίες.

Αυξημένη αποικοδόμηση εντομοκτόνων

Οι τρεις γνωστοί τύποι αποικοδόμησης εντομοκτόνων που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα είναι οι εξής (Denholm *et al.* 1998, Denholm & Devine 2001):

(1) Αυξημένος οξειδωτικός μεταβολισμός των εντομοκτόνων από το κυτόχρωμα P₄₅₀ της μονοοξυγενάσης. Αυτό μπορεί να προκαλέσει ανθεκτικότητα σε όλες τις σημαντικότερες ομάδες εντομοκτόνων εκτός από τα κυκλοδιένια. Ωστόσο τα περισσότερα στοιχεία για αυτόν τον μηχανισμό είναι έμμεσα και βασίζονται στην ικανότητα του βουτοξειδίου του πιπερονυλίου (Piperonyl Butoxide) ή συγγενών ουσιών, που είναι γνωστές ως αναστολείς του κυτοχρώματος P₄₅₀ της μονοοξυγενάσης, να καταστέλλουν την ανθεκτικότητα όταν χρησιμοποιούνται ως συνεργιστές σε βιοδοκιμές. Περιπτώσεις στις οποίες ο αυξημένος οξειδωτικός μεταβολισμός των εντομοκτόνων εξηγήθηκε άμεσα μέσω δέσμευσης ή με μελέτες μεταβολισμού είναι ακόμα σπάνιες.

(2) Αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου της τρανσφεράσης γλουταθειόνης (GSTs), το οποίο καταλύει τη γλουταθειόνη σε μια ποικιλία αντιδρώντων υποστρωμάτων. Ο μηχανισμός αυτός προσδίδει ανθεκτικότητα κυρίως στα

οργανοφωσφορικά. Εντούτοις, πληροφορίες για το ρόλο του (GSTs) στην ανθεκτικότητα είναι ακόμα ατελής μιας και ο μηχανισμός αυτός δεν μπορεί να διαγνωστεί αξιόπιστα με βιοδοκιμές. GSTs, όπως και οι μονοοξυγενάσες, υπάρχουν σε πολυάριθμες μοριακές μορφές με διαφορετικές ιδιότητες, κάνοντας έτσι το συσχετισμό της δραστηριότητας του ενζύμου με την ανθεκτικότητα πολύ ενδιαφέρον αλλά και συχνά ασαφή.

(3) Η υδρόλυση, η δέσμευση των εντομοκτόνων από εστεράσες (πχ καρβοξυλεστεράσες) είναι σπουδαίος παράγοντας στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Υπάρχουν περισσότερες από 20 περιπτώσεις που συνδέονται με έντομα από έξι τάξεις τα οποία συσχετίζουν τη δραστηριότητα των εστερασών με την ανθεκτικότητα κυρίως σε οργανοφωσφορικά ή/και καρβαμιδικά και πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα. Περίπου το ένα τρίτο των ειδών ανήκουν στα ημίπτερα. Οι εστεράσες κυρίως συνδέονται με την ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά ή και καρβαμιδικά εντομοκτόνα, ενώ σπάνια προσδίδουν ανθεκτικότητα μόνο στα καρβαμιδικά. Το πιο συχνό φαινόμενο είναι αυτό της αύξησης της ανθεκτικότητας λόγω αύξησης της δραστηριότητας των εστερασών. Μόνο τρεις περιπτώσεις υπάρχουν με μείωση της δραστηριότητας των εστερασών που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά. Τα είδη αυτά είναι η καρποκάψα *Cydia pomonella*, ο θρίπας *Frankliniella occidentalis* και ο τετράνυχος *Amblyseius potentillae* (Reyes et al. 2007).

Μείωση της ευαισθησίας του στόχου δράσης των εντομοκτόνων

Ο διαχωρισμός της αλλαγής του σημείου δράσης που οδηγεί στην ανθεκτικότητα απαιτεί τη γνώση του τρόπου δράσης των εντομοκτόνων αυτών. Μέχρι τώρα, οι πληροφορίες αυτές είναι περισσότερες για τη μοριακή δέσμευση των ενζύμων ή υποδοχέων στο νευρικό σύστημα των εντόμων. Τρία παραδείγματα ανθεκτικότητας στο σημείο δράσης είναι μέχρι τώρα καλά μελετημένα.

Οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά θανατώνουν τα έντομα με τη δέσμευση του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE) συνέπεια της οποίας είναι η αυξημένη παραγωγή νευρικών παλμών στη σύναψη. Περιπτώσεις

AChE με μειωμένη δέσμευση από τα οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά έχουν παρατηρηθεί σε πολλά είδη εντόμων και τετρανύχων (Denholm *et al.* 1998). Βιοχημικός προσδιορισμός μη ευαίσθητης AChE στα εντομοκτόνα έδειξε ότι τα έντομα μπορεί να φέρουν μια μεταλλαγμένη μορφή του ενζύμου, που προσδίδει ανθεκτικότητα.

Ο τρόπος δράσης των πυρεθρινών είναι στα σημεία του νευρικού άξονος που γίνεται η ανταλλαγή ιόντων Na, δηλ. στις πύλες νατρίου (Sodium channel). Ο μηχανισμός προκαλεί ανθεκτικότητα του στόχου στις πυρεθρίνες με αλλαγή της πρωτεΐνης της διόδου νατρίου στις κυτταρικές μεμβράνες και ονομάζεται **knockdown resistance (kdr)**. Αυτός ο τύπος ανθεκτικότητας έχει προσδιοριστεί σε πολλά είδη εντόμων συμπεριλαμβανομένων του δορυφόρου της πατάτας, αφίδων, οικιακής μύγας, κατσαρίδων και κουνουπιών (Field *et al.* 1997, Denholm *et al.* 1998).

Παρόλο που το endosulfan ήταν το μόνο σε χρήση εντομοκτόνο της ομάδας των κυκλοδιενίων που χρησιμοποιούταν για τον έλεγχο της αφίδας, η μοριακή ανάλυση έχει δείξει συσχέτιση στην αφίδα *M. persicae* μεταξύ της ανθεκτικότητας στο εντομοκτόνο αυτό και την παρουσία μιας σημειακής μετάλλαξης στον υποδοχέα GABA (γ-αμινοβουτυρικό οξύ). Ο υποδοχέας GABA είναι στόχος δράσης για πολλές ομάδες εντομοκτόνων, συμπεριλαμβανομένων τα κυκλοδιενίων (υπόταξη των οργανοχλωριωμένων), αβεμεκτινών και τον fipronil. Ο βασικός μηχανισμός ανθεκτικότητας των κυκλοδιενίων και fipronils σε πολλά είδη σχετίζεται με την αλλαγή μιας συγκεκριμένη υπομονάδας του υποδοχέα GABA, με αποτέλεσμα την αλλαγή της ευαισθησίας του σημείου δράσης αυτών των εντομοκτόνων.

Διασταυρούμενη και πολλαπλή ανθεκτικότητα

Τα αρθρόποδα σπάνια είναι ανθεκτικά σε μια μόνο τοξική ουσία. Πιο συχνά, παρουσιάζουν διαφορετικά επίπεδα ανθεκτικότητας σε ποικιλία συγγενών ή μη συγγενών εντομοκτόνων. Ένα σοβαρό βήμα στην αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας είναι ο προσδιορισμός της διασταυρούμενης ανθεκτικότητας που δίνει κάποιος μηχανισμός. Ο προσδιορισμός κατηγοριών

διασταυρούμενης ανθεκτικότητας είναι ουσιώδης για τη χρήση εντομοκτόνων κατά τέτοιο τρόπο (π.χ εναλλαγή) ώστε να αποφεύγεται η συνεχής επιλογή του ίδιου ανθεκτικού μηχανισμού. Η διαδικασία για την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας μπορεί να γίνει περίπλοκη από την πολλαπλή ανθεκτικότητα, δηλαδή την παρουσία στο έντομο δυο ή περισσότερων μηχανισμών, ο καθένας με συγκεκριμένο τύπο διασταυρούμενης ανθεκτικότητας.

Κατηγορίες διασταυρούμενης ανθεκτικότητας είναι δύσκολο να προβλεφθούν εκ των προτέρων. Οι μηχανισμοί που βασίζονται στην αποικοδόμηση ή στην αλλαγή της ευαισθησίας του στόχου δράσης μπορεί να διαφέρουν σημαντικά. Ως παράδειγμα, η ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά, που οφείλεται στην αυξημένη δραστικότητα εστερασών μπορεί να έχει ευρύ φάσμα επιδρώντας σε αρκετά από αυτά τα εντομοκτόνα (π.χ, E4 ανθεκτικότητα στο *M. persicae*, Field *et al.* 1997) ή πολύ ειδική δράση σε λίγα εντομοκτόνα ή ακόμα σε ένα μόνο μόριο. Ομοίως, οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας που οφείλονται στην τροποποίηση του στόχου δράσης μπορεί να διαφέρουν στους τύπους της διασταυρούμενης ανθεκτικότητας. Η ανθεκτικότητα μπορεί να είναι πολύ εκτεταμένη επηρεάζοντας μια μεγάλη σειρά από οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά εντομοκτόνα ή να είναι πολύ συγκεκριμένη, όπως με το τροποποιημένο ένζυμο AChE που προσδιορίστηκε στο *M. persicae* και δίνει ανθεκτικότητα σε λίγα καρβαμιδικά εντομοκτόνα, όπως το pirimicarb και το triazamate (Field *et al.* 1997).

Παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση ανθεκτικότητας

Ο ρυθμός με τον οποίο τα γονίδια ανθεκτικότητας επιλέγονται οφείλεται στον συνδυασμό από πολυάριθμους αβιοτικούς και βιοτικούς παράγοντες. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση ανθεκτικότητας μπορεί να ταξινομηθούν σε γενετικούς και βιολογικούς, ανάλογα με τις γενετικές και οικολογικές ιδιότητες των εχθρών ή τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας. Μπορεί επίσης να ταξινομηθούν και σε λειτουργικούς, συνδυάζοντάς τον τύπο του εντομοκτόνου που χρησιμοποιείται και με το πώς εφαρμόζεται.

Οι γενετικοί και βιολογικοί παράγοντες, κοινώς του βιολογικού κύκλου και ο αριθμός γενεών, είναι εκτός του δικού μας ελέγχου, όμως, μπορεί να γίνεται εκτίμηση του κινδύνου εμφάνισης ανθεκτικότητας κάτω από συγκεκριμένες στρατηγικές ελέγχου.

Οι οικολογικοί παράγοντες, όπως η μετανάστευση ή το μέγεθος των πληθυσμών των εντόμων, μπορούν να ερευνηθούν πριν από την εμφάνιση της ανθεκτικότητας και να βελτιωθούν οι γνώσεις των στρατηγικών διαχείρισης της ανθεκτικότητας. Αντίθετα, οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας μπορούν να μελετηθούν μόνο όταν έχει αναπτυχθεί η ανθεκτικότητα και έχει χαρακτηριστεί στο εργαστήριο (Denholm & Jespersen 1998). Ωστόσο, αυτή η γνώση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για σωστή διαχείριση της ανθεκτικότητας και επιπλέον για να κατανοηθούν πιο πολύπλοκα φαινόμενα, όπως αυτό της διασταυρούμενης ανθεκτικότητας.

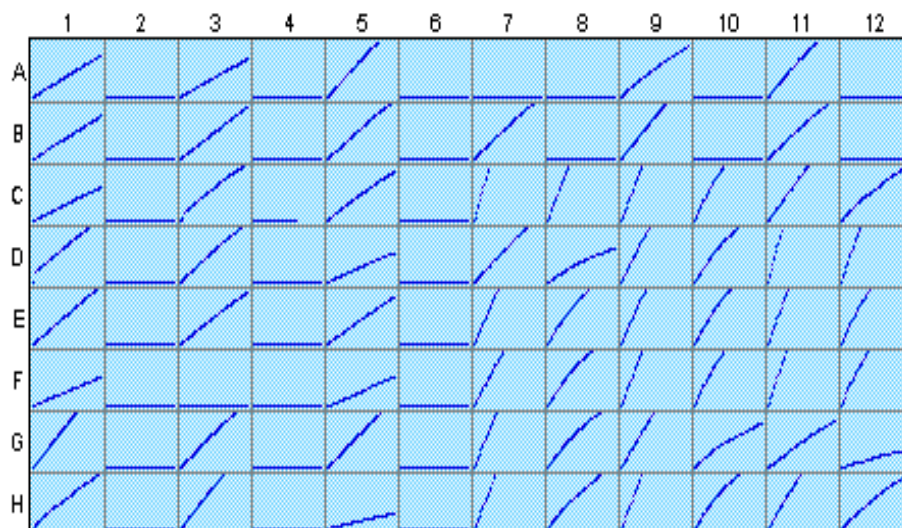
Οι λειτουργικοί παράγοντες όπως ο τύπος, οι δόσεις, η συχνότητα των εφαρμογών με εντομοκτόνα είναι άμεσα ελεγχόμενοι και μπορεί να γίνεται χειρισμός τους με πολλούς τρόπους προκειμένου να μειωθεί η πίεση για επιλογή ανθεκτικών γονιδίων.

Μέθοδοι διαπίστωσης ανθεκτικότητας

Στα πλαίσια της Ολοκληρωμένης Αντιμετώπισης Εχθρών είναι υποχρεωτικός ο έλεγχος της ανθεκτικότητας των εχθρών. Η ανθεκτικότητα αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα της γεωργίας σε παγκόσμιο επίπεδο, μιας και έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συχνότητας εφαρμογών και της ποσότητας του εφαρμοζόμενου εντομοκτόνου, τη μείωση της απόδοσης της καλλιέργειας σε συνδυασμό με το ρίσκο για αυξημένα υπολείμματα στις τροφές και υποβάθμιση του περιβάλλοντος μιας και αυξάνονται οι ξενοβιοτικές ουσίες στον αέρα, το έδαφος και το νερό. Για την αντιμετώπισή της είναι απαραίτητο να διαγνωστεί στους πληθυσμούς των εντόμων, που μας ενδιαφέρουν. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι. Οι κυριότερες εξ' αυτών χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες, κλασικές, βιοχημικές και μοριακές μεθόδους.

Οι κλασικές μέθοδοι είναι οι πιο διαδεδομένες και περιλαμβάνουν κυρίως βιοδοκιμές με διαφορετικές δόσεις του εντομοκτόνου που εξετάζεται κάθε φορά. Οι βιοδοκιμές αυτές μπορεί να γίνουν με τοπική εφαρμογή, ακριβή ψεκασμό πρότυπων διαλυμάτων, έκθεση των ουσιών σε φιλμ, χαρτί ή γυαλί και εμβάπτιση του εντόμου. Η επιλογή της μεθόδου εξαρτάται κυρίως από το είδος και το μέγεθος του εντόμου αλλά και τον τρόπο έλεγχου του. Σε όλες τις περιπτώσεις, υπολογίζεται το LC_{50} , ED_{50} , LD_{50} κλπ. ώστε να διαπιστωθεί η ανθεκτικότητα. Οι κλασικές μέθοδοι διαπίστωσης της ανθεκτικότητας είναι αρκετά αποτελεσματικές, παρόλα αυτά είναι χρονοβόρες και δεν μπορούν να απαντήσουμε ακρίβεια σε άλλα ερωτήματα, όπως π.χ. ποιός είναι ο υπεύθυνος μηχανισμός (ή μηχανισμοί) της ανθεκτικότητας. Για μεγαλύτερη λεπτομέρεια, υπάρχουν οι βιοχημικές και οι μοριακές μέθοδοι.

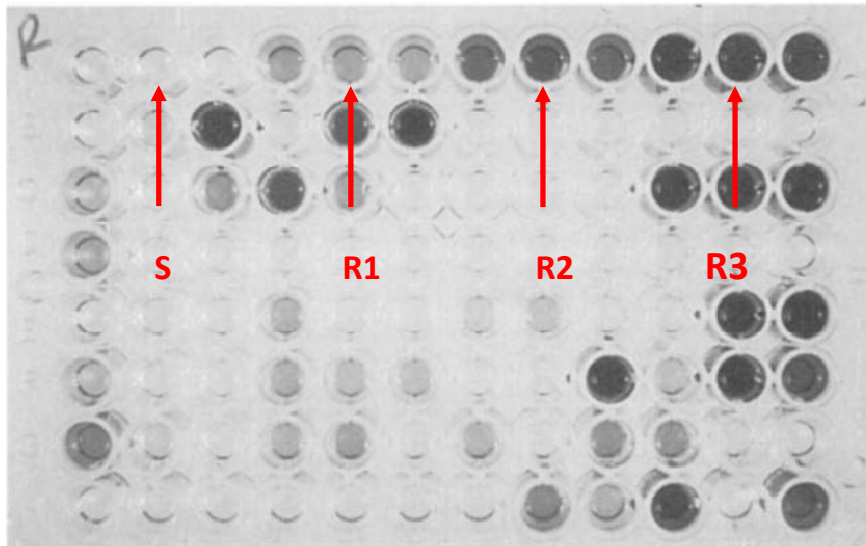
Οι βιοχημικές και μοριακές μέθοδοι μπορούν να ανιχνεύσουν τους μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για την ανθεκτικότητα εξετάζοντας άτομα και όχι ομάδες ατόμων. Για αυτόν ακριβώς το λόγο μπορούν να επιβεβαιώσουν την ύπαρξη ανθεκτικότητας χρησιμοποιώντας έναν πολύ μικρό αριθμό εντόμων. Η αναγνώριση των μηχανισμών ανθεκτικότητας είναι πολύ σημαντική γιατί: (α) βοηθάει στον καθορισμό του φάσματος της διασταυρωτής ανθεκτικότητας, που αποτελεί ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα στην αντιμετώπιση των εντόμων, (β) διευκολύνει την επιλογή εναλλακτικών εντομοκτόνων, και (γ) επιτρέπει τη λεπτομερή χαρτογράφηση περιοχών με ανθεκτικούς πληθυσμούς (Denholm *et al.* 1998). Πολλές βιοχημικές τεχνικές έχουν αναπτυχθεί για όλους τους γνωστούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας εκτός από εκείνων της *kdr* και των υποδοχέων του GABA (π.χ. Brogdon 1989, Brogdon & Barber 1990, Brogdon & McAllister 1997). Οι βιοχημικές μέθοδοι χρησιμοποιούν κυρίως σπεκτροφωτόμετρο ή φθορισμόμετρο, που έχουν σχέση με κινητικότητα, υπερπαραγωγή ή τροποποίηση ενζύμων. Τέτοιου είδους μηχανισμοί ανθεκτικότητας είναι η τροποποιημένη ακετυλοχολινεστεράση (MACE) (Εικόνα 1),



Εικόνα 1. Η κινητικότητα του ενζύμου AChE μετράται σε φασματοφωτόμετρο και μετά από επεξεργασία των αποτελεσμάτων σε Ηλεκτρονικό Υπολογιστή προκύπτει η παραπάνω εικόνα. Κάθε τετράγωνο δείχνει την κινητικότητα του ενζύμου σε κάθε δείγμα με μορφή διαγράμματος.

η αυξημένη παραγωγή εστερασών (Εικόνα 2), ο οξειδωτικός μεταβολισμός από το κυτόχρωμα P_{450} της μονοοξυγενάσης και η αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου της τρανσφεράσης γλουταθειόνη. Οι μέθοδοι αυτές είναι γρήγορες και αποτελεσματικές. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται ευρέως από τους ερευνητές, παρά το γεγονός ότι δίνουν ποσοστά ανθεκτικότητας για τα άτομα των εντόμων που εξετάστηκαν χωρίς να παρέχουν ακριβή στοιχεία.

Οι μέθοδοι που προτιμώνται λόγω της ακρίβειας των αποτελεσμάτων τους είναι οι μοριακές. Οι πληροφορίες που αντλούνται από τις μοριακές τεχνικές, για τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας αποτελούν ακριβή διάγνωση. Με τις μεθόδους αυτές ανιχνεύονται σημειακές μεταλλάξεις που σχετίζονται με τους μηχανισμούς αλλαγής του στόχου δράσης των εντομοκτόνων ή αποτοξίκωσης των ενζύμων. Συγκεκριμένα οι μηχανισμοί αλλαγής στόχου μπορούν να προσδιοριστούν με τη χρήση της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR) σε συνδυασμό με συγκεκριμένους μοριακούς δείκτες (π.χ. Field *et al.* 1996, Steichen *et al.* 1994).



Εικόνα 2. Επίπεδο ανθεκτικότητας για τον μηχανισμό υπερπαραγωγής εστερασών στην αφίδα *M. persicae*. (S=ευαίσθητα, R1= λίγο ανθεκτικά, R2= μέτρια ανθεκτικά, R3= πολύ ανθεκτικά)

Ανθεκτικότητα των αφίδων σε εντομοκτόνα

Η εκτεταμένη χρήση εντομοκτόνων έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε πολλά είδη εντόμων, μέσα σε αυτά και τις αφίδες, με αυτό να αποτελεί μια από τις κύριες αιτίες για την αποτυχία ελέγχου των εχθρών των καλλιεργειών. Από την παγκόσμια επισκόπηση της ανθεκτικότητας από τον Georgiou (1983) 400 άρθροποδα είχαν αναφερθεί να έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα, σε μια ή περισσότερες τάξεις εντομοκτόνων, και αυτά περιλαμβάνουν 18 είδη αφίδων. Σήμερα, παρόλο που έχουν αναφερθεί περισσότερα από 20 είδη ανθεκτικών αφίδων, το πρόβλημα είναι πιο επίμονο, διαδεδομένο και σοβαρό σε λίγα είδη, όπως τα *M. persicae*, *Phorodon humuli* (Schrank), *Schizaphis graminum* (Rondani) και *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera: Aphididae).

Αρκετοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας έχουν ανιχνευθεί σε διαφορετικά είδη αφίδων. Στην αφίδα *A. gossypii* έχουν γίνει αρκετές μελέτες στην Αμερική (O'Brien *et al.* 1992) και στην Ιαπωνία (Saito 1989; Hosoda *et al.* 1992) και έχει βρεθεί συσχέτιση μεταξύ της δραστηριότητας των εστερασών και της ανθεκτικότητάς τους σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα. Έχει αναφερθεί ότι

ανθεκτικοί κλώνοι σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα μπορεί να έχουν από 15 έως και 35 φορές περισσότερη δραστικότητα των εστερασών από ότι οι ευαίσθητοι κλώνοι (Suzuki & Hama 1998). Επίσης, η ανθεκτικότητα δεν έχει αποδοθεί σε ένα μόνο ενζυμο αλλά σε μια ομάδα διαφορετικών ισοενζύμων. Η ανθεκτικότητα σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα στην αφίδα *A. gossypii* δεν μπορεί να αποδοθεί πάντα σε ένα μηχανισμό που βασίζεται στις εστεράσες. Έχει βρεθεί συσχέτιση μεταξύ ανθεκτικότητας σε οργανοφωσφορικά και υψηλή ισχύ των οξειδασών (Sun *et al.* 1970).

Το 2004 σε μια εργασία των Toda και συνεργατών έγινε αναφορά για παρουσία στην *A. gossypii* τροποποιημένης ακετυλοχολινεστεράσης. Συγκεκριμένα, εφαρμόζοντας μοριακές μεθόδους, οι παραπάνω επιστήμονες εντόπισαν αντικαταστάσεις δυο αμινοξέων στο ένα γονίδιο της AChE που προσδίδουν ανθεκτικότητα στο έντομο σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα και στο pirimicarb. Επίσης, υψηλή ανθεκτικότητα έχει βρεθεί και στα πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα στην Αμερική (O'Brien *et al.* 1992) αλλά και σε άλλες χώρες.

Μια άλλη αφίδα που έχει απασχολήσει αρκετά τους επιστήμονες για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας είναι η *S. graminum*. Η αφίδα αυτή παρουσίασε ανθεκτικότητα σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, με αποτέλεσμα η αντιμετώπισή της να παρουσιάζει αποτυχίες. Οι Ono *et al.* (1999) με τη βοήθεια μοριακών μεθόδων ανακάλυψαν ότι ο υπεύθυνος μηχανισμός ήταν η υπερπαραγωγή εστερασών, οι οποίες ταξινομούνται σε δύο τύπους (Τύπος 1 και Τύπος 2) και παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με τα γονίδια των εστερασών E4 και FE4 που είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο *M. persicae*.

Ανθεκτικότητα του *Myzus persicae* σε εντομοκτόνα

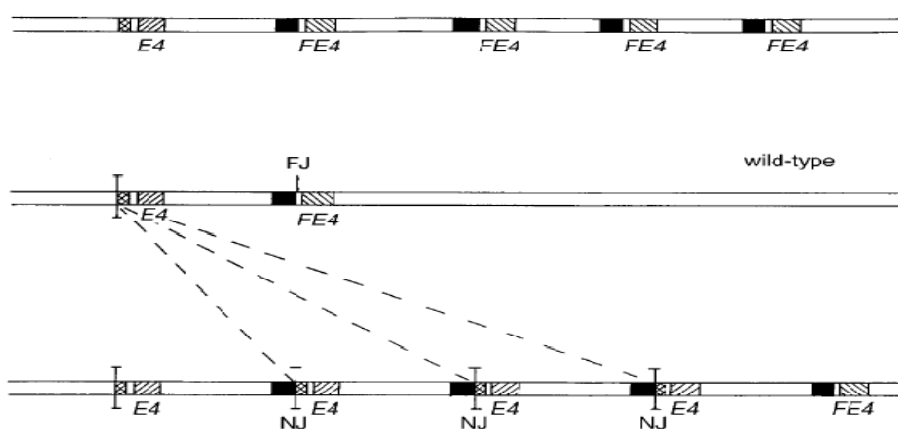
Κατά τον έλεγχο της εξέλιξης της ανθεκτικότητας στην αφίδα *M. persicae* πρέπει να λάβουμε υπόψη τον περίπλοκο βιολογικό της κύκλο, ο οποίος μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται (Blackman 1974) και τον ξενιστή που αποικίζει. Η ανθεκτικότητα της αφίδας *M. persicae* μπορεί να οφείλεται είτε στην αποτοξίκωση των εντομοκτόνων είτε στην αλλαγή του στόχου δράσης του εντομοκτόνου κ.α.

Αποτοξίκωση εντομοκτόνων από εστεράσες και ενίσχυση των γονιδίων των εστερασών

Οι Devonshire και Moores (1982) απέδειξαν ότι η ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα στην αφίδα της ροδακινιάς *M. persicae* μπορεί να οφείλεται στην αύξηση της σύνθεσης καρβοξυλεστεράσων (E4), οι οποίες υδρολύουν και απομακρύνουν τον εστέρα του εντομοκτόνου. Επίσης έχει βρεθεί ότι ένας άλλος, στενά συσχετιζόμενος καρβοξυλεστέρας (FE4), προσδίδει ανθεκτικότητα. Και στις δυο περιπτώσεις η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν αποτέλεσμα της παρουσίας ενός ενισχυμένου γονιδίου (Field *et al.* 1993). Μοριακές μελέτες έδειξαν ότι τα ενισχυμένα γονίδια (E4) βρίσκονται πάνω σε μια περιοχή 24kb του DNA (Field *et al.* 1996a) ως μια διαδοχικά επαναλαμβανόμενη σειρά (Field & Devonshire 1997), συνήθως σε μια περιοχή του χρωμοσώματος που σχετίζεται με την 1,3 μετάθεση στα αυτοσώματα (Blackman *et al.* 1995). Σε αντίθεση, τα γονίδια FE4 μπορεί να βρίσκονται σε πολλές περιοχές του γονιδιόματος και δεν υπάρχουν φανερές χρωμοσωμικές ανωμαλίες (Blackman *et al.* 1995, 1996). Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις δυο μορφές των εστερασών (E4 και FE4) έχουν μέγεθος 5kb και είναι παρόμοια. Διαφέρουν μόνο σε εννιά αμινοξέα και στο ότι η FE4 έχει 12 αμινοξέα στο τέλος της αλυσίδας, με αποτέλεσμα να αλλάζουν τα κωδικόνια λήξης, τα οποία βρίσκονται στα γονίδια της E4 (Εικόνα 3).

Η χρωματομετρική μέθοδος που μετρά την ποσότητα των ενζύμων, E4 ή FE4 σε μια αφίδα έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ποσοτικοποίηση των επίπεδων ανθεκτικότητας ως S, R1, R2 και R3 με κατά προσέγγιση

τετραπλάσια αύξηση της ποσότητας του ενζύμου μεταξύ των κατηγοριών (Devonshire *et al.* 1986). Πρόσφατα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αύξηση της ποσότητας του ενζύμου στην R3 κατηγορία, ανακλά την αύξηση των αντίγραφων του γονιδίου σε 80 (Field *et al.* 1999) ή 100 (Bizzaro *et al.* 2005) περίπου αντίγραφα. Αυτές οι εστεράσες αποτελούν το 1% των συνολικών πρωτεϊνών της αφίδας και το αποτέλεσμα της υδρόλυσης και της δέσμευσης των μορίων είναι η ανθεκτικότητα σε ένα ευρύ φάσμα εντομοκτόνων, όπως οργανοφωσφορικά, καρβαμιδικά και πυρεθροειδή. Παρά το γεγονός ότι η FE4 υδρολύει πιο γρήγορα από την E4 τα εντομοκτόνα, η υπερπαραγωγή οποιασδήποτε από τις δυο μορφές προσδίδει υψηλή ανθεκτικότητα. Η ανθεκτικότητα με την αυξημένη παραγωγή εστερασών, αποτελεί δευτερεύοντα μηχανισμό ανθεκτικότητας των αφίδων στα πυρεθροειδή, εφόσον ο βασικός μηχανισμός ανθεκτικότητας σε αυτά τα εντομοκτόνα είναι η αλλαγή του στόχου δράσης (Devonshire *et al.* 1998).



Εικόνα 3. Υπερπαραγωγή αντιγράφων των γονιδίων E4 και FE4 σε σχέση με τον ευαίσθητο γενότυπο (Field & Devonshire 1998)

Θεωρείται ότι είναι πολύ σπάνιο να βρεθούν σε μια αφίδα τα ενισχυμένα γονίδια και των δυο εστερασών, υποδεικνύοντας ότι τα άτομα που φέρουν διαφορετικά γονίδια δεν αναπαράγονται μεταξύ τους. Πρώτη φορά τα δυο ενισχυμένα γονίδια βρέθηκαν μαζί στους απογόνους εργαστηριακών

πληθυσμών ενώ εμφανίστηκε ένας μικρός αριθμός αφίδων και με τα δυο γονίδια σε χωράφια της Ελλάδας (Blackman *et al.* 1995, 1996, 1999).

Μετά από πολλές έρευνες αποδείχθηκε ότι η υπερπαραγωγή των γονιδίων E4 και FE4 εξαρτάται από διαφορετικά γεγονότα, τα οποία συμβαίνουν μια φορά και στη συνέχεια επιλέγονται οι ανθεκτικές αφίδες μετά την επέμβαση με εντομοκτόνα. Η εξάπλωση των γονιδίων γίνεται με τη μετανάστευση του είδους. Το 5' άκρο των δυο γονιδίων διαφέρει, κάτι που αποδεικνύει ότι η έκφρασή τους γίνεται με διαφορετικό τρόπο. Συγκεκριμένα, το γονίδιο FE4 έχει μια συνηθισμένη αλληλουχία υποκινητή, ενώ το E4 έχει μια απομονωμένη περιοχή με κυτοσίνη και γουανίνη (CpG) κάτι που μπορεί να επηρεάσει την έκφραση του γονιδίου μέσω αλλαγών στη μεθυλίωση του DNA.

Ανθεκτική ακετυλοχολινεστεράση (AChE)

Η ακετυλοχολινεστεράση (AChE, EC 3.1.1.7) είναι ο στόχος των οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών εντομοκτόνων στη μετασυναπτική μεμβράνη όπου υδρολύει έναν νευροδιαβιβαστή, την ακετυλοχολίνη και τερματίζει την νευροδιαβίβαση. Αναστολή της AChE από εντομοκτόνα, προκαλεί υπερβολική διέγερση στα νεύρα, μπλοκάρισμα της νευρικής μετάδοσης και θάνατο του εντόμου. Ανθεκτικότητα της AChE σε οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά εντομοκτόνα είναι ένας σημαντικός μηχανισμός ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα (Nabeshima *et al.* 2003). Στο *M. persicae* δεν είχε ανιχνευτεί μέχρι το 1990 (Moores *et al.* 1994a). Αρχικά εντοπίστηκε σε πληθυσμούς του εντόμου από την Ελλάδα και στη συνέχεια βρέθηκε σε πληθυσμούς από την Ιαπωνία, την Νότια Αφρική και την Ευρώπη (Moores *et al.* 1994b). Η μετάλλαξη που βρέθηκε από τους Nabeshima *et al.* (2003) είναι η S431F (σερίνη σε φαινυλαλανίνη), που βρίσκεται στη δεύτερη ακετυλοχολινεστεράση (AChE-2). Πληθυσμοί αφίδων με τροποποιημένη AChE πρωτοπαρουσιάστηκαν στην Αγγλία το 1995, αλλά τότε η αλλαγή αυτή δεν προκάλεσε προβλήματα στην αντιμετώπιση του εντόμου. Το 1996 παρουσιάστηκαν μεγάλοι πληθυσμοί αφίδων, με ανθεκτική AChE στην Ανατολική Αγγλία και το έτος εκείνο απέτυχε η αντιμετώπιση του πληθυσμού

των εντόμων με το pirimicarb, που μέχρι τότε αποτελούσε το κύριο μέσο αντιμετώπισης των αφίδων (Foster *et al.* 1998).

Το γεγονός ότι ο μηχανισμός της τροποποιημένης AChE εντοπίστηκε πρόσφατα και λαμβάνει χώρα μαζί με τον μηχανισμό των ενισχυμένων εστερασών (E4 - FE4) δηλώνει ότι ο μηχανισμός αυτός εξελίχτηκε πιο πρόσφατα. Το γονίδιο της AChE είναι το ίδιο στις αφίδες με το γονίδιο E4 ή FE4, κάτι που δηλώνει ότι αρχικά παρουσιάστηκε σε ολοκυκλικούς γενότυπους και στη συνέχεια εξαπλώθηκε μέσα στο είδος. Αν το τροποποιημένο γονίδιο της AChE εμφανίστηκε ως μετάλλαξη, η μεταφορά του σε αφίδες που είχαν στο γονιδίωμά τους τη μετατόπιση των αυτοσωμάτων 1 και 3 (ανολοκυκλικά ή ανδροκυκλικά άτομα) πρέπει να έγινε με σύζευξη θηλυκού απόμου με αρσενικό που προερχόταν από ανδροκυκλικό κλώνο με το ενισχυμένο γονίδιο E4. Η συνεχής παρθενογενετική αναπαραγωγή των απογόνων αυτής της διασταύρωσης, είχε ως αποτέλεσμα τη διατήρησή της σε ετεροζυγωτία. Παρόλα αυτά τροποποιημένο γονίδιο AChE, έχει βρεθεί και σε ομοζυγωτία σε συνδυασμό με τα ενισχυμένα γονίδια E4 και FE4. Αυτό δείχνει ότι έγινε σύζευξη αρσενικών με το γονίδιο E4 και θηλυκών με φυσιολογικό καρυότυπο και το ανθεκτικό γονίδιο της AChE (Moore *et al.* 1994b, Devonshire *et al.* 1998).

Η ανθεκτική AChE προσδίδει στο *M. persicae* ανθεκτικότητα στο pirimicarb και το triazamate. Πρόκειται για δυο αφιδοκτόνα, που ανήκουν στην οικογένεια των διμεθυλοκαρβαμιδικών. Λόγω της ανθεκτικότητας που έχει αναπτυχθεί στα παραπάνω δυο εντομοκτόνα, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν πλέον με αποτελεσματικότητα. Παρατηρήθηκε ότι άτομα με το γονίδιο της ανθεκτικής AChE δεν είναι ανθεκτικά σε ένα μεγάλο εύρος οργανοφωσφορικών και μεθυλο-καρβαμιδικών εντομοκτόνων. Το χαρακτηριστικό που προκαλεί την ανθεκτικότητα των εντομοκτόνων αυτών είναι η παρουσία δυο διπλών δεσμών αζώτου στα μόρια τους (Devonshire *et al.* 1998).

Παρά το γεγονός ότι σε άλλα είδη εντόμων, η αλλαγή της AChE οφείλεται σε μια ή περισσότερες μεταλλάξεις που αλλάζουν τη σειρά των

αμινοξέων κοντά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, οι αλλαγές που συμβαίνουν στο ένζυμο στην περίπτωση του *M. persicae* δεν έχουν εντοπιστεί ακόμα.

Τροποποιημένη δίοδος νατρίου (kdr ανθεκτικότητα)

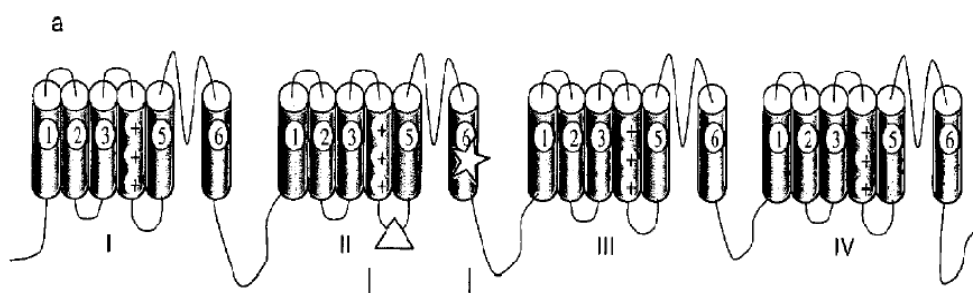
Τα πυρεθροειδή εντομοκτόνα έχουν εκλεκτική δράση στα ασπώνδυλα σε χαμηλές συγκεντρώσεις και αποτελούν το 20% των εντομοκτόνων που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως (McCaffery & Nauen 2006). Ωστόσο, πολλά είδη έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή με αποτέλεσμα την δημιουργία προβλημάτων στη διαχειρισή τους και αύξηση της οικονομικής ζημιάς (McCaffery & Nauen 2006). Ο σπουδαιότερος μηχανισμός ανθεκτικότητας του *M. persicae* στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα, είναι η τροποποίηση της δίοδου νατρίου στο νευρικό σύστημα (kdr και super-kdr). Όπως αναφέρθηκε, ο μηχανισμός με τις αυξημένες εστεράσες προσδίδει και αυτός ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή αλλά είναι δευτερεύουσας σημασίας σε σχέση με την kdr και την super-kdr. Η kdr ανθεκτικότητα ανιχνεύτηκε πριν 10 περίπου χρόνια στο *M. persicae* και το γεγονός ότι μπορεί να συνυπάρχει με το μηχανισμό των ενισχυμένων εστερασών οφείλεται στη στενή τους σχέση (Martinez-Torres *et al.* 1999, Devonshire *et al.* 1998). Η super-kdr (Eleftherianos *et al.* 2002) ανιχνεύτηκε πιο πρόσφατα, το 2002.

Μετά από πειράματα που έγιναν για την εκτίμηση της ανθεκτικότητας του *M. persicae* στο deltamethrin βρέθηκε ότι σε άτομα που δεν είχαν τον kdr μηχανισμό, παρά τα υψηλά επίπεδα των εστερασών, η ανθεκτικότητα ήταν πολύ μικρή. Σε άτομα που υπήρχε μόνο ο μηχανισμός kdr η ανθεκτικότητα εξαπλασιάστηκε (Martinez-Torres *et al.* 1999). Πιο πρόσφατες μελέτες (Eleftherianos *et al.* 2008) έδειξαν ότι η super-kdr προσδίδει πολύ μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε περίπτωση που βρίσκεται (έως και 455 φορές σε σχέση με τον κλώνο αναφοράς) στον πληθυσμό, ενώ επίσης έχουν παρατηρηθεί διαφορές τόσο μεταξύ των τύπων των πυρεθροειδών εντομοκτόνων (Τύπος I σε σχέση με τον Τύπο II) όσο και στη μορφή την οποία βρίσκεται (ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία).

Ο μηχανισμός ανθεκτικότητας kdr οφείλεται σε μια μετάλλαξη, όπου το αμινοξύ λευκίνη αντικαταστάθηκε από το αμινοξύ φαινυλαλανίνη στην περιοχή της υπομοναδας II στο τμήμα S₆ του γονιδίου του παράτυπου της δίοδου

νατρίου (Εικόνα 4). Αυτή η μετάλλαξη πρώτη φορά διαπιστώθηκε σε οικιακές μύγες και κατσαρίδες και στη συνέχεια βρέθηκε σε πολλά είδη εντόμων συμπεριλαμβανόμενου και το *M. persicae* (Martinez-Torres *et al.* 1999). Ο μηχανισμός ανθεκτικότητας super-kdr οφείλεται σε μια μετάλλαξη, όπου το αμινοξύ μεθειονίνη αντικαταστάθηκε από το αμινοξύ θρεονίνη στην διαμεμβρανική έλικα μεταξύ των τμημάτων S₄ - S₅ της υπομοναδας II του γονιδίου της διόδου νατρίου.

Σε Αγγλικούς πληθυσμούς της αφίδας, είχε βρεθεί ότι υπάρχει μεγάλη συσχέτιση μεταξύ του μηχανισμού kdr και της ενίσχυσης του γονιδίου E4, κάτι που αργότερα αποδείχτηκε ότι δεν ίσχυε (Field & Foster 2002). Σε αφίδες που προέρχονταν από 15 χώρες βρέθηκε ότι 5 στους 30 κλώνους με ενισχυμένα γονίδια E4, δεν είχαν το μηχανισμό ανθεκτικότητας kdr (Field *et al.* 1997). Γενικά δεν είναι γνωστό αν η σχέση μεταξύ των δυο μηχανισμών ανθεκτικότητας υποδηλώνει στενή σύνδεση σε ένα χρωμόσωμα. Είναι πιθανότερο η μετάλλαξη στη διόδο νατρίου να συνέβη σε ένα άτομο που είχε ήδη ενισχυμένο το γονίδιο E4. Το άτομο αυτό μετέφερε στους απογόνους του το μεγάλο πλεονέκτημα της επιλογής, δηλαδή να επιζούν αναπτύσσοντας ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα ανάλογα με την περίπτωση. Το χαρακτηριστικό αυτό μεταφέρθηκε και καθιερώθηκε μέσα σε έναν κλώνο. Τα αρσενικά από τον κλώνο αυτό πέρασαν τη μετάλλαξη της διόδου νατρίου, μέσω της σεξουαλικής αναπαραγωγής, σε γενότυπους που είχαν ενισχυμένο γονίδιο FE4 (Devonshire *et al.* 1998).



Εικόνα 4. Απεικόνιση της διόδου νατρίου και της μετάλλαξης kdr (*) όπου η φαινυλανίνη αντικαταστάθηκε από λευκίνη και της super-kdr (Δ) όπου το αμινοξύ μεθειονίνη αντικαταστάθηκε από το αμινοξύ θρεονίνη (Eleftherianos *et al.* 2008).

Κεφάλαιο 3°

Φυσικοί εχθροί της αφίδας και Ολοκληρωμένη Διαχείριση Εχθρών (IPM)

Γενικά

Οι αφίδες βρίσκονται στα περισσότερα χερσαία ενδιαιτήματα. Συχνά μειώνεται ο πληθυσμός τους από τη δράση αρπακτικών, παρασιτοειδών και παθογόνων, τα οποία συνήθως αποκαλούνται αφιδοφάγα. Τα αρπακτικά σκοτώνουν το θήραμα τους τρέφόμενα με αυτό. Σε μερικές οικογένειες, που περιέχουν αρπακτικά έντομα (πχ πασχαλίτσες – Coccinellidae), οι προνύμφες αλλά και τα ενήλικα είναι αρπακτικά των αφίδων, ενώ σε άλλα τάξα (Syrphidae, Chrysoroidea, Itonididae), μόνο οι προνύμφες είναι θηρευτές της αφίδας.

Γενικά, η επίδραση και η συνεισφορά ενός φυσικού εχθρού στην μείωση της ζημιάς του εχθρού, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Μολονότι πολλά είδη αφίδων είναι ευρέως εξαπλωμένα και σχετικά κοινά, η πυκνότητα τους μπορεί να διαφέρει στο χρόνο και στο χώρο. Για τη συμβολή στην μείωση του πληθυσμού του εντόμου στόχου, ο φυσικός εχθρός πρέπει να είναι ικανός να βρίσκει το έντομο στόχο. Διάφορα μηνύματα του ξενιστή ή των αφίδων χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό τους σε μεγάλη απόσταση. Μόλις μια αποικία από αφίδες βρεθεί από ένα αρπακτικό, πια αποικία θα εκμεταλλευθεί εξαρτάται από το δυναμικό αδηφαγίας του αρπακτικού (Volkl *et al.* 2007). Ο τρόπος που χρησιμοποιούν τους πόρους, εξαρτάται από τη δομή του πληθυσμού, την ικανότητα αναζήτησης της τροφής και το βαθμό εξειδίκευσης. Οι εξειδικευμένοι φυσικοί εχθροί είναι γενικά ικανότεροι από τους πολυφάγους να βρίσκουν την αποικία των αφίδων και γι' αυτό το λόγο θεωρούνται πιο αποτελεσματικοί στον έλεγχο.

Η επικρατέστερη άποψη για την αλληλεπίδραση μεταξύ χημικών εντομοκτόνων και βιολογικής καταπολέμησης είναι ότι τα περισσότερα εντομοκτόνα είναι τοξικά στους φυσικούς εχθρούς της αφίδας. Σκοπός στα προγράμματα ολοκληρωμένης καταπολέμησης των εχθρών είναι η ενίσχυση και διατήρηση των φυσικών εχθρών μέσω της ενίσχυσης και διατήρησης των ενδιαιτημάτων τους ή μέσω της χρήσης εκλεκτικών εντομοκτόνων, που δεν

επιηρεάζουν τους φυσικούς εχθρούς ή έχουν μεγαλύτερη τοξικότητα στα έντομα στόχους (Horper 2003). Η εκλεκτικότητα των εντομοκτόνων μπορεί να συμβεί είτε με οικολογικές είτε με φυσιολογικές μεθόδους (Ripper 1956). Το πρώτο επιτυγχάνεται με τη μείωση της έκθεσης των φυσικών εχθρών σε εφαρμογές εντομοκτόνων (Ripper 1956, Croft & Brown 1975). Το δεύτερο επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση εντομοκτόνων τοξικών στα έντομα στόχους αλλά σχετικά ακίνδυνα στους φυσικούς εχθρούς (Yu 1988, Stark *et al.* 1995). Η συντήρηση των φυσικών εχθρών μέσω της χρησιμοποίησης εκλεκτικών εντομοκτόνων μειώνει την πιθανότητα επανεμφάνισης του εντόμου στόχου (Johnson & Tabashnik 1999) και των αριθμό επεμβάσεων με εντομοκτόνα (Hutchison *et al.* 2004).

Τα αρπακτικά έντομα της οικογένειας Coccinellidae

Γενικά

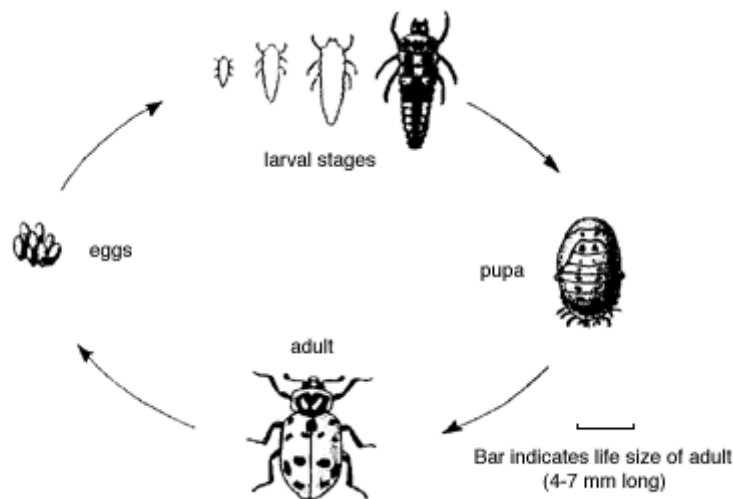
Οι πασχαλίτσες είναι κολεόπτερα, μια αρχαία και πολύ επιτυχημένη ομάδα εντόμων, που εξελίσσονται από την πέρμιο εποχή, περίπου 280 εκατομμύρια χρόνια πριν. Μετά το τέλος της ιουρασικής περιόδου όλες οι σύγχρονες υπεροικογένειες των κολεοπτέρων εξελίχτηκαν ως ξεχωριστές σειρές. Η φυλογένεση των κολεοπτέρων, βασισμένη κυρίως σε συγκριτικές μελέτες της μορφολογίας τους, τείνει να τοποθετήσει τις πασχαλίτσες (Coccinellidae) ανάμεσα στα πιο εξελιγμένα είδη της τάξης αυτής (Crowson 1981). Ωστόσο, μια μοριακή φυλογένεση βασισμένη στο μιτοχονδριακό τμήμα του κυτοχρώματος της οξειδάσης αποδεικνύει ότι οι πασχαλίτσες μπορεί να είναι πιο κοντά στα πρωτόγονα μέλη των κολεοπτέρων, τα Carabidae, όπως είχαν βρει παλιότερα (Howland & Hewitt 1995). Οι πασχαλίτσες απαρτίζουν μια πολύ διαφορετική μονοφυλετική οικογένεια, την Coccinellidae, η οποία περιλαμβάνει 4500 είδη παγκοσμίως.

Το όνομα της οικογένειας Coccinellidae, σημαίνει ότι περιβάλλεται με κόκκινο χρώμα και αναφέρεται στο κυρίαρχο κόκκινο χρώμα του καλύμματος των φτερών των εντομών της οικογένειας αυτής. Παρόλα αυτά, μια πιο λεπτομερή περιγραφή των εντόμων της οικογένειας Coccinellidae, αν και δεν

αποτελούν την πλειοψηφία των εντόμων αυτών, έχουν σκοτεινό χρώμα. Η οικογένεια Coccinellidae περιέχει επτά υποοικογένειες. Από τις υποοικογένειες, η Coccinellinae και η Epilachninae, περιέχουν είδη που τρέφονται με μύκητες ή με ανώτερα φυτά. Από τα αρπακτικά είδη τα περισσότερα τρέφονται με αφίδες είτε με κοκκοειδή, με μερικά είδη να τρέφονται και με τα δυο είδη θηράματος. Μερικά είδη τρέφονται με ακάρεα (Putman 1955), αφίδες της οικογένειας Adelgidae (Delucci 1954, Pope 1973), αλευρώδεις (Heinz & Zalom 1996), μυρμήγκια (Pope & Lawrence 1990), προνύμφες της οικογένειας Chrysomelidae (Elliott & de Little 1980), φυλλοξήρα (Pope 1973), ψύλλους (Booth 1997) κ.α. Η τροφή των Coccinellidae σε μια συγκεκριμένη περιοχή αντανακλά τη σύνθεση της πανίδας του δυνητικού θηράματος της περιοχής. Για παράδειγμα, στην Κεντρική Ευρώπη οι αφίδες είναι περισσότερες σε αριθμό σε σχέση με τα κοκκοειδή, έτσι η μεγαλύτερη αναλογία των Coccinellidae ειδικεύεται στις αφίδες απ' ό,τι στα κοκκοειδή. Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο γίνεται κυρίως αναφορά στα αρπακτικά έντομα της οικογένειας Coccinellidae που τρέφονται με αφίδες.

Βιολογικός Κύκλος

Οι πασχαλίτσες είναι ολομετάβολα έντομα, δηλ. έχουν πλήρη μεταμόρφωση και η ανάπτυξη τους περνά από τα παρακάτω στάδια: αυγό, προνύμφη 1^{ης} έως 4^{ης} ηλικίας (larva), νύμφη (pupa) και ενήλικο, για να ολοκληρώσουν την ανάπτυξη τους (μερικοί συγγραφείς αναφέρουν το στάδιο της pre-pupa ως ξεχωριστό στάδιο από αυτό της pupa). Ο βιολογικός τους κύκλος ξεκινά με το αυγό, το οποίο εκκολάπτεται και δίνει την προνύμφη πρώτης ηλικίας, η οποία περνά από τέσσερα στάδια μέχρι να νυμφωθεί και στην συνέχεια να μεταμορφωθεί σε ενήλικο (Σχήμα 4).



Σχήμα 4: Σχηματική απεικόνιση του κύκλου ζωής ενός Κολεοπτέρου, βασισμένη στο είδος *Hippodamia convergens* (πηγή: <http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/predators/hippodamia.html>).

Ο πλήρης βιολογικός κύκλος πολλών ειδών Coccinellidae στη φύση διαρκεί μέχρι και ένα χρόνο, ανάλογα με το είδος. Τα αυγά εναποτίθενται την άνοιξη ή τις αρχές του καλοκαιριού. Οι προνύμφες τρέφονται για περίπου ένα μήνα και έπειτα η νέα γενιά ενηλίκων εμφανίζεται στα μέσα με τέλη του καλοκαιριού. Τα ενήλικα συνήθως διατρέφονται, αλλά δε ζευγαρώνουν μέχρι την επόμενη Άνοιξη. Έτσι τα παραπάνω είδη έχουν μόνο μια γενιά το χρόνο (Majerus & Kearns 1989). Με τη μείωση της διάρκειας της ημέρας τα έντομα εισέρχονται σε διάπαυση, που με την ύπαρξη ενεργειακών αποθεμάτων και τον μειωμένο μεταβολισμό καθιστούν δυνατή την επιβίωση για μεγάλη περίοδο χωρίς διατροφή. Ο σημαντικότερος παράγοντας που επηρεάζει την είσοδο των εντόμων αυτών σε διάπαυση είναι η φωτοπερίοδος. Η μείωση της θερμοκρασίας και η φυσιολογική ωρίμανση των φυτών δεν επαναλαμβάνονται κάθε χρόνο με τόση ακρίβεια, όσο οι αλλαγές στη διάρκεια της ημέρας (Hodek 1973).

Στις συνθήκες της Ελλάδας για την είσοδο σε διάπαυση απαιτείται συνδυασμός της δράσης των καταλλήλων συνθηκών του περιβάλλοντος (φωτοπερίοδος – θερμοκρασία) στο “κρίσιμο” στάδιο ανάπτυξης των εντόμων, ώστε να δραστηριοποιηθεί ο ορμονικός μηχανισμός, και της επικράτησης μέσων θερμοκρασιών σε μεταγενέστερο στάδιο (Τσιτσιπής 1999). Κατά τη

διάρκεια της διάπαυσης η αντοχή σε αντίξοες κλιματικές συνθήκες αυξάνεται χάρη σε φυσιολογικά και μερικές φορές μορφολογικά γνωρίσματα που συνδυάζονται σε ένα “σύνδρομο προσαρμογής”, το οποίο ποικίλλει μεταξύ των ειδών (DeWilde 1970).

Αυγά: Τα αυγά είναι επιμήκη, συνήθως ωοειδούς σχήματος και το χρώμα τους ποικίλλει από ανοικτό κίτρινο έως βαθύ πορτοκαλί. Τα περισσότερα είδη στερεώνουν τα αυγά στη μια άκρη τους και έτσι αυτά βρίσκονται σε όρθια θέση. Υπάρχει ποικιλομορφία όσον αφορά τον αριθμό των αυγών που γεννιούνται κάθε φορά, αν και τα περισσότερα είδη γεννούν ομάδες αυγών (Majerus & Kearns 1989). Σύμφωνα με τον Dixon (2000) τα αφιδοφάγα Coccinellidae γεννούν τα αυγά τους σε ομάδες, ενώ αυτά που τρέφονται με κοκκοειδή γεννούν κάθε αυγό ανεξάρτητα. Τα αυγά σε μερικές ημέρες εκκολάπτονται, αν και το διάστημα αυτό ποικίλλει και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη θερμοκρασία. Λίγες ημέρες πριν την εκκόλαψη τα αυγά γίνονται γκρίζα (Hodek 1973, Hodek & Honek 1996).

Προνύμφες: Μετά την εκκόλαψη των αυγών, οι νεαρές προνύμφες παραμένουν κοντά στο κέλυφος για περίπου μια ημέρα. Συνήθως τρώγουν τα κελύφη, ενώ πολύ συχνά τρώγουν και τα αυγά που δεν έχουν εκκολαφθεί ή τις προνύμφες που εκκολαπτονται μετά από αυτές (Hodek & Honek 1996). Μόλις αφήσουν τα κελύφη, οι προνύμφες πρώτου σταδίου αρχίζουν να ψάχνουν για θηράματα ώστε να τραφούν κανονικά. Ο τρόπος με τον οποίο προσλαμβάνουν την τροφή εξαρτάται από τα σχετικά μεγέθη αρπακτικού και θηράματος. Είναι συνηθισμένο να συναντάται μια μικροσκοπική προνύμφη πρώτου σταδίου ‘αγκιστρωμένη’ στην πλάτη μιας σχετικά μεγάλης αφίδας. Τα στοματικά της μόρια είναι χωμένα βαθειά μέσα στην αφίδα και τρέφεται αναρροφώντας τα σωματικά υγρά της αφίδας, ενώ το περίβλημα και τα εξαρτήματα του σώματος παραμένουν ανέπαφα (Butt 1951, Harpaz 1958, Hagen 1962, Kesten 1969). Αυτός ο τρόπος διατροφής είναι συνηθισμένος στις μικρότερες προνύμφες (πρώτου και δευτέρου σταδίου). Καθώς η προνύμφη μεγαλώνει, αρχίζει να τρέφεται και με συμπαγή μέρη του σώματος του θηράματος, όπως τα πόδια ή οι κεραίες (Majerus & Kearns 1989).

Οι προνύμφες υφίστανται έκδυση τρεις φορές πριν τη νύμφωση. Το παλιό έκδυμα σχίζεται από την ραχιαία πλευρά και η προνύμφη

ελευθερώνεται σε περίπου μια ώρα. Ο νέος εξωσκελετός είναι αρχικά μαλακό και ωχρό, αλλά γρήγορα σκληραίνει και σκουραίνει. Η χρονική διάρκεια των προνυμφικών σταδίων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Σημαντικό ρόλο παίζει και η πυκνότητα των θηραμάτων, καθώς όσο μεγαλύτερη είναι, τόσο πιο γρήγορα μεγαλώνουν και οι προνύμφες. Από μια συγκεκριμένη πυκνότητα θηραμάτων και πάνω ο ρυθμός ανάπτυξης δεν αυξάνεται, όμως τα άτομα που προκύπτουν είναι μεγαλύτερα (Hodek 1973).

Η προνυμφική ανάπτυξη είναι δυνατή μέσα σε ένα σχετικά στενό θερμοκρασιακό εύρος. Η ταχύτητα ανάπτυξης αυξάνεται με τη θερμοκρασία μέχρι ένα μέγιστο. Πάνω από το ανώτερο θερμοκρασιακό όριο (άνω ουδός ανάπτυξης) παρατηρείται ακόμη και μείωση του ρυθμού ανάπτυξης. Η συμπλήρωση κάθε σταδίου ανάπτυξης απαιτεί τη συσσώρευση ενός συγκεκριμένου ποσού θερμικής ενέργειας. Έτσι η αποτελεσματική θερμοκρασία (η θερμοκρασία πάνω από την κάτω ουδό ανάπτυξης) αθροίζεται με τη μορφή των ημεροβαθμών (DD).

Pre-pupa: Η προνύμφη 4^{ου} σταδίου πριν από τη νύμφωση σταματά να τρέφεται και παραμένει ακίνητη. Η άκρη της κοιλιάς τους προσκολλάται σε μια επιφάνεια, που μπορεί να είναι φύλλο, μίσχος ή φλοιός και αρχίζει να κυρτώνεται (Hodek 1973).

Νύμφη: Η νύμφη εμφανίζεται σε μια χαρακτηριστική, κυρτωμένη θέση. Το τελευταίο προνυμφικό έκδυμα (της pre-pupa), έχει αποβληθεί έως το σημείο προσκόλλησης στην επιφάνεια και η νύμφη είναι ακάλυπτη. Παρότι οι νύμφες θεωρείται πως είναι αδρανείς, δεν είναι τελείως ακίνητες. Εάν ερεθιστούν υπάρχει ένας μηχανισμός ανταπόκρισης στον κίνδυνο, σύμφωνα με τον οποίο η περιοχή της κεφαλής σηκώνεται πολλαπλές φορές μέσω ανοδικών, απότομων κινήσεων του σώματος. Ο χρωματισμός της νύμφης επηρεάζεται πολύ από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, ενώ η διάρκεια της νύμφωσης ποικίλλει ανάλογα με τη θερμοκρασία.

Ενήλικο: Το ενήλικο έντομο προβάλλει σκίζοντας το μπροστινό μέρος της νυμφικής θήκης. Χρειάζονται αρκετά λεπτά μέχρι το έντομο να αποβάλει το νυμφικό περίβλημα. Στο στάδιο αυτό τα φτερά και τα έλυτρα είναι πολύ μαλακά και περιέχουν πολύ λίγη χρωστική ουσία. Το χρώμα των ελύτρων είναι κίτρινο ή ανοικτό πορτοκαλί. Ο χαρακτηριστικός χρωματισμός και τα σχέδια του ενήλικου αποκτούν την κανονική τους εμφάνιση σταδιακά,

ανάλογα με τη θερμοκρασία. Οι περισσότερες αλλαγές συμβαίνουν μέσα στις πρώτες ώρες, όμως το κόκκινο χρώμα έχει μια ανοικτή απόχρωση για εβδομάδες ή και μήνες. Έτσι για αρκετό χρόνο είναι εύκολο να διακρίνουμε τα ενήλικα άτομα της νέας γενιάς.

Μια μόνο σύζευξη είναι αρκετή για να καλύψει όλη την αναπαραγωγική ζωή των θηλυκών ατόμων των περισσότερων ειδών, παρόλ' αυτά τα ενήλικα ζευγαρώνουν πολλές φορές.

Μορφολογία

Το σώμα των ειδών της οικογένειας Coccinellidae αποτελείται από την κεφαλή, το θώρακα και την κοιλιά. Ο θώρακας καλύπτεται από το πρόνωτο και τα έλυτρα, τα οποία σκεπάζουν και την κοιλιά. Οι κεραίες των ειδών αυτών είναι κοντές, ροπαλοειδείς, και τα πόδια βαδιστικού τύπου. Επίσης, τα Coccinellidae έχουν το πρόσθιο ζεύγος πτερύγων τροποποιημένο, έτσι ώστε να σχηματίζει σκληρά έλυτρα, που ενώνονται σε μια κεντρική γραμμή και καλύπτουν την κοιλιά. Τα πρόσθια έλυτρα καλύπτουν το οπίσθιο ζεύγος πτερύγων, όταν το έντομο δεν πετά. Οι πίσω πτέρυγες είναι μεμβρανώδεις. Τα στοματικά μόρια των εντόμων είναι μασητικού τύπου (Majerus & Kearns 1989). Τα Coccinellidae είναι ολομετάβολα έντομα και οι προνύμφες τους έχουν μακρύ και ευλύγιστο σώμα. Τα αρσενικά και τα θηλυκά άτομα παρουσιάζουν κάποιες μορφολογικές διαφορές. Στα περισσότερα είδη, τα θηλυκά έχουν ελαφρά μεγαλύτερο μέγεθος από τα αρσενικά άτομα. Οι διαφορές σωματικού μεγέθους δεν αποτελούν ωστόσο απόλυτα αξιόπιστο κριτήριο αναγνώρισης του φύλου. Το ασφαλέστερο μορφολογικό κριτήριο που διαφοροποιεί τα αρσενικά από τα θηλυκά άτομα, είναι η ύπαρξη τριών κυρτωμένων δακτυλίων από λευκό εύκαμπτο δερμάτιο στα τελευταία κοιλιακά μεταμερή. Οι δακτύλιοι αυτοί επιτρέπουν την κάμψη της κοιλιάς των αρσενικών στις σωστές γωνίες κατά τη σύζευξη με τα θηλυκά (Majerus & Kearns 1989).

Κανιβαλισμός των αρπακτικών *Coccinellidae*

Νεοεκκολαπτόμενες προνύμφες μένουν μέσα στο κέλυφος του αυγού τους, στη συνέχεια καταναλώνουν τα διπλανά αυγά και μετά διασκορπίζονται (Dixon 1959). Το ίδιο συμβαίνει και σε μεγαλύτερες προνύμφες σε περίπτωση μη εύρεσης τροφής. Ο κανιβαλισμός αυξάνει την πιθανότητα επιβίωσης των κανίβαλων αρπακτικών. Εκτροφή με συγγενικά είδη αυξάνει το χρόνο που έχει στην διάθεση του να βρει αφίδες ένα αρπακτικό. Ο Mills (1982) πρότεινε ότι υψηλές τιμές κανιβαλισμού συνήθως είναι ψευδείς επειδή η εκτροφή των αρπακτικών *Coccinellidae* στο εργαστήριο οδηγεί σε μεγάλα ποσοστά στειρότητας. Ωστόσο, ο ίδιος βρήκε ποσοστά κανιβαλισμού στην φύση μεταξύ 6-30%. Αυτό το χαρακτηριστικό εμποδίζει ως ένα βαθμό τη μαζική παραγωγή των *Coccinellidae*, καθώς οι προνύμφες μόλις βγουν από το αυγό πρέπει να απομονώνονται.

Το είδος *Coccinella septempunctata* L. (Coleoptera: *Coccinellidae*)

Το *C. septempunctata* είναι ένας δυνητικός θηρευτής των αφίδων παγκοσμίως, ενώ πιο συγκεκριμένα στην Ελλάδα αποτελεί δυνητικός θηρευτής για την αφίδες *M. persicae* σε καλλιέργειες καπνού και ροδακινιάς (Katsarou *et al.* 2005, Karagounis *et al.* 2006) και *A. gossypi* σε καλλιέργειες βαμβακιού (Ζάρπας 2006).

Ταξινόμηση: Το αρπακτικό κολεόπτερο *C. septempunctata* θεωρείται ιθαγενές είδος της Παλαιαρκτικής ζώνης. Παρατηρείται στην Ευρώπη, την Αφρική, την Αμερική. Κατατάσσεται στην υπεροικογένεια Cucujoidea της τάξης των Κολεοπτέρων (Heie 1980).

Μορφολογία. Χαρακτηρίζεται από τα πορτοκαλί ως κόκκινα έλυτρα του, τα οποία φέρουν επτά μαύρα στίγματα, κατά το πρότυπο σχέδιο 1-4-2. Σε κάθε έλυτρο υπάρχουν τρία στίγματα και το έβδομο στίγμα βρίσκεται πίσω από τη μέση του προθώρακα. Η κεφαλή και ο θώρακός του έχουν μαύρο χρώμα. Σε κάθε πλευρά της κεφαλής υπάρχει μια λευκή ή ωχρή κηλίδα. Το κοιλιακό μέρος και τα πόδια του εντόμου είναι μαύρα. Τα θηλυκά άτομα διακρίνονται μορφολογικά από τα αρσενικά από το μεγαλύτερό τους μέγεθος και από το

τελευταίο κοιλιακό τους τμήμα. Στα θηλυκά άτομα αυτό είναι επίπεδο, ενώ στα αρσενικά εξογκωμένο. Το μέγεθος του σώματος συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 5,99 mm στους 14°C και 6,12 mm στους 23°C και το πλάτος του μεταξύ 4,07 mm στους 14°C και 4,3 mm στους 23°C (Katsarou *et al.* 2005). Οι προνύμφες του είδους έχουν σκούρο καστανό χρώμα και μακρύ σώμα που φτάνει τα 7-8 mm σε μήκος στο 4^ο στάδιο και τρία ζεύγη ποδιών. Οι νύμφες έχουν συνήθως σκούρο καστανό χρώμα, αλλά σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και χαμηλής υγρασίας, αποκτούν ανοιχτή πορτοκαλί απόχρωση (Hodek 1973). Τα αυγά είναι μακρά, ελλειπτικά με μήκος περίπου 1mm και κίτρινο χρώμα. Η ποιότητα και η ποσότητα τροφής των προνυμφών έχουν σημαντικό ρόλο στο μέγεθος και το βάρος των ενηλίκων αρπακτικών.

Προνυμφική ανάπτυξη. Κατά τη διάρκεια της ζωής του εντόμου, παρατηρούνται τέσσερα προνυμφικά στάδια, στη συνέχεια το στάδιο της νύμφης και τελικά το στάδιο του ενήλικου εντόμου. Η Katsarou *et al.* (2005) βρήκαν ότι η διάρκεια των σταδίων από το αυγό ως την έξοδο του τελείου κυμαίνεται από 70,4 μέρες στους 14°C, ως 22,1 μέρες στους 23°C.

Εύρος θηραμάτων. Το είδος *C. septempunctata* θεωρείται πολυφάγο. Τρέφεται με είδη αφίδων που προσβάλλουν τα ψυχανθή [*Aphis craccivora* (Koch), *Acyrtosiphon pisum* (Harris), *A. fabae*, *Megoura viciae* (Buckton)], τα σιτηρά [*Uromelan aeneus* (Mordvilko), *Rhopalosiphum padi* L.] το βαμβάκι [*A. gossypii*], τον καπνό και τη ροδακινιά [*M. persicae*], τα πυρηνόκαρπα [*Hyalopterus pruni* (Geoffroy)], τα λάχανα [*Brevicoryne brassicae* L.] και άλλα είδη αφίδων, όπως τα *Aphis urticae* (Gmelin), *Lipaphis erysimi* (Kaltenbach), *Longiunguis donacis*, *Macrosiphoniella artemisiae* (Boyer de Fonscolombe). Συναντάται και σε αυτοφυή είδη. Επίσης, τρέφεται και με είδη των οικ. Coccidae και Thripidae (Riudavets & Castané 1998).

Βιολογία. Στην Ελλάδα, ο βιολογικός κύκλος του είδους περιλαμβάνει κατά τον Katsoyannos (1976) την περίοδο από τα τέλη Μαρτίου ως τον Ιούλιο, κατά την οποία παρατηρείται δραστηριότητα και αναπαραγωγή των κολεοπτέρων, την περίοδο θερινής αναπαραγωγικής διάπαυσης από τον Ιούλιο ως τον Αύγουστο, την περίοδο διακοπής της διάπαυσης και επανεμφάνισης του

είδους στον αγρό από το Σεπτέμβριο ως το Νοέμβριο και την περίοδο διαχείμασης από το Νοέμβριο ως τα τέλη Φεβρουαρίου ή τις αρχές Μαρτίου.

Τα ενήλικα που εξέρχονται από τη διαχείμαση, εμφανίζονται στις πεδινές περιοχές από τα τέλη Μαρτίου ως τις αρχές Απριλίου. Τρέφονται και αναπαράγονται και γεννούν τα πρώτα αυγά κατά το δεύτερο μισό Απριλίου. Οι πληθυσμοί του είδους παρουσιάζουν παραλλακτικότητα ως προς τον αριθμό γενιών, εμφανίζοντας συχνά περισσότερες από μια γενιές το έτος (Hodek 1986). Στην Ελλάδα παρατηρήθηκε ότι το είδος εμφανίζει τέσσερις γενιές το έτος, με την πρώτη να παρατηρείται στον αγρό κατά το δεύτερο ή τρίτο δεκαήμερο Μαΐου, τη δεύτερη κατά τα τέλη Ιουνίου ως τις αρχές Ιουλίου, την τρίτη από τα τέλη Ιουλίου ως αρχές Αυγούστου και την τέταρτη από τις αρχές Σεπτεμβρίου ως τα τέλη του ίδιου μήνα ή το αργότερο ως το τρίτο δεκαήμερο Οκτωβρίου (Katsoyannos *et al.* 1997).

Κατά τα τέλη Ιουνίου παρατηρείται μετανάστευση ενός σημαντικού μέρους των ενηλίκων προς τις κοντινές ορεινές περιοχές, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται στα πεδινά σημαντικά μικρότεροι πληθυσμοί του είδους. Από το τρίτο δεκαήμερο Ιουλίου ως το τρίτο δεκαήμερο Αυγούστου, ένα ποσοστό 20-30% των θηλυκών της πρώτης γενιάς απογόνων παρουσιάζει ανάσχεση ανάπτυξης ωοθηκών, διακοπή της αναπαραγωγής και συνάθροιση σε ομάδες των 13-60 ατόμων. Εισέρχεται δηλαδή σε θερινή αναπαραγωγική διάπαυση, σύμφωνα με τους Katsoyannos *et al.* (1997b). Με τον τρόπο αυτό, τα ενήλικα αποφεύγουν τις περιόδους που παρατηρείται έλλειψη αφίδων. Την ίδια περίοδο οι Katsoyannos *et al.* (1997b) παρατήρησαν τη συσσώρευση αποθεμάτων λιπώδους ιστού στα ενήλικα και παρατεταμένη περίοδο πρωτοκίας στα θηλυκά, η οποία κυμαινόταν μεταξύ 90 ημερών στις αρχές Ιουλίου και 82 ημερών στις αρχές Αυγούστου. Τα θηλυκά της δεύτερης γενιάς εκδηλώνουν διάπαυση σε ποσοστό μεγαλύτερο από 50%. Τα θηλυκά της τρίτης γενιάς εκδηλώνουν διάπαυση σε ποσοστό μεγαλύτερο των ατόμων της δεύτερης και παρουσιάζουν καθυστερημένη έναρξη αναπαραγωγής. Τα θηλυκά της τέταρτης γενιάς δεν εισέρχονται σε διάπαυση, καθώς εμφανίζονται στον αγρό μετά το τέλος της περιόδου διάπαυσης των προηγούμενων γενιών. Η αναπαραγωγή των ενηλίκων και των τεσσάρων γενιών συνεχίζεται ως το δεύτερο δεκαήμερο Οκτωβρίου ή ως τις αρχές Νοεμβρίου το αργότερο. Η

συνολική ωοπαραγωγή των θηλυκών της τρίτης και περισσότερο της τέταρτης γενιάς είναι πολύ χαμηλότερη από τις αντίστοιχες της δεύτερης και πολύ περισσότερο της πρώτης γενιάς. Το φαινόμενο αποδίδεται από τους Katsoyannos *et al.* (1997b) στον περιορισμένο διαθέσιμο χρόνο για διατροφή και στις συνθήκες του περιβάλλοντος την εποχή του φθινοπώρου, με μέσες μηνιαίες θερμοκρασίες χαμηλότερες των 15°C και διάρκεια φωτοπεριόδου μικρότερη από 11,5 ώρες. Την ίδια περίοδο, παρατηρείται συσσώρευση λιπώδους ιστού στο σώμα των κολεοπτέρων, καθώς τα έντομα προετοιμάζονται για είσοδο σε διάπαυση. Από το Νοέμβριο ως τα τέλη Μαρτίου ή τις αρχές Απριλίου, τα άτομα του είδους *C. septempunctata* διαχειμάζουν σε προφυλαγμένες θέσεις, παρουσιάζουν αυξημένα αποθέματα λιπώδους ιστού και τα θηλυκά παρουσιάζουν επιπλέον ανάσχεση ανάπτυξης και ανωριμότητα των ωοθηκών (Katsoyannos *et al.* 1997b).

Το είδος, *Hippodamia (Semiadalia) undecimnotata* (Schneider) (Coleoptera: Coccinellidae)

Ταξινόμηση: Το αρπακτικό κολεόπτερο *H. undecimnotata* (Coleoptera: Coccinellidae) θεωρείται ιθαγενές είδος της Παλαιαρκτικής ζώνης. Παρατηρείται στη Νότια και Κεντρική Ευρώπη, την Ασία, τον Καύκασο, τη Δυτική Σιβηρία και στην Ελλάδα. Κατατάσσεται στην υπεροικογένεια Cucujoidea της τάξης των Κολεοπτέρων (Heie 1980)

Μορφολογία : Χαρακτηρίζεται από τα πορτοκαλί ως κόκκινα έλυτρά του, τα οποία φέρουν επτά μαύρα στίγματα, κατά το πρότυπο σχέδιο 3-4. Το μπροστινό μέρος της κεφαλής είναι λευκό στα αρσενικά και μαύρο στα θηλυκά. Τα θηλυκά άτομα επίσης διακρίνονται μορφολογικά από τα αρσενικά από το μεγαλύτερό τους μέγεθος και από το τελευταίο κοιλιακό τους τμήμα. Τα αυγά είναι μακρά, ελλειπτικά με μήκος περίπου 0,8mm και έχουν κίτρινο χρώμα. Η ποιότητα και η ποσότητα τροφής των προνυμφών έχουν σημαντικό ρόλο στο μέγεθος και το βάρος των ενηλίκων αρπακτικών.

Εύρος θηραμάτων: Το *H. undecimnotata* είναι ολιγοφάγο, δηλ. τρέφεται με λίγα είδη αφίδων. Τα είδη που τρέφεται το *H. undecimnotata* είναι τα *Myzus*

persicae (Sulzer) (Brun & Iperiti 1978) και *Aphis fabae* (Scopoli) (Brun & Iperiti 1978), ενώ αντίθετα με αρκετά άλλα είδη αφίδας (π.χ *Aphis craccivora*, *Aphis nerii*) δεν μπόρεσε να ολοκληρώσει την αναπτυξή του ή ακόμα προκάλεσαν και το θανατό του.

Βιολογία: Το *H. undecimnotata* είναι ένα είδος με πολλές γενιές στην Ελλάδα. Μπορεί να ολοκληρώσει από δυο μέχρι πέντε επικαλυπτόμενες γενιές όταν τρέφεται σε εξωτερικά κλουβιά με συνεχόμενη παροχή αφίδων (Katsoyannos *et al.* 1997a). Στη Κεντρική Ελλάδα, το *H. undecimnotata* αναπαράγεται την άνοιξη στις πεδινές περιοχές. Τον Ιούνιο, παρατηρείται μαζική μετανάστευση των ενηλίκων στις υψηλές κορυφές κοντινών βουνών. Σχηματίζει συναθροίσεις και βρίσκεται συνέχεια στα βουνά εως όταν οι πασχαλίτσες αυτές αρχίσουν να μεταναστεύουν, μεταξύ Μαρτίου και μέσα Απριλίου του επόμενου χρόνου. Από τον Ιούλιο μέχρι και το τέλος του Οκτωβρίου το *H. undecimnotata* είναι σπάνιο στις πεδινές περιοχές και κατά τη διάρκεια του χειμώνα απουσιάζει πλήρως (Katsoyannos *et al.* 1997a)

Το είδος *Hippodamia variegata* (Goeze) (Coleoptera: Coccinellidae)

Ταξινόμηση: Ανήκει στην υπεροικογένεια Cucujoidea της τάξης Coleoptera, στην οικογένεια Coccinellidae, στην υποοικογένεια Coccinellinae, στο γένος *Hippodamia* και στο είδος *variegata*. Το κοινό του όνομα είναι πολύχρωμη πασχαλίτσα (Variegated Lady Beetle). Υπάρχει σε όλη την Ευρώπη, την Αυστραλία και την Αμερική.

Μορφολογία : Το είδος έχει χαρακτηριστικά επιμήκη, κιτρινοκόκκινα έλυτρα με ποίκιλα μαύρα στίγματα. Σε κάθε έλυτρο μπορούν να υπάρχουν 4 ή λιγότερα στίγματα. Τα πόδια και η κοιλιά του εντόμου έχουν μαύρο χρώμα. Στο μαύρο πρόνωτο παρατηρείται μια λευκή γραμμή στην άκρη των ματιών του και από δυο απομονωμένα λευκά στίγματα. Το μήκος του εντόμου κυμαίνεται από 4mm ως 5mm. Οι προνύμφες είναι σκούρου χρώματος, μακρές, με τρία ζεύγη ποδιών και φέρουν πορτοκαλί στίγματα. Τα αυγά είναι κίτρινα και επιμήκη.

Εύρος θηραμάτων: Είναι πολυφάγο είδος, όμως τα ενήλικα και οι προνύμφες τρέφονται κυρίως με αφίδες. Συνηθισμένα θηράματά του αποτελούν οι αφίδες του είδους *Dysaphis crataegi* (Kontodimas & Stathas 2005), καθώς και άλλες αφίδες όπως *A. pisum*, *A. craccivora*, *A. fabae* (σε μπιζέλια), *Aphis nerii*, *Aphis pomi* (L), *Diuraphis noxia*, *Macrosiphoniella artemisiae*, *M. persicae*, *R. maidis*, *S. graminum* (Hodek & Honek 1996). Αν οι αφίδες είναι λιγοστές, τα ενήλικα και οι προνύμφες μπορεί να διατραφούν με προνύμφες και αυγά άλλων εντόμων, ακάρεα και περιστασιακά με νέκταρ και μελιτώματα αφίδων ή άλλων μυζητικών εντόμων.

Βιολογία: Το *H. variegata* είναι ένα είδος με πολλές γενιές στην Ελλάδα. Μπορεί να ολοκληρώσει επτά επικαλυπτόμενες γενιές όταν τρέφεται σε εξωτερικά κλουβιά με συνεχόμενη παροχή αφίδων μεταξύ Απριλίου και Νοεμβρίου (Kontodimas & Stathas 2005). Στην Κεντρική Ελλάδα, το *H. variegata* άρχισε να εμφανίζεται στο σιτάρι στις αρχές Απριλίου μέχρι μέσα Μαΐου (Kavalieratos *et al.* 2002), από τα μέσα Μαΐου μέχρι μέσα Ιουλίου στο βαμβάκι (Kavalieratos *et al.* 2002) ενώ σε καλλιέργεια καπνού, από τα μέσα Ιουλίου μέχρι και τα τέλη Σεπτεμβρίου (Kavalieratos *et al.* 2004).

Σκοπός της διατριβής

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι να συμβάλει στο έλεγχο της αφίδας *M. persicae* στα πλαίσια της Ολοκληρωμένης Αντιμετώπισης των Έχθρων. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε η ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα πληθυσμών της αφίδας *M. persicae* από διάφορες περιοχές της Ελλάδος και καλλιέργειες, ενώ έγινε συσχέτιση του βιολογικού κύκλου της αφίδας *M. persicae* σε σχέση με την ανθεκτικότητα. Επίσης, μελετήθηκε η ανθεκτικότητα στο νεονικοτινοειδές εντομοκτόνο imidacloprid σε φυσικούς εχθρούς της αφίδας *M. persicae*, έγινε καταγραφή τους σε καλλιέργειες καπνού και ροδακινιάς, ενώ μελετήθηκαν τα δημογραφικά και βιολογικά χαρακτηριστικά στα τρία σημαντικότερα είδη από αυτά με λεία την αφίδα *M. persicae*.

Η αφίδα *M. persicae* έχει βρεθεί ότι έχει αναπτύξει ανθεκτικότητα σε αρκετές ομάδες εντομοκτόνων. Η χρήση εντομοκτόνων όπου έχει αναπτύξει ανθεκτικότητα η αφίδα *M. persicae* προσφέρει μικρή προστασία έναντι των ανθεκτικών αφίδων, επιδεινώνει το πρόβλημα με τη θανάτωση των φυσικών εχθρών τους και επιβαρύνει δυσμενώς το περιβάλλον. Έτσι κρίνεται απαραίτητη για να μειωθεί ο κίνδυνος ανάπτυξης ανθεκτικότητας από τις αφίδες η συνετή χρήση των εντομοκτόνων και η παρακολούθηση της ανθεκτικότητας τόσο στα νεονικοτινοειδή όσο και σε άλλα αφιδοκτόνα (οργανοφωσφωρικά, καρβαμιδικά, πυρεθρίνες) σε εύρος πληθυσμών της αφίδας. Για το λόγο αυτό, η μελέτη αυτή έχει στόχο να διευκρινίσει σε ποιες ομάδες και σε ποιο βαθμό έχει αναπτύξει ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα η αφίδα *M. persicae* αλλά και τον βαθμό ανθεκτικότητας στο νεονικοτινοειδές εντομοκτόνο imidacloprid στους φυσικούς της εχθρούς. Άλλοι παράμετροι της οικολογίας του *M. persicae* που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη στην Ολοκληρωμένη Προστασία των καλλιεργειών είναι η συχνότητα εμφάνισης διαφορετικών γενοτύπων (π.χ. γενότυποι με διαφορετικούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας ή κατηγορία βιολογικού κύκλου) κατά την καλλιεργητική περίοδο καθώς και η διερεύνηση των παραγόντων που εμπλέκονται. Συνεπώς η γνώση σχετικά με τη συχνότητα εμφάνισης των διαφορετικών ανθεκτικών ή μη γενοτύπων σε εντομοκτόνα και η μελέτη των παραγόντων που ασκούν πίεση επιλογής θα βοηθήσει στη διαχείριση των πληθυσμών του εντόμου και στην αποτροπή της ομογενοποίησής τους σε ανθεκτικούς.

Στην Ελλάδα έχουν καταγραφεί παρασιτοειδή και αρπακτικά, που πιθανώς συμβάλλουν στον έλεγχο της αφίδας *M. persicae*. Ωστόσο, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση και καταγραφή των ειδών που εμφανίζονται σε σημαντικές καλλιέργειες για την Ελλάδα όπως είναι ο καπνός και η ροδακινιά.

Τα αφιδοφάγα Coccinellidae καταγράφονται συχνά σε πολλά αγροοικοσυστήματα, αλλά εμφανίζουν παραλλακτικότητα στην εγκατάστασή τους, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε ελάττωση της αποτελεσματικότητάς τους. Η καλύτερη κατανόηση παραγόντων όπως: αναπαραγωγικό δυναμικό, ανάπτυξη σε σχέση με τη θερμοκρασία και γενετική δομή των πληθυσμών, ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα συμβάλει στη διαλεύκανση του ρόλου τους και στην αρτιότερη χρήση τους. Η εργασία αυτή στοχεύει στη μελέτη ειδών Coccinellidae, πολυφάγων και δυνητικά ικανών να ελέγχουν υψηλούς πληθυσμών αφίδων σε διάφορα αγροοικοσυστήματα.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Μέρος I

Μελέτη του βιολογικού κύκλου κλώνων του *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) από διάφορες περιοχές της Ελλάδας

Εισαγωγή

Υπάρχουν δυο κύριοι τύποι βιολογικού κύκλου στις αφίδες: ετερόοικος και μονόοικος. Η αφίδα *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) είναι ένα τυπικό ετερόοικο είδος. Ο πρωτεύων ξενιστής είναι η ροδακινιά *Prunus persicae* L. (συμπεριλαμβάνοντας και την νεκταρινιά *Prunus persicae* v. *nectarina*) ενώ ο δευτερεύων ξενιστής μπορεί να είναι ο καπνός καθώς και άλλα ποώδη φυτά που ανήκουν σε περισσότερες από 40 οικογένειες.

Κατά την διάρκεια 1995-1998 οι Margaritoroulos *et al.* (2002) μελέτησαν την κατηγορία βιολογικού κύκλου σε 2.532 κλώνους του *Myzus persicae* που συλλέχθηκαν από διάφορους ξενιστές και περιοχές της Μακεδονίας, Κεντρικής και Στερεάς Ελλάδας και Κρήτης. Βρήκαν ότι το είδος παρουσιάζει και τις τέσσερις κατηγορίες βιολογικού κύκλου που έχουν περιγραφεί ενώ επίσης βρήκαν μεγάλη γεωγραφική παραλλακτικότητα στον τρόπο διαχείμασής του που σχετίζεται με την αφθονία του πρωτεύοντος ξενιστή, τη ροδακινιά. Στις περιοχές της Μακεδονίας, βρήκαν ότι το ποσοστό των ολοκυκλικών γενοτύπων κυμάνθηκε κυρίως πάνω από το 50% και σε ορισμένες περιόδους έφτασε το 100%. Αντίθετα, στις άλλες περιοχές κυμάνθηκε από 0% έως 31%. Στο πρωτεύοντα ξενιστή το πλείστο των κλώνων ήταν πράσινου χρώματος. Επίσης, γεωγραφική παραλλακτικότητα είχε βρεθεί στο χρώμα των αφίδων που αποικίζουν το καπνό. Περισσότεροι κόκκινοι κλώνοι είχαν συλλεχθεί σε περιοχές όπου οι αφίδες διαχειμάζουν ως παρθενογενετικά άτομα σε αυτοφυή φυτά ή χειμερινές καλλιέργειες.

Στην Σύγχρονη Φυτοπροστασία και στα πλαίσια της Ολοκληρωμένης Καταπολέμησης των Εχθρών, είναι αναγκαίο για την σωστή αντιμετώπιση του εχθρού – στόχου η γνώση του βιολογικού του κύκλου. Ο διαφορετικός βιολογικός κύκλος της κάθε αφίδας μπορεί να έχει σημαντική επίπτωση στην επίδραση του εντόμου στο φυτό. Για παράδειγμα, ο βιολογικός κύκλος μπορεί να καθορίζει κατά πόσον ένα είδος μπορεί να συναντήσει κάποιο φυτό και ο

αριθμός των διαφορετικών φυτών που μπορεί να συναντήσει καθόλη την περίοδο του χρόνου. Επίσης, η πυκνότητα του πληθυσμού ενός είδους αφίδας εξαρτάται, κάθε χρόνο, από παράγοντες όπως η θερμοκρασία και οι φυσικοί εχθροί, αλλά η σχετική σημαντικότητα των παραγόντων εξαρτάται από τον βιολογικό κύκλο της αφίδας. Η μορφή από ένα συγκεκριμένο είδος αφίδας που προσβάλλει το φυτό έχει επίδραση στον βαθμό της ζημιάς που η αφίδα θα επιφέρει. Για παράδειγμα, άπτερες παρθενογενετικές μορφές μιας αφίδας αναπαράγονται με 70% μεγαλύτερο ρυθμό από ότι η πτερωτές μορφές της (Noda 1959, Dixon & Wratten 1971), παρόλο που η προφανής ικανότητα τους να διασπείρονται μακριά χάνεται.

Η μορφή της αφίδας παίζει σημαντικό ρόλο στην εξάπλωση των ιώσεων. Πολλοί ιοί μεταφέρονται σε καλλιέργειες από πτερωτά άτομα (πρωτογενής μόλυνση), αλλά η μορφή της αφίδας που έχει τον σπουδαιότερο ρόλο στην μετάδοση των ιώσεων μέσα στην καλλιέργεια (δευτερογενής μόλυνση) αποτελεί σημείο αμφισβήτησης. Αρχικά, πτερωτές αφίδες θεωρούνταν υπεύθυνες για την εξάπλωση του ιού *Beet yellows virus* μέσα σε καλλιέργεια ζαχαρότευτλων (Watson & Healy 1953). Εν τούτοις, πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι άπτερες αφίδες, περπατώντας από φυτό σε φυτό, είναι πιο πιθανό να είναι η κυρία πηγή της εξάπλωσης του ιού μέσα στο ίδιο χωράφι (Williams *et al.* 2000).

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι αν η διαπίστωση των διαφορετικών στρατηγικών διαχείμασης που ακολουθούν οι πληθυσμοί του *M. persicae* στην Ελλάδα έχουν σχέση με την ανθεκτικότητα.

Υλικά και Μέθοδοι

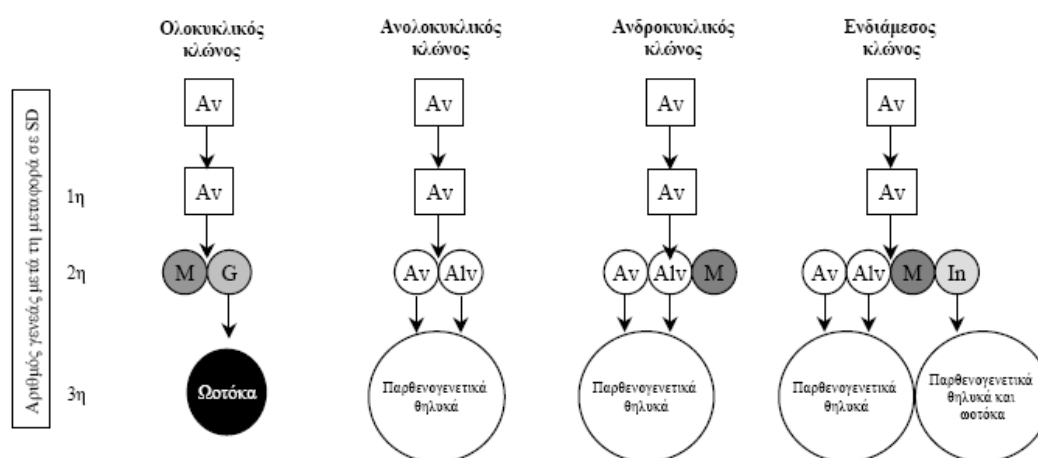
Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε οπωρώνες ροδακινιάς κατά την περίοδο μεταξύ τέλη Απριλίου και μέσα Ιουνίου και σε φυτείες καπνού κατά τους θερινούς μήνες (μέσα Ιουνίου – τέλη Αυγούστου) και τα τρία έτη της μελέτης (2005, 2006 και 2007). Τα δείγματα από οπωρώνες ροδακινιάς συλλέχτηκαν από την περιοχή της Μελίκης του νομού Ημαθίας, Νέα Έφεσο Κατερίνης, Βελβεντό Κοζάνης, από τις περιοχές Βελεστίου και Λεχωνίων του νομού Μαγνησίας και την περιοχή Προσύμνης Αργολίδος. Τα δείγματα καπνού συλλέχθηκαν από περιοχές της βόρειας Ελλάδας (Μελίκη, Νέα Έφεσο Κατερίνης, Βατερό Κοζάνης και Κρύα Βρύση), Θεσσαλίας (Μητρόπολη Καρδίτσας) και Νότιας και Κεντρικής Ελλάδας (Αμφίκλεια και Προσύμη Αργολίδος). Επίσης πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες σε ζιζάνια και σπορεία καπνού. Συνολικά εξετάσθηκαν 967 κλώνοι. Οι κλώνοι πριν την έναρξη της μελέτης του βιολογικού κύκλου διατηρήθηκαν σε συνθήκες μεγάλης ημέρας LD σε βιοκλιματικό θάλαμο με φωτοπερίοδο L16:D8 (ώρες φωτός:ώρες σκότους, L=light – D=dark), θερμοκρασία $17 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ και σχετική υγρασία $55 \pm 5 \%$.

Για τη διατήρηση των κλώνων χρησιμοποιήθηκαν ειδικά κουτιά εκτροφής αφίδων (Blackman 1971) διαστάσεων 7,7 cm x 4,5 cm x 2 cm, με άνοιγμα καλυμμένο με τούλι για τον αερισμό του εσωτερικού τους, στη βάση των οποίων υπήρχε τεμάχιο από σφουγγάρι. Σε αυτό τοποθετήθηκε τρυφερό μετρίου μεγέθους φύλλο πατάτας *Solanum tuberosum* (Solanaceae) ποικιλίας Sprunta πάνω στο οποίο τρέφονταν οι αφίδες. Τα κουτιά εκτροφής ήταν τοποθετημένα σε δίσκο με μικρή ποσότητα νερού για τη διαβροχή του σπόγγου και σε μικρή κλίση έτσι ώστε το φύλλο να βρίσκεται σε φυσική θέση. Το νερό επίσης λειτουργεί ως εμπόδιο, για την απομόνωση των κουτιών και την αποφυγή τυχόν μόλυνσης από περιπλανώμενες αφίδες.

Η αντικατάσταση των φύλλων γινόταν κάθε 3 ημέρες με ταυτόχρονη μεταφορά 15-20 περίπου ατόμων για τη διατήρηση δυναμικής αποικίας. Με αυτό τον τρόπο η θρεπτική κατάσταση των φύλλων διατηρούταν σε υψηλά επίπεδα, χωρίς να δημιουργείται πρόβλημα στη θρέψη και τον πολλαπλασιασμό των αφίδων. Μετά από 2-3 γενιές εκτροφής των κλώνων σε LD ελέγχθηκε η κατηγορία βιολογικού κύκλου. Ο έλεγχος έγινε εκτρέφοντας

τις αφίδες για τρεις γενιές σε συνθήκες μικρής μέρας SD (L10:D14) στους $17 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ και σχετική υγρασία $55 \pm 5 \%$.

Ένα άπτερο παρθενογενετικό θηλυκό μεταφέρθηκε από την αποικία που ήταν σε συνθήκες μεγάλης ημέρας, σε συνθήκες SD. Μετά από μία ημέρα απομακρύνθηκαν οι μητέρες (G0) και κρατήθηκαν περίπου πέντε απόγονοί τους (G1 γενιά). Έπειτα εξετάστηκε η μορφή των 60 - 80 πρώτων απογόνων (G2 γενιά) των G1 θηλυκών από τους οποίους χαρακτηρίστηκε ο βιολογικός κύκλος των κλώνων (Margaritoroulos *et al.* 2002).



Σχήμα 1. Διαφορετικές μορφές απογόνων στις τέσσερις κατηγορίες βιολογικού κύκλου του *M. persicae*. Av: άπτερα παρθενογενετικά θηλυκά, M: αρσενικά, G: θηλυτόκα, Alv: πτερωτά παρθενογενετικά θηλυκά, In: ενδιάμεσα πτερωτά θηλυκά (Σχήμα από Μαργαριτόπουλος Ι. 2001).

Αναγνωρίστηκαν τρεις κατηγορίες πτερωτών θηλυκών από τις μορφές των απογόνων τους. Τα θηλυτόκα γέννησαν σχεδόν αποκλειστικά ωτοτόκα θηλυκά, ενώ τα πτερωτά παρθενογενετικά παρήγαν παρθενογενετικές μορφές. Η τρίτη κατηγορία πτερωτών ήταν τα ενδιάμεσα που γέννησαν παρθενογενετικές μορφές και λίγα ωτοτόκα. Οι ολοκυκλικοί κλώνοι στη δεύτερη γενιά σε SD παράγουν κυρίως θηλυτόκα, που γεννούν ωτοτόκα (τρίτη γενιά). Αντίθετα, οι ανολοκυκλικοί κλώνοι στη δεύτερη γενιά παράγουν κυρίως άπτερα παρθενογενετικά θηλυκά και αριθμό πτερωτών παρθενογενετικών θηλυκών. Τα πτερωτά αυτά αποτελούν μια ενδιάμεση μορφή μεταξύ των

θηλυτόκων των ολοκυκλικών κλώνων και των πτερωτών παρθενογενετικών θηλυκών των ανολοκυκλικών κλώνων. Στους ανδροκυκλικούς κλώνους (όλα τα άπτερα της δεύτερης γενιάς σε SD) γεννούν αρσενικά. Τα αρσενικά παράγονται μετά από ορισμένο αριθμό θηλυκών (Blackman 1971, 1972). Σε άλλο πείραμα ελέγχθηκε η ικανότητα παραγωγής αρσενικών από ανολοκυκλικούς κλώνους (ανδροκυκλικοί κλώνοι), εξετάζοντας τη μορφή όλων των απογόνων από περίπου 10- 12 άπτερα παρθενογενετικά θηλυκά της πρώτης γενιάς σε SD. Επίσης, ανδροκυκλικοί κλώνοι βρέθηκαν, όταν εξετάσθηκε η μορφή των 60-80 πρώτων απογόνων των 3-5 άπτερων θηλυκών της πρώτης γενιάς σε SD, αλλά σε πολύ μικρό ποσοστό.

Αναπαράσταση όλων των κατηγοριών βιολογικού κύκλου του *Myzus persicae*, που μπορεί να προκύψουν ύστερα από τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω, δίνεται στο Σχήμα 1. Η στατιστική επεξεργασία μεταξύ των ποσοστών των διαφορετικών κατηγοριών βιολογικού κύκλου έγινε με το χ^2 κριτήριο.

Αποτελέσματα

Στη ροδακινιά, το πλείστο των κλώνων και τα τρία χρόνια της μελέτης ήταν ολοκυκλικοί σε ποσοστό 90% (50% έως και 100%) (Πίνακες 1-4). Οι ενδιάμεσοι κλώνοι βρεθήκαν σε μικρό ποσοστό 1,2% (Πίνακας 5).

Στην περίπτωση των κλώνων που συλλέχτηκαν στον καπνό τα αποτελέσματα ήταν διαφορετικά από ότι στη ροδακινιά. Στον καπνό βρέθηκε μεγάλη γεωγραφική παραλλακτικότητα στο ποσοστό των ολοκυκλικών κλώνων για τα τρία χρόνια της μελέτης. Το ποσοστό των ολοκυκλικών κλώνων στη Βόρεια Ελλάδα, όπου καλλιεργείται η ροδακινιά σε ποσοστό περίπου 96% (στοιχεία Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων) κυμάνθηκε από 42% έως και 84% για τα τρία χρόνια της μελέτης. Αντίθετα, στην Κεντρική, Νότια, Στερεά και Βορειοδυτική Ελλάδα το ποσοστό των ολοκυκλικών κλώνων ήταν σημαντικά μικρότερο και κυμάνθηκε στο σύνολο των κλώνων που συλλέχτηκαν όλη την καλλιεργητική περίοδο και για τα τρία χρόνια της μελέτης από 0% έως και 42%. Το μικρότερο ποσοστό (0%) παρουσιάστηκε στην Αμφίκλεια Φθιώτιδας (12 Ιουλίου και 12 Αύγουστου το

2005) και στο Βατερό Κοζάνης, ενώ το μεγαλύτερο στο Βελβεντό Κοζάνης στις 10 Σεπτεμβρίου το 2006 (Πινάκες 1-3). Τα ποσοστά των ολοκυκλικών κλώνων που συλλέχτηκαν από τον καπνό ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα στις περιοχές της Κεντρικής Μακεδονίας όπου καλλιεργείται εκτεταμένα η ροδακινιά από ότι στις υπόλοιπες περιοχές (Πίνακας 6).

Πίνακας 1. Ολοκυκλικοί κλώνοι (Ο) του *Myzus persicae*, που συλλέχθηκαν απο ροδακινιές και διάφορες περιοχές της Ελλάδας το 2005 (Ε: εξετασθέντες κλώνοι).

Περιοχές	Ημ/νία συλλογής	Ξενιστής	Πράσινοι κλώνοι		Κόκκινοι κλώνοι		Σύνολο	
			Ε	Ο	Ε	Ο	Ε	Ο (%)
2005								
Λεχώνια	14-Μαΐ	Ροδακινιά	5	3	0	0	5	60,0
Λεχώνια	16-Μαΐ	Ροδακινιά	5	5	0	0	5	100,0
Λεχώνια	21-Μαΐ	Ροδακινιά	5	5	0	0	5	100,0
Λεχώνια	23-Μαΐ	Ροδακινιά	5	3	0	0	5	60,0
Λεχώνια	1-Ιουν	Ροδακινιά	3	2	0	0	3	66,7
Μελίκη	3-Μαΐ	Ροδακινιά	3	3	0	0	3	100,0
Μελίκη	14-Μαΐ	Ροδακινιά	2	1	0	0	2	50,0
Μελίκη	22-Μαΐ	Ροδακινιά	6	6	0	0	6	100,0
Μελίκη	27-Μαΐ	Ροδακινιά	4	4	3	2	7	85,7
Βελεστίνο	11-Μαΐ	Ροδακινιά	5	3	0	0	5	60,0
Βελεστίνο	22-Μαΐ	Ροδακινιά	3	3	1	1	4	100,0

Πίνακας 2. Ολοκυκλικοί κλώνοι (Ο) του *Myzus persicae*, που συλλέχθηκαν από φυτά καπνού και διάφορες περιοχές της Ελλάδας το 2005 (Ε: εξετασθέντες κλώνοι).

Περιοχές	Ημ/νία συλλογής	Ξενιστής	Πράσινοι κλώνοι		Κόκκινοι κλώνοι		Σύνολο	
			Ε	Ο	Ε	Ο	Ε	Ο (%)
2005								
Αμφίκλεια	12-Ιουλ	Καπνός	2	0	8	0	10	0,0
Αμφίκλεια	12-Αυγ	Καπνός	0	0	11	0	11	0,0
Μητρόπολη	8-Ιουλ	Καπνός	0	0	18	2	18	11,1
Μητρόπολη	31-Ιουλ	Καπνός	0	0	17	4	17	23,5
Νέα Έφεσος	18-Ιουν	Καπνός	1	1	16	9	17	58,8
Νέα Έφεσος	24-Ιουλ	Καπνός	1	0	11	10	12	83,3
Μελίκη	7-Ιουν	Καπνός	2	2	7	4	9	66,7
Μελίκη	17-Ιουλ	Καπνός	0	0	7	5	7	71,4
Μελίκη	31-Ιουλ	Καπνός	2	1	9	5	11	54,5
Μελίκη	5-Αυγ	Καπνός	1	1	7	3	8	50,0
Προσύμνη	16-Ιουν	Καπνός	3	1	8	0	11	9,1

Πίνακας 3. Ολοκυκλικοί κλώνοι (Ο) του *Myzus persicae*, που συλλέχθηκαν από διάφορους ξενιστές και περιοχές της Ελλάδας το 2007 (Ε: εξετασθέντες κλώνοι).

Περιοχές	Ημ/νία συλλογής	Ξενιστής	Πράσινοι κλώνοι		Κόκκινοι κλώνοι		Σύνολο	
			Ε	Ο	Ε	Ο	Ε	Ο (%)
2007								
Νέα Έφεσος	6-Ιουλ	Καπνός	15	15	12	1	27	59,3
Νέα Έφεσος	22-Ιουλ	Καπνός	13	12	9	0	22	54,5
Βελβεντός	18-Μαΐ	Ροδακινιά	20	20	0	0	20	100,0
Βελβεντός	5-Αυγ	Καπνός	30	21	24	0	54	38,9
Λεχώνια	11-Μαΐ	Ροδακινιά	25	25	1	0	26	96,2
Μελίκη	18-Μαΐ	Ροδακινιά	23	23	0	0	23	100,0
Μελίκη	30-Μαΐ	Ροδακινιά	23	23	0	0	23	100,0
Μελίκη	30-Μαΐ	Ζωχός	1	0	0	0	1	0,0
Μελίκη	6-Ιουλ	Καπνός	9	9	5	0	14	64,3
Μελίκη	8-Αυγ	Καπνός	9	8	2	0	11	72,7
Μελίκη	18-Αυγ	Καπνός	6	5	6	0	12	41,7
Προσύμνη	11-Απρ	Ροδακινιά	38	38	0	0	38	100,0
Βελεστίνο	11-Μαΐ	Ροδακινιά	29	29	1	0	30	96,7

Πίνακας 4. Ολοκυκλικοί κλώνοι (Ο) του *Myzus persicae*, που συλλέχθηκαν από διάφορους ξενιστές και περιοχές της Ελλάδας το 2006 (Ε: εξετασθέντες κλώνοι).

Περιοχές	Ημ/νία συλλογής	Ξενιστής	Πράσινοι κλώνοι		Κόκκινοι κλώνοι		Σύνολο	
			Ε	Ο	Ε	Ο	Ε	Ο (%)
2006								
Αμφίκλεια	9-Μαΐ	Ζωχός	1	0	0	0	1	0,0
Μητρόπολη	1-Απρ	Ζωχός	0	0	1	0	1	0,0
Νέα Έφεσος	7-Μαΐ	Σπορεία Καπνού	1	1	6	1	7	28,6
Νέα Έφεσος	24-Μαΐ	Ροδακινιά	22	20	0	0	22	90,9
Νέα Έφεσος	24-Μαΐ	Καπνός	3	2	12	7	15	60,0
Νέα Έφεσος	19-Ιουν	Καπνός	4	3	7	4	11	63,6
Νέα Έφεσος	28-Ιουν	Καπνός	7	6	9	4	16	62,5
Νέα Έφεσος	8-Ιουλ	Καπνός	0	0	5	3	5	60,0
Νέα Έφεσος	15-Ιουλ	Καπνός	2	2	7	2	9	44,4
Βελβεντός	7-Ιουν	Ροδακινιά	24	20	0	0	24	83,3
Βατερό	2-Ιουλ	Καπνός	3	0	2	0	5	0,0
Βελβεντός	10-Σεπ	Καπνός	16	12	32	8	48	41,7
Λεχώνια	15-Απρ	Ζωχός	1	0	1	0	2	0,0
Λεχώνια	3-Μαΐ	Ροδακινιά	30	24	2	2	32	81,3
Λεχώνια	13-Μαΐ	Ροδακινιά	13	12	0	0	13	92,3
Λεχώνια	16-Μαΐ	Ροδακινιά	6	6	0	0	6	100,0
Αμφίκλεια	9-Μαΐ	Πατάτα	2	0	0	0	2	0,0
Μελίκη	17-Απρ	Ροδακινιά	20	19	1	1	21	95,2
Μελίκη	17-Απρ	Ζωχός	9	0	0	0	9	0,0
Μελίκη	17-Απρ	Βλήτο	7	0	14	0	21	0,0
Μελίκη	7-Μαΐ	Ροδακινιά	34	30	1	0	35	85,7
Μελίκη	20-Μαΐ	Ροδακινιά	20	19	0	0	20	95,0
Μελίκη	24-Μαΐ	Ροδακινιά	12	9	0	0	12	75,0
Μελίκη	1-Ιουν	Ροδακινιά	5	4	0	0	5	80,0
Μελίκη	6-Ιουν	Ροδακινιά	2	2	0	0	2	100,0
Μελίκη	8-Ιουλ	Καπνός	4	4	5	0	9	44,4
Μελίκη	28-Ιουλ	Καπνός	2	2	7	3	9	55,6
Μελίκη	5-Αυγ	Καπνός	14	13	4	0	18	72,2
Μελίκη	19-Αυγ	Καπνός	22	14	27	8	49	44,9
Προσύμνη	24-Απρ	Ροδακινιά	19	13	2	2	21	71,4
Προσύμνη	24-Απρ	Ζωχός	1	0	0	0	1	0,0
Βελεστίνο	15-Απρ	Ζωχός	2	0	4	0	6	0,0
Βελεστίνο	15-Απρ	Ροδακινιά	5	5	0	0	5	100,0
Βελεστίνο	11-Μαΐ	Ροδακινιά	10	9	0	0	10	90,0
Βελεστίνο	29-Μαΐ	Ροδακινιά	13	12	0	0	13	92,3

Αναφορικά με το χρώμα των αφίδων οι περισσότεροι κόκκινοι κλώνοι συλλέχτηκαν στον καπνό (63,2%) και σε δευτερεύοντες ξενιστές (51%). Στη ροδακινιά οι κλώνοι ήταν κυρίως πράσινου χρώματος (97,3%) σε όλες τις περιοχές δειγματοληψίας και για τα τρία χρόνια της μελέτης. Στις περιοχές όπου δεν υπάρχει η καλλιέργεια ροδακινιάς οι κόκκινοι κλώνοι επικρατούν, όπως την περιοχή Καρδίτσας. Από τους κλώνους που συλλέχτηκαν στον καπνό στη Κ. Μακεδονία, τη Βορειοδυτική Μακεδονία, Θεσσαλία, Σ. Ελλάδα και Πελοπόννησο το 59,8%, 54,2, 100%, 90,5% και 72,7% αντίστοιχος ήταν κόκκινοι κλώνοι.

Πίνακας 5. Ενδιάμεσοι κλώνοι του *M. persicae* που συλλέχθηκαν από διάφορους ξενιστές κατά τα έτη 2005-7.

Περιοχές	Ξενιστής	Εξετασθέντες	Ανολοκυκλικός	Ενδιάμεσοι	
				Αρ.	%
Νέα Έφεσος	Σπορεία Καπνού	7	5	0	0,0
Νέα Έφεσος	Ροδακινιά	22	2	0	0,0
Βελβεντό	Ροδακινιά	44	4	0	0,0
Λεχώνια	Ροδακινιά	100	13	2	2,0
Μελίκη	Ροδακινιά	160	13	3	1,9
Προσύμνη	Ροδακινιά	59	6	0	0,0
Βελεστίνο	Ροδακινιά	67	5	0	0,0
Αμφίκλεια	Πατάτα	2	2	0	0,0
Αμφίκλεια	Καπνός	21	19	2	9,5
Μητρόπολη	Καπνός	35	29	1	2,9
Νέα Έφεσος	Καπνός	134	55	2	1,5
Βελβεντό	Καπνός	102	62	0	0,0
Βατερό	Καπνός	5	5	0	0,0
Μελίκη	Καπνός	157	70	1	0,6
Προσύμνη	Καπνός	11	10	1	9,1
Αμφίκλεια	Ζώχος	1	1	0	0,0
Μητρόπολη	Ζώχος	1	1	0	0,0
Λεχώνια	Ζώχος	2	2	0	0,0
Μελίκη	Ζώχος	10	10	0	0,0
Προσύμνη	Ζώχος	1	1	0	0,0
Βελεστίνο	Ζώχος	6	6	0	0,0
Μελίκη	Βλήτο	21	21	0	0,0
	Σύνολο	968	342	12	1,2

Βρέθηκαν και κλώνοι που χαρακτηρίστηκαν ως ενδιάμεσοι καθώς στη δεύτερη γενιά σε SD γέννησαν κυρίως άπτερα και πτερωτά παρθενογενετικά θηλυκά, λίγα αρσενικά και 'ενδιάμεσα' πτερωτά θηλυκά, που γέννησαν κυρίως παρθενογενετικές μορφές και λίγα ωτόκα θηλυκά. Οι ενδιάμεσοι κλώνοι στον καπνό βρέθηκαν σχεδόν σε όλες τις περιοχές (εκτός από την ΒΔ. Μακεδονία) σε μικρό ποσοστό που κυμάνθηκε από 0,6% έως και 9,5% (Πίνακας 5). Βρέθηκαν συνολικά σε ποσοστό 1,2% από όλους τους κλώνους που ελέγχθηκαν.

Πίνακας 6. Ολοκυκλικοί κλώνοι του *M. persicae* που συλλέχθηκαν από καπνό από διάφορες περιοχές της Ελλάδας τους μήνες Μάιο έως Αύγουστο κατά τα έτη 2005-2007.

Περιοχή	Έτος δειγματοληψίας	Εξετασθέντες κλώνοι	Ολοκυκλικοί κλώνοι	(%)
Νέα Έφεσος	2005	29	20	69,0
Μελίκη	2005	35	21	60,0
Μελίκη	2007	37	22	59,5
Νέα Έφεσος	2007	49	28	57,1
Νέα Έφεσος	2006	63	35	55,6
Μελίκη	2006	85	44	51,8
Βελβεντός	2006	48	19	39,6
Βελβεντός	2007	54	21	38,9
Μητρόπολη	2005	35	6	17,1
Προσύμνη	2005	11	1	9,1
Αμφίκλεια	2005	21	0	0,0
Βατερό	2006	5	0	0,0

Πίνακας 7. Ποσοστό (%) ολοκυκλικών κλώνων του *M. persicae* που συλλέχθηκαν από καπνό κατά την περίοδο Μαΐου - Σεπτεμβρίου κατά τα έτη 2005-2007. Σε παρένθεση είναι ο αριθμός εξετασθέντων κλώνων.

Περιοχές	Έτη			
	2005-2007	2005	2006	2007
Κ. Μακεδονία	57,7 (291)	64,1 (64)	54,6 (141)	58,1 (86)
Δ. Μακεδονία	38,3 (107)	-	37,7 (53)	38,9 (54)
Κ. Ελλάδα	17,1 (35)	17,1 (35)	-	-
Σ. Ελλάδα	00,0 (21)	00,0 (21)	-	-
Πελοπόννησος	09,1 (21)	09,1 (21)	-	-
	$\chi^2=53,6, df=4$ $p<0,001$	$\chi^2=38,7, df=3$ $p<0,001$	$\chi^2=4,39, df=1$ $p<0,0362$	$\chi^2=4,92, df=1$ $p<0,027$

Πίνακας 7. Ανδροκυκλικοί κλώνοι του *M. persicae* που συλλέχθηκαν από διάφορους ξενιστές κατά τα έτη 2005-7.

Ξενιστής	Μη ολοκυκλικοί	Ανδροκυκλικοί	
		Αρ	%
Ροδακινιά	2	1	50,0
Καπνός	23	11	47,8

Συζήτηση

Τα αποτελέσματα της μελέτης του βιολογικού κύκλου της αφίδας *M. persicae* έδειξαν ότι στην Ελλάδα η αφίδα είναι πολυμορφική με όλες τις τέσσερες κατηγορίες βιολογικού κύκλου να παρατηρούνται (Blackman 1971, 1972, Margaritoroulos *et al.* 2002). Όπως είχαν βρει και οι Margaritoroulos *et al.* το 2002 οι ολοκυκλικοί, ανολοκυκλικοί και οι ανδροκυκλικοί γενότυποι βρεθήκαν σε σχετικά υψηλή συχνότητα, ενώ οι ενδιάμεσοι κλώνοι βρεθήκαν σε χαμηλά ποσοστά (1,2% στο σύνολο των κλώνων). Η αφίδα *M. persicae* στην Ελλάδα φαίνεται να έχει την ικανότητα να προσαρμόζεται σε διαφορετικές κλιματικές συνθήκες επενδύοντας και στις δυο στρατηγικές διαχείμασης το χειμώνα (διαπάυων ωο και διαχειμάζουσες παρθενογενετικές μορφές) επιτυγχάνοντας ένα βιολογικό προτέρημα στην επιβίωση και επέκταση. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με προγενέστερη μελέτη όπου εξετάστηκε η παραλλακτικότητα στη στρατηγική αναπαραγωγής σε πληθυσμούς από διάφορους ξενιστές και περιοχές της Ελλάδας (Margaritoroulos *et al.* 2002).

Όπως ήταν αναμενόμενο, η πλειονότητα των κλώνων (90%) από ροδακινιά στην Ελλάδα ήταν ολοκυκλικοί, δηλαδή προήλθαν από το διαχειμάζον ωό, προϊόν σεξουαλικής αναπαραγωγής που έλαβε χώρα το προηγούμενο Φθινόπωρο. Λίγο μεγαλύτερο ποσοστό (94%) είχαν βρει οι Margaritoroulos *et al.* το 2002 στα τέσσερα χρόνια της μελέτης. Στον καπνό υψηλό ποσοστό ολοκυκλικών κλώνων βρέθηκε στη Β. Ελλάδα, όπου καλλιεργείται εκτεταμένα η ροδακινιά. Οι ολοκυκλικοί κλώνοι από τη ροδακινιά

μεταναστεύουν στο τέλος της άνοιξης-αρχές καλοκαιριού στις πλησίον καπνοκαλλιέργειες. Αντίθετα, στην Κ. Ελλάδα, όπου δεν καλλιεργείται εκτεταμένα η ροδακινιά (μόνο σποραδικοί οπωρώνες συναντώνται), το πλείστο των κλώνων από καπνό ήταν μη-ολοκυκλικοί, δηλαδή μπορούν και αναπαράγονται όλο το χρόνο παρθενογενετικά. Επίσης, μεγάλα ποσοστά ολοκυκλικών κλώνων βρέθηκαν στην περιοχή Βελβεντού Κοζάνης. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα με άλλες αντίστοιχα περιοχές, όπου συνυπάρχουν οι δυο καλλιέργειες, αυτή του καπνού με ροδακινιές. Επίσης, βρέθηκε κάποια συσχέτιση χρώματος και κατηγορίας βιολογικού κύκλου, με περισσότερους πράσινους κλώνους να επενδύουν στη σεξουαλική αναπαραγωγή από ότι οι κόκκινοι.

Η γεωγραφική κατανομή των ολοκυκλικών γενοτύπων που αποικίζουν τον καπνό παρουσιάζει διαφορές ανά περιοχή. Βρέθηκε μεγάλο ποσοστό ολοκυκλικών κλώνων, κυρίως στις περιοχές της Ημαθίας, όπου καλλιεργείται εκτεταμένα η ροδακινιά. Αντίθετα, στις περιοχές Αμφίκλειας, Καρδίτσας και Ναυπλίου το μεγαλύτερο ποσοστό των κλώνων ήταν ανολοκυκλικοί. Όπως έχουν αναφέρει για την Ελλάδα οι Margaritoroulos *et al.* (2002)! η αφθονία του πρωτεύοντος ξενιστή φαίνεται ότι είναι ο κύριος παράγοντας για την παρουσία υψηλού ποσοστού ολοκυκλικών πληθυσμών στους δευτερεύοντες ξενιστές κατά την καλοκαιρινή περίοδο.

Μέρος II

Μελέτη της ανθεκτικότητας της αφίδας *Myzus persicae* και των φυσικών της εχθρών σε εντομοκτόνα.

Εισαγωγή

Η ροδακινιά, ο καπνός, η πιπεριά και άλλα σολανώδη φυτά είναι σημαντικές καλλιέργειες για την Ελλάδα, και για άλλες Ευρωπαϊκές χώρες. Στην Ελλάδα, οι καλλιεργούμενες με ροδακινιές, καπνό, πατάτες και πιπεριές εκτάσεις κατά το 2005 ήταν 50.000, 56.000, 45.000 και 3.800 εκτάρια αντίστοιχα (FAO Statistics 2005). Ένας από τους σοβαρότερους εχθρούς της ροδακινιάς, και ο σημαντικότερος του καπνού και άλλων σολανωδών καλλιεργειών, είναι η αφίδα *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). Είναι εξαιρετικά πολυφάγο είδος που προσβάλλει περισσότερα από 400 είδη φυτών (Blackman & Eastop, 1984). Στις ποώδεις καλλιέργειες εκτός από άμεσες, προκαλεί επιπλέον σοβαρές έμμεσες ζημιές, μέσω της μετάδοσης μη-έμμεσων ιών (Kennedy *et al.* 1962, Van Emden *et al.* 1969, Katis *et al.* 1993).

Τα τελευταία χρόνια έχει δημιουργηθεί η ανάγκη για χρήση φιλικότερων μεθόδων και σκευασμάτων καταπολέμησης των εχθρών των καλλιεργειών ως προς το περιβάλλον, τον χρήστη και τα έντομα μη στόχους, όπως σκευάσματα διαφορετικά των χημικών εντομοκτόνων (Karagounis *et al.* 2007, Perring *et al.* 1999, Edelson *et al.* 2002) ή βιολογική καταπολέμηση (Carver *et al.* 1987). Ο έλεγχος του *M. persicae* παγκοσμίως βασίζεται σχεδόν αποκλειστικά στην χρήση χημικών εντομοκτόνων. Η αλόγιστη χρήση τους για περισσότερο από τέσσερες δεκαετίες έχει δημιουργήσει προβλήματα ανθεκτικότητας. Η ανθεκτικότητα των εντόμων στα εντομοκτόνα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συχνότητας εφαρμογών των εντομοκτόνων. Επίσης, τη μείωση της απόδοσης της καλλιέργειας σε συνδυασμό με το ενδεχόμενο να βρεθούν αυξημένα υπολείμματα στις τροφές και υπάρξει υποβάθμιση του περιβάλλοντος μιας και αυξάνονται οι ξενοβιοτικές ουσίες στον αέρα, το έδαφος και το νερό. Από το 1950 και μετά, η αλόγιστη χρήση

εντομοκτόνων οδήγησε στην γρήγορη, σε σχέση με τα προηγούμενα έτη, επιλογή διαφόρων μηχανισμών ανθεκτικότητας (Sudderuddin 1973).

Στην Ελλάδα, τα νεονικοτινοειδή συχνά χρησιμοποιούνται εναντίον του *M. persicae* σε καλλιέργειες καπνών και ροδάκινα. Το imidacloprid είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο εντομοκτόνο και έχει αντικαταστήσει τα εντομοκτόνα άλλων κατηγοριών. Στον καπνό το 45% των εντομοκτόνων που χρησιμοποιήθηκαν το 2003 ανήκαν στην τάξη των νεονικοτινοειδών. Αντιθέτως, στις ροδακινιές τα πυρεθροειδή χρησιμοποιούνται συχνότερα έναντι των νεονικοτινοειδών (40% έναντι 15% των νεονικοτινοειδών) λόγω της χρήσης τους για τον έλεγχο και άλλων εντομολογικών εχθρών. Οι μελέτες ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα στο *M. persicae* στην Ελλάδα τα τελευταία χρόνια είχαν βρει την ύπαρξη ανθεκτικότητας σε οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά, σπάνια στα πυρεθροειδή ενώ δεν είχε βρεθεί στα νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα. Πιο συγκεκριμένα, ο Ιωαννίδης (1999) είχε βρει ότι οι πληθυσμοί του *M. persicae* από καπνό και ροδακινιές είχαν αναπτύξει ισχυρή ανθεκτικότητα στο pirimicarb και την τάση για ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο imidacloprid για τους πληθυσμούς που προέρχονται μόνο από καπνό. Επίσης, οι πληθυσμοί από την βόρεια Ελλάδα εμφάνισαν μεγάλα επίπεδα εστερασών. Ίδια αποτελέσματα είχαν βρει για τα έτη 1998 έως 2000 οι Cox και συνεργάτες (2004).

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε φυσικούς πληθυσμούς είναι ένα δυναμικό φαινόμενο και χρειάζεται συνεχή παρακολούθηση. Στην Ελλάδα, εκτός από την ισχυρή τοπική πίεση επιλογής των εντομοκτόνων, υπάρχει και ισχυρή τοπική διακύμανση στην κατηγορία του βιολογικού κύκλου της αφίδας, που μπορεί να επηρεάζει τη δυναμική ανάπτυξης της ανθεκτικότητας. Στην βόρεια Ελλάδα το *M. persicae* αναπαράγεται μια φορά σεξουαλικά στον πρωτεύοντα ξενιστή και στη συνέχεια παρθενογενετικά σε ποώδεις ξενιστές. Σε αντίθεση, στην νότια και την βορειοανατολική Ελλάδα οι πληθυσμοί του *M. persicae* αποτελούνται κυρίως από μη σεξουαλικούς γενοτύπους (Margaritoroulos *et al.* 2002). Η σεξουαλική αναπαραγωγή που λαμβάνει χώρα στη βόρεια Ελλάδα μπορεί να επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη της ανθεκτικότητας, λόγω ανασυνδυασμού του γενετικού κώδικα οπότε μεταβάλλεται η συχνότητα τους σε σχέση με τη μη σεξουαλική αναπαραγωγή. Επίσης, υψηλός μεταναστευτικός ρυθμός εμφανίζεται την άνοιξη από τα ροδάκινα σε άλλα

φυτά με αποτέλεσμα τη διασπορά ανθεκτικών γενοτύπων. Από την άλλη, μπορεί να υπάρχει πίεση επιλογής ενάντια των παρθενογενετικά ανθεκτικών γενοτύπων μέσω του χειμώνα, επειδή πολλοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα στο *M. persicae* έχουν σχετιστεί με κόστος στην αρμοστικότητα τους (fitness costs) (Foster *et al.* 2000, Foster *et al.* 1997, Foster *et al.* 2002).

Τα τελευταία χρόνια, η σωστή διαχείριση των φυσικών εχθρών στα πλαίσια προγραμμάτων της Ολοκληρωμένης Καταπολέμησης Εχθρών (Integrated Pest Management, IPM) είναι επιτακτική. Ένας τρόπος για την επιτυχία των προγραμμάτων αυτών είναι η χρησιμοποίηση εκλεκτικών εντομοκτόνων. Η εκλεκτικότητα των εντομοκτόνων μπορεί να προέλθει με οικολογικές είτε με φυσικές μεθόδους. Οι πρώτες επιτυγχάνονται με μείωση της έκθεσης των φυσικών εχθρών σε κάθε εφαρμογή εντομοκτόνου (Croft *et al.* 1975), ενώ οι τελευταίες με τη χρησιμοποίηση εντομοκτόνων τοξικών στα έντομα στόχους αλλά σχετικά μη τοξικών στους φυσικούς εχθρούς (Croft *et al.* 1975, Stark *et al.* 1995)

Η σημασία των φυσικών εχθρών στον έλεγχο των εντόμων που προσβάλλουν γεωργικές καλλιέργειες έχει αναδειχθεί σε πολλές εργασίες (DeBach & Rosen 1991, Obrycki & Kring 1998). Η διεθνής βιβλιογραφία αναφέρει δεκάδες φυσικούς εχθρούς του *M. persicae*, ικανούς να ελέγχουν τους πληθυσμούς των αφίδων τόσο στον αγρό, όσο και σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες (Waage & Mills 1992, Price 1997). Ορισμένοι από αυτούς τους φυσικούς εχθρούς χρησιμοποιούνται σε προγράμματα βιολογικής καταπολέμησης.

Στο κεφάλαιο αυτό εξετάζεται η ανθεκτικότητα πληθυσμών της αφίδας *Myzus persicae* σε εντομοκτόνα διαφόρων τάξεων όπως νεονικοτινοειδή, οργανοφωσφορικά, καρβαμιδικά και πυρεθροειδή εντομοκτόνα με κλασσικές βιοδοκιμές, με μοριακά και βιοχημικά διαγνωστικά τεστ μεταλλάξεων, που προσδίδουν ανθεκτικότητα και αλληλούχηση του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης για εύρεση νέων μεταλλάξεων, όπως επίσης, η ανθεκτικότητα στο νεονικοτινοειδές imidacloprid ορισμένων αρπακτικών ειδών, φυσικών εχθρών της αφίδας.

Υλικά και Μέθοδοι

Ανθεκτικότητα της αφίδας M. persicae *Συλλογή δειγμάτων*

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε οπωρώνες ροδακινιάς την περίοδο τέλη Απριλίου μέσα Ιουνίου και σε φυτείες καπνού τους θερινούς μήνες (μέσα Ιουνίου – τέλη Αυγούστου) και τα τρία έτη της μελέτης (2005 - 2007). Τα δείγματα καπνού συλλέχθηκαν από περιοχές της βόρειας (Μελίκη, Νέα Έφεσο Κατερίνης, Βατερό Κοζάνης και Κρύα Βρύση), κεντρικής (Μητρόπολη Καρδίτσας και Αμφίκλεια) και νότιας Ελλάδας (Προσύμη Αργολίδος) (Εικόνα 1). Τα δείγματα από οπωρώνες ροδακινιάς συλλέχτηκαν από τις περιοχές Μελίκης Ημαθίας, Νέα Έφεσο Κατερίνης, Βελβεντό Κοζάνης, Βελεσίνο και Λεχώνια Μαγνησίας και Προσύμη Αργολίδος. Από κάθε χωράφι συλλέγονταν 25 δείγματα, καθένα από τα οποία περιείχε πληθυσμό από ένα μόνο δέντρο (στην περίπτωση της ροδακινιάς) και 2–3 διπλανών φυτών (στην περίπτωση του καπνού). Μετά τη συλλογή, τα δείγματα τοποθετούνταν σε ειδικό, ερμητικά κλειστό πλαστικό σακουλάκι δειγματοληψίας, μαζί με τεμάχιο απορροφητικού χαρτιού. Τα δείγματα τοποθετούνταν σε φορητό ψυγείο μικρού μεγέθους με παγοκύστες, για την καλύτερη διατήρησή τους κατά τη μεταφορά στο εργαστήριο. Στο εργαστήριο αποθηκεύονταν σε θερμοκρασία 4°C. Από ορισμένα δείγματα επιλέχθηκε μια άπτερη, ενήλικη, μη παρασιτισμένη αφίδα, για τη δημιουργία παρθενογενετικής σειράς. Σε περίπτωση που υπήρχαν περισσότερες από μια διαφορετικές μορφές χρώματος στο δείγμα, επιλέχθηκε ένα άτομο από κάθε μορφή. Οι παρθενογενετικές σειρές που προέκυψαν κάτω από αυτή τη διαδικασία, εκτρέφονταν σε φύλλα κινέζικου λάχανου *Brassica chinensis* (Brassicaceae) σε σταθερές συνθήκες (17°C±0.5 °C και L16:D8). Για την εκτροφή χρησιμοποιήθηκαν κουτιά τύπου Blackman (Blackman 1971), καθώς είναι τα πλέον κατάλληλα για εκτροφή αφίδων, επειδή παρέχουν πλήρη απομόνωση και αποτρέπουν μολύνσεις μεταξύ των αποικιών. Παράλληλα με τη συλλογή αφίδων έγινε και συλλογή πληθυσμών φυσικών έχθρων της αφίδας για το έλεγχο της ανθεκτικότητας τους στο εντομοκτόνο imidacloprid.



Εικόνα 1. Χάρτης δειγματοληψιών στην Ελλάδα. 1: Μελίκη, 2: Κατερίνη, 3: Κοζάνη, 4: Λεχώνια, 5: Βελεστίνο, 6: Καρδίτσα, 7: Αμφίκλεια, 8: Ναύπλιο.

Καταγραφή της ανθεκτικότητας του M. persicae σε εντομοκτόνα με την μέθοδο της στιγμιαίας εμβάπτισης (FAO DIP-TEST).

Οι πληθυσμοί του *M. persicae* που συλλέχθηκαν με την παραπάνω διαδικασία εξετάστηκαν ως προς την ανθεκτικότητά τους στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα methamidophos (Tamaron 60SL, Bayer Crop Science Ελλάς ABEE) και chlorpyrifos methyl (Reldan 22,5EC, Ελάνκο Ελλάς ΑΕΒΕ), το καρβαμιδικό εντομοκτόνο pirimicarb (Pirimor 50WG, Syngenta Hellas ΑΕΒΕ), τα πυρεθροειδή εντομοκτόνα bifenthrin (Talstar 10EC, FMC Ελλάς ΕΠΕ) και deltamethrin (Decis 2,5EC, Bayer Crop Science Ελλάς ΑΒΕΕ) και τα νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα imidacloprid (Confidor 20SL, Bayer Crop Science Ελλάς ΑΒΕΕ) και acetamiprid (Profil 20SG, Ευθυμιάδη Κ. & Ν. ΑΒΕΕ). Ο έλεγχος των δειγμάτων αγρού έγινε με τη μέθοδο της στιγμιαίας εμβάπτισης (rapid dip test), που συνιστά ο FAO για ενήλικες αφίδες (FAO 1979). Η βιοδοκιμή διεξαγόταν με στιγμιαία εμβάπτιση των αφίδων για 10 δευτερόλεπτα σε επτά με δέκα διαφορετικές συγκεντρώσεις εντομοκτόνου διαλυμένου σε νερό (συμπεριλαμβανομένου του μάρτυρα που περιείχε μόνο νερό). Μετά την εμβάπτιση, οι αφίδες διατηρούνταν σε σταθερές συνθήκες (23 °C, L16:D8) σε φύλλα κινέζικου λάχανου τοποθετημένα σε τριβλία petri και ο έλεγχος της θνησιμότητας γινόταν μετά από 48 ώρες. Σε κάθε βιοδοκιμή εξετάζονταν 130-240 ενήλικες, άπτερες αφίδες του ίδιου χρώματος (πράσινο ή κόκκινο). Ο αριθμός των δειγμάτων που ελέχθησαν ως προς την ανθεκτικότητα φαίνονται στο Πινάκα 1. Πιο αναλυτικά εξετάστηκαν ως προς την ανθεκτικότητά τους στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα methamidophos και chlorpyrifos methyl 100 και 24 δείγματα αντίστοιχα, το καρβαμιδικό εντομοκτόνο pirimicarb 85 δείγματα, τα πυρεθροειδή εντομοκτόνα bifenthrin και deltamethrin 71 και 87 δείγματα αντίστοιχα και τα νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα imidacloprid και acetamiprid 119 και 55 δείγματα αντίστοιχα. Οι ευαίσθητοι εργαστηριακοί κλώνοι (προμήθεια από το James Anstead, Rothamsted Research, UK) ήταν ο US1L, ο πράσινος κλώνος 4106A που συλλέχτηκε σε πατάτα τον Αύγουστο του 2000 στην Σκωτία και ο κόκκινος κλώνος 4793B που συλλέχτηκε σε καπνό το Μάιο του 2003 στην Ζιμπάμπουε χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση των δειγμάτων μεταξύ τους. Ο US1L και ο 4793B (παραχωρήθηκαν από την Linda Field, Rothamsted Research, UK) και

ο 4106A (παραχωρήθηκε από τον Martin Williamson, Rothamsted Research, UK) χρησιμοποιήθηκαν ως ευαίσθητοι κλώνοι και όταν αυτοί είχαν τη χαμηλότερη τιμή, χρησιμοποιήθηκαν για να βρεθεί ο συντελεστής ανθεκτικότητας. Πρέπει να αναφερθεί ότι η θνησιμότητα του μάρτυρα ήταν πάντα μικρότερη του 10%.

Πίνακας 1. Αριθμός εξετασθέντων δειγμάτων *M. persicae*, με την μέθοδο της στιγμιαίας εμβάπτισης.

Περιοχή	Πρώτο Έτος (2005)		Δεύτερο Έτος (2006)		Τρίτο Έτος (2007)		Σύνολο
	Ροδακινιά	Καπνός	Ροδακινιά	Καπνός	Ροδακινιά	Καπνός	
Μακεδονία	32	34	56	134	48	94	398
Κ. Ελλάδα	0	20	0	0	0	0	20
Μαγνησία	27	0	36	0	27	0	90
Στ. Ελλάδα	0	21	0	0	0	0	21
Πελοπόννησος	0	12	0	0	0	0	12
Σύνολο	59	87	92	134	75	94	541

Δείγμα = 2-3 προσβλημένα φύλλα ή βλαστοί από 15-20 διαφορετικά φυτά ή δένδρα από κάθε χωράφι ή οπωρώνα μεγέθους 10-15 στρέμματα.

Καταγραφή της ανθεκτικότητας του *M. persicae* με τη μέθοδο της τοπικής εφαρμογής (topical application).

Σε ορισμένες παρθενογενετικές σειρές, που εκτράφηκαν στο εργαστήριο με τη μέθοδο που αναφέρθηκε παραπάνω, ελέγχθηκε η ανθεκτικότητά τους στο imidacloprid και thiacloprid με τη μέθοδο της τοπικής εφαρμογής. Συγκεκριμένα, οι βιοδοκιμές έγιναν με τοπική εφαρμογή τεχνικών καθαρών ουσιών imidacloprid (Sigma Aldrich) ή thiacloprid (προσφορά της Bayer Crop Science) διαλυμένα σε ακετόνη με τη βοήθεια 5-μl μικροσυριγγών τύπου Hamilton. Για την κάθε παρθενογενετική σειρά χρησιμοποιήθηκαν 5–10 δόσεις που κυμαίνονταν από τα 0,0625 έως τα 8 ng εντομοκτόνου ανά αφίδα

διαλυμένο σε 0,5μl τεχνικώς καθαρή ακετόνη (Merck). Στον μάρτυρα υπήρχε μόνο 0,5 μl τεχνικώς καθαρή ακετόνη. Σε κάθε βιοδοκιμή χρησιμοποιούνταν 120-200 ενήλικα άπτερα θηλυκά. Οι αφίδες που εξετάσθηκαν διατηρούνταν σε σταθερές συνθήκες σε πλαστικά δοχεία διαμέτρου και ύψους 2cm, σκεπασμένο με διαφανές εντομοστεγές τούλι, και περιείχε 2mm άγαρ 1,1% w/v, πάνω στο οποίο τοποθετούνταν φύλλα κινέζικου λαχάνου. Ο έλεγχος της θνησιμότητας πραγματοποιούνταν σε 72 ωρες μετά την εφαρμογή. Για την εφαρμογή των εντομοκτόνων δεν χρειαζόταν η ακινητοποίηση των εντόμων, καθώς από τη φύση τους οι αφίδες δεν μετακινούνται όταν αρχίζουν να τρέφονται. Με τη μέθοδο αυτή ελέγχθηκε η ανθεκτικότητα σε 116 και 81 παρθενογενετικές σειρές της αφίδας *M. persicae* στο imidacloprid και thiacloprid αντίστοιχα.

Επίσης, σε 287 παρθενογενετικές σειρές της αφίδας *M. persicae* εξετάστηκαν με δυο διαγνωστικές δόσεις (η δόση που σκοτώνει το 90% του πιο ευαίσθητου κλώνου) για την ανθεκτικότητα των σειρών αυτών στο imidacloprid. Η μια διαγνωστική δόση, 2,25 ng/αφίδα, ήταν σύμφωνα με τους Foster *et al.* (2003), ενώ η άλλη, 0,42 ng/αφίδα που προήλθε από τις παραπάνω βιοδοκιμές στο imidacloprid. Σε κάθε εφαρμογή χρησιμοποιήθηκαν τουλάχιστον 30 ενήλικες άπτερες αφίδες και άλλες τόσες για το μάρτυρα. Ο έλεγχος της θνησιμότητας πραγματοποιούνταν σε 72 ώρες μετά την εφαρμογή. Σειρές με θνησιμότητα μικρότερη από 90% θεωρούνταν ως ανθεκτικές στο imidacloprid. Όσον αφορά την ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή, δηλ. τη διαπίστωση της ύπαρξης του μηχανισμού *kdr*, χρησιμοποιήθηκε μια διαγνωστική δόση του DDT (Chem Service Inc., West Chester, PA, USA) (200ng ανά αφίδα, Martinez-Torres *et al.* 1999). Με αυτή τη μέθοδο εξετάσθηκαν 366 παρθενογενετικές σειρές. Σε κάθε εφαρμογή χρησιμοποιήθηκαν 30 ενήλικες άπτερες μη παρασιτισμένες αφίδες και άλλες τόσες για το μάρτυρα, ενώ και για το DDT, ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ακετόνη, ενώ στο μάρτυρα η μεταχείριση αφορούσε καθαρή ακετόνη. Η ανάπτυξη των παρθενογενετικών σειρών όπως και η διατήρησή τους μεταξύ του διαστήματος που μεσολαβεί της βιοδοκιμής και της καταμέτρησης του αποτελέσματος γίνεται σε σταθερές συνθήκες των 23°C±0.5 °C και L16:D8. Σειρές με θνησιμότητα μικρότερη από 90% μετά από 48 ώρες

θεωρείτο ότι έχουν τη μετάλλαξη *kdr* που προσδίδει ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή και το DDT σύμφωνα με τους Martinez-Torres *et al.* 1999.

Μετά την πραγματοποίηση της βιοδοκιμής, ζυγίζονταν το βάρος 20 διαφορετικών ενηλίκων της συγκεκριμένης παρθενογενετικής σειράς σε ζυγό ακριβείας αφού πρώτα είχαν ακινητοποιηθεί ψυχοντάς τα για 10 δευτερόλεπτα στους $-10^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ και καταγραφόνταν το βάρος τους.

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS v13.0. Το LC_{50} κάθε πληθυσμού και κλώνου βρέθηκε με probit ανάλυση και λογαριθμική μετατροπή των δεδομένων, ενώ οι συγκρίσεις έγιναν με Ανάλυση Παραλλακτικότητας με το Statistica 6.0. Ο συντελεστής ανθεκτικότητας (Resistance Factor, RF ή ΣΑ) είναι το αποτέλεσμα της διαίρεσης του LC_{50} του κάθε δείγματος προς το πιο ευαίσθητο δείγμα ή ευαίσθητο εργαστηριακό κλώνο για το συγκεκριμένο εντομοκτόνο.

Τύπος και υπερπαραγωγή εστέρων.

Η ανίχνευση γενοτύπων που περιείχαν τα γονίδια FE4, E4 ή και τα δυο μαζί, έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο των Field *et al.* (1999). Με την μέθοδο αυτή εξετάστηκαν συνολικά 917 κλώνοι της αφίδας *M. persicae* από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Η ανίχνευση του γονιδίου έγινε με εφαρμογή της μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) και χρησιμοποίηση συγκεκριμένων εκκινητών που ανιχνεύουν τα δυο γονίδια. Η PCR, χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση των γονιδίων FE4, E4, μήκους 865 και 572 περίπου βάσεων αντίστοιχα. Για την ενίσχυση των γονιδίων χρησιμοποιήθηκαν οι τρεις παρακάτω εκκινητές Est1: 5-GGGAATTTTGGATTCT-3, E4 :(5-GGCGGACCTGACGACTC-3) και FE4 (5-TGGTTGGGATCTAGGG-3) (Field *et al.* 1999). Το ζευγάρι Est1 και E4 ενισχύει το γονίδιο E4 περίπου 572 βάσεων και το ζευγάρι Est1 και FE4 το γονίδιο FE4 περίπου 865 βάσεων.

Η ενίσχυση του δίκλωνου DNA πραγματοποιήθηκε σε όγκους αντιδράσεων των 25μl που περιείχαν: 1u Taq DNA πολυμεράση (Minotech, Heraklion, Greece), 2,5 μl ρυθμιστικό διάλυμα Taq 10 × (500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl pH 9), 1,5 mM MgCl_2 , 0,2 mM dNTPs, περίπου 30ng από τον

κοινό εκκινητή και 15ng από τους άλλους δυο και 1μl (περίπου 50 ng) από DNA κάθε απόμου.

Οι συνθήκες ενίσχυσης περιελάμβαναν μια προκαταρκτική αποδιάταξη του DNA στους 94°C για 30 δευτερόλεπτα, ένα σύνολο 35 κύκλων των 30 δευτερολέπτων στους 95°C, 120 δευτερολέπτων στους 45°C και 60 δευτερολέπτων στους 72°C. Τέλος το πρόγραμμα της αντίδρασης ολοκληρωνόταν με ένα τελικό στάδιο συμπληρωματικής επιμήκυνσης στους 72°C για δέκα λεπτά. Μετά τον πολλαπλασιασμό, ο έλεγχος της επιτυχίας της PCR γινόταν σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης 1% που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο 0,5 μl ml⁻¹ σε διάλυμα TAE. Η εξέταση των ζωνών του DNA έγινε σε λυχνία υπεριώδους ακτινοβολίας.

Για την εκτίμηση της ολικής δραστηριότητας των εστερασών εφαρμόστηκε η χρωματομετρική μέθοδος των Devonshire *et al.* (1992). Συνολικά εξετάστηκαν 942 κλωνικές σειρές για τα έτη 2005, 2006 και 2007. Η ομογενοποίηση των αφίδων διεξαγόταν με τη χρήση συσκευής πολυομογενοποιητή σε πλάκα ELISA 96 βοθρίων. Η αντίδραση μετρήθηκε με φασματοφωτόμετρο (Bio-Tek, ELX 808) στα 620 nm και εκτιμήθηκε το επίπεδο της ανθεκτικότητας των αφίδων σύμφωνα με τις κλίμακες των Devonshire *et al.* (1992) και Foster *et al.* (2002), όπου υπάρχει ο ευαίσθητος γενότυπος (S) και οι γενότυποι με τρία διαφορετικά επίπεδα ανθεκτικότητας (R1, R2 και R3 για μέτρια, υψηλή και πολύ υψηλή ανθεκτικότητα αντίστοιχα). Χρησιμοποιήθηκε ο κλώνος US1L ως ευαίσθητος κλώνος αναφοράς.

Βιοχημικός και μοριακός προσδιορισμός της τροποποιημένης ακετυλχολινεστεράσης (AChE).

Για την ανίχνευση γενοτύπων με το μηχανισμό τροποποιημένης ακετυλχολινεστεράσης εξετάστηκαν συνολικά 895 κλώνοι της αφίδας *M. persicae* από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, με εφαρμογή της βιοχημικής μεθόδου ελέγχου της ευαισθησίας της ακετυλχολινεστεράσης στο pirimicarb. Χρησιμοποιήθηκε ο κλώνος US1L ως ευαίσθητος κλώνος αναφοράς. Ο μηχανισμός MACE διαγνώστηκε με την βιοχημική μέθοδο μέτρησης της κινητικής του ενζύμου σύμφωνα με τους Moores *et al.* (1994a, b). Με τη

μέθοδο αυτή μετράται η δραστηριότητα της AChE σε 4 νεαρές αφίδες ανά κλώνο με ή χωρίς την προσθήκη διαγνωστικής δόσης pirimicarb (100 μM, Chem Service Inc., West Chester, PA, USA).

Για την ανίχνευση της μετάλλαξης στη θέση 431 από σερίνη σε φαινυλαλανίνη της AChE εξετάστηκαν συνολικά 907 κλώνοι της αφίδας *M. persicae* από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, με PCR και χρησιμοποίηση εξειδικευμένων εκκινητών που ανιχνεύουν τη μετάλλαξη στην AChE. Απομόνωση του DNA από μια μόνο αφίδα από κάθε κλώνο έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο των Sunnucks & Hales (1996). Η PCR χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου ACHE-2, μήκους 1269 περίπου βάσεων με τους δυο εκκινητές AChE-F2: GAG CCA GAA TAC ACA GAG AAG CG και AChE-R3: CGA GAC ACC ACC ACG TTT TCC TC (Cassanelli *et al.* 2005).

Η ενίσχυση του δίκλωνου DNA πραγματοποιήθηκε σε όγκους αντιδράσεων των 25μl που περιέχουν: 1u Taq DNA πολυμεράση (Minotech, Heraklion, Greece), 2,5 μl ρυθμιστικό διάλυμα Taq 10 × (500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl pH 9), 2,0 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 15ng από τους άλλους δυο εκκινητές, 1μl (περίπου 50 ng) από DNA κάθε ατόμου.

Οι συνθήκες ενίσχυσης περιελάμβαναν προκαταρκτική αποδιάταξη του DNA στους 94°C για 30 δευτερόλεπτα, 30 κύκλους των 30 δευτερολέπτων στους 94°C, 30 δευτερολέπτων στους 52°C, 60 δευτερολέπτων στους 72°C. Το πρόγραμμα της αντίδρασης ολοκληρωνόταν με στάδιο τελικής επιμήκυνσης στους 72°C για δέκα λεπτά. Μετά τον πολλαπλασιασμό, ο έλεγχος της επιτυχίας της PCR γινόταν σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης 1% που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο 0,5 μl ml⁻¹ σε διάλυμα TAE. Η εξέταση των ζωνών του DNA έγινε σε λυχνία υπεριώδους ακτινοβολίας. Στη συνέχεια σε 5μl από το προϊόν της PCR γινόταν πέψη με 0,2U ενζύμου περιορισμού SspI (New England Biolabs) σε 1X SspI buffer στους 37°C για 10 με 12 ώρες. Το αποτέλεσμα της πέψης ελέγχονταν σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης 2%. Η εξέταση των ζωνών του DNA έγινε σε λυχνία υπεριώδους ακτινοβολίας. Υπάρχουν τρεις δυνατές περιπτώσεις: i) να υπάρχει η μετάλλαξη σε ομοζυγωτία (**RR**), ii) να υπάρχει η μετάλλαξη σε ετεροζυγωτία (**RS**), iii) να μην υπάρχει καθόλου η μετάλλαξη όποτε είναι σε ομοζυγία ευαίσθητο (**SS**). Στη περίπτωση (**RR**) το ένζυμο δε θα "κόψει" στη θέση που υπάρχει η μετάλλαξη, παρά μονό στη θέση 435, οπότε θα πάρουμε δυο

ζώνες, μια στις 435 και μια στις 834 βάσεις, όταν έχουμε την περίπτωση **(RS)** παίρνουμε μια στις 435, μια στις 780 μια στις 54 και μια στις 834 βάσεις. Τέλος όταν έχουμε τη περίπτωση ευαίσθητου ατόμου **(SS)** τότε παίρνουμε μια ζώνη στις 435 μια στις 780 και μια στις 54 βάσεις.

*Ανίχνευση γενοτύπων *kdr**

Για την ανίχνευση γενοτύπων που περιείχαν τη μετάλλαξη *kdr* στη δίοδο νατρίου, εξετάστηκαν συνολικά 918 κλώνοι της αφίδας *M. persicae* από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, με PCR και χρησιμοποίηση εξειδικευμένων εκκινητών. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν 4 εκκινητές που ενισχύουν τα τμήματα DNA τόσο των ευαίσθητων, όσο και των ανθεκτικών αλληλομόρφων. Μεταξύ των αλληλομόρφων διακρίνονται τα ανθεκτικά R (αυτά που περιέχουν τη μετάλλαξη *kdr*) και τα ευαίσθητα S (αυτά που δεν την περιέχουν) και τα ετερόζυγα άτομα RS.

Η απομόνωση του DNA γινόταν με χρησιμοποίηση μιας μόνο αφίδας, σύμφωνα με τη μέθοδο των Sunnucks & Hales (1996). Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου της διόδου νατρίου που περιέχει τη μετάλλαξη (*kdr*) χρησιμοποιήθηκαν οι δυο εκκινητές Rv2 (5'-ATAGTACTTATACATACC ACGAA- 3') και Mp103 (5'-GTCATGGGTATGCAGTTATTTG- 3') (Guillemaud *et al.* 2003), ενώ για την ενίσχυση του τμήματος 600 βάσεων, όταν δεν περιέχει τη μετάλλαξη (*kds*), χρησιμοποιήθηκαν οι δυο παρακάτω εκκινητές Sd2 (5'-CTACTGTTGTCATTGGTAACC- 3') και Mp889 (5'-ATCTGGCATAAG TCTAAGAG-3') (Guillemaud *et al.* 2003).

Ο πολλαπλασιασμός του δίκλωνου DNA πραγματοποιήθηκε σε όγκους αντιδράσεων των 25μl που περιεχουν: 1u Taq DNA πολυμεράση (Minotech, Heraklion, Greece), 2,5 μl ρυθμιστικό διάλυμα Taq 10 x (500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl pH 9), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 15ng από τους άλλους δυο εκκινητές, 1μl (περίπου 50 ng) από DNA κάθε ατόμου.

Οι συνθήκες ενίσχυσης περιελάμβαναν προκαταρκτική αποδιάταξη του DNA στους 94°C για 120 δευτερόλεπτα, ένα σύνολο 30 κύκλων των 30 δευτερολέπτων στους 94°C, 45 δευτερολέπτων στους 61°C και 30 δευτερολέπτων στους 72°C. Μετά τον πολλαπλασιασμό, ο έλεγχος της

επιτυχίας της PCR γινόταν σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης 1%. Η εξέταση των ζωνών του DNA έγινε σε λυχνία υπεριώδους ακτινοβολίας.

*Έλεγχος της ανθεκτικότητας των φυσικών εχθρών του *M. persicae**

Αναπτύχθηκαν εργαστηριακές εκτροφές μιας γενιάς αρπακτικών των *Coccinella septempunctata*, *Hippodamia (Semiadalia) undecimnotata* και *Hippodamia variegata* (Goeze) (Coleoptera: Coccinellidae) καθώς και το *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae), που διατηρούνταν σε ειδικά πλαστικά κουτιά με φύλλα καπνού ή πατάτας προσβεβλημένα με αφίδες *M. persicae*. Τα είδη συλλέχθηκαν τον Σεπτέμβριο του 2004 και το καλοκαίρι του 2006 και 2007 από χωράφια καπνού και ροδάκινεώνες, ενώ το *C. carnea* από ροδάκινα κοντά στην περιοχή του Βελεσίνου. Πραγματοποιήθηκαν βιοδοκιμές με το imidacloprid σε προνύμφες μιας ημέρας στο τελευταίο προνυμφικό στάδιο της πρώτης εργαστηριακής γενιάς. Οι βιοδοκιμές έγιναν με τοπική εφαρμογή εντομοκτόνων στο scutellum του κάθε εντόμου με χρήση σύριγγας Hamilton των 10 μl. Σε κάθε βιοδοκιμή εξετάσθηκαν 120-140 άτομα από κάθε είδος, αφού προηγήθηκε αναισθητοποίησή τους με έκθεση για 15 δευτερόλεπτα σε CO₂. Τα αρπακτικά διατηρήθηκαν σε σταθερές συνθήκες (23°C, L16:D8) σε κουτιά εκτροφής που περιείχαν φύλλα καπνού προσβεβλημένα με αφίδες και η θνησιμότητα εκτιμήθηκε μετά από 48 ώρες. Επίσης, πριν από την κάθε βιοδοκιμή, ζυγίζόταν το βάρος της κάθε προνύμφης τελευταίου σταδίου σε ζυγό ακριβείας.

*Έλεγχος του τύπου AChE της αφίδας *Myzus persicae* (Sulzer) για μεταλλάξεις*

Από τις κλώνους που είχαν δημιουργηθεί από τη συλλογή δειγμάτων *M. persicae* από οπωρώνες ροδακινιάς και καλλιέργειες καπνού επιλέχθηκαν τυχαία κλώνοι και ελέγχθησαν ως προς την ανθεκτικότητά τους στο pirimicarb με τη μέθοδο της τοπικής εφαρμογής εντομοκτόνου (για λεπτομέρειες της μεθόδου δες Υλικά και Μέθοδοι). Από τους κλώνους αυτούς επιλέχθηκαν ένας αποδεδειγμένα ευαίσθητος κλώνος (4794) από τη Ζιμπάμπουε, ένας ανθεκτικός κλώνος (KvT25) από την Κρύα Βρύση και ένας ανθεκτικός κλώνος (NauT17) από το Ναύπλιο. Στη συνέχεια, έγινε ανάλυση της ανθεκτικότητας των κλώνων αυτών με τοπική εφαρμογή pirimicarb.

Απομόνωση DNA, RNA, mRNA και cDNA

Μετά το τέλος του βιοχημικού έλεγχου, το ολικό RNA απομονώθηκε με το αντιδραστήριο TRI (Sigma), όπως αναφέρουν οι Vontas *et al.* 2000. Το Poly(A)⁺ RNA απομονώθηκε από το συνολικό RNA με το PolyATract mRNA Isolation System IV (Promega), ακλουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η σύνθεση του cDNA έγινε με την βοήθεια μιας oligo-(dT) αλληλουχίας εκκινητή [5'-GACTCGAGTCGACATCGA-(dT)17-3'], χρησιμοποιώντας την SuperScript II (Gibco-BRL), με την παρουσία 10% DMSO στους 50 °C. Η απομόνωση γενομικού DNA έγινε σύμφωνα με την μέθοδο των Vaughan *et al.* (1995).

Κλωνοποίηση και αλληλούχιση του γονιδίου της AChE

Εκφυλισμένοι εκκινητές σχεδιάστηκαν βασισμένοι στην αλληλουχία του γονιδίου της AChE (*ace-1*) που υπάρχει στη βάση δεδομένων NCBI. Τα 50μl της αντίδρασης PCR περιείχαν 50ng cDNA, 0.5 μmol από τον κάθε εκκινητή, Mpace1F1 [5'-CTGCTAGGACACCAACGTGA] και Mpace1R1 [5'-GAAGCAAAC GATGACGTGAA], 0.5 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, και 2.5 Units από την HotStar Taq polymerase (Qiagen) μαζί με το ρυθμιστικό διάλυμα του κατασκευαστή. Στη συνέχεια, οι συνθήκες ενίσχυσης περιελάμβαναν 35 κύκλους των 30 δευτερολέπτων στους 94°C, 30 δευτερολέπτων στους 50°C, 90 δευτερολέπτων στους 72°C. Επιπλέον, μια δεύτερη semi-nested PCR εκτελέστηκε με τους εκκινητές Mpace1F2 [5'-CGGTACTIONTCGAC ACTGGACA] Mpace1R1 και [5'- GAAGCAAACGATGACGTGAA], με τα ίδια αντιδραστήρια και συνθήκες αντίδρασης 30 δευτερολέπτων στους 94°C, 30 δευτερολέπτων στους 48°C, 90 δευτερολέπτων στους 72°C. Τα προϊόντα της PCR κλωνοποιήθηκαν με το into pGEM T-easy (Promega) και έγινε αλληλούχιση και στις δυο κατευθύνσεις. Στην περίπτωση του *ace-2*, χρησιμοποιήθηκε παρόμοια μέθοδος όπου τα 50μl της αντίδρασης PCR περιείχαν 50ng cDNA, 0.5 μmol από τον κάθε εκκινητή, Mpace2F1 [5'- AAG CGTTGGGACACCAACTGC] και Mpace2R1 [5'- AATCATGTAAGTTTTGGTCC], 0.5 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, και 2.5 Units από την HotStar Taq polymerase (Qiagen) μαζί με το ρυθμιστικό διάλυμα του κατασκευαστή. Στη συνέχεια, οι συνθήκες ενίσχυσης περιελάμβαναν 35

κύκλους των 30 δευτερολέπτων στους 94°C, 30 δευτερολέπτων στους 50°C, 90 δευτερολέπτων στους 72°C. Επιπλέον, μια δεύτερη semi-nested PCR εκτελέστηκε με τους εκκινητές Mpace2F2 [5'- GGAGGATTTTACTCCGGGTC] Mpace2R1 [5'-AATCATGTAAGTTTTGGTCC], με τα ίδια αντιδραστήρια και συνθήκες αντίδρασης 30 δευτερολέπτων στους 94°C, 30 δευτερολέπτων στους 48°C, 90 δευτερολέπτων στους 72°C. Τα προϊόντα της PCR κλωνοποιήθηκαν με το into pGEM T-easy (Promega) και έγινε αλληλούχιση και στις δυο κατευθύνσεις.

Αποτελέσματα

*Καταγραφή της ανθεκτικότητας του *M. persicae* σε εντομοκτόνα με την μέθοδο της στιγμιαίας εμβάπτισης*

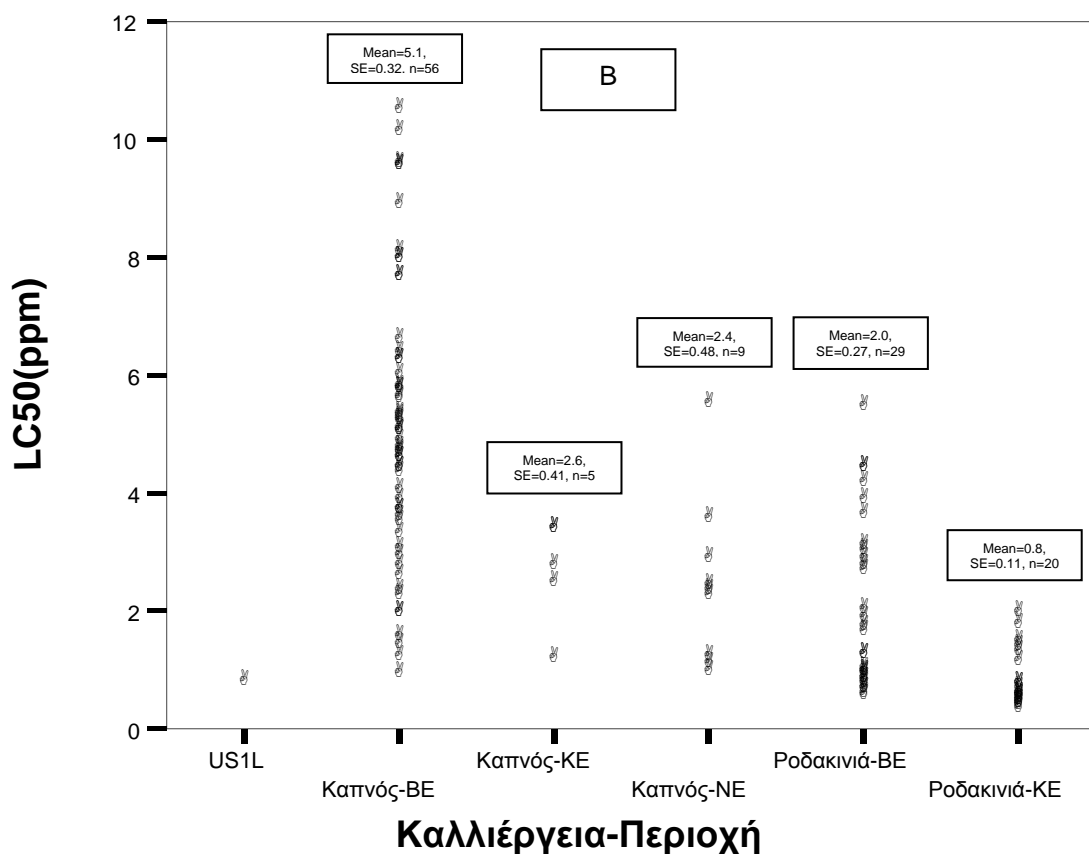
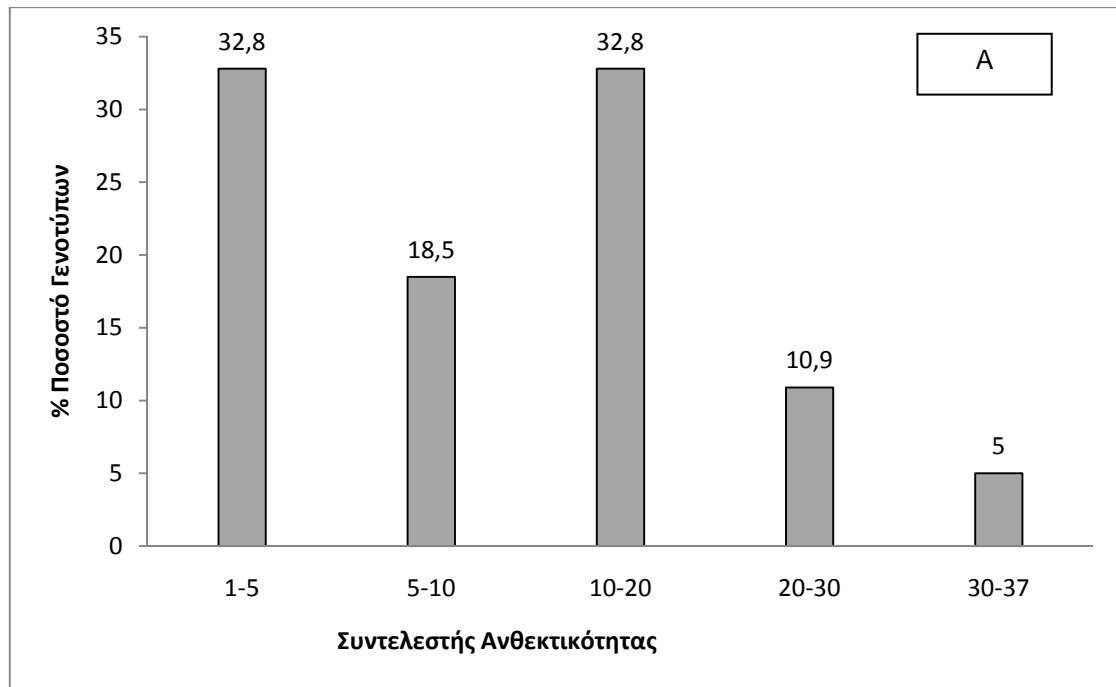
Νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα (imidacloprid & acetamiprid)

Πραγματοποιήθηκαν 119 συνολικά βιοδοκιμές στο εντομοκτόνο imidacloprid σε δείγματα από όλη την Ελλάδα, από τα οποία 49 προέρχονταν από σπωρώνες ροδακινιάς και 70 από φυτείες καπνού.

Η μέση θανατηφόρος συγκέντρωση LC_{50} στους πληθυσμούς από ροδακινιά κυμάνθηκε από 0,28 ppm (Λεχώνια) ως 5,43 ppm (Μελίκη) ενώ στους πληθυσμούς που συλλέχθηκαν από καπνό κυμάνθηκε από 0,85 ppm (Μελίκη) ως 10,43 ppm (Μελίκη). Συγκεντρωτικά οι μέσες θανατηφόρες συγκεντρώσεις LC_{50} δίνονται στο Σχήμα 2. Το LC_{50} για τον ευαίσθητο εργαστηριακό κλώνο US1L βρέθηκε ίσο με 0,72 ppm. Έτσι ο συντελεστής ανθεκτικότητας υπολογίστηκε με βάση τον πιο ευαίσθητο κλώνο που βρέθηκε στον αγρό.

Η σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων που συλλέχθηκαν από καλλιέργειες ροδακινιάς της Β.Ελλάδας ($n=29$) με σπωρώνες της Κεντρικής Ελλάδας ($n=20$) με δείγματα που συλλέχθηκαν από καλλιέργειες καπνού της Βόρειας Ελλάδας ($n=56$) και με δείγματα από φυτείες της Κεντρικής Ελλάδας ($n=5$) και της Νότιας Ελλάδας ($n=14$) έδειξε ότι υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($F=35.1$; $df=3, 115$; $p<0.001$). Το Tukey's test έδειξε ότι τα δείγματα του προέρχονται από καπνό από την Βόρεια Ελλάδα διέφεραν στατιστικώς από όλα τα άλλα δείγματα ενώ τα δείγματα που προέρχονταν από ροδάκινα είτε από τη Βόρεια είτε από την Κεντρική Ελλάδα δεν διέφεραν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

Για τον υπολογισμό του συντελεστή ανθεκτικότητας (ΣA , LC_{50} κάθε δείγματος/ LC_{50} του πλέον ευαίσθητου δείγματος) δεν χρησιμοποιήθηκε ως ευαίσθητος κλώνος αναφοράς ο εργαστηριακός κλώνος US1L, αλλά ένα δείγμα από πληθυσμό ροδακινιάς από τα Λεχώνια Μαγνησίας, το οποίο παρουσίασε τη χαμηλότερη τιμή LC_{50} (0,28 ppm).



Σχήμα 2. (Α) Συχνότητα των Συντελεστών Ανθεκτικότητας σε βιοδοκιμές με το imidacloprid και (Β) LC₅₀ (σε ppm) στους πληθυσμούς του *Myzus persicae* που εξετάστηκαν με imidacloprid. n = αριθμός που εξετάστηκαν. BE, KE, NE = Βόρεια, Κεντρική, Νότια Ελλάδα, αντίστοιχα. US1L = ευαίσθητος κλώνος, Συντελεστής Ανθεκτικότητας με βάση τον πιο ευαίσθητο πληθυσμό (06LehP01).

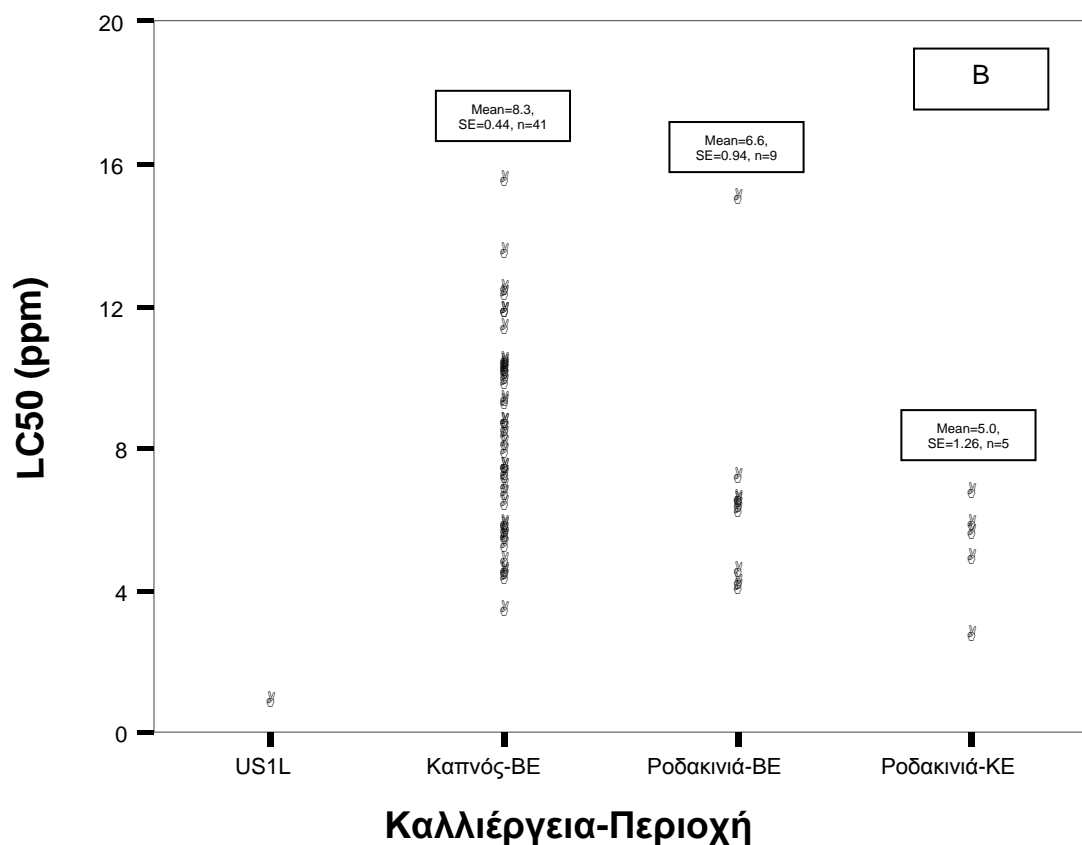
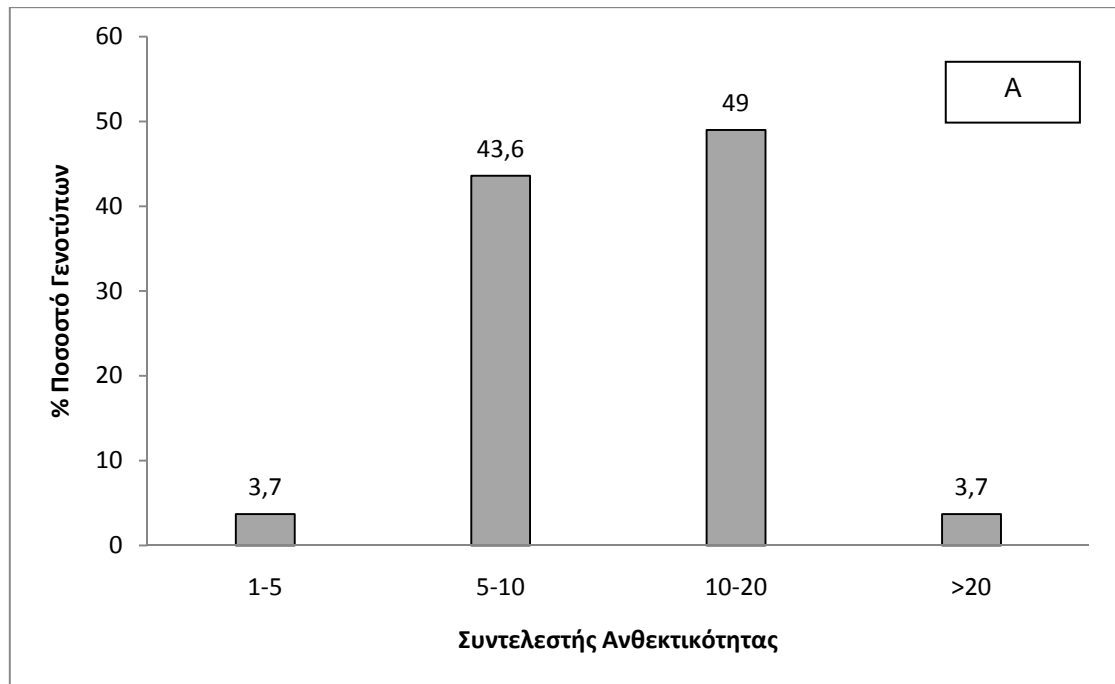
Για τα δείγματα από οπωρώνες ροδακινιάς, ο ΣΑ κυμάνθηκε μεταξύ 1 (περιοχή Λεχωνίων) και 19.1 (περιοχή Μελίκης), ενώ για αυτά από καπνό μεταξύ 3.0 (περιοχή Μελίκης) και 36.7 (περιοχή Μελίκης). Το 32.8 % των εξετασθέντων δειγμάτων ($n=119$) παρουσίασε πολύ χαμηλές τιμές ΣΑ (χαμηλότερες από 5), το 18.5 % ταξινομήθηκε στην κατηγορία χαμηλής ανθεκτικότητας (με τιμές ΣΑ μεταξύ 5 και 10), ένα ποσοστό 32.8 % έδειξε τιμές ΣΑ μεταξύ 10 και 20, ενώ το 10.9 % έδειξε σχετικά υψηλές τιμές ΣΑ που κυμάνθηκαν 20 και 30 ενώ ένα μικρό ποσοστό 5.0 % είχε υψηλό ΣΑ μεγαλύτερο από 30. Τα δείγματα αυτά προέρχονταν ως επί των πλείστον από καλλιέργεια καπνού της Βόρειας Ελλάδας.

Στην περίπτωση του εντομοκτόνου acetamiprid πραγματοποιήθηκαν συνολικά 55 βιοδοκιμές σε δείγματα από όλη την Ελλάδα, από τα οποία 14 προέρχονταν από οπωρώνες ροδακινιάς και 41 από φυτείες καπνού.

Η μέση θανατηφόρος συγκέντρωση LC_{50} στους πληθυσμούς από ροδακινιά κυμάνθηκε μεταξύ 2,59 ppm (Βελεστίνο) και 14,88 ppm (Μελίκη), ενώ σε αυτούς από καπνό μεταξύ 3,32 ppm (Κατερίνη) και 15,38 ppm (Μελίκη). Συγκεντρωτικά οι μέσες θανατηφόρες συγκεντρώσεις LC_{50} δίνονται στο Σχήμα 3.

Η σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων που συλλέχθηκαν από καλλιέργειες ροδακινιάς της β. Ελλάδας ($n=9$) και οπωρώνες της Κεντρικής Ελλάδας ($n=5$) και καπνού της β. Ελλάδας ($n=41$) έδειξε ότι υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($F=3,71$; $df=2, 52$; $p<0.031$). Το Tukey's test έδειξε ότι τα δείγματα του προέρχονται από καπνό από την Βόρεια Ελλάδα διέφεραν στατιστικώς από αυτά που προέρχονται από ροδακινιές της Κ. Ελλάδας και όχι από δείγματα που προέρχονταν από ροδακινιές από την Β. Ελλάδα, ενώ τα δείγματα που προέρχονται από ροδακινιές από την Β. και Κ. Ελλάδα δεν διέφεραν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

Για τον υπολογισμό του ΣΑ χρησιμοποιήθηκε ως κλώνος αναφοράς ο ευαίσθητος εργαστηριακός κλώνος US1L. Για τα δείγματα που προέρχονταν από οπωρώνες ροδακινιάς, ο ΣΑ κυμαινόταν από 3,7 (περιοχή Βελεστίνο) ως 21,3 (περιοχή Μελίκης), ενώ για αυτά που προέρχονταν από καπνό από 4.8 ως 22.1 (περιοχή Μελίκης).



Σχήμα 3. (Α) Συχνότητα των Συντελεστών Ανθεκτικότητας σε βιοδοκιμές με το acetamirid και (Β) LC_{50} (σε ppm) στους πληθυσμούς του *Myzus persicae* που εξετάστηκαν με acetamirid. n = αριθμός που εξετάστηκαν. ΒΕ, ΚΕ, = Βόρεια, Κεντρική, Ελλάδα, αντίστοιχα. US1L = ευαίσθητος κλώνος, Συντελεστής Ανθεκτικότητας με βάση τον πιο ευαίσθητο πληθυσμό (US1L).

Παρατηρήθηκε ότι μόνο το 3.7 % επί του συνολικού αριθμού δειγμάτων που εξετάστηκαν (n= 55) παρουσίασε πολύ χαμηλές τιμές ΣΑ (χαμηλότερες από 5), ένα ποσοστό 43.6 % ταξινομήθηκε στην κατηγορία χαμηλής ανθεκτικότητας (με τιμές ΣΑ μεταξύ 5 και 10), ένα ποσοστό 49,0 % έδειξε τιμές ΣΑ μεταξύ 10 και 20, ενώ ένα μικρό ποσοστό 3.7 % είχε υψηλό ΣΑ μεγαλύτερο από 20.

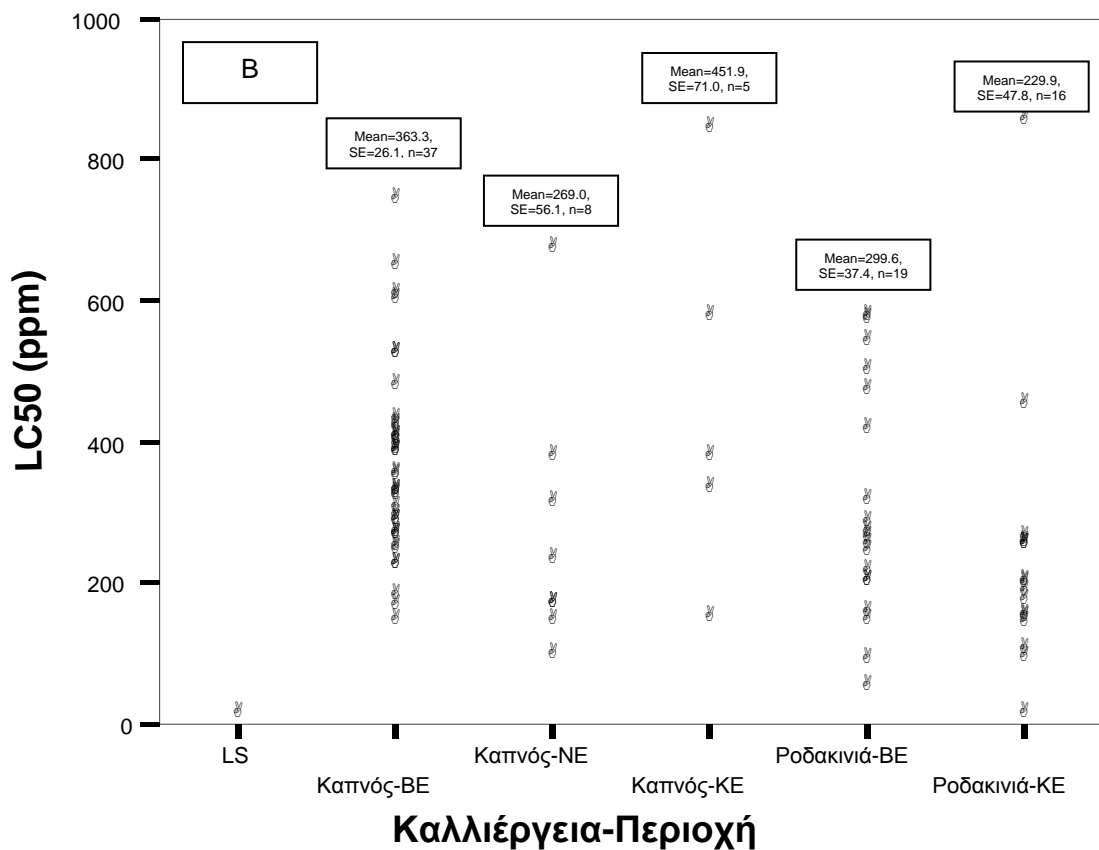
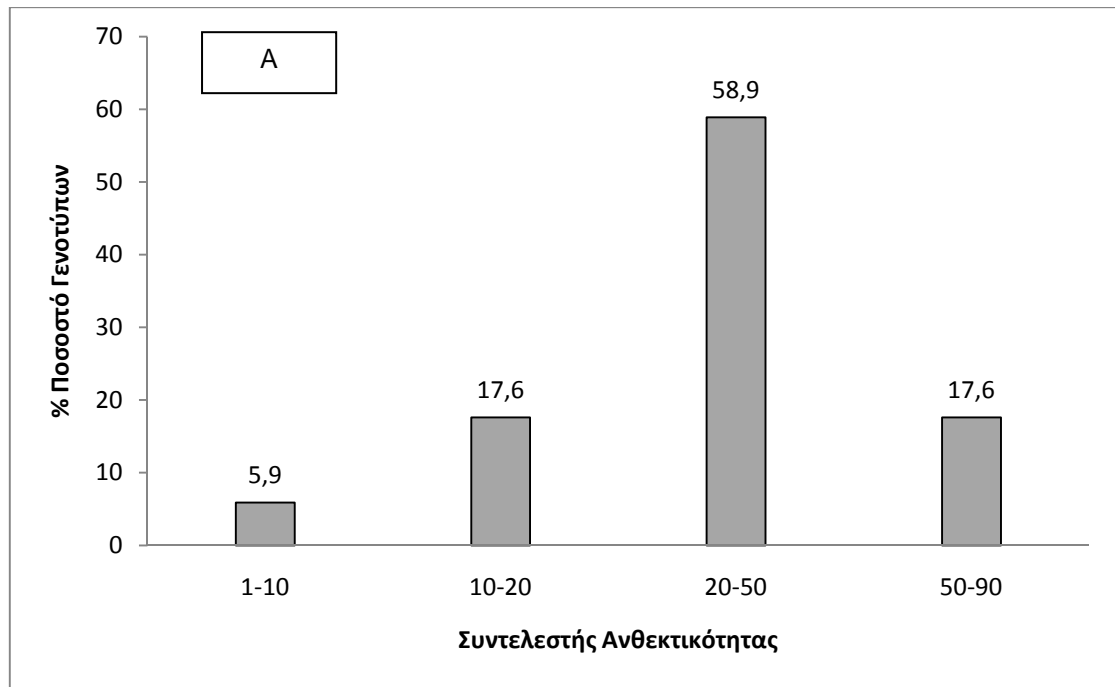
Ανθεκτικότητα στο pirimicarb

Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 85 βιοδοκιμές όσον αφορά το καρβαμιδικό εντομοκτόνο pirimicarb. Από αυτές, 35 διεξήχθησαν με δείγματα πληθυσμών της αφίδας που συλλέχθηκαν από οπωρώνες ροδακινιάς και 50 με δείγματα που συλλέχθηκαν από χωράφια καπνού. Συγκεντρωτικά οι μέσες τιμές (LC₅₀) δίνονται στο Σχήμα 4.

Όσον αφορά την τοξικότητα του εντομοκτόνου σε δείγματα από καπνό, η μέση LC₅₀ παρουσιάζει διακύμανση από 92.8 (περιοχή Αργολίδος) ως 840.5 ppm (περιοχή Καρδίτσας) και για τα δείγματα από οπωρώνες ροδακινιάς από 1.1 ως 848.5 ppm (Λεχώνια).

Η σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων που συλλέχθηκαν από καλλιέργειες ροδακινιάς της βόρειου Ελλάδας (n= 19), της κεντρικής Ελλάδας (n= 16), από καπνό της βόρειας Ελλάδας (n= 37) και από καπνό από τη νότια και κεντρική Ελλάδα (n= 14) έδειξε ότι δεν υπάρχουν στατιστικές σημαντικές διαφορές ($F=2.47$; $df=3, 81$; $p<0.068$).

Για τον υπολογισμό του ΣΑ χρησιμοποιήθηκε ως κλώνος αναφοράς ο ευαίσθητος εργαστηριακός κλώνος 4793B. Το 5.9 % του συνολικού αριθμού κλώνων που εξετάστηκαν ταξινομήθηκε στην κατηγορία χαμηλής ανοχής (με τιμές ΣΑ μεταξύ 1 και 10) και το 17.6 % έδειξε τιμές ΣΑ μεταξύ 10 και 20. Επιπλέον, το 58.9 % έδωσε ενδείξεις ανάπτυξης ανθεκτικότητας (με τιμές ΣΑ μεταξύ 20, και 50), ένα ποσοστό 17.6 % έδωσε σημεία ανάπτυξης ισχυρής ανθεκτικότητας (με τιμές ΣΑ από 50 ως 90).



Σχήμα 4. (Α) Συχνότητα των Συντελεστών Ανθεκτικότητας σε βιοδοκιμές με το pirimicarb και (Β) LC₅₀ (σε ppm) στους πληθυσμούς του *Myzus persicae* που εξετάστηκαν με pirimicarb n = αριθμός που εξετάστηκαν. BE, KE, = Βόρεια, Κεντρική, Ελλάδα, αντίστοιχα. LS = ευαίσθητος κλώνος, Συντελεστής Ανθεκτικότητας με βάση το πιο ευαίσθητο πληθυσμό (4793B).

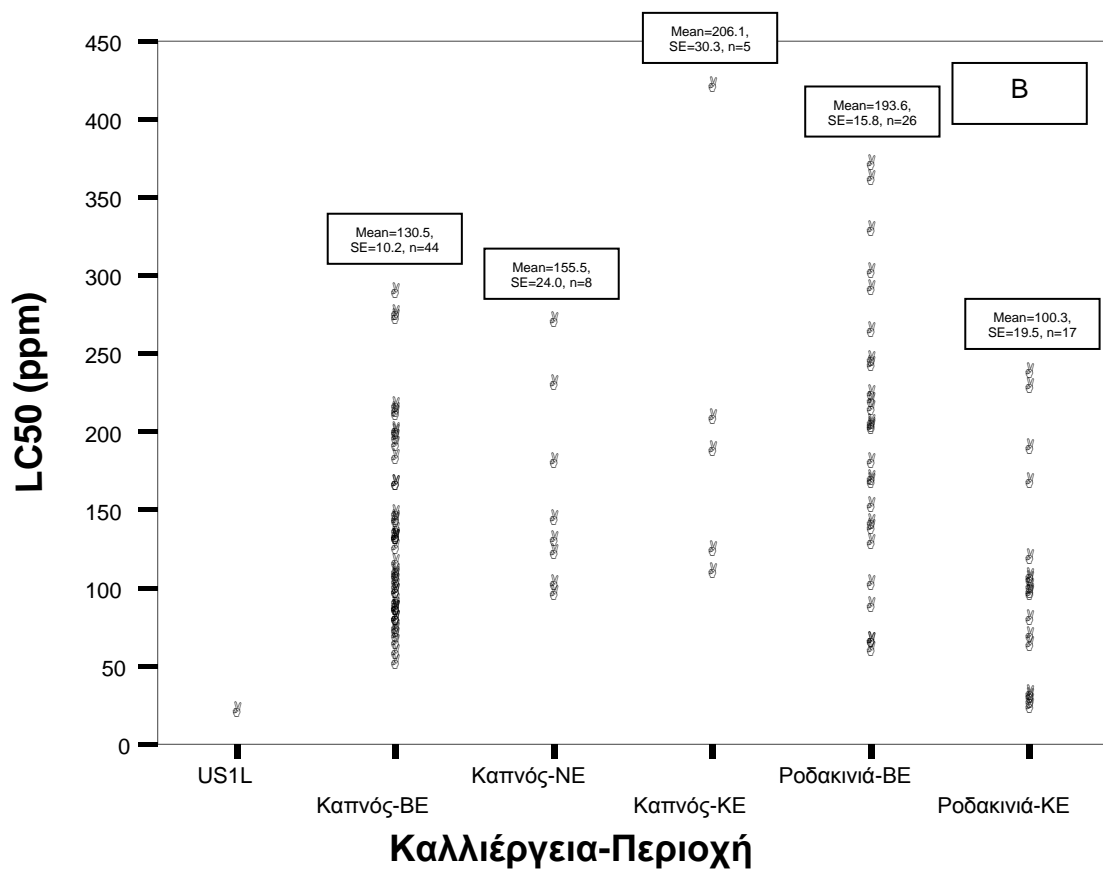
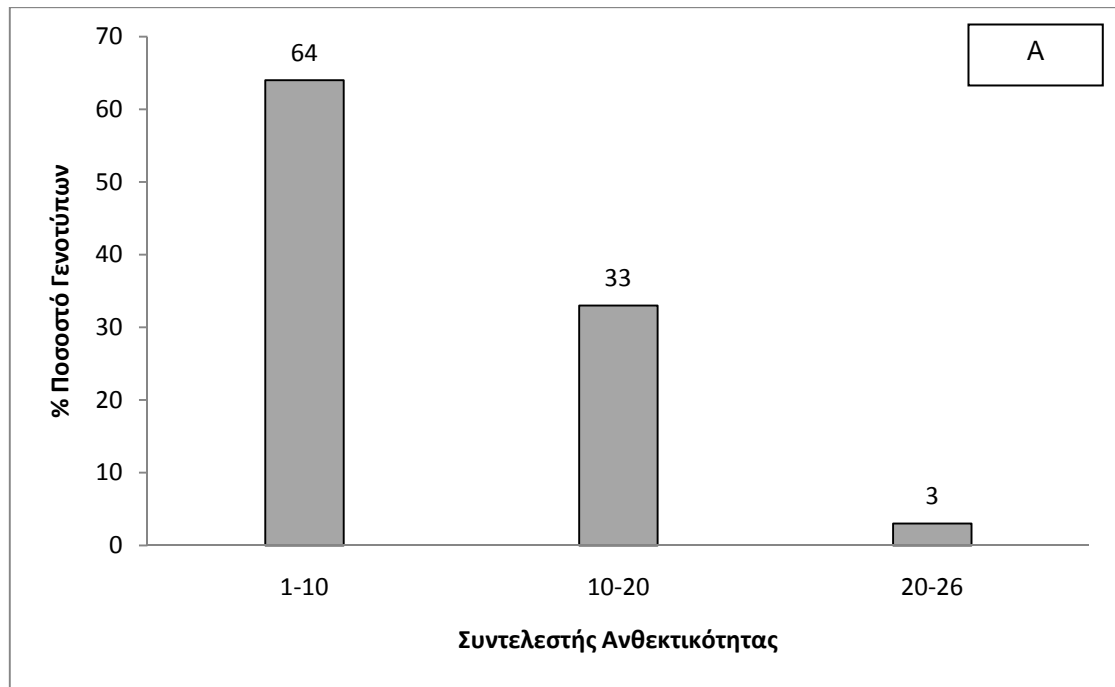
Ανθεκτικότητα σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα

Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 100 βιοδοκιμές με το οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο methamidophos. Από αυτές, 43 διεξήχθησαν με αφίδες που συλλέχθηκαν από οπωρώνες ροδακινιάς και 57 με αφίδες που συλλέχθηκαν από χωράφια καπνού. Σε αυτές με δείγματα από οπωρώνες ροδακινιάς, η μέγιστη LC₅₀ ήταν στα 366,8 ppm (περιοχή Μελίκης) ενώ η ελάχιστη 19,4 ppm (περιοχή Λεχωνίων). Οι αντίστοιχες τιμές για τα χωράφια καπνού αντίστοιχα είναι 417,5 ppm (περιοχή Καρδίτσας) και 47.7 ppm (περιοχή Κατερίνης). Οι τιμές της κάθε βιοδοκιμής, δίνονται συγκεντρωτικά στο Σχήμα 5.

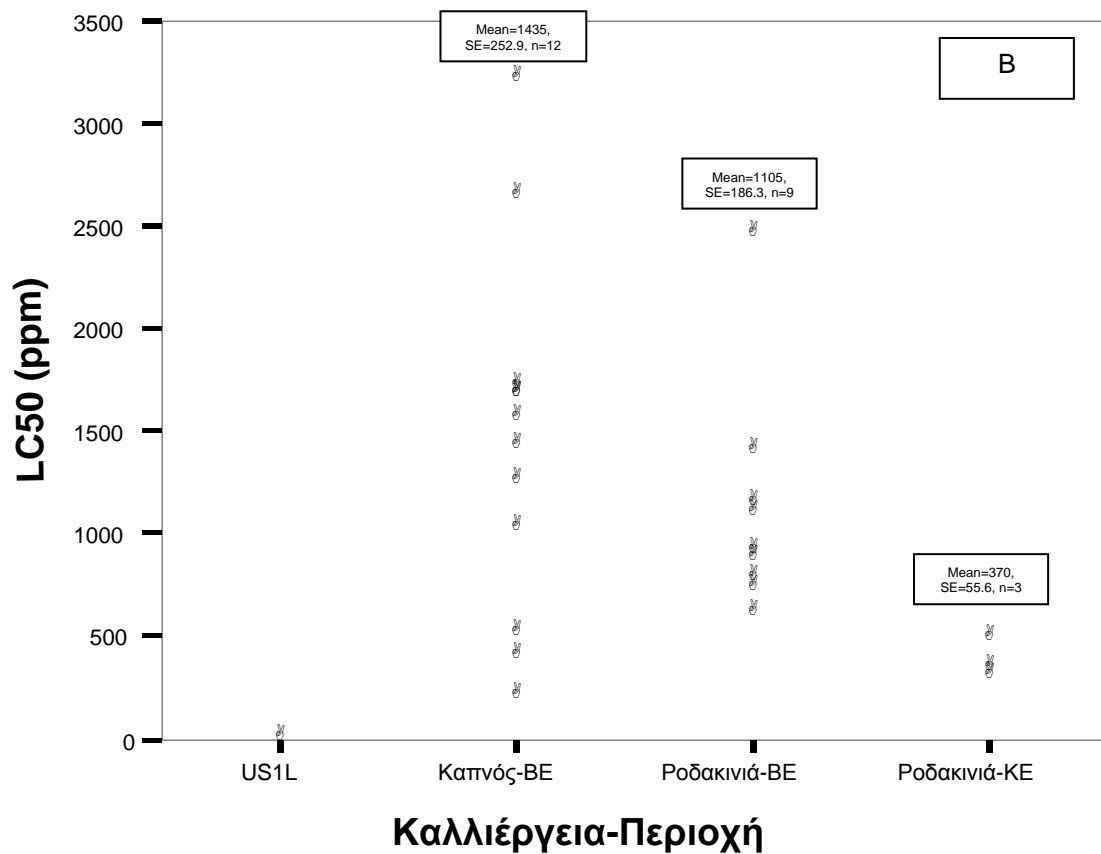
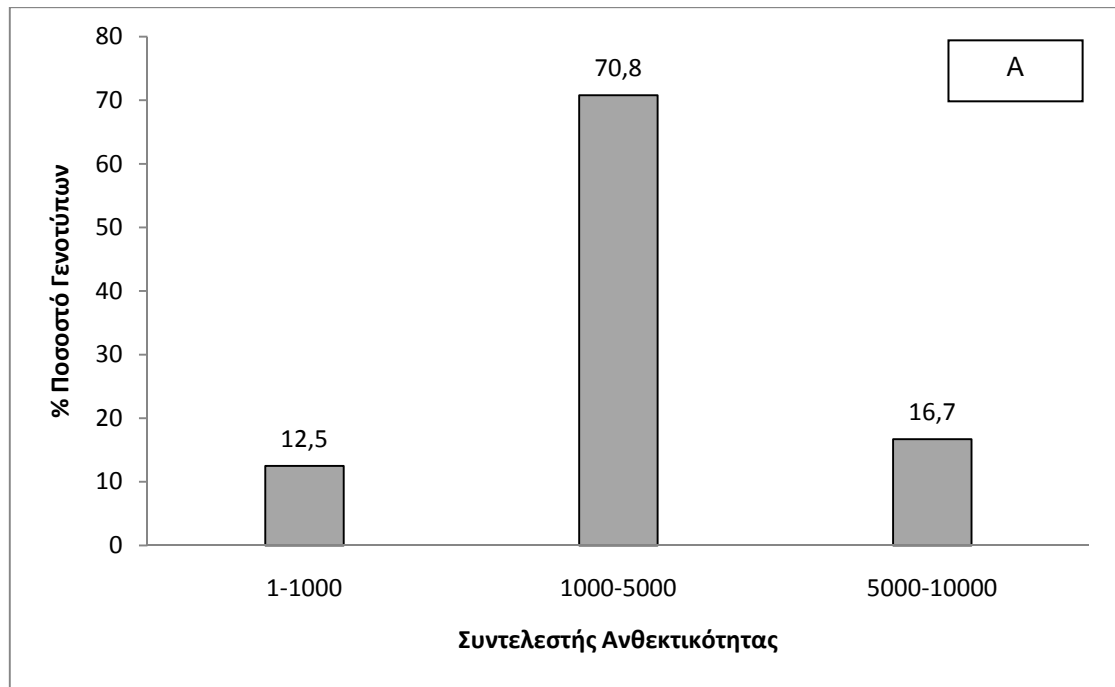
Η σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων που συλλέχθηκαν από καλλιέργειες ροδακινιάς της βόρειου Ελλάδας (n= 26), της κεντρικής Ελλάδας (n= 17), από καπνό στην βόρεια Ελλάδα (n= 44) και καπνό από την νότια και κεντρική Ελλάδα (n= 13) έδειξε ότι υπάρχουν στατιστικές διαφορές ($F=7.07$; $df=3, 96$; $p<0.001$). Το Tukey's test έδειξε ότι τα δείγματα του προέρχονται από ροδακινίες από τη Βόρεια Ελλάδα διέφεραν στατιστικώς από αυτά που προέρχονται από ροδακινίες της Κεντρικής Ελλάδας, ενώ τα δείγματα που προέρχονται από καπνό από την Βόρεια και την Νότια και Κεντρική Ελλάδα δεν διέφεραν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

Για τον υπολογισμό του ΣΑ χρησιμοποιήθηκε ως κλώνος αναφοράς ο ευαίσθητος εργαστηριακός κλώνος US1L. Το 64 % των εξετασθέντων δειγμάτων που εξετάστηκαν (n= 100) ταξινομήθηκε στην κατηγορία χαμηλής ανοχής (με τιμές ΣΑ μεταξύ 1 και 10). Στοιχεία ανάπτυξης μέτριας ανοχής παρατηρήθηκαν στο 33 % των δειγμάτων, με τιμές ΣΑ μεταξύ 10 και 20. Επιπρόσθετα, ένα μικρό ποσοστό 3 % έδωσε ενδείξεις ανάπτυξης ανθεκτικότητας με τιμές ΣΑ μεταξύ 20 και 26. Τα δείγματα αυτά προέρχονταν κυρίως από τη Βόρεια Ελλάδα.

Επίσης, πραγματοποιήθηκαν 24 βιοδοκιμές με το οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο chlorpyrifos methyl, από τις οποίες 12 από αυτές διεξήχθησαν με αφίδες από οπωρώνες ροδακινιάς και 12 με αφίδες από χωράφια καπνού. Σε αυτές από οπωρώνες ροδακινιάς, η μέγιστη μέση θανατηφόρος συγκέντρωση LC₅₀ ανήλθε στα 2450.1 ppm (περιοχή Μελίκης) ενώ η ελάχιστη στα 299.1 ppm (περιοχή Λεχωνίων).



Σχήμα 5. (Α) Συχνότητα των Συντελεστών Ανθεκτικότητας σε βιοδοκιμές με το methamidophos και (β) LD50 (σε ppm) στους πληθυσμούς του *Myzus persicae* που εξετάστηκαν με methamidophos. n = αριθμός που εξετάστηκαν. KE, BE, NE, = Κεντρική, Βόρεια, Νότια, Ελλάδα αντίστοιχα. Συντελεστής Ανθεκτικότητας με βάση τον πιο ευαίσθητο πληθυσμό (US1L).



Σχήμα 6. (Α) Συχνότητα των Συντελεστών Ανθεκτικότητας σε βιοδοκιμές με το chlorpyrifos methyl και (β) LD50 (σε ppm) στους πληθυσμούς του *Myzus persicae* που εξετάστηκαν με chlorpyrifos methyl. n = αριθμός που εξετάστηκαν. KE, BE, = Βόρεια, Κεντρική, Ελλάδα, αντίστοιχα. Συντελεστής Ανθεκτικότητας με βάση τον πιο ευαίσθητο πληθυσμό (US1L).

Οι αντίστοιχες τιμές για τα χωράφια καπνού είναι 3207 ppm (περιοχή Μελίκης) και 203.5 ppm (περιοχή Κατερίνης). Οι τιμές της κάθε βιοδοκιμής, δίνονται συγκεντρωτικά στο Σχήμα 6.

Η στατιστική ανάλυση στην περίπτωση του chlorpyrifos methyl δεν έδειξε την ύπαρξη στατιστικής σημαντικών διαφορών μεταξύ των δειγμάτων που συλλέχθηκαν από καλλιέργειες ροδακινιάς της Βόρειου Ελλάδος, με αυτά της Κεντρικής Ελλάδος και καπνού της Βορείου Ελλάδος ($F = 2.69$; $df=2, 21$; $p<0.091$). Σε όλα τα δείγματα ο ΣΑ ήταν αρκετά μεγάλος μιας και αυτός κυμάνθηκε από 602 έως 9484. Για τον υπολογισμό του ΣΑ χρησιμοποιήθηκε ως κλώνος αναφοράς ο ευαίσθητος εργαστηριακός κλώνος US1L.

Ανθεκτικότητα σε πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα

Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 70 βιοδοκιμές με τη πυρεθρίνη bifenthrin. Από αυτές, 30 διεξήχθησαν με αφίδες που συλλέχθηκαν από οπωρώνες ροδακινιάς και 40 με αφίδες που συλλέχθηκαν από καπνό. Στις βιοδοκιμές με αφίδες που προήλθαν από οπωρώνες ροδακινιάς, η μέγιστη μέση θανατηφόρος συγκέντρωση LC_{50} ήταν 0.653 ppm ενώ η ελάχιστη 0.013 ppm. Οι αντίστοιχες τιμές για τα χωράφια καπνού αντίστοιχα ήταν 0.347 ppm και 0.052 ppm αντίστοιχα. Οι τιμές LC_{50} της κάθε βιοδοκιμής δίνονται συγκεντρωτικά στο Σχήμα 7.

Η στατιστική ανάλυση έδειξε την ύπαρξη στατιστικής σημαντικών διαφορών μεταξύ των δειγμάτων της αφίδας από ροδακινιές με προέλευση τη Βόρεια Ελλάδα, την Κεντρική Ελλάδα, καπνό από την Βόρεια Ελλάδα και καπνό από τη Νότια και Κεντρική Ελλάδα ($F = 8.10$; $df=3, 66$; $p<0.001$). Το Tukey's test έδειξε ότι τα δείγματα του προέρχονται από ροδακινιές από την Κεντρική Ελλάδα διέφεραν στατιστικώς από όλα τα άλλα δείγματα που προέρχονται είτε από ροδακινιές της Βόρειας Ελλάδας, καπνό από την Βόρεια και τη Νότια και Κεντρική Ελλάδα, που δεν διέφεραν μεταξύ τους.

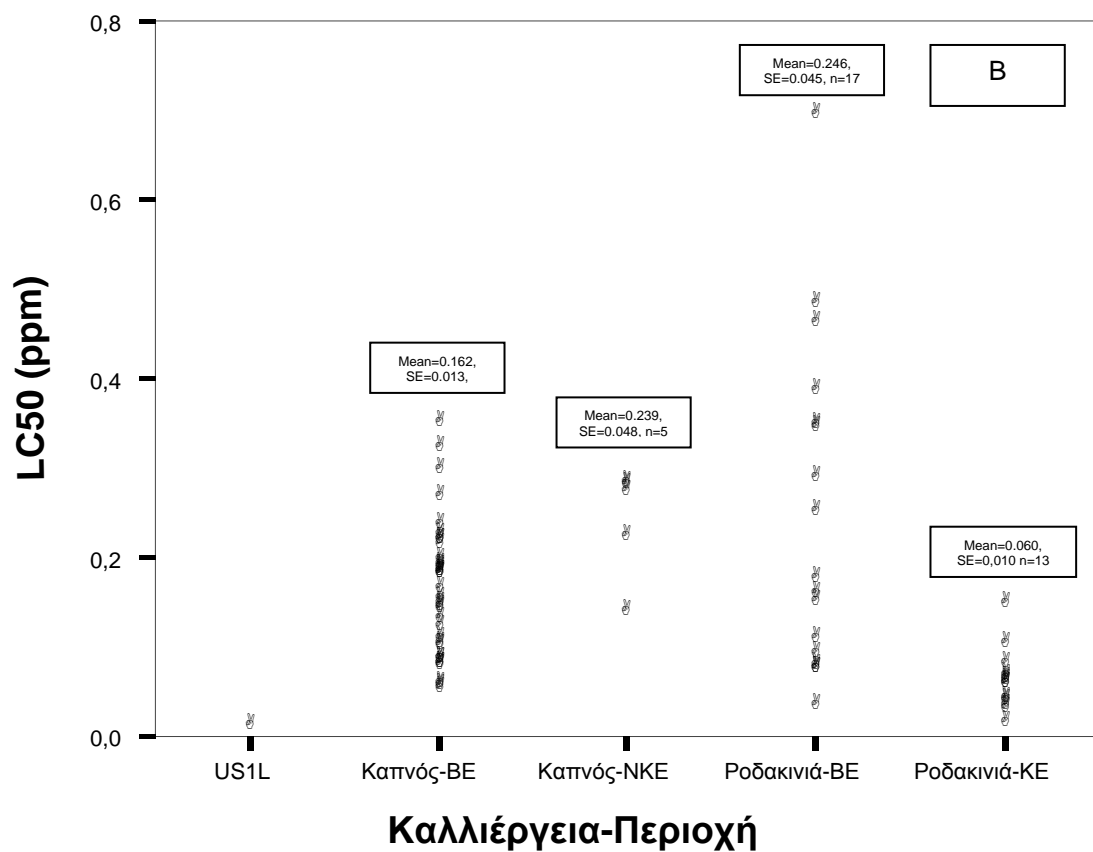
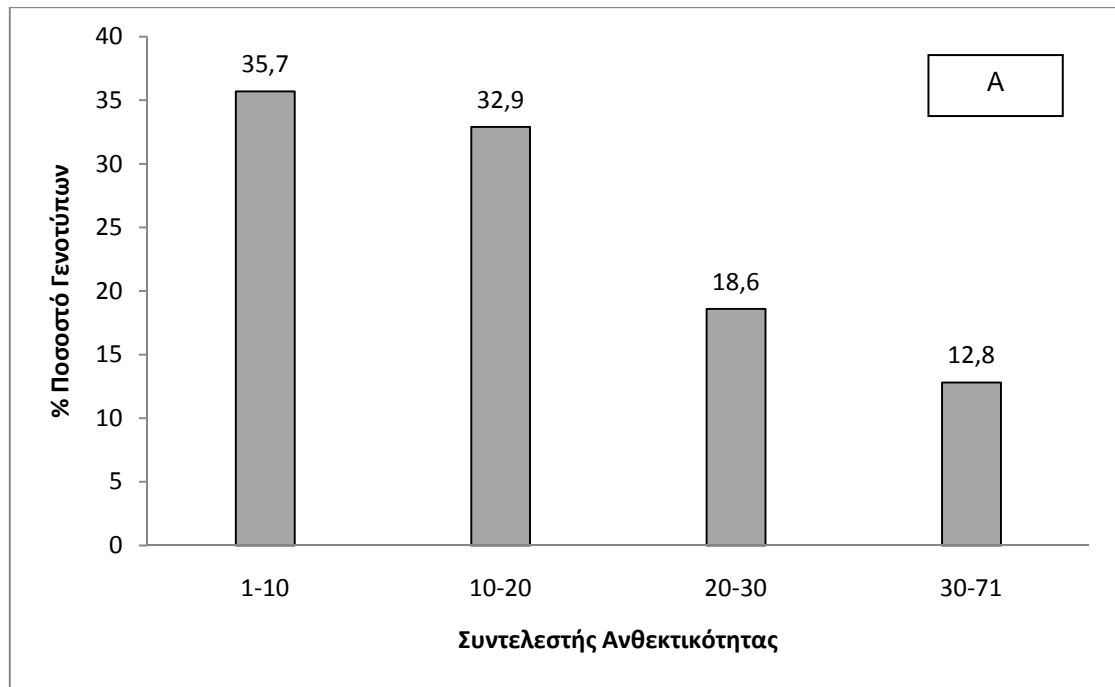
Για τον υπολογισμό του ΣΑ χρησιμοποιήθηκε ως κλώνος αναφοράς ο ευαίσθητος εργαστηριακός κλώνος US1L. Το 35.7 % των εξετασθέντων δειγμάτων ($n= 70$), ταξινομήθηκε στην κατηγορία χαμηλής ανοχής (με τιμές

ΣΑ μεταξύ 1 και 10). Ανάπτυξη μέτριας ανοχής παρατηρήθηκε στο 32.9 % των δειγμάτων, με τιμές ΣΑ 10 - 20. Επιπρόσθετα, το 18,6 % έδωσε τιμές ΣΑ μεταξύ 20 - 30, ενώ στο 12.8 % παρατηρήθηκε ισχυρή ανθεκτικότητα με τιμές ΣΑ από 30 μέχρι 71. Τα δείγματα αυτά προέρχονταν κυρίως από τη Β. Ελλάδα.

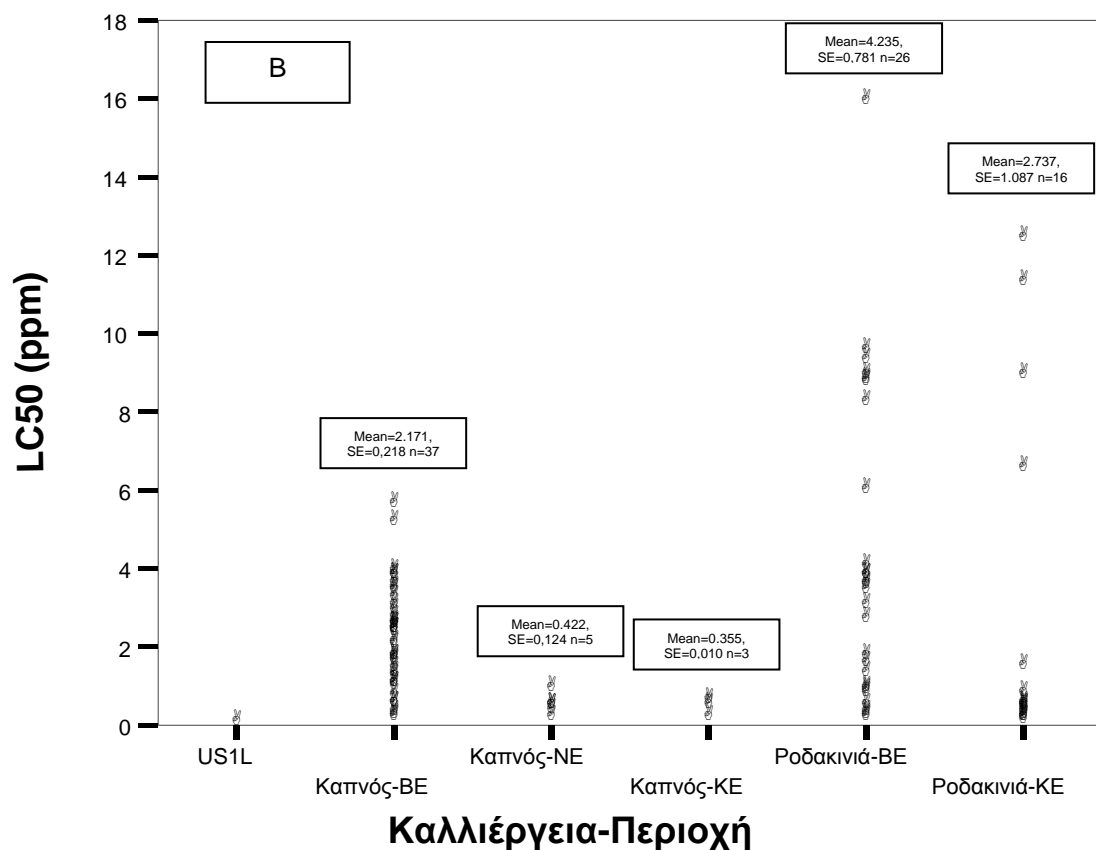
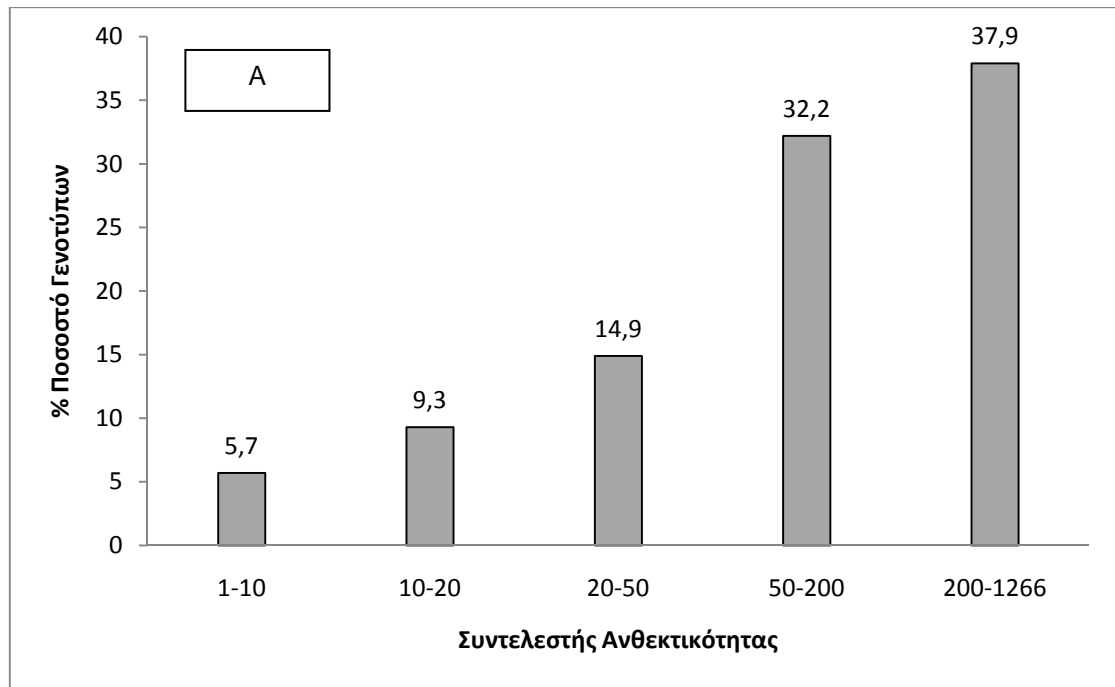
Όσον αφορά το πυρεθρινοειδές deltamethrin πραγματοποιήθηκαν συνολικά 87 βιοδοκιμές. Από αυτές, 42 διεξήχθησαν με αφίδες από οπωρώνες ροδακινιάς και 45 με αφίδες από χωράφια καπνού. Στις βιοδοκιμές με αφίδες από οπωρώνες ροδακινιάς, η μέγιστη LC₅₀ ανήλθε στα 15.84 ppm (Μελίκη) ενώ η ελάχιστη στα 0.05 ppm (Λεχώνια). Οι αντίστοιχες τιμές για τα δείγματα από καπνό ήταν 5.56 ppm (Κοζάνη) και 0.01 ppm (Μελίκη) αντίστοιχα. Οι τιμές της κάθε βιοδοκιμής δίνονται συγκεντρωτικά στο Σχήμα 8.

Η στατιστική ανάλυση έδειξε την ύπαρξη στατιστικής σημαντικών διαφορών μεταξύ των δειγμάτων της αφίδας από ροδακινιές με προέλευση τη Βόρεια Ελλάδα, την Κεντρική Ελλάδα, καπνό από την Βόρεια Ελλάδα και καπνό από τη Νότια και Κεντρική Ελλάδα ($F = 4.24; df=3, 83; p<0.008$). Το Tukey's test έδειξε ότι τα δείγματα του προέρχονται από ροδάκινα από την Βόρεια Ελλάδα διέφεραν στατιστικώς από όλα τα άλλα δείγματα που προέρχονται από καπνό από τη Βόρεια και τη Νότια και Κεντρική Ελλάδα, όπου δεν διέφεραν μεταξύ τους.

Για τον υπολογισμό του ΣΑ χρησιμοποιήθηκε ως κλώνος αναφοράς ο ευαίσθητος εργαστηριακός κλώνος US1L. Το 5.7 % των εξετασθέντων δειγμάτων (n= 87), ταξινομήθηκε στην κατηγορία χαμηλής ανοχής (με τιμές ΣΑ 1 - 10). Ανάπτυξη μέτριας ανοχής παρατηρήθηκε στο 9.2 % των δειγμάτων, με τιμές ΣΑ 10 - 20. Το 14.9 % είχε ΣΑ 20 - 50, ενώ στο 32.2 % παρατηρήθηκε ισχυρή ανθεκτικότητα με τιμές ΣΑ 50 - 200, το 37.9% παρουσίασε ισχυρή ανθεκτικότητα με τιμές ΣΑ 200 - 1266. Τα δείγματα αυτά προέρχονταν κυρίως από ροδακινιές της Βορείου Ελλάδος.



Σχήμα 7. (A) Συχνότητα των Συντελεστών Ανθεκτικότητας σε βιοδοκιμές με το bifethrin και (B) LC_{50} (σε ppm) στους πληθυσμούς του *Myzus persicae* που εξετάστηκαν με bifethrin. n = αριθμός που εξετάστηκαν. NKE, BE, = Κεντρική & Νότια, Βόρεια, Ελλάδα, αντίστοιχα. Συντελεστής Ανθεκτικότητας με βάση τον πιο ευαίσθητο πληθυσμό (US1L).



Σχήμα 8. (Α) Συχνότητα των Συντελεστών Ανθεκτικότητας σε βιοδοκιμές με το deltamethrin και (β) LC₅₀ (σε ppm) στους πληθυσμούς του *Myzus persicae* που εξετάστηκαν με deltamethrin. n = αριθμός που εξετάστηκαν. KE, BE, NE, = Βόρεια, Κεντρική, Νότια Ελλάδα, αντίστοιχα. Συντελεστής Ανθεκτικότητας με βάση τον πιο ευαίσθητο πληθυσμό (US1L).

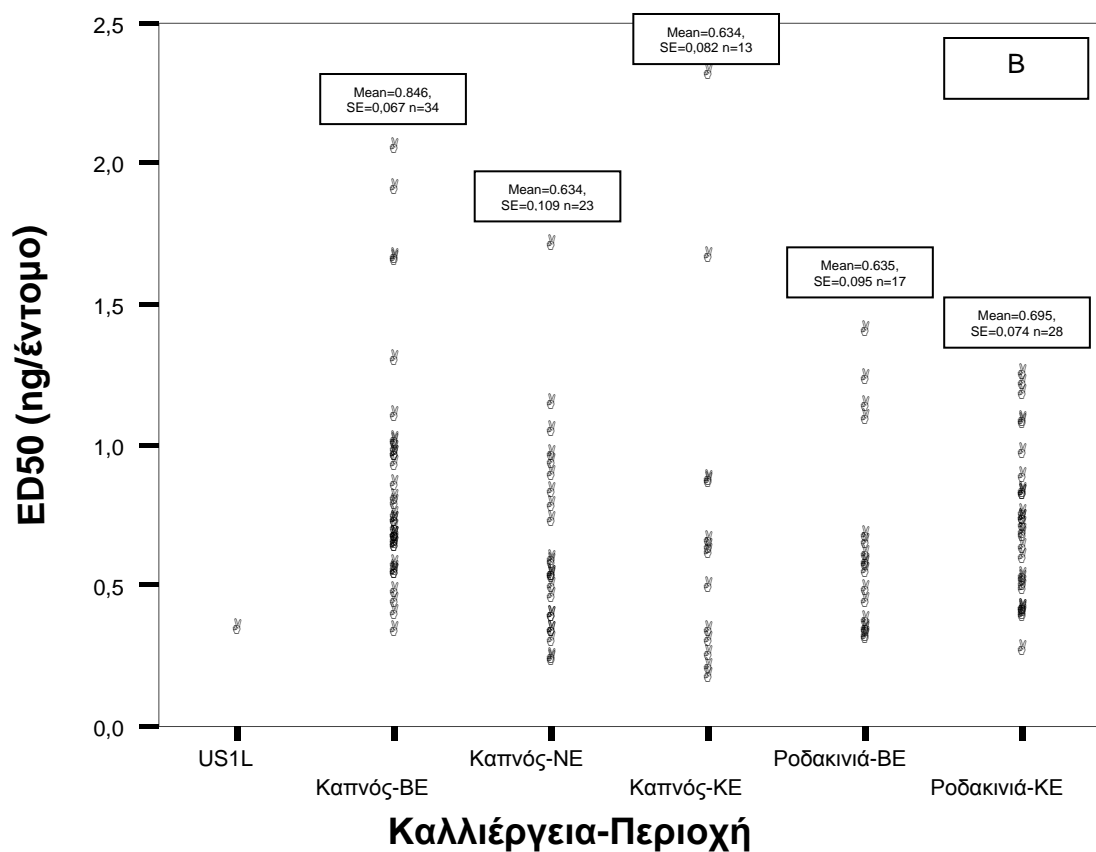
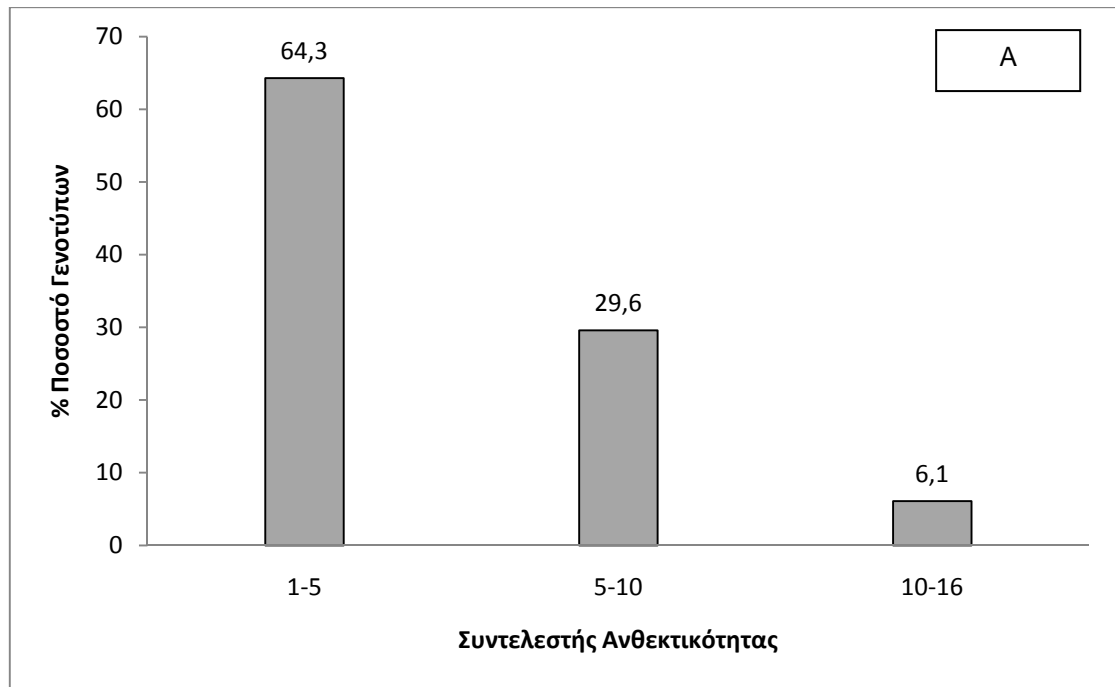
Καταγραφή της ανθεκτικότητας του *Myzus persicae* σε εντομοκτόνα με τη μέθοδο της τοπικής εφαρμογής

Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 115 βιοδοκιμές με τη μέθοδο της τοπικής εφαρμογής με τεχνικώς καθαρή ουσία του εντομοκτόνου imidacloprid σε κλώνους της αφίδας *M. persicae* από οπωρώνες ροδακινιάς και φυτείες καπνού της Ελλάδος. Σαράντα πέντε προέρχονταν από οπωρώνες ροδακινιάς 70 από καπνό. Στις βιοδοκιμές με αφίδες από οπωρώνες ροδακινιάς η μέγιστη μέση θανατηφόρος δόση ήταν 1.35 ng/έντομο (σε κλώνο από τη Μελίκη) ενώ η ελάχιστη 0.25 ng/έντομο (σε κλώνο από τα Λεχώνια). Οι αντίστοιχες τιμές για κλώνους από καπνό ήταν 2.30 ng/έντομο και 0.15 ng/έντομο (κλώνοι από την Καρδίτσα). Οι τιμές της κάθε βιοδοκιμής δίνονται συγκεντρωτικά στο Σχήμα 9.

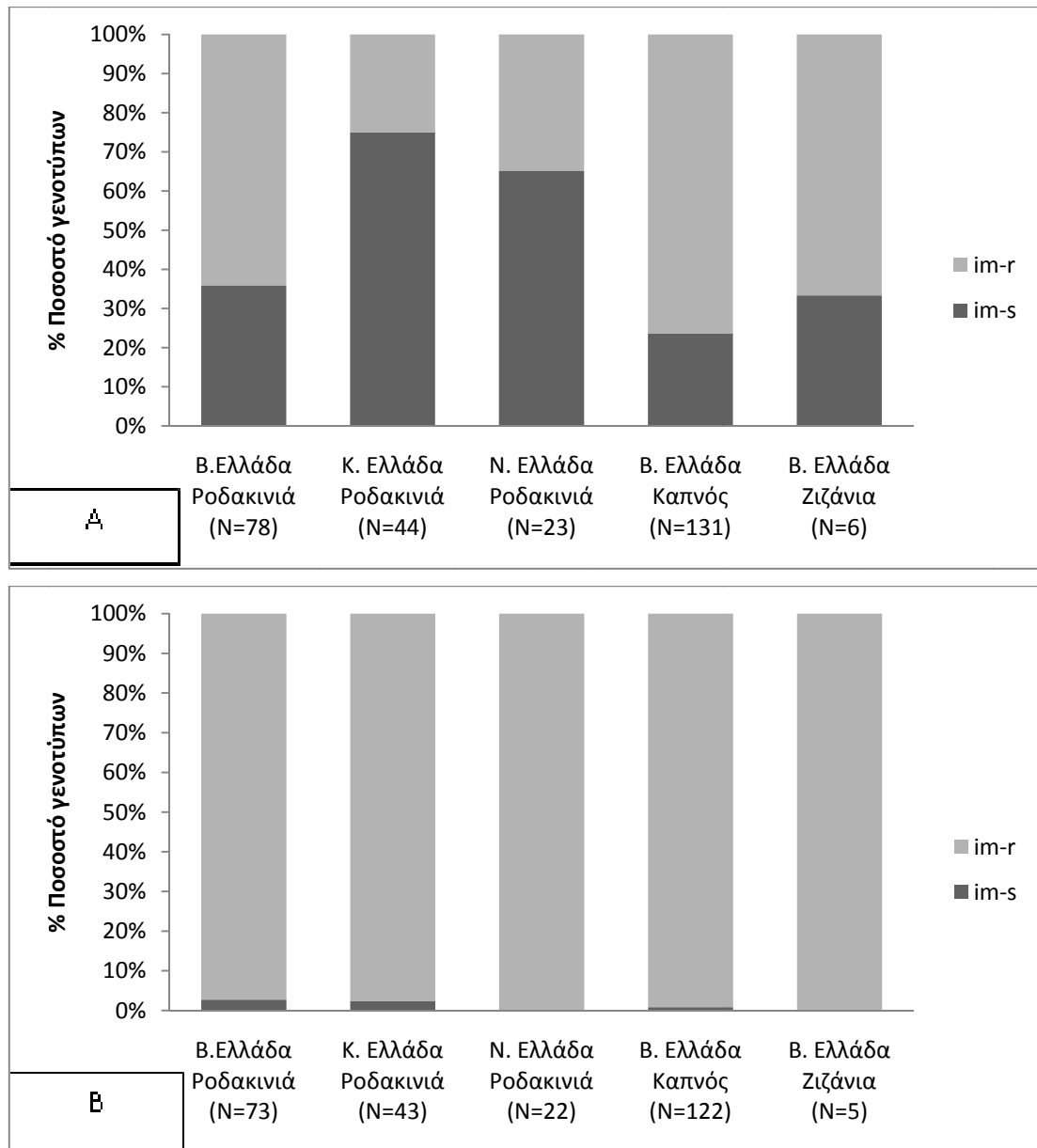
Η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε την ύπαρξη στατιστικώς σημαντικών διαφορών μεταξύ των δειγμάτων της αφίδας από ροδακινιές και προέλευση τη Βόρεια, την Κεντρική Ελλάδα, τον καπνό από τη Βόρεια Ελλάδα, την Κεντρική Ελλάδα και τη Νότια Ελλάδα ($F = 1.38$; $df=4, 110$; $p<0.245$).

Για τον υπολογισμό του ΣΑ χρησιμοποιήθηκε ως κλώνος αναφοράς ο πιο ευαίσθητος κλώνος 05KarT11. Το μεγαλύτερο ποσοστό ίσο με 64,3 % επί του συνολικού αριθμού των κλώνων που εξετάστηκαν ($n= 115$) ταξινομήθηκε στην κατηγορία χαμηλής ανοχής (με τιμές ΣΑ μεταξύ 1 και 5), ενώ μόνο το 29,6 % των κλώνων έδειξε ΣΑ μεταξύ 5 – 10, ενώ το 6,1 % είχε ΣΑ από 10 - 16.

Οι βιοδοκιμές με τις διαγνωστικές δόσεις στο imidacloprid (2,25 ng/έντομο και 0,42 ng/έντομο) έδειξε για τη μια δόση αναφοράς (0,42 ng/έντομο) ότι σχεδόν όλα τα δείγματα είναι μη ευαίσθητα. Αντίθετα, η άλλη δόση αναφοράς (2,25 ng/έντομο) έδειξε ότι στη βόρεια Ελλάδα έχουν επικρατήσει οι μη ευαίσθητοι κλώνοι (76%, 67% και 64% για καπνά, ζιζάνια και ροδάκινα αντίστοιχα), ενώ στην κεντρική και νότια Ελλάδα τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν πολύ μικρότερα (25% και 35% για ροδάκινα στην κεντρική και Νότια Ελλάδα αντίστοιχα) με τα δείγματα να διαφέρουν μεταξύ τους ανά περιοχή ($\chi^2 = 31,50$, $df=4$, $p<0,001$).



Σχήμα 9. (Α) Συχνότητα των Συντελεστών Ανθεκτικότητας σε βιοδοκιμές με το imidacloprid και (β) ED50 (σε ng/έντομο) στους πληθυσμούς του *Myzus persicae* που εξετάστηκαν με τη μέθοδο της τοπικής εφαρμογής στο imidacloprid. n = αριθμός που εξετάστηκαν. KE, BE, NE, = Βόρεια, Κεντρική, Νότια Ελλάδα, αντίστοιχα. Συντελεστής Ανθεκτικότητας με βάση τον πιο ευαίσθητο πληθυσμό (05KarT11).



Σχήμα 10. Κατηγορίες ανθεκτικότητας με βάση τη θνησιμότητα στο imidaclorpid σε κλώνους του *M. persicae* που συλλέχθηκαν μεταξύ των ετών 2005 έως 2007 από διάφορες περιοχές και καλλιέργειες της Ελλάδας. (Α) 2,25ng/έντομο (Β) 0,42ng/έντομο. N = αριθμός κλωνικών σειρών που εξετάστηκαν. Κ.Ελλάδα Ροδακινιά: Βελεστίνο & Λεχώνια, Β.Ελλάδα Ροδακινιά: Μελίκη & Κατερίνη, Ν.Ελλάδα Ροδακινιά: Προσύμνη Αργολίδος, Β. Ελλάδα Καπνός: Μελίκη & Κατερίνη, Β. Ελλάδα Ζιζάνια: Μελίκη, (im-s: ευαίσθητος, im-r: μη ευαίσθητος κλώνος)

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν βιοδοκιμές με την ουσία thiacloprid (τεχνικώς καθαρή ουσία thiacloprid) σε 78 κλώνους της αφίδας *M. persicae*. Σαράντα έξι κλώνοι προέρχονταν από σπυρώνες ροδακινιάς και 32 από καπνό. Στις βιοδοκιμές με κλώνους που προήλθαν από σπυρώνες

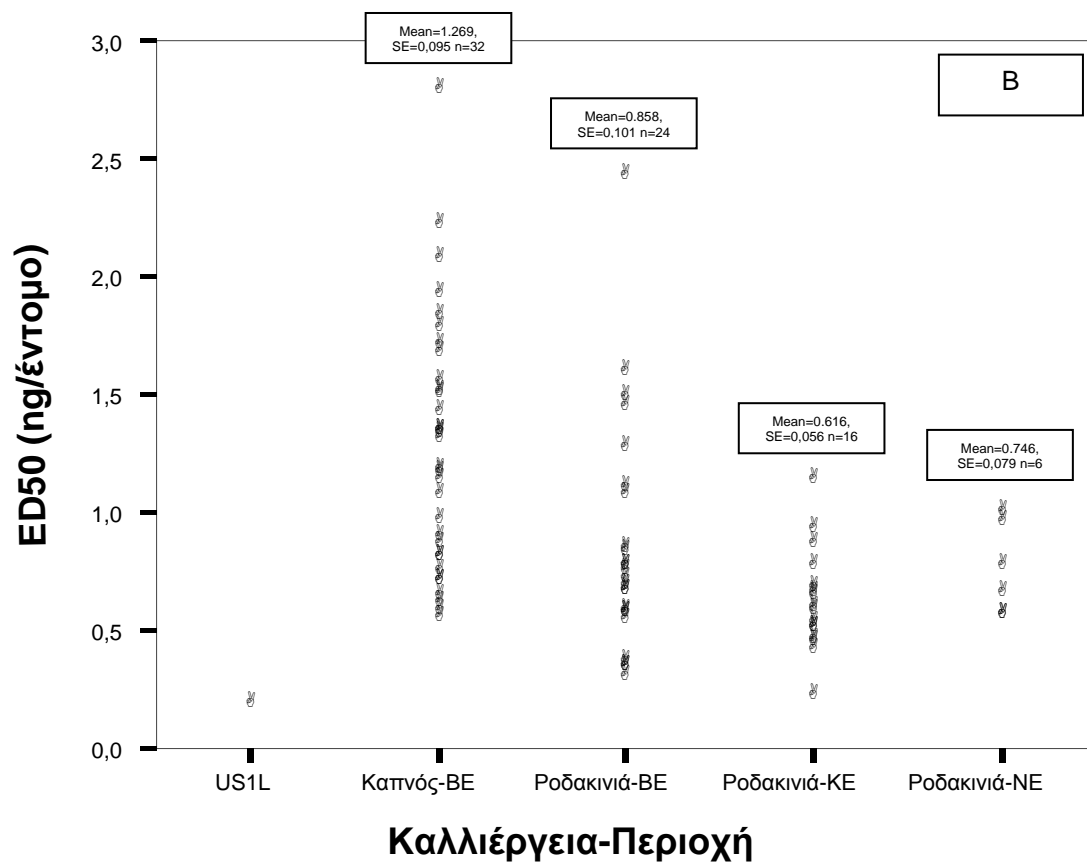
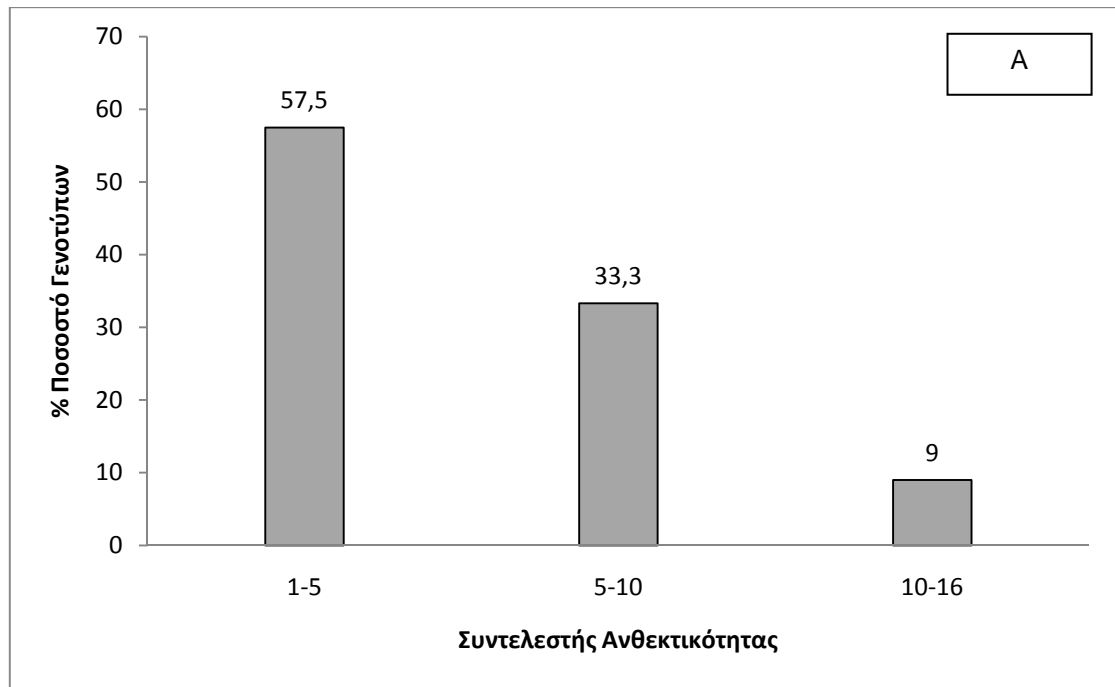
ροδακινιάς, η μέγιστη ED₅₀ ανήλθε στα 2.42 ng/έντομο (κλώνος από Μελίκη) ενώ η ελάχιστη στα 0.21 ng/έντομο (κλώνος από Λεχώνια). Οι αντίστοιχες τιμές για κλώνους από καπνό είναι 2.79 ng/έντομο (κλώνος από Μελίκη) και 0.55 ng/έντομο (κλώνος από Κοζάνη). Οι τιμές της κάθε βιοδοκιμής για κάθε κλώνο φαίνονται στο Σχήμα 11.

Η στατιστική ανάλυση έδειξε την ύπαρξη στατιστικώς σημαντικών διαφορών μεταξύ των κλώνων της αφίδας από ροδακινίες της Βόρειας, Κεντρικής, Νότιας Ελλάδα και καπνού της Βόρειας Ελλάδας ($F = 8.66$; $df=3, 74$; $p<0.001$). Το Tukey's test έδειξε ότι τα δείγματα του προέρχονται από καπνό από τη Βόρεια Ελλάδα διέφεραν στατιστικώς από αυτά που προέρχονται από ροδακινίες της Βόρειας, Κεντρικής και Νότιας Ελλάδας, ενώ τα δείγματα που προέρχονται από ροδακινίες από τη Βόρεια, Κεντρική και Νότια Ελλάδα δεν διέφεραν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

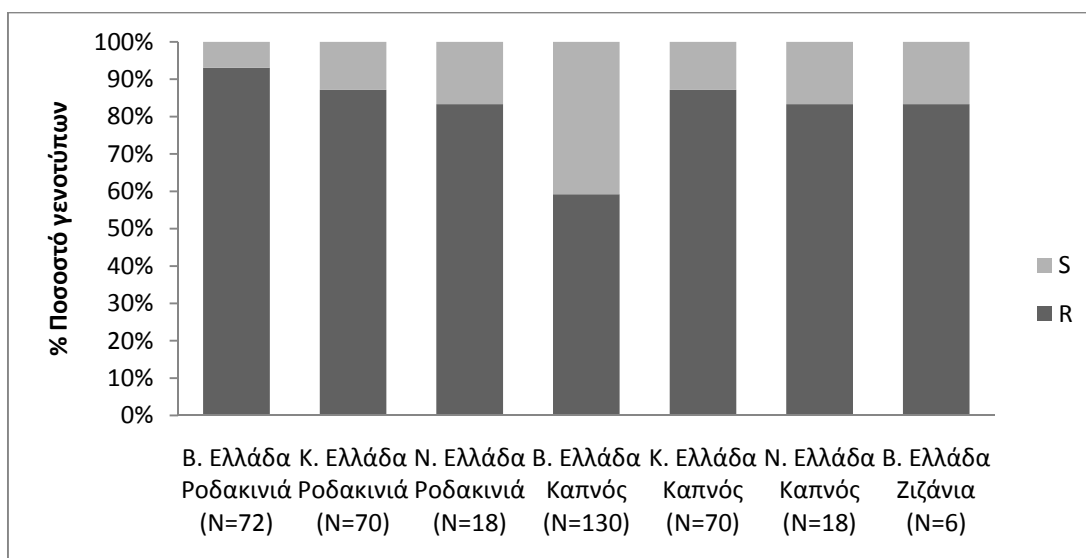
Για τους κλώνους από ροδακινιά, οι τιμές του ΣΑ κυμαίνονταν από 1.2 (Λεχώνια) ως 13.6 (Μελίκη), ενώ για αυτούς από καπνό από 3.1 (Κοζάνη) ως 15.7 (Μελίκη). Το 91 % των εξετασθέντων κλώνων ($n= 78$) ταξινομήθηκε στην κατηγορία χαμηλής ανοχής (με τιμές ΣΑ μεταξύ 1 και 5), ενώ μόνο το 33,3 % των κλώνων έδειξε ΣΑ μεταξύ 5 – 10, ενώ το 9 % είχε ΣΑ από 10 -16.

Για τον έλεγχο της kdr ανθεκτικότητας εφαρμόστηκε με τοπική εφαρμογή, διαγνωστική δόση DDT σε 362 κλώνους από ροδακινιά (160), καπνό (196) και ζιζάνια (6) από διάφορες περιοχές της Ελλάδας.

Στην ροδακινιά (Σχήμα 12) παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά μη ευαίσθητων κλώνων, όπου κυμάνθηκαν από 83% στη Νότια Ελλάδα ως 93% στη Βόρεια Ελλάδα. Αντίθετα, χαμηλότερα ποσοστά παρατηρήθηκαν στον καπνό στη Βόρεια Ελλάδα (59%). Τα αντίστοιχα ποσοστά στην κεντρική και νότια Ελλάδα ήταν 79% και 87%. Το 83% των κλώνων από ζιζάνια ήταν μη ευαίσθητοι. Συνολικά για τους κλώνους που προέρχονται από καπνό ($N=196$) το 33% βρέθηκε ευαίσθητο, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τους κλώνους που προέρχονται από ροδακινίες ($N=160$) βρέθηκε ακόμα μικρότερο περί του 11%. Στατιστικώς σημαντικές διαφορές βρέθηκαν ανάμεσα στις περιοχές και τις καλλιέργειες ($\chi^2=43.63$, $df=6$; $p<0,001$).



Σχήμα 11. Συχνότητα των Συντελεστών Ανθεκτικότητας σε βιοδοκιμές με το thiacloprid και (β) ED50 (σε ng/έντομο) στους πληθυσμούς του *Myzus persicae* που εξετάστηκαν με τη μέθοδο της τοπικής εφαρμογής στο thiacloprid. n = αριθμός που εξετάστηκαν. KE, BE, NE, = Βόρεια, Κεντρική, Νότια Ελλάδα, αντίστοιχα. Συντελεστής Ανθεκτικότητας με βάση τον πιο ευαίσθητο πληθυσμό (US1L).



Σχήμα 12. Κατηγορίες ανθεκτικότητας με βάση τη θνησιμότητα στο DDT σε πληθυσμούς του *Myzus persicae* που συλλέχθηκαν τα έτη 2005 - 2007 από διάφορες περιοχές και καλλιέργειες της Ελλάδας. N = ο αριθμός κλώνων που εξετάστηκαν. (S: ευαίσθητος, R: μη ευαίσθητος)

Διερεύνηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας στην αφίδα M. persicae με βιοχημικές και μοριακές μεθόδους.

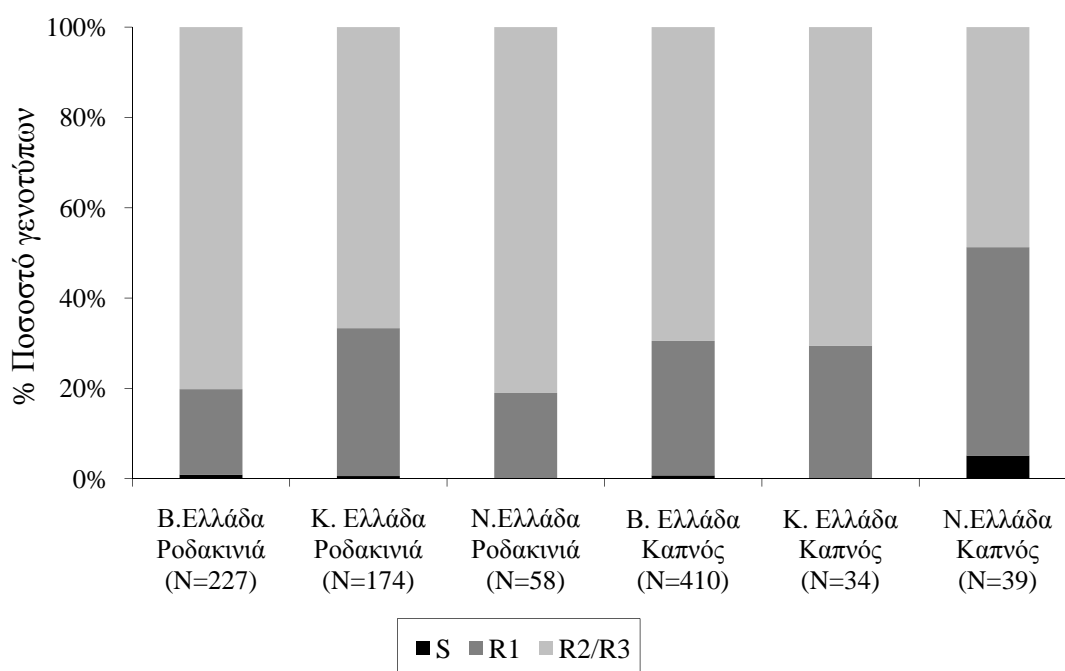
Εκτίμηση της ενζυματικής δραστηριότητας των ολικών εστερασών.

Από τα αποτελέσματα βρέθηκε ότι μόνο το 0,8% των κλώνων συνολικά τα έτη 2005, 2006 και 2007 ήταν ευαίσθητοι (S) από τους 942 συνολικά που ελέχθησαν στην Ελλάδα, ενώ το 27,7% βρέθηκαν μετρίως ανθεκτικοί (R1) και το 71,4% πολύ και πάρα πολύ ανθεκτικοί (R2/R3) (Πίνακας 3 και Σχήμα 13).

Συνολικά από τους κλώνους που προέρχονται από ροδακινιά τα χρόνια της έρευνας μόνο το 0,7% από τα 459 συνολικά εξετασμένα ήταν ευαίσθητοι, ενώ το 24,2% μετρίως ανθεκτικοί (R1) και το 75,1% πολύ ως πάρα πολύ ανθεκτικοί (R2/R3). Πιο συγκεκριμένα στα δείγματα που προέρχονταν από ροδάκινα της Β. Ελλάδας παρατηρήθηκε ο ευαίσθητος γενότυπος (S) με ποσοστό 0,9%, ο μετρίως ανθεκτικός (R1) με ποσοστό 18,9% και ο ανθεκτικός όσο και ο πολύ ανθεκτικός (R3/R2) γενότυπος σε ποσοστό 80,2%.

Στους πληθυσμούς από ροδακινιές της Κ. Ελλάδας, τα ποσοστά εμφάνισης των γενοτύπων S, R1, R2/R3 ήταν αντίστοιχα 0,6%, 32,8% και 66,7%, ενώ στα δείγματα από ροδακινιές της Ν. Ελλάδας, τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 0%, 19%, 81% (Σχήμα 13).

Τα δείγματα που προέρχονταν από καπνό τα τρία χρόνια της έρευνας μόνο το 1% από τους 483 συνολικά κλώνους ήταν ευαίσθητοι, ενώ το 31,1% βρέθηκαν μετρίως ανθεκτικοί (R1) και το 67,1% πολύ και πάρα πολύ ανθεκτικοί (R2/R3). Στα δείγματα που προέρχονταν από την Β. Ελλάδα παρατηρήθηκε ο ευαίσθητος γενότυπος (S) σε ποσοστό 0,7%, ενώ 29,8% και 69,5% παρατηρήθηκαν οι γενότυποι R1 και R2/R3 αντίστοιχα. Στα δείγματα από καπνό της Κ. Ελλάδας, τα ποσοστά εμφάνισης των γενοτύπων S, R1 και R2/R3 ήταν αντίστοιχα 0%, 29,4% και 70,6% ενώ τα δείγματα από καπνό της Ν. Ελλάδας, τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 5,1%, 46,2% και 48,7% (Πίνακας Σχήμα 13).



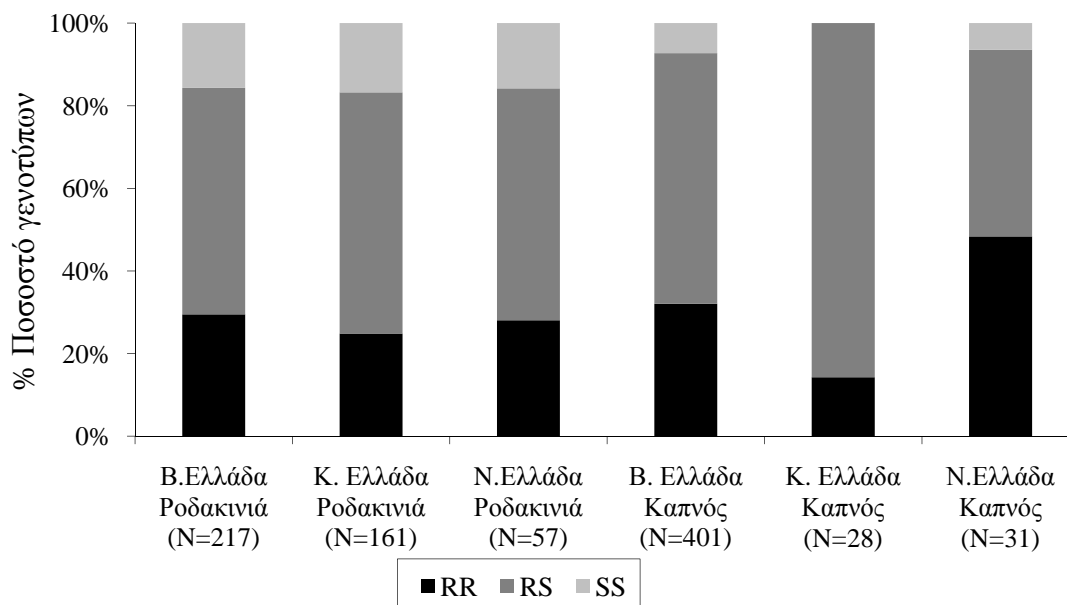
Σχήμα 13. Κατηγορίες ανθεκτικών φαινοτύπων με βάση την ενζυματική δραστηριότητα ολικών εστερασών σε πληθυσμούς *Myzus persicae* που συλλέχθηκαν από διάφορες περιοχές και καλλιέργειες της Ελλάδας τα έτη 2005 - 2007. N = αριθμός εξετασθέντων κλώνων. Κ.Ελλάδα Ροδακινιά: Μαγνησία, Κ. Ελλάδα Καπνός: Καρδίτσα.

Εκτίμηση της ενζυματικής δραστηριότητας της ακετυλχολινεστεράσης (AChE)

Για τον προσδιορισμό της δραστικότητας της AChE εξετάστηκαν συνολικά 895 κλώνοι από διάφορες περιοχές (Βόρεια, Κεντρική και Νότια Ελλάδα) και καλλιέργειες (ροδακινιά και καπνός). Από τους κλώνους αυτούς μόνο το 11,1% βρέθηκε ευαίσθητο (SS), το 60,1% ετερόζυγο (RS) και το 28,8% βρέθηκε ομοζύγωτο ανθεκτικό (RR).

Οι κλώνοι που συλλέχθηκαν από ροδακινιά βρέθηκαν σε ποσοστό 16,1% ευαίσθητοι (SS), το 56,3% βρέθηκε ετερόζυγο (RS) και το 27,6% βρέθηκε ομοζύγωτο ανθεκτικό (RR). Πιο συγκεκριμένα, στα δείγματα των κλώνων από ροδακινιά, που προέρχονταν από τη Β. Ελλάδα παρατηρήθηκε ο ευαίσθητος γενότυπος (SS) σε ποσοστό 15,7%, ενώ ο γενότυπος που παρατηρήθηκε με τη μεγαλύτερη συχνότητα ήταν ο ετερόζυγος (RS) με ποσοστό 54,8%. Γενότυποι (RR) παρατηρήθηκαν σε ποσοστό 29,5%. Ίδια εικόνα παρουσιάστηκε στα δείγματα από ροδακινιές της Κ. Ελλάδας. Σε αυτά, τα ποσοστά εμφάνισης των γενότυπων SS, RS και RR ήταν αντίστοιχα 16,8%, 58,4% και 24,8% και φάνηκε να επικρατεί ο ετερόζυγος γενότυπος. Στα δείγματα από ροδακινιά της Ν. Ελλάδας, τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 15,8 %, 56,1% και 28,1% (Πίνακας 3 και Σχήμα 14).

Αναφορικά με τα δείγματα που συλλέχθηκαν από καπνό, ο γενότυπος που φάνηκε να επικρατεί ήταν επίσης ο ετεροζύγος ανθεκτικός (RS). Οι συχνότητες εμφάνισης των ομοζυγωτικών (RR) γενότυπων ήταν υψηλές στην Ν. Ελλάδα, ενώ παρατηρήθηκαν ευαίσθητοι γενότυποι (SS) σε πολύ μικρά ποσοστά για όλη την Ελλάδα. Στα δείγματα που προέρχονταν από τη Β. Ελλάδα παρατηρήθηκε ο ευαίσθητος γενότυπος (SS) σε ποσοστό 6,7%, ενώ ο γενότυπος που παρατηρήθηκε με τη μεγαλύτερη συχνότητα ήταν σε αυτήν την περίπτωση ο ετεροζύγος (RS), σε ποσοστό 63,6%. Ομόζυγοι γενότυποι (RR) παρατηρήθηκαν σε ποσοστό 29,7%. Στα δείγματα από καπνό της Κ. Ελλάδας, τα ποσοστά εμφάνισης των γενότυπων SS, RS και RR ήταν αντίστοιχα 0%, 85,7% και 14,3%. Στα δείγματα από καπνό της Ν.Ελλάδας, τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 6,5 %, 45,2% και 48,4% (Πίνακας 3 και Σχήμα 14).



Σχήμα 14. Ποσοστά φαινοτύπων με τροποποιημένη AChE σε πληθυσμούς του *Myzus persicae* που συλλέχθηκαν μεταξύ 2005, 2006 και 2007 από διάφορες περιοχές και καλλιέργειες της Ελλάδας. N = αριθμός κλώνων που εξετάστηκαν.

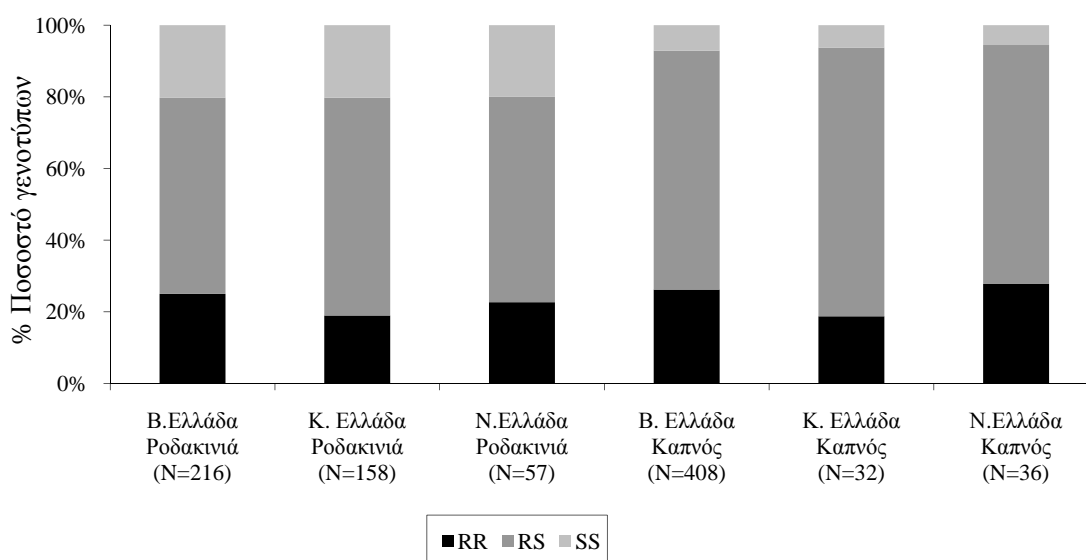
Έλεγχος της ύπαρξης του μηχανισμού τροποποιημένης ακετυλχολινεστεράσης (AChE) με μοριακές δοκιμές.

Για τη διερεύνηση της ύπαρξης του μηχανισμού ανθεκτικότητας που οφείλεται στην τροποποίηση της ακετυλχολινεστεράσης (AChE) με μοριακές δοκιμές εξετάστηκαν συνολικά 907 κλώνοι, από διάφορες περιοχές της Ελλάδας (Βόρεια, Κεντρική και Νότια Ελλάδα) και καλλιέργειες (ροδακινιά και καπνός). Μόνο το 12,8% των κλώνων ήταν ευαίσθητοι (SS), ενώ το 63,1% και 24,1 ήταν ετερόζυγο (RS) και ομόζυγο (RR) ως προς τη μετάλλαξη στην AChE.

Στους κλώνους από ροδακινιά, το 19,3% βρέθηκε να είναι ομοζύγωτο ευαίσθητο (SS), ετεροζύγωτο ανθεκτικό το 58,5% (RS) και ομοζύγωτο ανθεκτικό το 27,3% (RR). Πιο συγκεκριμένα, στα δείγματα που προέρχονταν από τη Β.Ελλάδα παρατηρήθηκε ο ευαίσθητος γενότυπος (SS) σε ποσοστό 19,9%, ενώ ο γενότυπος που παρατηρήθηκε με τη μεγαλύτερη συχνότητα ήταν ο ετερόζυγος (RS) σε ποσοστό 57,4%. Ομόζυγοι γενότυποι (RR) παρατηρήθηκαν σε ποσοστό 22,7%. Ίδια εικόνα παρουσιάστηκε στα δείγματα από ροδακινιές της Κ. Ελλάδας. Σε αυτά, τα ποσοστά εμφάνισης των

γενοτύπων SS, RS και RR ήταν αντίστοιχα 20,3%, 60,8% και 19,0%. Ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά στη Ν. Ελλάδα ήταν 14,0%, 56,1% και 29,8%.

Στα δείγματα από καπνό, ο γενότυπος που φάνηκε να επικρατεί ήταν ο ετεροζύγωτος ανθεκτικός (67,2%) (RS). Οι συχνότητες εμφάνισης των ομοζυγωτικών ανθεκτικών (RR) γενοτύπων ήταν υψηλές (25,8%), ενώ παρατηρήθηκαν ευαίσθητοι γενότυποι (SS) σε πολύ μικρά ποσοστά (6,9%). Στα δείγματα που προέρχονταν από τη Β. Ελλάδα παρατηρήθηκε ο ευαίσθητος γενότυπος (SS) σε ποσοστό 7,1%, ενώ ο γενότυπος που παρατηρήθηκε με τη μεγαλύτερη συχνότητα ήταν σε αυτή την περίπτωση ο ετεροζύγωτος (RS), σε ποσοστό 66,7%. Ομόζυγοι γενότυποι (RR) παρατηρήθηκαν σε ποσοστό 26,2%. Στα δείγματα από καπνό της Κ. Ελλάδας, τα ποσοστά εμφάνισης των γενοτύπων SS, RS και RR ήταν αντίστοιχα 6,3%, 75,0% και 18,8%. Στα δείγματα από καπνό της Ν. Ελλάδας, τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 5,6%, 66,7% και 27,8% (Πίνακας 3 και Σχήμα 15).



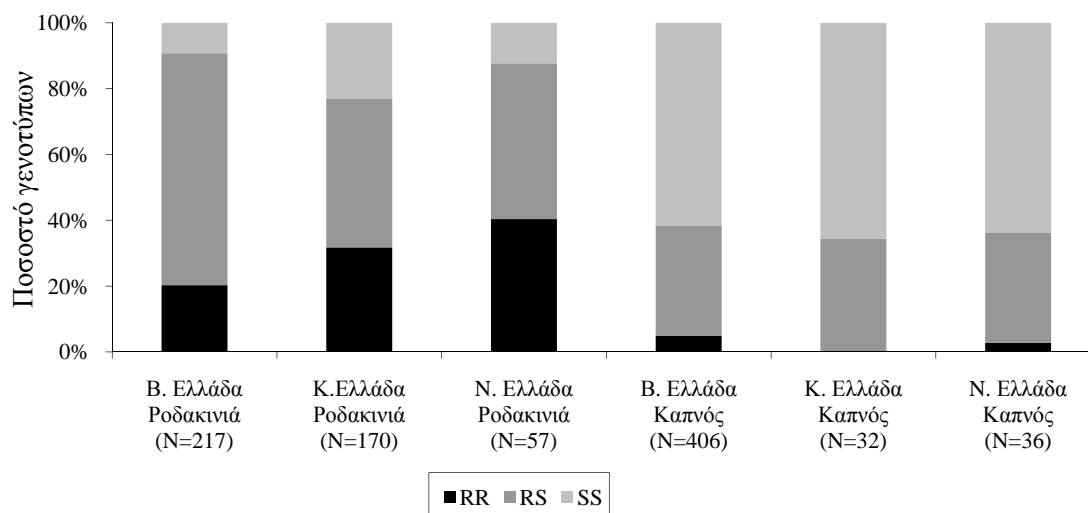
Σχήμα 15. Ποσοστά γενοτύπων με τροποποιημένη ακετυλχολινεστεράση (AChE) σε πληθυσμούς *Myzus persicae* από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. N = αριθμός κλώνων που εξετάστηκαν.

Έλεγχος της συχνότητας εμφάνισης της *kdr* μετάλλαξης

Για τον καθορισμό της ανθεκτικότητας που οφείλεται στο γονίδιο *kdr* εξετάστηκαν συνολικά 918 δείγματα, προερχόμενα από διάφορες περιοχές της Ελλάδος (Βόρεια, Κεντρική και Νότια Ελλάδα) και καλλιέργειες (ροδακινιά και καπνός). Το 39,2% των κλώνων ήταν ευαίσθητα (SS), ενώ το 45,3% και 15,5% ήταν ετερόζυγα (RS) και ομόζυγα (RR) ανθεκτικά ως προς τη μετάλλαξη στη δίοδο νατρίου (*kdr*) αντίστοιχα.

Συνολικά για όλα τα δείγματα των κλώνων που προέρχονται από ροδακινιές και για τα τρία χρόνια, το 14,9% ήταν ευαίσθητοι (SS), ενώ το 57,9% και 27,3% ήταν ετερόζυγοι (RS) και ομόζυγοι (RR) ανθεκτικοί. Στα δείγματα από ροδακινιά, που προέρχονταν από τη Β. Ελλάδα παρατηρήθηκε ο ευαίσθητος γενότυπος (SS) σε ποσοστό 9,2%, ενώ ο γενότυπος που παρατηρήθηκε με τη μεγαλύτερη συχνότητα ήταν ο ετερόζυγος (RS), σε ποσοστό 70,5%. Ομόζυγοι γενότυποι με τη μετάλλαξη *kdr* (RR) παρατηρήθηκαν σε ποσοστό 20,3%. Σε δείγματα από πληθυσμούς από ροδακινιές της Κ. Ελλάδας, τα ποσοστά εμφάνισης των γενοτύπων SS, RS και RR ήταν αντίστοιχα 22,9%, 45,3% και 31,8% ενώ τα δείγματα που προέρχονται από ροδακινιές της Ν. Ελλάδας τα ποσοστά εμφάνισης των γενοτύπων SS, RS και RR ήταν αντίστοιχα 12,3%, 47,4% και 40,4%

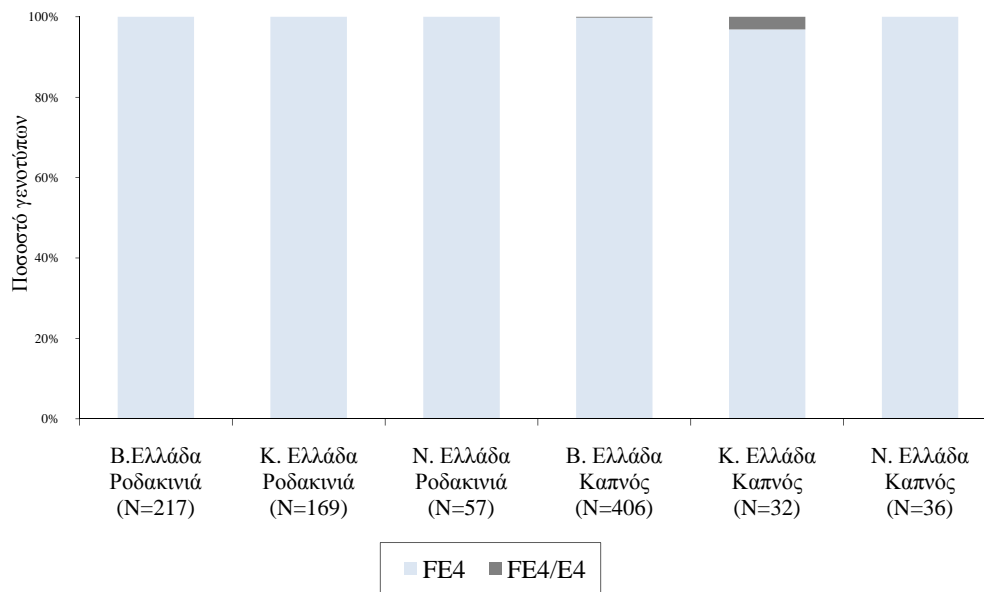
Αναφορικά με τα δείγματα που συλλέχθηκαν από καπνό, ο γενότυπος που φάνηκε να επικρατεί ήταν και σε αυτή την περίπτωση ο ευαίσθητος (SS) με ποσοστό 62,0%, ενώ ο ετερόζυγος (RS) και ο ομόζυγος (RR) γενότυπος με τη μετάλλαξη *kdr* σε ποσοστό 33,5% και 4,4%. Στα δείγματα που προέρχονταν από τη Β. Ελλάδα παρατηρήθηκε ο ευαίσθητος γενότυπος (SS) σε ποσοστό 61,6%, ενώ ο ετερόζυγος γενότυπος παρατηρήθηκε σε ποσοστό 33,5%. Ομόζυγοι γενότυποι με τη μετάλλαξη *kdr* (RR) παρατηρήθηκαν σε ποσοστό 4,9%. Στους κλώνους από καπνό της Κ.Ελλάδας, τα ποσοστά εμφάνισης των γενοτύπων SS, RS και RR ήταν αντίστοιχα 65,6%, 34,4% και 0%. Στους κλώνους από καπνό της Ν.Ελλάδας, τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 63,9%, 33,3% και 2,8% (Πίνακας 3 Σχήμα 16).



Σχήμα 16. Ποσοστά κατηγοριών ανθεκτικότητας οφειλόμενης στο μηχανισμό *kdr* σε πληθυσμούς του *Myzus persicae* που συλλέχθηκαν από διάφορες περιοχές της Ελλάδος και καλλιέργειες τα έτη 2005 – 2007. N = αριθμός κλώνων που εξετάστηκαν

Έλεγχος της συχνότητας εμφάνισης των γονιδίων *FE4* και *E4* με μοριακές τεχνικές

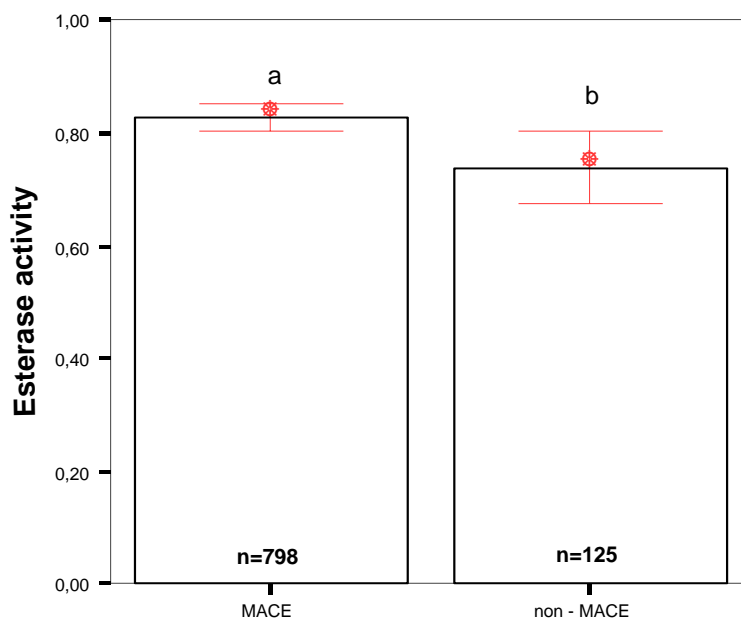
Για τον καθορισμό γονιδίων των εστερασών εξετάστηκαν συνολικά 917 κλώνοι, προερχόμενοι από διάφορες περιοχές της Ελλάδας (Βόρεια, Κεντρική και Νότια Ελλάδα) και καλλιέργειες (ροδακινιά και καπνός). Στα δείγματα από ροδακινιά δεν παρατηρήθηκε το γονίδιο *FE4/E4* παρά μόνο το γονίδιο *FE4*. Στα δείγματα από καπνό παρατηρήθηκε το γονίδιο *FE4* και *E4* σε ποσοστό 0,4%, (Σχήμα 17).



Σχήμα 17. Συχνότητες εμφάνισης FE4 και FE4+E4 σε πληθυσμούς *Myzus persicae* που συλλέχτηκαν μεταξύ των ετών 2005 έως 2007 από διάφορες περιοχές της Ελλάδας και καλλιέργειες τα έτη 2005 - 2007.

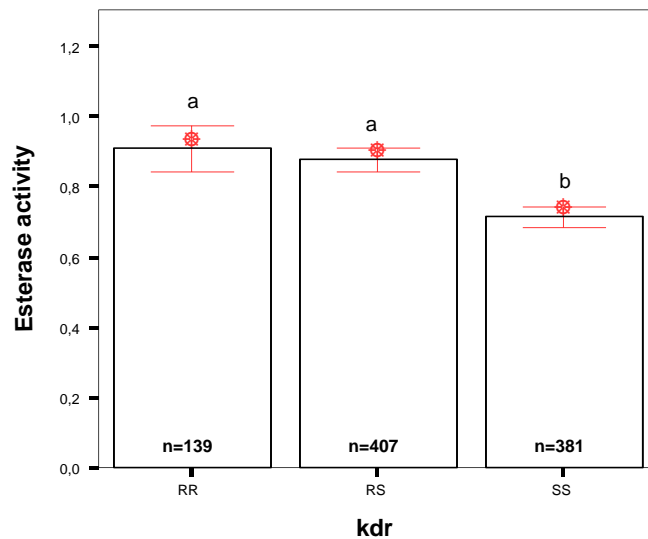
Συσχετισμός μεταξύ της ενζυμικής δραστηριότητας των εστερασών και της ύπαρξης MACE και *kdr*.

Για την καλύτερη συσχέτιση μεταξύ των μηχανισμών ανθεκτικότητας, χρησιμοποιήθηκαν οι συνεχείς τιμές των ολικών εστερασών (OD) (Denno *et al.* 1986), αντί των τεσσάρων κατηγοριών των επιπέδων των εστερασών (S,R1,R2,R3). Στο Σχήμα 18 φαίνεται το επίπεδο των εστερασών για τις αφίδες που συλλέχτηκαν στον καπνό και ροδακινιές, με ή χωρίς τροποποιημένη ακετυλχολινεστεράση και στο Σχήμα 19 το επίπεδο των εστερασών για τις αφίδες που συλλέχτηκαν στον καπνό και ροδακινιές, με ή χωρίς *kdr*. Οι αφίδες με τη μετάλλαξη MACE είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές ολικών εστερασών (R2) από ότι αυτές χωρίς την μετάλλαξη (R1). Η στατιστική ανάλυση στην περίπτωση αυτή έδειξε την ύπαρξη στατιστικών σημαντικών διαφορών μεταξύ των δειγμάτων της αφίδας με MACE σε σχέση με αυτές που δεν είχαν τη μετάλλαξη MACE ($F = 6.82$; $df=1$, 921 ; $p<0.009$).



Σχήμα 18. Σχέση μεταξύ του επιπέδου εστερασών και της παρουσίας της μετάλλαξης στην AChE για κλώνους *Myzus persicae*. Οι δείκτες των ορίων δηλώνουν το 95% των ορίων εμπιστοσύνης του μέσου όρου (n= ο αριθμός των δειγμάτων). Ράβδοι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά στο μέσο επίπεδο εστερασών βασιζόμενο στην ANOVA ($P < 0.009$, $df=1$, $LSD=0,123$, $F < 0,05$)

Στο Σχήμα 19 φαίνεται το επίπεδο των εστερασών για τις αφίδες που συλλέχτηκαν στο καπνό και ροδακινιές, χωρίς kdr και με kdr σε ομοζυγωτία και ετεροζυγωτία. Οι αφίδες με τη μετάλλαξη kdr είχαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερες τιμές ολικών εστερασών (R2) από ότι αυτές χωρίς τη μετάλλαξη (R1). Η στατιστική ανάλυση στην περίπτωση αυτή έδειξε την ύπαρξη στατιστικώς σημαντικών διαφορών μεταξύ των δειγμάτων της αφίδας με kdr μετάλλαξη σε σχέση με αυτές που δεν είχαν τη μετάλλαξη kdr ($F = 28,50$; $df=2$, 924 ; $p < 0.001$).



Σχήμα 19. Σχέση μεταξύ του επιπέδου εστερασών και της παρουσίας της μετάλλαξης kdr σε κλώνους *Myzus persicae*. Οι δείκτες των ορίων δηλώνουν το 95% των ορίων εμπιστοσύνης του μέσου όρου (n= ο αριθμός των δειγμάτων). Ράβδοι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά στο μέσο επίπεδο εστερασών βασισόμενο στην ANOVA ($P < 0.001$, $df = 2$, $LSD = 0,116$, $F < 0,05$)

Πίνακας 3. Ποσοστά (%) κλώνων *M. persicae* με διαφορετικούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας από καπνό και ροδακινίες από την Ελλάδα.

Ξενιστής - Περιοχή	Esterase ^a				MACE ^b				MACE ^c				kdr ^d			
	N	S	R1	R2+R3	N	R/R	R/S	S/S	N	R/R	R/S	S/S	N	R/R	R/S	S/S
Σύνολο 2005	189	4,2	39,7	56,1	152	36,8	56,6	6,6	168	25,6	65,5	8,9	174	1,7	39,1	59,2
Ροδακινιά	51	5,9	47,1	47,1	37	40,5	37,8	21,6	39	30,8	43,6	25,6	49	0,0	51,0	49,0
KE	29	3,4	55,2	41,4	17	47,1	29,4	23,5	18	27,8	38,9	33,3	28	0,0	57,1	42,9
BE	22	9,1	36,4	54,5	20	35,0	45,0	20,0	21	33,3	47,6	19,0	21	0,0	42,9	57,1
Καπνός	138	3,6	37,0	59,4	115	35,7	62,6	1,7	129	24,0	72,1	3,9	125	2,4	34,4	63,2
BE	65	4,6	35,4	60,0	56	39,3	60,7	0,0	61	24,6	73,8	1,6	57	3,5	35,1	61,4
KE	34	0,0	29,4	70,6	28	14,3	85,7	0,0	32	18,8	75,0	6,3	32	0,0	34,4	65,6
NE	39	5,1	46,2	48,7	31	48,4	45,2	6,5	36	27,8	66,7	5,6	36	2,8	33,3	63,9
Σύνολο 2006	452	0,0	26,8	73,2	442	31,9	59,0	9,0	438	26,7	61,4	11,9	443	18,7	47,4	33,9
Ροδακινιά	248	0,0	26,6	73,4	238	32,4	52,5	15,1	232	24,1	55,6	20,3	235	31,1	57,9	11,1
KE	89	0,0	31,5	68,5	88	28,4	55,7	15,9	84	21,4	58,3	20,2	86	38,4	39,5	22,1
BE	139	0,0	23,0	77,0	131	33,6	53,4	13,0	129	22,5	57,4	20,2	130	23,1	73,1	3,8
NE	20	0,0	30,0	70,0	19	42,1	31,6	26,3	19	47,4	31,6	21,1	19	52,6	36,8	10,5
Καπνός	204	0,0	27,0	73,0	204	31,4	66,7	2,0	206	29,6	68,0	2,4	208	4,8	35,6	59,6
BE	204	0,0	27,0	73,0	204	31,4	66,7,0	2,0	206	29,6	68,0	2,4	208	4,8	35,6	59,6
Σύνολο 2007	301	0,0	21,6	78,4	301	20,3	63,5	16,3	301	19,6	64,1	16,3	301	18,6	45,8	35,5
Ροδακινιά	160	0,0	13,1	86,9	160	17,5	66,3	16,3	160	17,5	66,3	16,3	160	30,0	60,0	10,0
KE	56	0,0	23,2	76,8	56	12,5	71,4	16,1	56	12,5	71,4	16,1	56	37,5	48,2	14,3
BE	66	0,0	4,5	95,5	66	19,7	60,6	19,7	66	19,7	60,6	19,7	66	21,2	74,2	4,5
NE	38	0,0	13,2	86,8	38	21,1	68,4	10,5	38	21,1	68,4	10,5	38	34,2	52,6	13,2
Καπνός	141	0,0	31,2	68,8	141	23,4	60,3	16,3	141	22,0	61,7	16,3	141	5,7	29,8	64,5
BE	141	0,0	31,2	68,8	141	23,4	60,3	16,3	141	22,0	61,7	16,3	141	5,7	29,8	64,5
Γενικό Σύνολο	942	0,8	27,7	71,4	895	28,8	60,1	11,1	907	24,1	63,1	12,8	918	15,5	45,3	39,2

^aS=ευαίσθητοι, R1, R2 και R3 = μετρίως, πολύ και πάρα πολύ ανθεκτικοί αντίστοιχα.

^{b,c,d}S/S= ευαίσθητοι, R/S και R/R ετεροζύγωτη και ομοζύγωτη ανθεκτικότητα. ^b=βιοχημική μέθοδος, ^c=μοριακή μέθοδος
KE,BE,NE= Κεντρική, Βόρεια και Νότια Ελλάδα αντίστοιχα.

Έλεγχος της ανθεκτικότητας των φυσικών εχθρών της αφίδας *M. persicae*

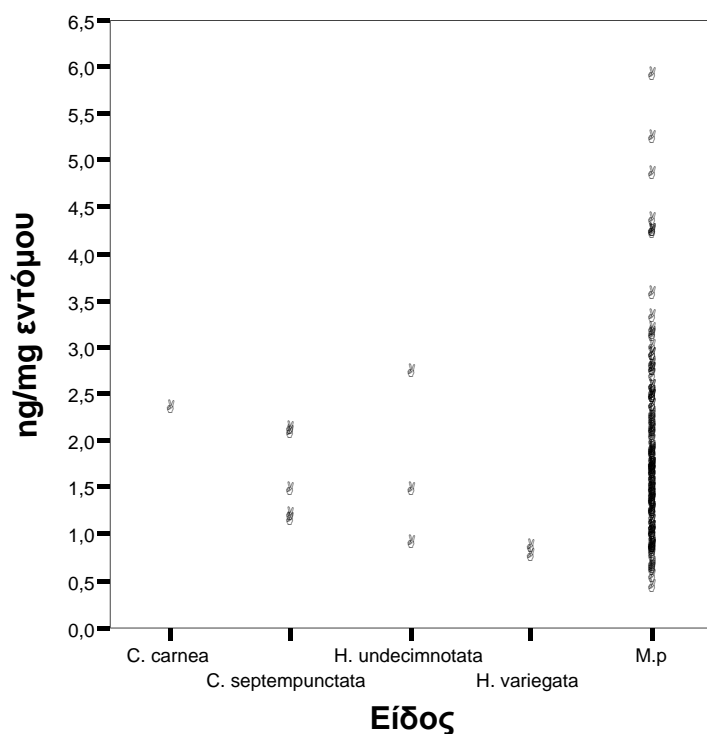
Ο έλεγχος της ανθεκτικότητας των φυσικών εχθρών της αφίδας *M. persicae* στο imidacloprid πραγματοποιήθηκε με τοπικές εφαρμογές σε προνύμφες μιας ημέρας του τελευταίου σταδίου της πρώτης εργαστηριακής γενιάς των αρπακτικών. Τα αρπακτικά έντομα, ήταν τα *Coccinella septempunctata* L., *Hippodamia undecimnotata* (Schneider), *Hippodamia variegata* (Goeze) (Coleoptera: Coccinellidae) και το *Crysoperla carnea*, (Neuroptera: Chrysopidae) και τα αποτελέσματα των βιοδοκίμων τους δίνονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Αποτελέσματα της τοπικής εφαρμογής με το imidacloprid για σε φυσικούς εχθρούς. N = αριθμός προνυμφών που εξετάστηκαν

Είδος	Καλλιέργεια-Περιοχή	N	Ημ/νια Συλλογής	ED50	(95% CI ^a)			Κλίση	X ²	p	Df
<i>H. variegata</i>	Ροδάκινα-ΚΕ	139	11/5/2006	4,6	3,3	6,3	2,17	1,90	0,75	4	
<i>H. variegata</i>	Καπνός-BE	140	5/9/2004	5,1	3,8	6,9	2,33	0,70	0,95	4	
<i>H. undecimnotata</i>	Καπνός-BE	160	19/6/2006	12,2	8,9	16,7	1,98	3,25	0,66	5	
<i>C. septempunctata</i>	Καπνός-BE	160	19/6/2006	20,5	15,0	28,6	1,90	4,40	0,49	5	
<i>H. undecimnotata</i>	Καπνός-BE	161	13/6/2006	20,7	15,1	28,7	1,92	1,15	0,95	5	
<i>C. septempunctata</i>	Ροδάκινα-BE	160	7/5/2006	21,2	15,9	28,5	2,24	2,31	0,81	5	
<i>C. carnea</i>	Ροδάκινα-ΚΕ	140	5/9/2004	24,2	18,5	32,6	2,60	5,68	0,23	4	
<i>C. septempunctata</i>	Ροδάκινα-BE	166	18/5/2007	26,1	18,4	38,1	1,60	3,15	0,68	5	
<i>C. septempunctata</i>	Καπνός-BE	160	13/6/2006	37,5	28,5	50,6	2,46	0,29	1,00	5	
<i>C. septempunctata</i>	Καπνός-BE	178	8/8/2007	38,2	26,9	55,4	1,60	2,78	0,84	6	
<i>H. undecimnotata</i>	Καπνός-BE	207	8/8/2007	39,1	28,8	52,9	1,80	3,63	0,82	7	

a: Όρια εμπιστοσύνης για 95%
(BE: Βόρεια Ελλάδα, ΚΕ: Κεντρική Ελλάδα)

Πιο ευαίσθητο από όλα τα αρπακτικά που ελέχθησαν, αποδείχτηκε το *H. variegata* ενώ πιο ανθεκτικό το *H. undecimnotata*. Η σύγκριση των τιμών (σε ng imidacloprid/mg εντόμου) της μέσης τιμής θανατηφόρου δόσης για τα ωφέλιμα με την αντίστοιχη τιμή για τις αφίδες, που εξετάστηκαν με τοπική εφαρμογή εντομοκτόνου στο imidacloprid (παράγραφος 3.2) φαίνονται στο Σχήμα 20. Από τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών βρέθηκε ότι το 16,4% των κλώνων της αφίδας *M. persicae* είναι ανθεκτικότερο από το πιο ανθεκτικό φυσικό εχθρό της αφίδας (*H. undecimnotata*).



Σχήμα 20. Σύγκριση της μέση θανατηφόρου δόσης ανάλογα με το είδος του εντόμου. (M.p= *M. persicae*, MO= Μέσος Όρος , R= Ανθεκτικός κλώνος, S= Ευαίσθητος κλώνος)

Έλεγχος του τόπου AChE της αφίδας Myzus persicae (Sulzer) για μεταλλάξεις

Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών έδειξαν ότι και οι δυο κλώνοι είναι ανθεκτικοί στο pirimicarb μιας και το LC₅₀ (ng/έντομο) ήταν πολύ μεγαλύτερο από την προτεινόμενη από την εταιρεία δόση (250 ng/έντομο). Το LC₅₀ από τον κλώνο από την Κρύα Βρύση ήταν 605 ng/έντομο ενώ για τον κλώνο από το Ναύπλιο 960 ng/έντομο.

Οι βιοχημικές αντιδράσεις των κλώνων αυτών έδειξαν ότι ο κλώνος από την Ζιμπάμπουε ήταν ευαίσθητος, ενώ οι κλώνοι από Κρύα Βρύση και Ναύπλιο ήταν ανθεκτικοί. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση του κλώνου από την Ζιμπάμπουε είχαμε μόνο 10% υπολειμματική ενεργότητα (residual activity) του ενζύμου της AChE, ενώ στην περίπτωση των κλώνων από την Κρύα Βρύση και Ναύπλιο είχαμε 61% και 71% υπολειμματική ενεργότητα (residual activity) του ενζύμου της AChE.

Ανθεκτικότητα και Βιολογικός Κύκλος

Στατιστικώς σημαντικές διαφορές βρέθηκαν ανάμεσα στην κατηγορία του βιολογικού κύκλου (ολοκυκλικοί και ανολοκυκλικοί) και το επίπεδο εστερασών ($F = 25.91$; $df=1, 907$; $p<0.001$) με τους ολοκυκλικούς κλώνους να έχουν υψηλότερη τιμή σε σχέση με τους ανολοκυκλικούς (0,868 με 0,743 αντίστοιχα). Επίσης στατιστικές διαφορές βρέθηκαν μεταξύ του βιολογικού κύκλου (ολοκυκλικοί και ανολοκυκλικοί) και την ενεργότητα του ενζύμου της AChE ($F = 5.32$; $df=1, 869$; $p<0.022$) με τους ανολοκυκλικούς να έχουν υψηλότερη τιμή σε σχέση με τους ολοκυκλικούς (0,733 με 0,693 αντίστοιχα). Στην Βόρεια Ελλάδα, στην περιοχή Μελική όπου και συνυπάρχουν ο καπνός και η ροδακινιά, στον καπνό δεν βρέθηκαν διαφορές μεταξύ ολοκυκλικών και ανολοκυκλικών κλώνων ($F = .013$; $df=1, 148$; $p<0.909$) όπως επίσης δεν βρέθηκαν διαφορές ως προς την ενεργότητα του ενζύμου της AChE ($F = 0.398$; $df=1, 144$; $p<0.529$).

Συζήτηση

Νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα

Ο έλεγχος της ανθεκτικότητας της αφίδας *M. persicae* με την μέθοδο της στιγμιαίας εμβάπτισης, στα εντομοκτόνα imidacloprid και acetamiprid, έδειξε ότι δεν έχει αναπτυχθεί ακόμα ισχυρή ανθεκτικότητα στην Ελλάδα. Το 51,3% και το 47,3% των εξετασθέντων δειγμάτων με τα imidacloprid και acetamiprid, αντίστοιχα, είχαν ΣΑ μικρότερο από 10. Το imidacloprid και δευτερευόντως το acetamiprid χρησιμοποιούνται για αρκετές δεκαετίες στην Ελλάδα και στο εξωτερικό αλλά δεν έχουν αναφερθεί αποτυχημένοι ψεκασμοί. Ωστόσο, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι υπάρχει σε μεγάλο βαθμό ανάπτυξη μέσου επιπέδου ανθεκτικότητας, καθώς το 32,8% και 49% των δειγμάτων παρουσίασαν τιμές ΣΑ μεταξύ 10 - 20 για το imidacloprid και acetamiprid αντίστοιχα. Το 15,9% και 3,7% των πληθυσμών για το imidacloprid και acetamiprid αντίστοιχα παρουσίασαν ΣΑ με τιμές μεγαλύτερες από 20, (με όλα τα δείγματα στην περίπτωση του imidacloprid να προέρχονται από καπνό) αποδεικνύοντας την ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Ίδια αποτελέσματα

έδειξε και ο έλεγχος της ανθεκτικότητας στα νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα imidacloprid και thiacloprid με τη μέθοδο της τοπικής εφαρμογής εντομοκτόνου. Άλλες μελέτες με δείγματα από την Ευρώπη (Margaritoroulos *et al.* 2007), την Αμερική και την Ιαπωνία την τελευταία δεκαετία έχουν επίσης αναδείξει την ανάπτυξη χαμηλού επιπέδου ανθεκτικότητας. Παρόλο που απευθείας σύγκριση των αποτελεσμάτων δεν μπορεί να γίνει διότι ακολουθήθηκε διαφορετική μέθοδος βιοδοκιμών, όλες αυτές οι μέθοδοι έχουν γενικά αναφέρει συντελεστές ανθεκτικότητας μικρότερους του 10 (Foster *et al.* 2003, Devine *et al.* 1996, Nauen *et al.* 1996). Η παρουσία ωστόσο, δειγμάτων με μεσαία επίπεδα ανθεκτικότητας στο imidacloprid αλλά και τα υπόλοιπα νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα σε γεωγραφικά ξεχωριστούς πληθυσμούς πιθανότατα υποδεικνύουν το ενδεχόμενο αύξησης της ανθεκτικότητας ή και την προσαρμογή αυτών που τρέφονται στον καπνό. Σε προηγούμενη μελέτη, οι Nauen & Elbert (1997) είχαν βρει τιμή LC_{50} 16ppm με την μέθοδο της στιγμιαίας εμβάπτισης του FAO σε ένα πληθυσμό από την Γαλλία από καπνό. Η τιμή αυτή είναι λίγο μεγαλύτερη από τις πιο υψηλές τιμές που βρέθηκαν στη παρούσα μελέτη.

Πιθανοί μηχανισμοί ή μηχανισμός που να οφείλεται η ανοχή που έχει αναπτύξει η αφίδα *M. persicae* στα νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα δεν έχει βρεθεί ακόμα. Από την άλλη όμως, μετά από 17 χρόνια χρήσης των νεονικοτινοειδών εντομοκτόνων, μερικοί από τους πιο σημαντικούς εχθρούς των καλλιεργειών παγκοσμίως έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στην κατηγορία αυτή, όπως είναι το *Bemisia tabaci* (Gennadius) και *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Cahill *et al.* 1996, Elbert & Nauen 2000, Gorman *et al.* 2007), το *Nilaparvata lugens* (Stal), ο δορυφόρος της πατάτας *Leptinotarsa decemlineata* (Say) και το *Idioscopus clypealis* (Lethierry) (Nauen & Denholm 2005). Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση του *Nilaparvata lugens* η ανθεκτικότητα οφείλεται σε μετάλλαξη στο σημείο δράσης των νεονικοτινοειδών (Liu *et al.* 2005) ενώ στην περίπτωση του *Bemisia tabaci* σε υπερπαραγωγή των P450 (Rauch & Nauen 2003). Οι τρεις ευρέως διαδεδομένοι μηχανισμοί ανθεκτικότητας, MACE, kdr και υπερπαραγωγή εστερασών δεν έχουν καμιά επίδραση στην ανθεκτικότητα των νεονικοτινοειδών (Foster *et al.* 2003). Σε προηγούμενες εργασίες,

ανθεκτικότητα στο imidacloprid είχε συσχετιστεί με τη μείωση της δραστηριότητας της νικοτίνης (Devine *et al.* 1996, Nauen *et al.* 1996). Ωστόσο, καμιά σημειακή μετάλλαξη δεν έχει συσχετιστεί με την ανθεκτικότητα στο imidacloprid (Nauen *et al.* 1996). Μια εξήγηση που συνδέει την ανθεκτικότητα στο imidacloprid με τη φυσική επίκτητη ανθεκτικότητα στη νικοτίνη είναι ότι όλα σχεδόν τα δείγματα προέρχονται από τον καπνό, αλλά χρειάζεται περαιτέρω έρευνα.

Όποιος και να είναι ο μηχανισμός που προσδίδει ανθεκτικότητα, η πίεση επιλογής από το imidacloprid, αλλά και γενικά από τα νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα, αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα που εξηγεί σε κάποιο βαθμό το γεγονός ότι οι πληθυσμοί με μεσαίους και μεγάλους ΣΑ συλλέχτηκαν από καπνό και κυρίως από την Βόρεια Ελλάδα, όπου συνυπάρχει με τις ροδακινιές. Η κοινή πρακτική στην Ελλάδα ενάντια της αφίδας *M. persicae* στον καπνό είναι η εφαρμογή imidacloprid στο νερό της μεταφύτευσης. Αν και η μέθοδος αυτή ελαττώνει την επίδραση του εντομοκτόνου στα ωφέλιμα έντομα, δημιουργεί συνεχή πίεση επιλογής για ανθεκτικούς γενοτύπους. Πρέπει να συνυπολογιστεί ότι στη Βόρεια Ελλάδα η αφίδα *M. persicae* μεταναστεύει από τις ροδακινιές, στον καπνό και αντιστρόφως και συχνά γίνεται ψεκασμός για τον έλεγχο της στις ροδακινιές με imidacloprid, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η πίεση επιλογής που ασκείται καθ' όλη την καλλιεργητική περίοδο (Απρίλιο μέχρι Σεπτέμβριο). Οι πληθυσμοί της αφίδας *M. persicae* σε ροδακινιές αποτελούνται από μεγάλο αριθμό διαφορετικών γενοτύπων, (ευαίσθητων και μη) που είναι προϊόν σεξουαλικής αναπαραγωγής. Σε αντίθεση, η επιλογή ορισμένων ανθεκτικών γενοτύπων στο καπνό, που πολλαπλασιάζονται παρθενογενετικά, οδηγεί σε ομογενοποιημένους ανθεκτικούς πληθυσμούς. Αυτό, μπορεί να εξηγεί γιατί πιο ανθεκτικοί πληθυσμοί βρέθηκαν στον καπνό από ότι τα ροδάκινα αλλά και γιατί οι πληθυσμοί που προέρχονται από ροδάκινα της Βορείου Ελλάδας είναι πιο ανθεκτικοί από τους πληθυσμούς που προέρχονται από ροδάκινα της Κεντρικής Ελλάδας.

Πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα

Η ανθεκτικότητα της αφίδας *M. persicae* σε πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα έχει καταγράψει στην Ευρώπη (Field *et al.* 1997, Foster *et al.* 1998, Field & Foster, 2002, Mazzoni & Cravedi, 2002; Guillemaud *et al.* 2003, Nauen & Elbert, 2003, Anstead *et al.* 2004, Fenton *et al.* 2005, Zamoum *et al.* 2005) τις ΗΠΑ, την Χιλή και την Ιαπωνία (Field *et al.* 1997, Fuentes- Contreras *et al.* 2004).

Ο έλεγχος της ανθεκτικότητας της αφίδας *M. persicae* με τη μέθοδο της στιγμιαίας εμβάπτισης στα πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα bifenthrin και deltamethrin έδειξε ότι έχει αναπτυχτεί ανθεκτικότητα στους Ελληνικούς πληθυσμούς. Πιο συγκεκριμένα, ισχυρότερη ανθεκτικότητα έχει αναπτυχτεί στην περίπτωση του deltamethrin μιας και το 70,1% των δειγμάτων είχαν ΣΑ από 50 μέχρι 1266 με το πλείστο των δειγμάτων αυτών να προέρχεται από ροδακινίες της Βορείου Ελλάδος, ενώ αντίστοιχα στο bifenthrin εμφάνισε μικρότερους ΣΑ μιας και μόνο ένα δείγμα είχε ΣΑ μεγαλύτερο από 50 (RF=71) με το πλείστο των δειγμάτων, που εμφάνισαν ανθεκτικότητα, να προέρχονται επίσης από ροδακινίες της Βορείου Ελλάδος. Το deltamethrin πλέον δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της αφίδας *M. persicae* μιας και το 60,9% των δειγμάτων είχαν LC₉₅ μεγαλύτερο από την προτεινόμενη από την εταιρεία δόση (17,5ppm). Αντιθέτως, το bifenthrin δεν αντιμετωπίζει προβλήματα ελέγχου της αφίδας μιας και όλα τα δείγματα εκτός από ένα, παρουσίασαν LC₉₅ αρκετά χαμηλότερο από την προτεινόμενη από την εταιρεία δόση (40ppm). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν το μεγάλο ποσοστό των κλώνων που βρέθηκαν σε ροδάκινα στην Β. Ελλάδα (91% μέσο όρο για τα τρία χρόνια της μελέτης) με τη μετάλλαξη στη δίοδο νατρίου σε αντίθεση με το μικρότερο ποσοστό (38% μέσο όρο για τα τρία χρόνια της μελέτης) που βρέθηκαν στα καπνά της Βορείου Ελλάδος. Αυτό μπορεί να οφείλεται και στις ποσότητες των πυρεθρινοειδών εντομοκτόνων που αποτελούν το 41% στη ροδακινιά και το 7% στα καπνά.

Ο κύριος μηχανισμός που οφείλεται η ανθεκτικότητα της αφίδας *M. persicae* στα πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα και το DDT, είναι οι δυο μεταλλάξεις που έχουν βρεθεί στη δίοδο νατρίου του εντόμου. Οι μεταλλάξεις αυτές είναι η

λευκίνη σε φαινουλαλανίνη L1014F (knockdown resistance, kdr) και μεθειονίνη σε θρεονίνη M918T (super-kdr) (Martinez-Torres *et al.* 1999, Eleftherianos *et al.* 2002). Στην εργασία αυτή, η αφίδα *M. persicae* βρέθηκε να είναι πιο ανθεκτική στο 2^{ου} τύπου πυρεθρινοειδές εντομοκτόνο (deltamethrin) από ότι στο 1^{ου} τύπου (bifenthrin). Ανθεκτικά έντομα στα πυρεθρινοειδή που έχουν τη μετάλλαξη M918T (super-kdr), παρουσιάζουν σε μεγαλύτερο βαθμό ανθεκτικότητα στα 2^{ου} τύπου πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα (deltamethrin), από ότι σε έντομα που έχουν μόνο τη μετάλλαξη L1014F (kdr) (Farnham & Khambay, 1995a,b, Eleftherianos *et al.* 2008). Οι Anstead *et al.* 2007 είχαν βρει την μετάλλαξη της super-kdr σε ποσοστό 22% για δείγματα του 2002 από καπνό και ροδακινίες στην Ελλάδα. Σε αυτό πιθανότατα οφείλονται και τα διαφορετικά επίπεδα ανθεκτικότητας που παρουσιάζονται ανάμεσα στα δυο εντομοκτόνα, αλλά χρειάζεται έρευνα πάνω στην εξακρίβωση της μετάλλαξης super-kdr για τα συγκεκριμένα δείγματα.

Η διαφορά αυτή ανάμεσα στα δείγματα που προέρχονται από τον καπνό σε σχέση με αυτά που προέρχονται από τις ροδακινίες μπορεί να οφείλεται στον τρόπο ελέγχου της αφίδας *M. persicae* και στην πίεση επιλογής που ασκείται από αυτά. Στον καπνό, η ποσότητα εντομοκτόνων που χρησιμοποιήθηκαν το 2004 ήταν 44%, 31%, 18% και 7% για νεονικοτινοειδή, οργανοφωσφορικά, καρβαμιδικά και πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα αντίστοιχα. Ωστόσο, στις ροδακινίες, τα πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα χρησιμοποιήθηκαν σε μεγαλύτερη ποσότητα (41% έναντι 25% και 15% για τα οργανοφωσφορικά και τα νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα, 13% για τα εντομοκτόνα λάδια, 4% για τα καρβαμιδικά εντομοκτόνα και 2% τα ακαρεοκτόνα, στοιχεία Bayer CropScience Hellas). Ένα στοιχείο που επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα αυτά είναι ότι το ποσοστό kdr για τα δείγματα από τον καπνό και για τα τρία χρόνια της μελέτης ήταν 38%, ενώ αντίστοιχα τα δείγματα που προέρχονταν από την ροδακινιά εμφάνισαν τη μετάλλαξη αυτή σε ποσοστό 85,2%. Από τα στοιχεία αυτά διαπιστώνεται επίσης ότι έχει επέλθει δραματική μεταβολή στη συχνότητα εμφάνισης του μηχανισμού kdr στους Ελληνικούς πληθυσμούς κατά τη διάρκεια των 8 τελευταίων χρόνων, καθώς οι Cox *et al.* (2004) είχαν παρατηρήσει την ύπαρξη της μετάλλαξης σε πολύ χαμηλές συχνότητες γενοτύπων (4,5 %, σε συγκεντρωτικά στοιχεία από τα 3 χρόνια της μελέτης,

1998-2000), όπως αυτή προσδιορίστηκε με τη διαγνωστική δόση DDT. Στατιστικώς σημαντικές διαφορές βρέθηκαν τα τρία χρόνια της μελέτης ($\chi^2=36.16$, $df=2$; $p<0,001$) για την ύπαρξη της μετάλλαξης *kdr*, με τα δείγματα αυτά του 2005 να διαφέρουν από αυτά του 2006 ($\chi^2=33.15$, $df=1$; $p<0,001$) και 2007 ($\chi^2=25.00$, $df=1$; $p<0,001$), ενώ αυτά του 2006 και 2007 δεν διέφεραν μεταξύ τους ($\chi^2=0.23$, $df=1$; $p<0,635$).

Οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα

Η αφίδα *M. persicae* έχει αναπτύξει ισχυρή ανθεκτικότητα και στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, κάτι που διαπιστώθηκε από τις βιοδοκιμές με το *chlorpyrifos methyl* μιας και η μέση θανατηφόρα δόση ήταν μεγαλύτερη από τη συνιστώμενη από την εταιρία για το 75% των δειγμάτων, με το ΣΑ να εμφανίζει τιμές από 602 έως και 9484 ενώ, το LC_{95} σε όλα τα δείγματα βρέθηκε πολύ μεγαλύτερο από τη συνιστώμενη από την εταιρία δόση. Αντίστοιχα, στο *methamidophos* δεν παρατηρήθηκαν σε σημαντικά ποσοστά (3% επί του συνολικού αριθμού δειγμάτων) τιμές ΣΑ μεταξύ 20–30. Αν και δεν είναι δυνατή η άμεση σύγκριση των αποτελεσμάτων εξαιτίας των διαφορετικών μεθόδων που πραγματοποιήθηκαν, παρατηρήθηκε ανθεκτικότητα της αφίδας έναντι του *methamidophos* και από τους Nauen & Elbert (2003), που παρατήρησαν θνησιμότητα μικρότερη του 80% σε ποσοστό 12,5% των κλώνων που εξετάστηκαν με μια διαγνωστική δόση του *methamidophos*.

Η γενότυποι με υπερπαραγωγή εστερασών που ευθύνεται για την αποτοξίκωση οργανοφωσφορικών, παρατηρήθηκαν σε υψηλές συχνότητες σε ευρεία γεωγραφική κλίμακα. Γενότυποι (R2/ R3) διαπιστώθηκαν σε ποσοστά μεταξύ 75,2% σε πληθυσμούς από ροδακινίες. Επίσης υψηλές συχνότητες ανθεκτικών γενοτύπων βρέθηκαν στους πληθυσμούς από καπνό (R2/R3 - 67,9%. Ο μηχανισμός MACE που ευθύνεται για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας της αφίδας εκτός από τα καρβαμιδικά και στα οργανοφωσφορικά βρέθηκε σε υψηλές επίσης συχνότητες, με βάση τις μοριακές και βιοχημικές δοκιμές που διεξήχθησαν. Υψηλές συχνότητες ανθεκτικών γενοτύπων με υπερπαραγωγή εστερασών (R2/ R3) αναφέρθηκαν και από τους Cox *et al.* (2004) σε δείγματα

από ροδακινιές στην Βόρεια Ελλάδα με ποσοστά από 93% (1999) έως 99% (2000). Υψηλές συχνότητες επιπέδων ανθεκτικότητας R2/ R3 παρατηρήθηκαν και στην Κεντρική Ελλάδα, ενώ σε πληθυσμούς από καπνό οι συχνότητες εμφάνισης των επιπέδων ανθεκτικότητας R2 ή R3 κυμαίνονταν μεταξύ 64 και 79 % το διάστημα 1999- 2000.

Καρβαμιδικό εντομοκτόνο

Ένα από τα καλύτερα εντομοκτόνα που υπήρχαν για το έλεγχο της αφίδας *M. persicae* λόγω της εκλεκτικότητας του, το pirimicarb, δεν μπορεί πλέον να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχό της. Από την παρούσα μελέτη φάνηκε ότι η ανθεκτικότητα στα διμεθυλοκαρβαμιδικά είναι ισχυρή, καθώς από τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών με τη μέθοδο FAO dip-test παρατηρήθηκαν υψηλές τιμές ΣΑ. Σε ποσοστό 58,8% των δειγμάτων που εξετάστηκαν οι τιμές του ΣΑ κυμαίνονταν μεταξύ 20 και 50, ενώ ένα σημαντικό ποσοστό (18,8%) παρουσίασε τιμές ΣΑ μεγαλύτερες από 50, ενώ πρέπει να αναφερθεί ότι το 38,8% των δειγμάτων παρουσίασε μέση θανατηφόρο δόση μεγαλύτερη από την προτεινόμενη δόση της εταιρείας (250ppm).

Η ύπαρξη της ανθεκτικότητας επιβεβαιώθηκε και σε μοριακό και βιοχημικό επίπεδο, καθώς από τις βιοχημικές δοκιμές καταγραφής της δραστηριότητας της AChE φάνηκε ότι ήταν μικρό το ποσοστό ευαίσθητων γενοτύπων (με μη τροποποιημένη AChE) κυρίως σε πληθυσμούς από καπνό. Πιο συγκεκριμένα, δεν παρατηρήθηκε ο ευαίσθητος γενότυπος σε δείγματα από καπνά της Κεντρικής Ελλάδος, ενώ στη Βόρεια και Νότια Ελλάδα, παρατηρήθηκαν σε χαμηλές συχνότητες (6,7% και 6,5% αντίστοιχα). Αντίθετα, οι ευαίσθητοι γενότυποι παρατηρήθηκαν σε λίγο μεγαλύτερες συχνότητες στη Βόρεια Ελλάδα (15,7%) στους πληθυσμούς από ροδακινιές. Από τα αποτελέσματα των βιοχημικών δοκιμών φάνηκε ότι οι ανθεκτικοί γενότυποι είναι διαδεδομένοι σε ευρεία γεωγραφική έκταση και έχουν επικρατήσει σε όλη την Ελλάδα και στις δυο καλλιέργειες. Αντίστοιχα αποτελέσματα έδωσε και η διερεύνηση της ύπαρξης ανθεκτικών γενοτύπων με μοριακές δοκιμές, από τις οποίες επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη ανθεκτικών γενοτύπων στους πληθυσμούς από καπνό σε πολύ υψηλά ποσοστά (ως και 100 %) και σε υψηλά ποσοστά

σε πληθυσμούς από ροδακινιές. Υψηλά ποσοστά εμφάνισης του μηχανισμού MACE αναφέρθηκαν και από τους Cox *et al.* (2004) σε δείγματα πληθυσμών του *M. persicae* που συλλέχτηκαν την περίοδο 1998-2000 από περιοχές της Ελλάδας στις οποίες καλλιεργούνταν η ροδακινιά και ο καπνός. Παρατηρήθηκε η ύπαρξη του μηχανισμού MACE σε πληθυσμούς από ροδάκινα στη Βόρεια Ελλάδα σε ποσοστά από 94 % (2000) έως 97 % (1999) και στην Κεντρική Ελλάδα σε ποσοστό 64% το 1998. Σε πληθυσμούς από καπνό, παρατηρήθηκε η εμφάνιση του μηχανισμού MACE σε ποσοστά που κυμάνθηκαν από 50 έως 67 % του συνολικού πληθυσμού το διάστημα 1999-2000.

Μηχανισμοί υπερπαραγωγής εστερασών, MACE και kdr

Οι τρεις γνωστοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας (MACE, kdr και υπερπαραγωγή εστερασών) που έχουν περιγραφεί στην αφίδα *M. persicae* έχουν βρεθεί σε μεγάλες συχνότητες σε σχεδόν όλους τους πληθυσμούς που συλλέχτηκαν στην Ελλάδα. Οι συχνότητες των αφίδων με υψηλά επίπεδα εστερασών (R2/R3) ήταν σχεδόν σε όλες τις περιοχές, καλλιέργειες και χρόνια πάνω από 50%, και σε μερικές περιπτώσεις έφτανε το 80-95%. Ομοίως, το 88,7% και το 60,8% των δειγμάτων συνολικά βρέθηκαν να έχουν τροποποιημένη ακετυλχολινεστεράση και τη μετάλλαξη στη δίοδο νατρίου. Δεν υπάρχει έκπληξη για τη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων εστερασών και kdr μιας και οι δυο μηχανισμοί προσδίδουν ανθεκτικότητα στα πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα. Αυξημένα επίπεδα εστερασών, απομακρύνουν και αποτοξικοποιούν τα πυρεθρινοειδή και η kdr και η super-kdr μειώνουν την ευαισθησία της δίοδου νατρίου (Devonshire *et al.* 1998). Και οι δυο μηχανισμοί επιλέγονται μέσω της πίεσης επιλογής των πυρεθρινοειδών εντομοκτόνων και επιπλέον, σε μη σεξουαλικά αναπαραγόμενους πληθυσμούς, φαίνονται σαν να είναι συνδεδεμένοι.

Η συχνότητα και η δυναμική των τριών αυτών μηχανισμών ανθεκτικότητας έχουν μελετηθεί πολύ καλά επί πολλά χρόνια στη δυτική Ευρώπη. Σε μια πρόσφατη μελέτη στο Ηνωμένο Βασίλειο μεταξύ 1996 και 2000, οι Foster *et al.* (2002) παρατήρησαν δραματική μείωση των

μηχανισμών ανθεκτικότητας MACE και υπερπαραγωγής εστερασών μέσω των ετών. Η μείωση αυτή αποδόθηκε σε μια ευθεία (μέσω του μηχανισμού υπερπαραγωγής εστερασών) ή έμμεση σύνδεση (μηχανισμός MACE μέσω σύνδεσης με υπερπαραγωγή εστερασών, μηχανισμός υπερπαραγωγής εστερασών μέσω σύνδεσης με το μηχανισμό *kdr*) των μηχανισμών αυτών. Ένα κόστος προσαρμοστικότητας των ανθεκτικών γενοτύπων αφίδων (καθώς αυτοί παρουσιάζουν αυξημένη θνησιμότητα κατά το χειμώνα, χαμηλή τάση μετακίνησης από γηράσκοντα φύλλα και ανταπόκρισης στις φερομόνες συναγερμού που εκλύονται από άλλες αφίδες) και με μείωση της χρήσης οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών εντομοκτόνων, με παράλληλη αύξηση χρήσης των συνθετικών πυρεθροειδών και νεονικοτινοειδών εντομοκτόνων (Foster *et al.* 1996,1997, Foster & Devonshire 1999, Field & Foster 2002, Foster *et al.* 2002). Η μείωση της πίεσης επιλογής από τη χρήση οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών οδήγησε σε επιλογή εις βάρος των ανθεκτικών γενοτύπων, κυρίως κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Οι Foster *et al.* (2002) ανέφεραν την ύπαρξη υψηλών επίσης συχνοτήτων γενοτύπων αφίδων που έφεραν τη μετάλλαξη *kdr*, η οποία αποδόθηκε σε ισχυρή πίεση επιλογής από τα πυρεθροειδή, που υπερνικούσε το όποιο κόστος αρμοστικότητας που σχετιζόταν με αυτόν το μηχανισμό. Μείωση στη συχνότητα της εμφάνισης ανθεκτικότητας που οφείλεται σε υπερπαραγωγή εστερασών έχει επίσης παρατηρηθεί σε οπωρώνες ροδακινιάς της νότιας Γαλλίας (Guillemaud *et al.* 2003), εκεί ο μηχανισμός MACE εμφανιζόταν σπάνια ενώ αντίθετα η μετάλλαξη *kdr* ανιχνευόταν συχνά.

Η κατάσταση στην Ελλάδα είναι μάλλον διαφορετική συγκριτικά με αυτήν στη δυτική Ευρώπη, καθώς η συχνότητα του μηχανισμού που οφείλεται στην υπερπαραγωγή εστερασών και πολύ περισσότερο του μηχανισμού MACE (με βάση τα στοιχεία της παρούσας μελέτης και Margaritoroulos *et al.* 2007) φαίνεται ότι παραμένουν κυρίως σε υψηλά επίπεδα κατά τη διάρκεια των 8 τελευταίων χρόνων. Στο φαινόμενο αυτό ίσως εμπλέκονται τρεις πιθανοί παράγοντες. Ο χειμώνας στην Ελλάδα είναι ηπιότερος σε σύγκριση με τη δυτική Ευρώπη και η επιλογή κατά των γονιδίων ανθεκτικότητας εξαιτίας του κόστους αρμοστικότητας κατά τη διάρκεια του χειμώνα είναι πιθανότατα χαμηλότερη. Επιπρόσθετα, η επιλογή κατά των γονιδίων ανθεκτικότητας είναι

λιγότερο πιθανή κατά τη διάρκεια του χειμώνα σε σεξουαλικά αναπαραγόμενους πληθυσμούς, οι οποίοι διαχειμάζουν, ως του διαπαύοντος ωού, που είναι ανθεκτικά στο ψύχος. Στις βόρειες περιοχές της Ελλάδας, όπου παρατηρείται η πλειοψηφία των οπωρώνων ροδακινιάς, οι περισσότεροι από τους πληθυσμούς στους δευτερεύοντες ξενιστές αναπαράγονται σεξουαλικά (Margaritoroulos *et al.* 2002, Blackman *et al.* 2007). Επομένως, η καλλιέργεια της ροδακινιάς ίσως ενεργεί ως «καταφύγιο» για την επιβίωση των ανθεκτικών γενοτύπων. Ένας άλλος παράγοντας που ευνοεί την επιλογή του μηχανισμού που οφείλεται στην υπερπαραγωγή εστερασών και του MACE, είναι η συνέχιση της χρήσης οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών εντομοκτόνων (παρά την αυξανόμενη χρήση νεονικοτινοειδών τα τελευταία χρόνια), καθώς, ειδικά σε οπωρώνες ροδακινιάς με αυτά τα εντομοκτόνα καταπολεμούνται και άλλα επιβλαβή έντομα. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο μηχανισμός MACE ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα το 1990 από τους Moores *et al.* (1994b), κάτι που δείχνει ότι η εντατική χρήση καρβαμιδικών για μια δεκαετία οδήγησε στην ανάπτυξη ισχυρής ανθεκτικότητας, στους πληθυσμούς της αφίδας. Επιπρόσθετα, η συχνή χρήση πυρεθροειδών και ειδικά σε οπωρώνες ροδακινιάς φαίνεται να είναι ο παράγοντας που ευθύνεται για την τεράστια αύξηση της συχνότητας των γενοτύπων με τη μετάλλαξη *kdr* κατά τα τελευταία οκτώ έτη.

Η κατηγορία βιολογικού κύκλου σε συνδυασμό με την ανθεκτικότητα έδειξε ότι υπάρχουν διάφορες ανάμεσα σε ολοκυκλικούς και ανολοκυκλικούς κλώνους με το επίπεδο των εστερασών και την ενεργότητα του ενζύμου της AChE για όλους τους κλώνους που συλλεχτήκαν στην Ελλάδα και τα τρία χρόνια της μελέτης. Η διαφορά ανάμεσα στους ολοκυκλικούς και ανολοκυκλικούς κλώνους πιθανότατα οφείλεται στον τρόπο έλεγχου της αφίδας *M. persicae*. Όμως στα δείγματα των κλώνων που συλλεχτήκαν στο καπνό, που προέρχονται από την περιοχή Μελίκης Ημαθίας δεν έδειξαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές τόσο στο επίπεδο των εστερασών όσο και στην ενεργότητα του ενζύμου της AChE, εκεί όπου συνυπάρχουν και οι δυο τύποι βιολογικού κύκλου άλλα και οι δυο καλλιέργειες.

Καταγραφή της ανθεκτικότητας των φυσικών εχθρών της αφίδας στο imidacloprid

Από τη μελέτη φαίνεται ότι στο imidacloprid για τα ωφέλιμα έντομα που εξετάστηκαν αλλά και την αφίδα *M. persicae*, φάνηκε ότι η αφίδα *M. persicae* (με μέση τιμή ED₅₀/mg 1,83 ng/mg) έχει ελαφρά χαμηλότερη τιμή σε σχέση με το *C. carnea* (2,30 ng/mg) και σημαντικά μεγαλύτερη από τα *C.septempunctata* (1,55 ng/mg) και *H. variegata* (0,76 ng/mg). Συνεπώς, διαπιστώθηκε ότι το πιο ευαίσθητο αρπακτικό είδος ήταν το *H. variegata*, ακολούθως το *C.septempunctata* το *H. undecimnotata* και τέλος το *C. carnea*. Οι συγκρίσιμες τιμές που παρατηρήθηκαν για τα αρπακτικά υποδηλώνουν ότι στα ωφέλιμα αυτά είδη δεν έχει ακόμα αναπτυχθεί, όπως και στις αφίδες ισχυρή ανθεκτικότητα, κάτι που παρατηρήθηκε σε μεγαλύτερο βαθμό με τα είδη *C. septempunctata* και *H. variegata*. Στις αφίδες παρατηρούνται περισσότερες γενιές ανά χρόνο και επιπλέον παρατηρούνται διάφορες κατηγορίες βιολογικού κύκλου (ολοκυκλικός- ανολοκυκλικός), οπότε σε πληθυσμούς της αφίδας, που αναπαράγονται μόνο παρθενογενετικά, οι ανθεκτικοί γενότυποι, που πιθανώς θα επικρατήσουν, θα αυξηθούν πληθυσμιακά γρηγορότερα από ότι σε πληθυσμούς που αναπαράγονται και παρθενογενετικά και με σεξουαλική αναπαραγωγή. Επομένως, στα ωφέλιμα (που αναπαράγονται μόνο με σεξουαλική αναπαραγωγή) η αύξηση των πληθυσμών που θα προέρχονται από ανθεκτικούς γενοτύπους, οι οποίοι ενδεχομένως θα επικρατήσουν, αναμένεται ότι θα καθυστερεί περισσότερο από ότι στην αφίδα. Τα αποτελέσματα αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη σχεδίαση προγραμμάτων ολοκληρωμένης καταπολέμησης της αφίδας, καθώς βοηθούν στην επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εφαρμογής του imidacloprid στις καλλιέργειες. Αυτή θα μπορούσε να γίνει πριν την εμφάνιση των ωφέλιμων ειδών στον αγρό ή στην καλλιέργεια του καπνού με το νερό άρδευσης. Επίσης, θα ήταν καλό να γίνουν πειράματα επιβίωσης, αναπαραγωγικού δυναμικού, κατανάλωσης αφίδων των αρπακτικών κολεοπτέρων εκτεθειμένα σε δόσεις εντομοκτόνου που σκοτώνουν ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού της αφίδας *M. persicae*

Έλεγχος του τόπου AChE της αφίδας *Myzus persicae* (Sulzer) για μεταλλάξεις

Αποτελέσματα – Συζήτηση

Η αλληλουχία των ace1 και ace2 αποτελούνταν από 665 και 647 αμινοξέα αντίστοιχα (Εικόνα 2 και 3). Στο ace2 που θα περιμέναμε να βρούμε τη μετάλλαξη Ser431Phe, που έχει περιγράψει από τους Nabeshima *et al.* (2003) δεν βρέθηκε σε κανένα από τα δυο ανθεκτικά δείγματα (Εικόνα 3). Αντιθέτως, μεταλλάξεις βρέθηκαν στο ace1 σε τρεις διαφορετικές θέσεις (με κόκκινα γράμματα, Εικόνα 2). Ωστόσο, σε προηγούμενη εργασία (Javed *et al.* 2003) είχε αναφερθεί ότι στις αφίδες, για το ace1, δεν υπάρχει απόδειξη ότι εκφράζεται ως ενεργό ενζυμο και ότι στα Ημίπτερα μόνο ένα ενζυμο είναι ενεργό και αυτό εκφράζεται από το ace2.

Οι τρεις νέες μεταλλάξεις που βρέθηκαν χρειάζονται περισσότερη έρευνα για να βρεθεί αν έχουν κάποιο ρόλο ως προς την ανθεκτικότητα της αφίδας *M. persicae* σε οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά εντομοκτόνα. Επίσης, επιπλέον έρευνα χρειάζεται για την απουσία της μετάλλαξης Ser431Phe στο ace2.

Ace1



Εικόνα 2. Η αλληλουχία των αμινοξέων του *Ace1* από το pirimicarb ευαίσθητο κλώνο (SS_Mpace1), του ανθεκτικού κλώνου (RR_JM_Ace1), της αφίδας *Arhis gossypii* (Agossypri), του δάκου της ελιάς *Bactrocera oleae* (BO.PRO) και της *M. persicae* από τους Javed *et al.* 2003.

Ace2

	10	20	30	40	50	60	70	
1	MDQWLLWESYLVASTYGSLRHHARHQSVGTPPTAEELIETPQLIEDTDHVFQRASDMFAQEFYTEKRNLNHRRRSEFSG							Suscept_ace2_db.PRO
1	-----I SVGTPPTAEFTLAPQTLIEDTDHVFQRASDMFAQEFYTEKRNLNHRRRSEFSG							RR_JM_Ace2_2paral.PRO
1	MDQWLLWESYLVASTYGSLRHHARHQSVGTPPTAEELIETPQLIEDTDHVFQRASDMFAQEFYTEKRNLNHRRRSEFSG							aphisgossipi_ace_2_1.pro
	80	90	100	110	120	130	140	150
80	NQDNDFESSGETYSAYKSDDFLVIHTNKGKIRGITQAASGKLVDAWLGIPYAKKPIGDLRFHFRFPIDRWDNINPETII							Suscept_ace2_db.PRO
57	NQDNDFESSGETYSAYKSDDFLVIHTNKGKIRGITQAASGKLVDAWLGIPYAKKPIGDLRFHFRFPIDRWDNINPETII							RR_JM_Ace2_2paral.PRO
81	NQDNDFESSGETYSAYSDDFLVIHTNKGKIRGITQEAHSGKLVDAWLGIPYAKKPIGDLRFHFRFPIDRWDTTSPETII							aphisgossipi_ace_2_1.pro
	160	170	180	190	200	210	220	230
160	NCTTPENTCVQIFDTLFGDFPGATMWNPNFVSEDCLYINVVVFKPRPQNAAMVWVIFGGGFYSSSATLDIYDPKVLVSE							Suscept_ace2_db.PRO
137	NCTTPENTCVQIFDTLFGDFPGATMWNPNFVSEDCLYINVVVFKPRPQNAAMVWVIFGGGFYSSSATLDIYDPKVLVSE							RR_JM_Ace2_2paral.PRO
161	NCTTPENTCVQIFDTLFGDFPGATMWNPNFVSEDCLYINVVVFRPRPQNAAMVWVIFGGGFYSSSATLDIYDPKVLVSE							aphisgossipi_ace_2_1.pro
	240	250	260	270	280	290	300	310
240	ENVILVSMQYRVASLGFLYFDTEVDFGNAGLFDQIMALQVWHENIKLFGGNFNNVTLFGESGAGAVSVGLHLLSPLSRNLI							Suscept_ace2_db.PRO
217	ENVILVSMQYRVASLGFLYFDTEVDFGNAGLFDQIMALQVWHENIKLFGGNFNNVTLFGESGAGAVSVGLHLLSPLSRNLI							RR_JM_Ace2_2paral.PRO
241	ENVILVSMQYRVASLGFLYFDTEVDFGNAGLFDQIMALQVWHENIKLFGGNFNNVTLFGESGAGAVSVGLHLLSPLSRNLI							aphisgossipi_ace_2_1.pro
	320	330	340	350	360	370	380	390
320	NQAIMESGSSTAPWAILSRREESYSRGLRLARAMGCPDDRNEIHKTVCELRKANSSSTMVEKEWDHVAICFFPFVVDGAE							Suscept_ace2_db.PRO
297	NQAIMESGSSTAPWAILSRREESYSRGLRLARAMGCPDDRNEIHKTVCELRKANSSSTMVEKEWDHVAICFFPFVVDGAE							RR_JM_Ace2_2paral.PRO
321	NQAIMESGSSTAPWAILSRREESYSRGILKLRAMGCPDDRNEIHKTVCELRKANSSSTMVEKEWDHVAICFFPFVVDGAE							aphisgossipi_ace_2_1.pro
	400	410	420	430	440	450	460	470
400	LDDYFQKSLSTNNFKKTNILMGSNSEEGYYSIFYLTELFPKKEENVVSRNFVKAIGQLNENADA AVKSAIEFEYTDWE							Suscept_ace2_db.PRO
377	LDDYFQKSLSTNNFKKTNILMGSNSEEGYYSIFYLTELFPKKEENVVSRNFVKAIGQLNENADA AVKSAIEFEYTDWE							RR_JM_Ace2_2paral.PRO
401	LDDYFQKSLSTNNFKKTNILMGSNSEEGYYSIFYLTELFPKKEENVVSRNFVKAIGQLNENADA AVKSAIEFEYTDWE							aphisgossipi_ace_2_1.pro
	480	490						
480	SPNDPEKRNALDKMVGDT-----							Suscept_ace2_db.PRO
457	SPNDPEKRNALDKMVGDTQFTCNVNEFAHKYALTGNNVYMYFKHRSLNPFKWTGVMHGDEISVFGDPLNFKRYE							RR_JM_Ace2_2paral.PRO
481	SPNDPEKRNALDKMVGDTQFTCNVNEFAHKYALTGNNVYMYFKHRSLNPFKWTGVMHGDEISVFGDPLNFKRYE							aphisgossipi_ace_2_1.pro
	498							
498	-----H							Suscept_ace2_db.PRO
537	TEEEIELSKMMRYWTFNAKTNPSKTFEGSWVTPKWFVHTAYGKEFLTLDTNNTSIGVGRLEQCAFWKNYVEDLMAISH							RR_JM_Ace2_2paral.PRO
561	TEEEIELSKMMRYWTFNAKTNPSKTFEGSWVTPKWFVHTAYGKEFLTLDTNNTSIGVGRLEQCAFWKNYVEDLMAISH							aphisgossipi_ace_2_1.pro
	498							
498	-----H							Suscept_ace2_db.PRO
617	SMKSDKNCTTISGGTKTMI							RR_JM_Ace2_2paral.PRO
641	SMKSDKNCTTISGGTKTMI							aphisgossipi_ace_2_1.pro

Εικόνα 3. Η αλληλουχία των αμινοξέων του Ace2 από το pirimicarb ευαίσθητο κλώνο (Suscept_ace2), του ανθεκτικού κλώνου (RR_JM_Ace2) και της αφίδας *Aphis gossypii*.

Μέρος III

Καταγραφή αφιδοφάγων Coccinellidae σε διάφορες καλλιέργειες της Ελλάδας

Εισαγωγή

Οι αφίδες είναι σοβαρός εχθρός δενδρωδών και ποωδών καλλιεργειών. Στις τελευταίες, εκτός από άμεσες, οι αφίδες προκαλούν και έμμεσες ζημιές με τη μετάδοση αρκετών φυτο-ιών (Blackman & Eastop 2000). Στην Ελλάδα η καταπολέμηση των αφίδων βασίζεται κυρίως στη χρήση εντομοκτόνων, αν και έχουν αναφερθεί περιπτώσεις ανθεκτικότητας σε μεγάλο εύρος εντομοκτόνων, όπως π.χ. στο *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) (Margaritoroulos *et al.* 2007).

Οι αφίδες έχουν πολλούς φυσικούς εχθρούς από διάφορες τάξεις εντόμων. Ανάμεσα στους αποτελεσματικούς φυσικούς εχθρούς των αφίδων στην Ελλάδα συγκαταλέγονται αρπακτικά Neuroptera των οικογενειών Chrysoridae και Hemerobiidae (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος 1998), αρπακτικά Coleoptera της οικογένειας Coccinellidae, όπως *Hippodamia convergens* Guérin-Méneville και *Coccinella septempunctata* L. (Katsarou *et al.* 2005, Ζάρπας 2006), *H. undecimnotata* (Σκούρας και συνεργάτες 2007), αρπακτικά Diptera της οικογένειας Syrphidae και παρασιτοειδή Hymenoptera των οικογενειών Braconidae, Chalcididae και Proctotrypidae (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος 1998). Τα αρπακτικά έντομα της οικογένειας Coccinellidae είναι γνωστά με το κοινό όνομα «πασχαλίτσες» ή «παπαδίτσες». Είναι συνήθως πολυφάγα είδη, ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι δεν είναι όλα τα Coccinellidae αρπακτικά, καθώς ορισμένα είδη είναι αποκλειστικά φυτοφάγα (Hodek & Honek 1996). Τα αρπακτικά Coccinellidae διαθέτουν διάφορα βιολογικά χαρακτηριστικά που τα καθιστούν αποτελεσματικούς εχθρούς των αφίδων, όπως π.χ. υψηλή ικανότητα αναζήτησης τροφής και αδηφαγία, σχετικά υψηλό αναπαραγωγικό δυναμικό, ικανότητα να αποικίζουν όλα τα περιβάλλοντα όπου ζουν οι αφίδες και να τρέφονται με εναλλακτικές τροφές. Τρέφονται με Ημίπτερα έντομα (συνήθως αφίδες), αλλά μπορούν να τραφούν με νεαρές

προνύμφες και αυγά ειδών Κολεοπτέρων, Λεπιδοπτέρων και Υμενοπτέρων (Hodek & Honek 1996).

Τα αποτελέσματα του περιορισμού των αφίδων από εντομοφάγα έντομα σε ορισμένες περιπτώσεις υπήρξαν εντυπωσιακά (Waage & Mills 1992, Price 1997). Όμως τα ωφέλιμα έντομα δεν μπορούν συνήθως να περιορίσουν σε μεγάλο βαθμό τους πληθυσμούς των αφίδων στον αγρό, γιατί ο συγχρονισμός των πληθυσμών τους δεν είναι πάντοτε ικανοποιητικός. Γενικά, θεωρούνται αποτελεσματικά τα αρπακτικά που καταναλώνουν αφίδες σε ικανοποιητική ποσότητα, ώστε να επηρεάζουν σημαντικά τη δυναμική των πληθυσμών των αφίδων (Frazer 1988). Η χρήση των Coccinellidae σε προγράμματα βιολογικής καταπολέμησης ευνοείται από την ικανότητά τους να τρέφονται με διαφορετικά είδη λείας. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί το *Adalia bipunctata* (L.) να τρέφεται και με τετράνυχο (Robinson 1951). Επίσης, τόσο τα ενήλικα όσο και οι προνύμφες είναι αρπακτικά και έτσι επιδρούν για περισσότερο χρόνο στη δυναμική του πληθυσμού των αφίδων (Hodek & Honek 1996). Αντίθετα, σε αρπακτικά Νευρόπτερα όπως το *Chrysoperla carnea* (Stephens) ή σε Δίπτερα της οικογένειας Syrphidae, μόνο οι προνύμφες τρέφονται με αφίδες και τα ενήλικα με γύρη ή νέκταρ. Η βιολογική καταπολέμηση έχει ως σκοπό να μειώσει τον πληθυσμό των εντόμων κάτω από το επίπεδο οικονομικής ζημιάς (Smith & Reynolds 1966, Mumford & Knight 1997, Flint & Dreistadt 1998). Οι βασικές αρχές της βιολογικής καταπολέμησης πρέπει να εφαρμόζονται εξειδικευμένα για κάθε αγροοικοσύστημα. Συνεπώς, περαιτέρω μελέτες στα διαφορετικά αγροοικοσυστήματα πρέπει να γίνουν για τα επικρατέστερα είδη Coccinellidae, ώστε να γίνει εφικτή η βέλτιστη διαχείριση τους.

Στην Ελλάδα, περιορισμένες είναι οι πληροφορίες για τα αρπακτικά είδη Coccinellidae που απαντώνται σε σημαντικές καλλιέργειες όπως ο καπνός, και η ροδακινιά, αλλά και σε παρακείμενες σε αυτές καλλιέργειες και ζιζάνια. Ο Ζάρπας (2006) σε τρία χρόνια της μελέτης είχε βρει στο βαμβάκι τα είδη *H. convergens*, *C. septempunctata*, και *Adalia bipunctata* (L.) (f. *typica*). Οι Kavallieratos *et al.* (2002) βρήκαν το *C. septempunctata* να είναι το πιο συνηθισμένο αρπακτικό στο σκληρό σιτάρι, το *Adonia variegata* στο βαμβάκι. Επίσης οι Kavallieratos *et al.* (2004) είχαν βρει ότι στο καπνό το κοινό αρπακτικό κολεόπτερο ήταν το *H. undecimnotata*. Η παρούσα μελέτη είχε ως

στόχο την καταγραφή των αρπακτικών ειδών Coccinellidae και της συχνότητας εμφάνισής τους σε καλλιέργειες καπνού, ροδακινίες, αλλά και σε παρακείμενες σε αυτές καλλιέργειες και ζιζάνια σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας.

Υλικά και μέθοδοι

Τα έτη 2005, 2006 και το 2007 έγιναν δειγματοληψίες ανά δέκα ημέρες για την καταγραφή αρπακτικών Coccinellidae σε ροδακινέωνες στο Βελεστίνο και τα Λεχώνια Μαγνησίας, στη Μελίκη Ημαθίας, στο Βελβεντό Κοζάνης, στη Νέα Έφεσο Πιερίας και στην Προσύμνη Αργολίδας. Τις ίδιες χρονιές έγιναν δειγματοληψίες σε καπνό στη Μητρόπολη Καρδίτσας, στην Προσύμνη Αργολίδας, στη Μελίκη Ημαθίας, στο Βελβεντό και Βατερό Κοζάνης, στη Νέα Έφεσο Πιερίας και στην Αμφίκλεια Φθιώτιδας. Επιπλέον, έλεγχο για την καταγραφή αρπακτικών Coccinellidae έγινε και σε ζιζάνια πλησίον των καλλιεργειών καπνού και ροδακινιάς. Στην περίπτωση του καπνού η καταμέτρηση των αρπακτικών έγινε, ανά δέκα φυτά σε κάθε γραμμή και σε κάθε δέκα γραμμές του αγρού γινόταν καταμέτρηση και αναγνώριση σε ένα φυτό όλων των ενηλίκων και των προνυμφών. Στις ροδακινίες σε ένα δένδρο ανά τρεις γραμμές γινόταν καταμέτρηση και αναγνώριση των ωφελίμων σε ένα τυχαίο κλάδο. Η αναγνώριση των ειδών γινόταν επιτόπου, ενώ σε εξαιρετικές περιπτώσεις αδυναμίας ταυτοποίησης λαμβάνονταν δείγματα σε πλαστικό φιαλίδιο με αιθυλική αλκοόλη και η αναγνώριση γινόταν στο εργαστήριο. Στην περίπτωση των προνυμφών, γινόταν μεταφορά στο εργαστήριο και εκτροφή τους μέχρι το στάδιο του ενηλικού και ακολουθούσε η αναγνώρισή τους.

Αποτελέσματα και Συζήτηση

Τα ζιζάνια στα όποια βρεθήκαν τα αρπακτικά κολεόπτερα πλησίον σε καλλιέργεια καπνού ή ροδακινιάς είναι τα: γαιδουράγκαθο (*Carduus nutans*), λουβουδιά (*Chenopodium album*), μολόχα (*Malva spp*), λάπαθο (*Rumex*

crispus), μεγάλο λάπαθο (*Rumex obtusifolius*), κουφάγκαθο (*Silybum marianum*), ζωχός (*Sonchus oleraceus*), αγριομελιτζάνα (*Xanthium strumarium*) και η καφέλα (*Capsella bursa-pastoris*)

Τα είδη των κολεοπτέρων αρπακτικών που καταγράφηκαν συνολικά σε όλα τα χρόνια των δειγματοληψιών και σε όλες τις καλλιέργειες ήταν τα *C. septempunctata*, *H. undecimnotata*, *Hippodamia variegata* (Goeze), *Adalia bipunctata* (L.) (f. *typica*), *A. bipunctata* (f. *quadrinotata*), *Adalia 10-punctata* (L.) (f. *bimaculata*), *Propylea 14-punctata* (L.) και διάφορα είδη του γένους *Scymnus*. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα περισσότερα είδη βρέθηκαν στις ροδακινιές (Πίνακας 1). Επίσης, σε όλες τις περιοχές βρέθηκε το *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) ενώ σε όλες τις περιοχές που καλλιεργείται ο καπνός βρέθηκαν τα αρπακτικά έντομα *Macrolophus pygmaeus* Rambur (Hemiptera: Miridae) και *Macrolophus costalis* Fieber (Hemiptera: Miridae) και πλήθος από παρασιτοειδή και υπερπαρασίτα.

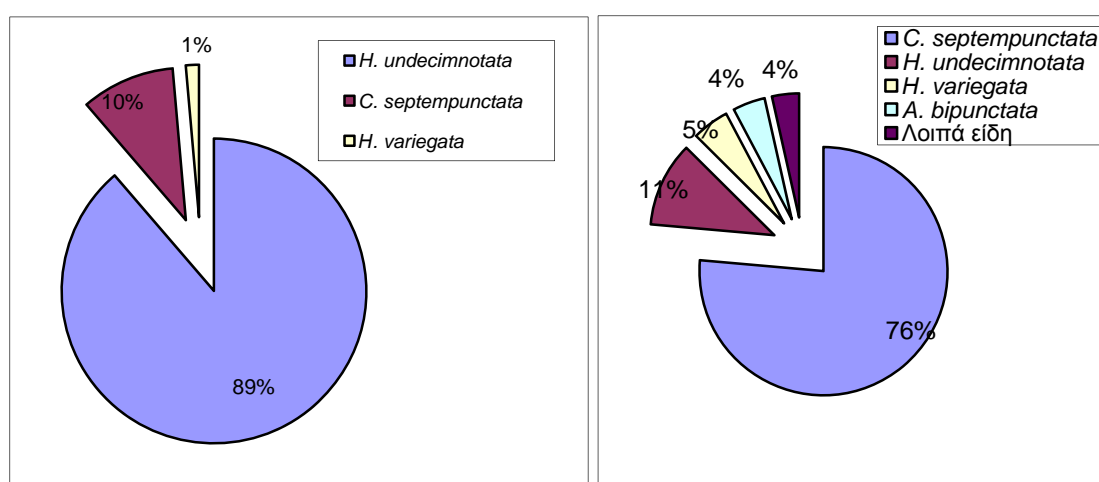
Πίνακας 1. Είδη αρπακτικών Coccinellidae σε καπνό και ροδακινιές καλλιέργειες στην Ελλάδα

Είδος	Καλλιέργεια
<i>Adalia bipunctata</i> (L.) (f. <i>typica</i>)	ροδακινιά,
<i>Adalia bipunctata</i> (L.) (f. <i>quadrinotata</i>)	ροδακινιά
<i>Adalia 10-punctata</i> (L.) (f. <i>bimaculata</i>)	ροδακινιά
<i>Coccinella septempunctata</i> L.	καπνός, ροδακινιά,
<i>Hippodamia undecimnotata</i> (Schneider)	καπνός, ροδακινιά
<i>Hippodamia variegata</i> (Goeze)	καπνός, ροδακινιά
<i>Propylea 14-punctata</i> (L.)	ροδακινιά
<i>Scymnus</i> spp.	ροδακινιά
<i>Hippodamia convergens</i> Guérin-Ménéville	καπνός,

Στον καπνό, βρέθηκαν τα είδη *H. variegata*, *Hippodamia convergens* Guérin-Ménéville, *C. septempunctata* και *H. undecimnotata*. Συγκεντρωτικά για όλη την Ελλάδα στην καλλιέργεια καπνού, το είδος *H. undecimnotata* βρέθηκε σε μεγαλύτερη συχνότητα με ποσοστό 89%, ενώ τα *C.*

septempunctata και *H. variegata* βρέθηκαν σε ποσοστά 10% και 1%, αντίστοιχα. Η συχνότητα εμφάνισης του *H. undecimnotata* στη Βόρεια, Κεντρική και Νότια Ελλάδα ήταν 89%, 88% και 86%, αντίστοιχα. Τα αντίστοιχα ποσοστά για το *C. septempunctata* ήταν 9%, 9% και 14% και για το *H. variegata* 2%, 3% και 0% (Σχήματα 1 και 2).

Στη ροδακινιά βρέθηκαν τα είδη *C. septempunctata*, *H. undecimnotata*, *H. variegata*, *A. bipunctata f. typica*, *A. bipunctata f. quadrimaculata*, *A. 10-punctata f. bimaculata*, *P. 14-punctata* και διάφορα είδη του γένους *Scymnus*. Συνολικά για όλη την Ελλάδα στη ροδακινιά το *C. septempunctata* βρέθηκε σε μεγαλύτερη συχνότητα με ποσοστό 76%, τα *H. undecimnotata* και *H. variegata* καταγράφηκαν σε ποσοστά 11% και 5%, αντίστοιχα, ενώ το *A. bipunctata* και τα υπόλοιπα είδη σε ποσοστό 4%. Πιο αναλυτικά, για τα τρία πιο κοινά είδη, το *C. septempunctata* βρέθηκε σε ποσοστά 83%, 84% και 76% στη Βόρεια, Κεντρική και Νότια Ελλάδα, αντίστοιχα, ενώ το είδος *H. undecimnotata* σε ποσοστά 14%, 7% και 20%. Τα αντίστοιχα ποσοστά στο *H. variegata* ήταν 3%, 9% και 4% (Σχήματα 1 και 2). Αρπακτικά της οικογένειας Coccinellidae καταγράφηκαν επίσης σε παρακείμενα ζιζάνια, δένδρα και καλλιέργειες (π.χ. σιτηρά, βαμβάκι). Ωστόσο, δε βρέθηκαν διαφορετικά είδη από τα προαναφερθέντα.

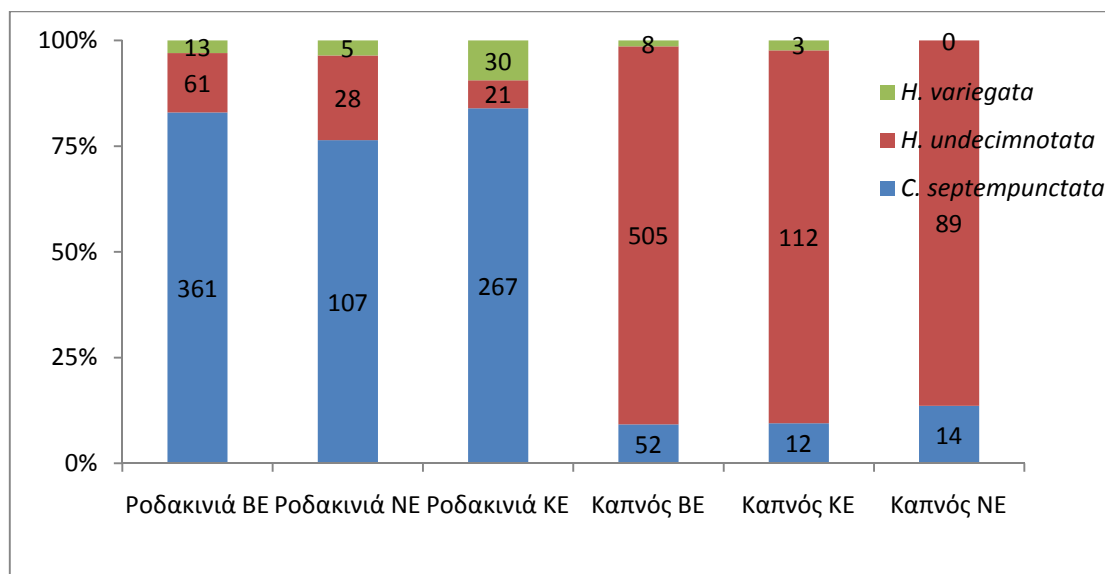


Σχήμα 1. Συχνότητα εμφάνισης αρπακτικών Coccinellidae σε καλλιέργεια καπνού (αριστερά) και ροδακινιάς (δεξιά) τα έτη 2005 έως και το 2007

Σχετικά με την εποχική διακύμανση των Coccinellidae, τα διαχειμάζοντα ή διαπαύοντα αρπακτικά εμφανίζονταν σε ζιζάνια περί τα μέσα Μαρτίου, ενώ μετά μετακινούνταν σε παρακείμενες καλλιέργειες σιταριού και ροδακινιάς στα μέσα Απριλίου. Παρόμοια μετακίνηση παρατηρούνταν από τα μέσα Μαρτίου και μετά από ζιζάνια στον καπνό (σπορεία και κύρια καλλιέργεια) έως το τέλος Σεπτεμβρίου. Στην περίπτωση του βαμβακιού, σε πολλές περιπτώσεις γεινίασης βαμβακοφύτων με σιτηρά, παρατηρούνταν εμπλουτισμός της ωφέλιμης εντομοπανίδας (ιδίως του *C. septempunctata*) στο βαμβάκι κατά το μήνα Ιούνιο, που συμπίπτει με την περίοδο θερισμού των σιτηρών, γεγονός που υποδηλώνει μετακίνηση πληθυσμών αρπακτικών (Ζάρπας 2006).

Στο Σχήμα 3 φαίνεται ο αριθμός για τα τρία χρόνια της μελέτης τα τρία κυριότερα αρπακτικά *C. septempunctata*, *H. undecimnotata* και *H. variegata* που βρέθηκαν σε καλλιέργειες ροδακινιάς, καπνού και παρακείμενες σε αυτές καλλιέργειες ή ζιζάνια. Και στα τρία χρόνια, πρώτο εμφανιζόταν το *C. septempunctata* περί τα μέσα Μαρτίου, σε ζιζάνια ή σε σιτηρά, όπου τρέφονταν κυρίως με αφίδες που διαχειμάζαν εκεί ή με γύρη. Στη συνέχεια μετακινούνταν στις ροδακινιές περί τα τέλη Απριλίου με αρχές Μαΐου, όπου και οι πληθυσμοί της αφίδας *M. persicae* και *H. pruni* αρχίζουν να γίνονται μεγάλοι. Στη συνέχεια, μετά το τέλος Μαΐου, μικροί πληθυσμοί βρέθηκαν σε καλλιέργειες καπνού αλλά και σε παρακείμενα ζιζάνια αλλά και καλλιέργειες (π.χ. βαμβάκι) σε πολύ μικρό βαθμό μέχρι και το τέλος του καλοκαιριού. Αντίθετα, το αρπακτικό Κολεόπτερο *H. undecimnotata* βρέθηκε και τα τρία χρόνια της μελέτης μετά τα μέσα Απριλίου (ένα μήνα μετά τις πρώτες εμφανίσεις του *C. septempunctata*) σε μικρούς αριθμούς μέχρι και τα μέσα Ιουνίου. Μέχρι τότε το *H. undecimnotata* βρέθηκε καθόλη την περίοδο και σε ζιζάνια αλλά και σε ροδάκινα, αλλά δεν βρέθηκε σε άλλες καλλιέργειες (πχ βαμβάκι) εκτός από μια φορά (10/5/2005, Μελίκη) όπου βρέθηκε σε σιτηρά. Από τα μέσα Ιουνίου, μέχρι και το τέλος Αυγούστου μεγάλοι αριθμοί βρίσκονταν σε καλλιέργειες καπνού, σε όλη την Ελλάδα. Το τρίτο πιο κοινό αρπακτικό Κολεόπτερο που βρέθηκε και τα τρία χρόνια σε καλλιέργειες καπνού, ροδακινιές αλλά κυρίως σε παρακείμενα ζιζάνια και σιτηρά είναι το *H. variegata*. Βρέθηκαν σε ζιζάνια από τα μέσα Απριλίου και μετά, το Μάιο σε πολύ μικρούς αριθμούς στα ροδάκινα και περί τα τέλη Ιουλίου μέχρι τα τέλη Αύγουστου. Πάντα το *H. variegata* σε αυτές τις καλλιέργειες βρισκόταν σε

πολύ μικρούς αριθμούς, μόνη εξαίρεση ήταν σε παρακείμενες με της ροδακινίες λεύκες. Το αρπακτικό *A. bipunctata f. typical* δεν βρέθηκε καμιά φορά σε καλλιέργεια καπνού στη Βόρεια Ελλάδα, αλλά και σε πολύ μικρούς αριθμούς στις ροδακινίες και τα ζιζάνια.



Σχήμα 2. Συχνότητα εμφάνισης αρπακτικών Coccinellidae σε καλλιέργεια καπνού και ροδακινιάς (KE, BE, NE = Κεντρική, Βόρεια, Νότια Ελλάδα, αντίστοιχα)

Από τα αποτελέσματα παρατηρείται ότι τα τρία τελευταία χρόνια το είδος *H. undecimnotata* είναι το κυρίαρχο αρπακτικό σε καλλιέργειες καπνού στις περιοχές επισκόπησης, ενώ στη ροδακινιά κυριαρχεί το *C. septempunctata*. Η διαφορά αυτή της επικράτησης του *C. septempunctata* στη ροδακινιά έναντι του *H. undecimnotata* μπορεί να οφείλεται μεταξύ άλλων και στη διαφορετική τιμή της ουδού ανάπτυξης των δύο ειδών. Πιο συγκεκριμένα, πρόσφατα έχει βρεθεί ότι η ουδός ανάπτυξης του *C. septempunctata* στην Ελλάδα είναι 10,7 °C (Katsarou *et al.* 2005), ενώ αυτή του *H. undecimnotata* είναι 12,7 °C (Κεφάλαιο 4). Συνεπώς, το *C. septempunctata* εμφανίζεται πιο πρώιμα με αποτέλεσμα να αναπτύσσει γρηγορότερα πληθυσμούς και να επικρατεί στη ροδακινιά. Αργότερα, η επικράτηση του *H. undecimnotata* στον καπνό έναντι του *C. septempunctata* μπορεί να οφείλεται στη γρηγορότερη προνυμφική ανάπτυξη του πρώτου καθώς και στο μικρότερο ενδογενή ρυθμό αύξησης των πληθυσμών του δεύτερου ($r_m = 0.084$ για το *H. undecimnotata* έναντι 0,061 για το *C. septempunctata*) (Κεφάλαιο 4). Ο Katsoyannos (1997) βρήκε το *H.*

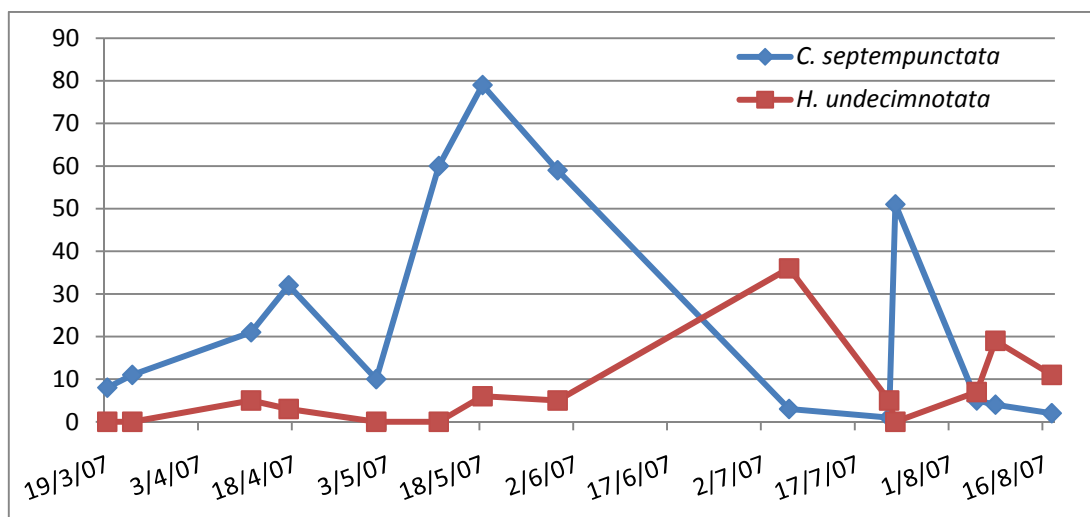
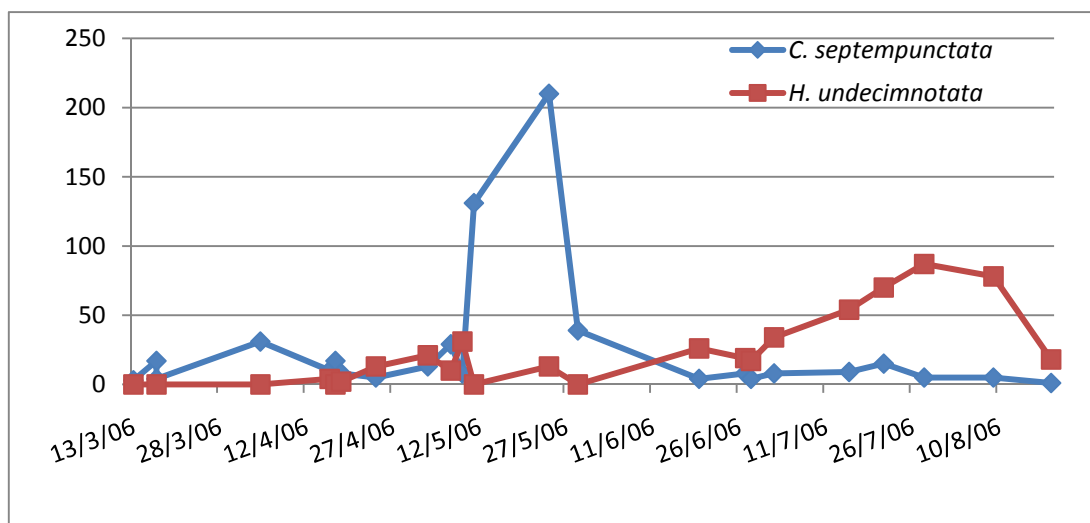
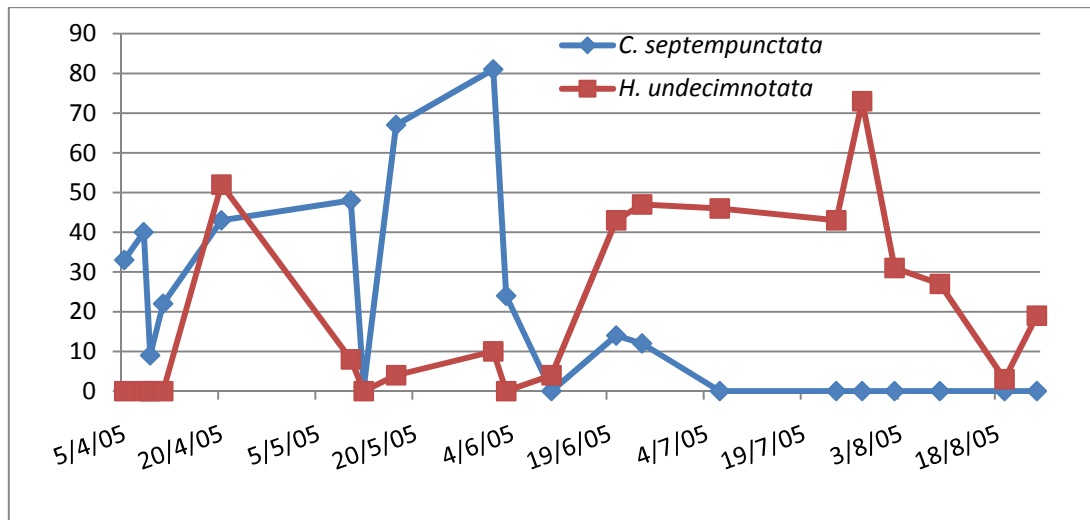
undecimnotata στην Κωπαΐδα σε διάφορες καλλιέργειες μέχρι τα μέσα Ιουνίου. Μετά αναφέρει ότι παρατηρείται ένα είδος μετανάστευσης (υψοτακτική) σε βουνά.

Οι Kavallieratos *et al.* (2004) είχαν βρει στην Τιθορέα της Κεντρικής Ελλάδος σε καλλιέργεια καπνού τα *H. undecimnotata*, *H. variegata* και *A. bipunctata* με το πρώτο να βρίσκεται σε πολύ μεγαλύτερο αριθμό σε σχέση με τα άλλα δύο. Η καταγραφή του *A. bipunctata* και οι μεγαλύτεροι αριθμοί του *H. undecimnotata* μάλλον οφείλονται στο ότι ο αγρός ήταν χωρίς την χρήση εντομοκτόνων.

Η μη καταγραφή του *H. undecimnotata* σε καλλιέργειες βαμβακιού οφείλεται πιθανότατα στο γεγονός ότι το είδος αυτό είναι ολιγοφάγο (Hodek & Honek 1996) και η αφίδα *A. gossypii* δεν είναι προτιμητέα τροφή για αυτό. Επίσης σε όλα τα ζιζάνια που βρέθηκε το *H. undecimnotata* η αφίδα που το είχε προσβάλει ήταν είτε η *A. fabae* είτε η *M. persicae*. Ωστόσο, χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για να επιβεβαιωθούν τα ανωτέρω.

Στα πλαίσια της Ολοκληρωμένης Διαχείρισης Εχθρών (IPM), τα είδη, ο αριθμός και το βιολογικό στάδιο των αρπακτικών Coccinellidae, αλλά και των υπόλοιπων αρπακτικών που υπάρχουν στην καλλιέργεια θα πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη στο πρόγραμμα φυτοπροστασίας που ακολουθείται. Η χημική μέθοδος καταπολέμησης θα πρέπει να είναι η τελευταία μετά τις καλλιεργητικές, μηχανικές, φυσικές και βιολογικές μεθόδους με απώτερο στόχο τον περιορισμό των αρνητικών επιπτώσεων στους φυσικούς εχθρούς, στο περιβάλλον, αλλά και στον καταναλωτή.

Έτσι, ιδιαίτερα στην Ελλάδα, πιο εντατικές βιολογικές μελέτες ανάπτυξης σε διάφορους ξενιστές με διαφορετικά είδη λείας, αρπακτικότητας, κανιβαλισμού, μελέτες ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα, αλλά και μελέτες καταγραφής των αρπακτικών Coccinellidae σε περισσότερες καλλιέργειες θα αναδείξουν τη σημαντική συμβολή τους στην αντιμετώπιση των εντομολογικών εχθρών στα πλαίσια της Ολοκληρωμένης Διαχείρισης Εχθρών.



Σχήμα 3. Αριθμός των αρπακτικών Κολεοπτέρων *H. undecimnotata* και *C. septempunctata* στην Ελλάδα που βρεθήκαν σε καπνό, ροδακινιά και παρακείμενα φυτά το 2005, το 2006 και το 2007.

Μέρος IV

Μελέτη των αρπακτικών *Coccinella septempunctata* L., *Hippodamia variegata* (Goeze) και *Hippodamia (Semiadalia) undecimnotata* (Schneider) (Coleoptera: Coccinellidae) και της δράσης τους επί της αφίδας *Myzus persicae* σε συνθήκες εργαστηρίου.

Εισαγωγή

Η *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae) είναι μια πολυφάγος αφίδα που προσβάλλει περισσότερα από 400 είδη φυτών που ανήκουν σε περισσότερες από 40 οικογένειες (Blackman & Eastop, 2007). Ο Blackman (1987) αρχικά είχε αναφέρει για τη μορφή της αφίδας που είναι προσαρμοσμένη στον καπνό ότι είναι ένα διαφορετικό είδος, αλλά στην συνέχεια μοριακές μελέτες (Field *et al.* 1994, Margaritopoulos *et al.* 1998) ότι η μορφή αυτή είναι ένα υποείδος (ως *Myzus persicae* ssp. *nicotianae* Blackman) (Margaritopoulos *et al.* 2003). Το *Myzus persicae nicotianae* είναι ένα επιβλαβές έντομο για τον καπνό, προκαλώντας σε αυτόν άμεσες και έμμεσες μέσω της μετάδοσης φυτικών ιών (Kennedy *et al.* 1962, Mistic & Clark 1979, Blackman & Eastop 2007).

Ο έλεγχος της αφίδας *Myzus persicae nicotianae* βασίζεται κυρίως στα εντομοκτόνα. Ωστόσο, υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας έχουν παρουσιαστεί σε όλο τον κόσμο (Nauen & Elbert 2003) αλλά και στην Ελλάδα (Margaritopoulos *et al.* 2007). Έτσι μέθοδοι πιο φιλικές με το περιβάλλον πρέπει να βρεθούν για τον έλεγχο της. Συνήθως μειώνεται ο πληθυσμός των αφίδων από αρπακτικά, παράσιτα και παθογόνα. Μερικές οικογένειες με αρπακτικά έντομα, (πχ Coccinellidae) και οι προνύμφες με τα ενήλικα τρέφονται με αφίδες, ενώ σε άλλες οικογένειες (π.χ. Syrphidae και Chrysopidae) μόνο οι προνύμφες είναι θηρευτές.

Τα αρπακτικά έντομα της οικογενείας Coccinellidae είναι συνδεδεμένα με το βιολογικό έλεγχο των έχθρων περισσότερο από οποιαδήποτε αλλά αρπακτικά έντομα. Τα αρπακτικά Coccinellidae είναι σημαντικοί φυσικοί εχθροί επιζήμιων εντόμων όπως αφίδες, αλευρώδεις, ακάρεα κ.α. (Obrycki & Kring 1998).

Τα είδη *Coccinella septempunctata* L., *Hippodamia variegata* (Goeze) και *Hippodamia (Semiadalia) undecimnotata* (Schneider) αποτελούν ένα σημαντικό μέρος των φυσικώς συναντώμενων ωφελίμων εντόμων που ασκούν βιολογική καταπολέμηση στις αφίδες, συνεπώς ενδιαφέρει ο προσδιορισμός διαφόρων χαρακτηριστικών της βιολογίας τους.

Η γνώση των βιολογικών παραμέτρων είναι ουσιώδης προκειμένου να εκτιμηθεί ο ενδεχόμενος ρυθμός αύξησης ενός πληθυσμού και να προβλεφθεί ο μέγιστος αριθμός των γενιών που μπορούν να εμφανιστούν μέσα σε μια καλλιεργητική περίοδο, σε μια συγκεκριμένη περιοχή.

Ο περιορισμός των αφίδων από τα παραπάνω είδη παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον, αφού η αφίδα του καπνού, *Myzus persicae* Sulzer, προκαλεί σοβαρές ζημιές στην παραγωγή λόγω ποιοτικής και ποσοτικής υποβάθμισης, ενώ μειώνει την οικονομικότητα της εκμετάλλευσης λόγω του αυξημένου κόστους από τη χρήση εντομοκτόνων (Margaritoroulos *et al.* 2007). Συνεπώς, η εκτίμηση του ελέγχου που ασκείται στις αφίδες από τα αρπακτικά Coccinellidae είναι απαραίτητη.

Συγκριτικές μελέτες μεταξύ των ειδών *C. septempunctata*, *H. variegata* και *H. undecimnotata*, θα δείξουν την ταχύτητα ανάπτυξης και την κατανάλωση αφίδων του πληθυσμού καθενός από τα είδη αυτά σε συγκεκριμένες θερμοκρασίες. Με βάση τα στοιχεία αυτά, είναι δυνατή η εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των συγκεκριμένων αρπακτικών στον έλεγχο των αφίδων. Οι διαφορετικοί ρυθμοί ανάπτυξης των ειδών, εάν υπάρχουν, μπορεί να συνδέονται με συγκεκριμένες κλιματικές συνθήκες και να επηρεάζουν τη δυναμική των πληθυσμών των φυσικών εχθρών σε περίπτωση που αυτοί βρεθούν σε νέες κλιματικές συνθήκες (Miller 1983).

Τα είδη *H. undecimnotata*, *H. variegata* και *C. septempunctata* είναι μερικά από τα κυριότερα αρπακτικά αφίδων, καθώς παρ'ότι είναι πολυφάγα επιδεικνύουν μια προτίμηση στις αφίδες και έτσι αποτελούν σημαντικούς παράγοντες περιορισμού των πληθυσμών τους (Hodek 1973).

Η γνώση των χαρακτηριστικών της ζωής των τριών αυτών ειδών είναι απαραίτητη και προαπαιτείται για κάθε στάδιο της βιολογικής καταπολέμησης, από την επιλογή του κατάλληλου φυσικού εχθρού έως και την απελευθέρωσή του και τη διαχειρισή του στον αγρό. Επιπλέον, στα πλαίσια της κλασσικής

βιολογικής καταπολέμησης η απελευθέρωση ενός καλά προσαρμοσμένου φυσικού εχθρού θεωρείται κρίσιμη (Albuquerque *et al.* 1994).

Στοιχεία των παραμέτρων ανάπτυξης συναρτήσει της θερμοκρασίας είναι σημαντικά προκειμένου να κατανοηθεί η δυναμική σχέση αρπακτικού και θηράματος. Η αύξηση των αφιδοφάγων Coccinellidae της εύκρατης ζώνης συναρτήσει της θερμοκρασίας έχει μελετηθεί αρκετά. Πολυάριθμες μελέτες δείχνουν πως η θερμοκρασία που δέχονται τα έντομα στα στάδια της ανήλικης ζωής τους επηρεάζει άμεσα τη θνησιμότητα, τους ρυθμούς ανάπτυξης και το μέγεθός τους.

Τα στοιχεία από τη μέχρι σήμερα μελέτη της ανάπτυξης των αφιδοφάγων Coccinellidae συναρτήσει της θερμοκρασίας, δείχνουν ομοιότητες μεταξύ των ειδών της εύκρατης ζώνης. Οι θερμοκρασίες που αντιπροσωπεύουν την κάτω ουδό ανάπτυξης κυμαίνονται από 8.2 έως 14.4 °C, ενώ οι απαιτήσεις σε ημεροβαθμούς για ανάπτυξη από το στάδιο του αυγού έως το τέλειο κυμαίνονται από 181 έως 595 (Obrycki & Tauber 1978, 1981, Naranjo *et al.* 1990, Orr & Obrycki 1990, Miller 1992, Hodek & Honek 1996).

Ωστόσο σε μία μελέτη έχει ερευνηθεί η σχέση των συγκεκριμένων αρπακτικών (Katsarou *et al.* 2005) και των αφίδων του καπνού στην Ελλάδα. Ακόμα θα ήταν χρήσιμο να γνωρίζουμε αν μεταξύ των ειδών *H. variegata*, *H. undecimnotata* και *C. septempunctata*, που συναντώνται σε όλες τις περιοχές Ελλάδας και πιθανώς ασκούν ένα βαθμό φυσικού βιολογικού ελέγχου, υπάρχουν σαφείς και διακριτές μεταξύ τους περιβαλλοντικές διαφορές

Συνεπώς, σκοπός της εργασίας είναι η μελέτη της ανάπτυξης και δημογραφίας στα είδη αρπακτικών εντόμων *H. variegata*, *H. undecimnotata* και του *C. septempunctata*, για την καλύτερη γνώση της βιολογίας τους και την κατανόηση του ρόλου τους στον έλεγχο των πληθυσμών της αφίδας του καπνού *M. persicae*.

Υλικά και Μέθοδοι

Πειραματικό υλικό

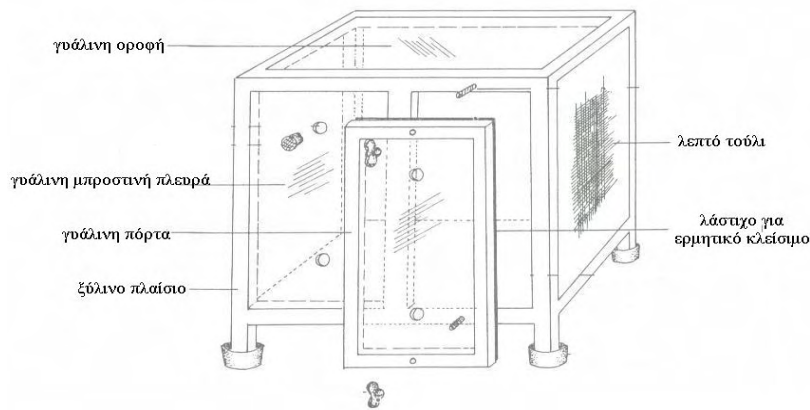
Τα δύο είδη αρπακτικών Κολεοπτέρων *H. variegata* και *H. undecimnotata* συλλέχθηκαν στην περιοχή Κατερίνης το έτος 2004, ενώ το *C. septempunctata* το 2006 από καλλιέργεια καπνού. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε ένας κόκκινος ανολοκυκλικός κλώνος της αφίδας του καπνού *Myzus persicae* από πληθυσμό που συλλέχθηκε από την περιοχή της Κατερίνης σε καπνό. Η ποικιλία καπνού (*Nicotiana tabacum* L, οικ. Solanaceae) που χρησιμοποιήθηκε για την εκτροφή του κλώνου της αφίδας αλλά και ως ξενιστή, ήταν η Ανατολικού τύπου Σ79.

Διατήρηση πειραματικού υλικού

Αποικίες αφίδων

Μετά τη συλλογή τους οι αφίδες μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο όπου διατηρήθηκαν σε ειδικούς κλωβούς εκτροφής (Εικόνα 1), διαστάσεων 50 x 40 x 45 cm. Οι δύο πλευρές και η οροφή τους καλύπτονταν από γυαλί, ενώ οι άλλες δυο πλευρές καλύπτονταν από πολύ λεπτό τούλι που επέτρεπε τον αερισμό. Οι κλωβοί έκλειναν ερμητικά, εμποδίζοντας τη διαφυγή των αφίδων ενώ ταυτόχρονα αποφευγόταν η μόλυνση από άλλα έντομα.

Οι κλωβοί τοποθετήθηκαν σε δωμάτιο ελεγχόμενων συνθηκών, με θερμοκρασία ρυθμιζόμενη στους $23 \pm 0,5$ °C, υγρασία 50 % (± 5) και φωτοπερίοδο L16:D8 (ώρες φωτός:ώρες σκότους, L=Light, D=Darkness). Οι συνθήκες εξασφάλιζαν τη συνεχή παρθενογενετική αναπαραγωγή των αφίδων. Οι αφίδες τρέφονταν σε φυτά ραπανιού (*Raphanus sativus* L.). Η τοποθέτηση καινούργιων φυτών στους κλωβούς επαναλαμβάνονταν κάθε δύο ημέρες, αφού είχε προηγηθεί πλύσιμο, λεπτομερής καθαρισμός με πινέλο και έλεγχος ώστε να αποφευχθεί η μόλυνση της αποικίας από αφίδες ή άλλα είδη εντόμων.



Εικόνα 1: Κλωβός εκτροφής αφίδων επάνω σε γλαστρικά φυτά, διαστάσεων 50 x 40 x 45 cm (Blackman 1988).

Αποικίες αρπακτικών

Ενήλικα άτομα και των τριών ειδών αρπακτικών μετά τη συλλογή τους από το χωράφι τοποθετήθηκαν σε ειδικά αεροστεγή σακουλάκια δειγματοληψίας σε κουτί με παγοκύστες και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο για την ίδρυση αποικίας. Στο εργαστήριο διατηρήθηκαν σε δωμάτιο με ελεγχόμενες συνθήκες, με θερμοκρασία ρυθμιζόμενη στους 23 ± 1 °C, με υγρασία $50\% (\pm 5)$ και φωτοπερίοδο 16:8 (L: D). Κάθε είδος τοποθετήθηκε χωριστά σε ξύλινο κουτιά διαστάσεων 20 x 20 x 20 cm στο πάνω μέρος των οποίων υπήρχε ένα στρογγυλό άνοιγμα, το οποίο καλυπτόταν με λεπτό τούλι και επέτρεπε τον αερισμό. Σε κάθε κουτί κάθε δυο ημέρες προσθέτονταν φύλλα καπνού και νέες αφίδες για τη διατροφή τους. Καθημερινώς γινόταν έλεγχος για την εναπόθεση ωών, τα οποία και μεταφέρονταν σε άλλα κουτιά μέχρι την εκκόλαψή τους. Μετά την εκκόλαψη των ωών οι νεαρές προνύμφες τοποθετούνταν σε μικρότερα στρογγυλά κουτιά διαμέτρου 4,5 και ύψους 2 cm, χωριστά η κάθε μια για να αποφευχθεί ο καννιβαλισμός και κάθε δυο ημέρες προσθέτονταν αφίδες για τη διατροφή τους. Όταν τα έντομα έφταναν στο στάδιο του τελείου, μεταφέρονταν στα μεγαλύτερα κουτιά προκειμένου να αναπαραχθούν και να διατηρηθεί η αποικία.

Φυτά

Τα φυτά καπνού, τα φύλλα των οποίων χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα (ποικιλία Σ79), αναπτύχθηκαν σε θερμοκήπιο. Ένα με δύο περίπου μήνες μετά τη σπορά τους στο σπορείο, 1-2 νεαρά φυτά καπνού μεταφυτεύονταν σε γλάστρες διαμέτρου 11,5cm. Το εδαφικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε, ήταν ένα μείγμα τύρφης και κομποστοποιημένων φυτικών υλικών.

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν φυτά από ραπανάκι (*R. sativus*) της μεγαλόκαρπης ποικιλίας Radish για την εκτροφή των αφίδων. Ο λόγος που χρησιμοποιήθηκε ραπανάκι ήταν ότι αποτελεί έναν καλό ξενιστή για το *M. persicae* και συντελεί στην ανάπτυξη μεγάλων αριθμών αφίδων. Συγχρόνως, η ανάπτυξή του στο θερμοκήπιο είναι εύκολη.

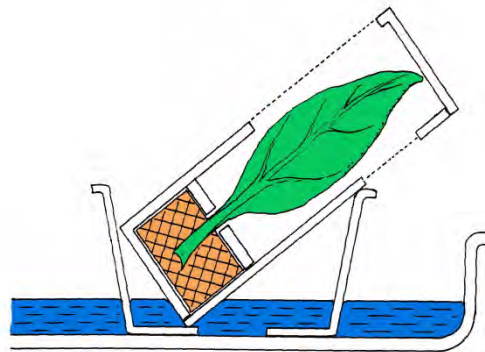
Εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε

Για την πραγματοποίηση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν πέντε βιοκλιματικοί θάλαμοι με φωτοπερίοδο 16:8 (L: D) και θερμοκρασίες $17 \pm 0,5$ °C, $20 \pm 0,5$ °C, $23 \pm 0,5$ °C, $26 \pm 0,5$ °C και $29 \pm 0,5$ °C. Επίσης χρησιμοποιήθηκε ένας ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας Precisa 40SM-200A (Sartorius Bradford, UK).

Πειραματική μεθοδολογία

Για τη μελέτη των εντόμων μέχρι το στάδιο του τελείου, μεμονωμένα αυγά μεταφέρονταν από τις αποικίες, όπου διατηρούνταν τα αρπακτικά, στις σταθερές θερμοκρασίες των πειραματικών συνθηκών 17, 20, 23, 26 και 29 °C. Σε ημερήσια βάση γινόταν καταγραφή για την εκκόλαψη των αυγών και τη θνησιμότητά τους. Κάθε μια από τις νεοεκκολαφθείσες προνύμφες μεταφερόταν σε ένα φύλλο καπνού μήκους 8-10cm, το οποίο ήταν τοποθετημένο μέσα σε ένα αριθμημένο κουτί εκτροφής διαστάσεων 7,7 x 4,5 x 2 cm (Εικόνα 2), στη βάση του οποίου υπήρχε ένα κομμάτι σπόγγου που διαβρεχόταν με νερό (Blackman 1971). Η διαβροχή εξασφαλίστηκε τοποθετώντας τα κουτιά εκτροφής με μικρή κλίση (ώστε να βρίσκεται το

φύλλο σε φυσική θέση) σε μεγαλύτερα κουτιά διαστάσεων 14,5 cm x 8,5 cm με μικρή ποσότητα νερού. Χρησιμοποιήθηκαν αφίδες ενός κόκκινου κλώνου του *M. persicae*. Στο φύλλο του καπνού τοποθετούνταν ενήλικα άπτερα παρθενογενετικά άτομα. Η αντικατάσταση των φύλλων γινόταν κάθε μια με δυο ημέρες ώστε η θρεπτική τους κατάσταση να διατηρείται στα άριστα επίπεδα για τη διατροφή των αφίδων. Κάθε ημέρα γινόταν καταμέτρηση της κατανάλωσης αφίδων από κάθε προνύμφη και προσθήκη γνωστού αριθμού αφίδων (10-90 αφίδες), έτσι ώστε να διατηρούνται σε υπερεπάρκεια μέχρι το στάδιο της νύμφωσης. Επίσης, καταγραφόταν η θνησιμότητα και η διάρκεια των ανώριμων σταδίων με καθημερινό έλεγχο για την παρουσία εκδυμάτων. Αμέσως μετά την έξοδό τους από την νύμφωση τα τέλεια έντομα τοποθετούνταν για 2-3 λεπτά στους 0°C προκειμένου να αδρανοποιηθούν και να ακινητοποιηθούν. Στη συνέχεια ζυγίζονταν σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας (με ακρίβεια εκατοντάκις χιλιοστού του γραμμαρίου).



Εικόνα 2: Κουτί εκτροφής αρπακτικών διαστάσεων 7,7 x 4,5 x 2 cm (Blackman 1971).

Σε κάθε μια από τις πέντε εξεταζόμενες θερμοκρασίες τοποθετήθηκαν τουλάχιστον είκοσι επαναλήψεις για κάθε είδος, όμως στα αποτελέσματα συμπεριλήφθηκαν μόνο οι επαναλήψεις των εντόμων που ολοκλήρωσαν το βιολογικό τους κύκλο έως και το στάδιο του τελείου.

Για τη μελέτη της ωοτοκίας των τελείων εντόμων, η οποία έγινε σε πειραματικές συνθήκες θερμοκρασίας $23^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, υγρασίας 50% και φωτοπεριόδου 16:8 (L:D), ζεύγη του είδους *C. septempunctata*, *H. variegata*

και *H. undecimnotata* που αναπτύχθηκαν στους 23 °C, τοποθετήθηκαν σε ορθογώνια κουτιά διαστάσεων 7 x 8 x 4 cm. Εκεί αφέθηκαν μέχρι το θάνατο του θηλυκού εντόμου. Καταγραφή της κατανάλωσης αφίδων (για το *C. septempunctata* για της 50 πρώτες ημέρες του ενήλικου θηλυκού) και της ωοτοκίας γινόταν σε ημερήσια βάση μέχρι το θάνατο των εντόμων, ενώ τα παραγόμενα αυγά απομακρύνονταν από το κουτί.

Ανάλυση στοιχείων

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το στατιστικό πακέτο Statistica v6.0. Περιελάμβανε το χ^2 test αβεβαιότητας για την ανάλυση των στοιχείων της επιβίωσης και τη γραμμική συσχέτιση για την εκτίμηση της κάτω ουδού ανάπτυξης (Dth) καθώς και οι απαιτήσεις σε ημεροβαθμούς (DD). Οι ημεροβαθμοί χρησιμοποιήθηκαν ως μονάδες μέτρησης της θερμικής σταθεράς k. Η διάρκεια ανάπτυξης σε σχέση με τη θερμοκρασία εκφράζεται με διάφορους τρόπους. Ο τρόπος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν η σχέση της θερμικής άθροισης $y(x-a)=k$, όπου y είναι η διάρκεια ανάπτυξης, x η θερμοκρασία, a το κάτω θερμικό όριο ανάπτυξης (αναπτυξιακό μηδέν) και k η θερμική σταθερά. Στη γραμμική συσχέτιση τα στοιχεία από το ρυθμό ανάπτυξης (το αντίστροφο των ημερών ανάπτυξης) χρησιμοποιήθηκαν ως η εξαρτημένη μεταβλητή και η θερμοκρασία ως η ανεξάρτητη.

Η μαθηματική έκφραση της γραμμικής συσχέτισης για την περιγραφή της σχέσης μεταξύ του ρυθμού ανάπτυξης και της θερμοκρασίας ήταν : $1/\text{ημέρες} = b + (a \times \text{θερμοκρασία})$ όπου οι παράμετροι a και b προσδιορίζονται από τη γραμμική συσχέτιση. Η κάτω ουδός ανάπτυξης υπολογίστηκε ως το σημείο τομής της γραμμικής εξίσωσης $(-b/a)$ με τον άξονα x. Οι μέρες πάνω από το Dth που απαιτούνται για ανάπτυξη, υπολογίστηκαν ως το αντίστροφο της καμπύλης συσχέτισης.

Η σύγκριση της συνολικής και ημερήσιας κατανάλωσης αφίδων, μεταξύ θερμοκρασιών, έγινε με τη μέθοδο ανάλυσης της παραλλακτικότητας (one-way Anova). Επιπρόσθετα, τα χαρακτηριστικά των ενηλίκων βάρους, συγκρίθηκαν με την Anova, χρησιμοποιώντας το φύλο και τη θερμοκρασία ως παράγοντες. Η σύγκριση των μέσων όρων έγινε με το κριτήριο του Duncan.

Τα δεδομένα ανάπτυξης και θνησιμότητας ατελών σταδίων, καθώς και η παρατηρούμενη αναλογία φύλου, η γονιμότητα και η διάρκεια ζωής των τέλειων χρησιμοποιήθηκαν για την κατάρτιση πινάκων ζωής των δυο αρπακτικών. Ο ενδογενής ρυθμός αύξησης (r_m) των αντίστοιχων πληθυσμών υπολογίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο του Birch (1948) μέσω της εξίσωσης: $\sum \exp(-r \cdot x) \cdot l_x \cdot m_x = 1$, όπου n ο αριθμός των εξετασθέντων θηλυκών, x η ηλικία των ατόμων, l_x η πιθανότητα επιβίωσης στην ηλικία x και m_x ο μέσος αριθμός θηλυκών απογόνων σε χρόνο x . Για τον υπολογισμό της αρχικής τιμής του l_x για το ενήλικο στάδιο της ζωής ενός είδους εντόμου, χρησιμοποιείται ο λόγος αριθμού ατόμων του εξεταζόμενου δείγματος, τα όποια φτάνουν στην ενηλικίωση προς των αρχικό αριθμό αυγών του δείγματος. Ακόμη, υπολογίστηκαν ο καθαρός αναπαραγωγικός ρυθμός ($R_0 = \sum l_x m_x$), η μέση διάρκεια γενιάς ($T = \ln(R_0)/r_m$) και ο χρόνος διπλασιασμού του πληθυσμού ($DT = \ln(2)/r_m$).

Αποτελέσματα – Συζήτηση

Προνομφική θνησιμότητα

Στα δυο είδη αρπακτικών που εξετάστηκαν σε πέντε διαφορετικές θερμοκρασίες παρατηρήθηκε πως η θνησιμότητα σε όλα τα ατελή στάδια (ωά, προνύμφη 1^{ου}- 4^{ου} σταδίου, νύμφη) ήταν σχετικά υψηλή στους 17 °C και χαμηλή στους 26 °C και 29 °C (Πίνακας 1). Για το *H. variegata* η θνησιμότητα των ωών κυμάνθηκε από 4,9 % στους 20 °C έως και 24,4 % στους 29 °C, η θνησιμότητα των προνομφών από 38,24 % (29 °C) έως 62,1 % (20 °C) και αυτή των νυμφών ήταν 0% σε όλες τις θερμοκρασίες. Οι αντίστοιχες τιμές θνησιμότητας του *H. undecimnotata* κυμάνθηκαν από 7,6% (23 °C) έως 20,4% (29 °C) για τα ωά, από 27,6 % (29 °C) έως 59,2 % (17 °C) για τις προνύμφες, και για τις νύμφες ήταν 0% σε όλες τις θερμοκρασίες. Στο *C. septempunctata* η θνησιμότητα των ωών ήταν μικρή (13%) στους 23 °C, η θνησιμότητα στο στάδιο L1, L2, L3 και L4 ήταν 22,5%, 18.2%, 0% και 0% αντίστοιχα ενώ συνολικά η θνησιμότητα για όλα τα προνομφικά στάδια

βρέθηκε στο 37% ενώ δεν παρατηρήθηκε θνησιμότητα στο στάδιο της νύμφης (pupae).

Πίνακας 1. Θνησιμότητα για κάθε στάδιο ζωής και ποσοστό θνησιμότητας σε σχέση με τον αρχικό αριθμό αυγών, για κάθε στάδιο ζωής των *H. variegata*, *H. undecimnotata* σε πέντε σταθερές θερμοκρασίες και L16 : D8 (E= αριθμός ατόμων που εξετάστηκαν). Τα είδη τρέφονταν με αφίδες *M. persicae*.

Στάδιο ζωής	Θερμοκρασία (°C)										X ² /p
	<i>H. variegata</i>										
	17°C		20°C		23°C		26°C		29°C		
	E	%	E	%	E	%	E	%	E	%	
Ωο	37	12,1a	61	4,9a	70	12,9a	58	17,2a	45	24,4a	9,3/0,05
L1	33	39,4a	58	46,6a	61	31,2a	48	25,0a	34	29,4a	2,3/0,68
L2	20	5,0a	31	19,4a	42	26,2a	36	22,2a	24	8,3a	6,1/0,19
L3	19	5,3a	25	12,0a	31	9,7a	28	10,7a	22	4,6a	1,3/0,87
L4	18	0,0a	22	0,0a	28	3,6a	25	4,2a	21	0,0a	2,4/0,67
L1-L4	33	45,5a	58	62,1a	61	55,7a	48	50,0a	34	38,2a	5,0/0,29
Pupae	18	0,0a	22	0,0a	27	0,0a	24	0,0a	21	0,0a	-
<i>H. undecimnotata</i>											
	17°C		20°C		23°C		26°C		29°C		
	E	%	E	%	E	%	E	%	E	%	
Ωο	54	9,3a	58	10,3a	39	7,7a	34	17,6a	49	20,4a	5,1/0,28
L1	49	46,9a	52	53,9a	36	41,7ab	28	22,7bc	39	18,0bc	18,8/0,001
L2	26	23,1ab	24	4,2a	21	4,8ab	23	4,4ab	32	28,1b	12,1/0,02
L3	20	0,0a	23	0,0a	20	0,0a	22	0,0a	23	8,7a	7,5/0,11
L4	20	0,0a	23	0,0a	20	0,0a	22	0,0a	21	0,0a	-
L1-L4	49	59,2a	52	55,8ab	36	44,4ab	28	27,3b	39	46,2ab	11,9/0,02
Pupae	20	0,0a	23	0,0a	20	0,0a	22	0,0a	21	0,0a	-

Οι μέσοι όροι που ακολουθούνται από διαφορετικό μικρό γράμμα στις γραμμές διαφέρουν στατιστικά σημαντικά με βάση το κριτήριο X²(P<0.05).

Στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των θερμοκρασιακών μεταχειρίσεων βρέθηκαν στη θνησιμότητα στο στάδιο L1, L2 και L1-L4 μόνο για το είδος *H. undecimnotata*, ενώ δεν βρέθηκε η θερμοκρασία να επιδρά στη θνησιμότητα για το είδος *H. variegata*. Η συνολική επιβίωση από το στάδιο του ωού έως το στάδιο του ενήλικου για το *H. variegata* τόσο στους 23 °C όσο και στους 26 °C ήταν μικρότερη από ότι είχε βρεθεί από τους Lanzoni *et al.* (2004) στην Ιταλία στους 25°C. Επίσης οι ElHag & Zaitoon (1996) είχαν βρει

για το *H. variegata* και *C. septempunctata*, τρεφόμενα με τις αφίδες *Brevicoryne brassicae* (L.) και *Rhopalosiphum padi* (L.) στους 25 °C ότι η επιβίωση από το στάδιο του ωού έως το στάδιο του ενήλικου ήταν 61,8% και 54,5% αντίστοιχα για τα δυο είδη. Οι Okmar & Srivastava (2003) είχαν βρει για διάφορες αφίδες επιβίωση από 73% έως 44% και για την αφίδα *M. persicae* 66,6%.

Ανάπτυξη

Για το είδος *H. variegata*, η ολοκλήρωση της ανάπτυξης από το στάδιο του ωού έως το ενήλικο κυμάνθηκε από 12,4 ημέρες στους 29 °C έως 40,6 ημέρες στους 17 °C, ενώ στο είδος *H. undecimnotata* η αντίστοιχη διάρκεια ανάπτυξης κυμάνθηκε από 14,4 ημέρες στους 29 °C έως 48,5 ημέρες στους 17 °C (Πίνακας 2). Η διάρκεια ανάπτυξης των ωών, των προνυμφών και των νυμφών του *H. variegata* αντιπροσώπευε κατ' αντιστοιχία το 13-16%, 59-66% και 19-26% της συνολικής περιόδου ανάπτυξης. Τα αντίστοιχα ποσοστά για το *H. undecimnotata* ήταν 13-16%, 58-66% και 19-27%. Η διάρκεια ανάπτυξης του ωού, της προνύμφης και της νύμφης αλλά και η συνολική διάρκεια ανάπτυξης μέχρι το ενήλικο των *H. undecimnotata* και *H. variegata* μειωνόταν στατιστικώς καθώς αυξανόταν η θερμοκρασία. Η ανάλυση παραλλακτικότητας έδειξε ότι εκτός από την επίδραση της θερμοκρασίας ($F = 1515,29$; $df=4, 208$; $p<0.001$) η συνολική διάρκεια ανάπτυξης μέχρι το στάδιο του ενήλικου διέφερε ανάμεσα στα δυο είδη ($F = 1722,1$; $df=1, 208$; $p<0.001$) καθώς επίσης και η αλληλεπίδραση της θερμοκρασίας με το είδος ($F = 14,7$; $df=4, 208$; $p<0.001$).

Η διάρκεια ανάπτυξης του *H. variegata* από ωο έως ενήλικο είχε βρεθεί από τους Lanzoni *et al.* (2004) στην Ιταλία να διαρκεί 18,1 ημέρες στους 25°C, επίσης στην ίδια θερμοκρασία αλλά με διαφορετικό θήραμα (*B. brassicae* και *R. padi*) 20,1 ημέρες από τους ElHag & Zaitoon (1996) ενώ για το *C. septempunctata* οι συγγραφείς είχαν βρει στις ίδιες συνθήκες, ότι χρειάζεται 20,0 ημέρες. Οι Okmar & Srivastava (2003) είχαν βρει για διάφορες αφίδες διάρκεια αναπτυξής από 13,93 έως 22,85 ημέρες και για την αφίδα *M.*

persicae η διάρκεια ανάπτυξης του ήταν 15,24 ημέρες στους 25 °C. Οι Katsarou *et al.* 2005 είχαν βρει διάρκεια ανάπτυξης για το *C. septempunctata* τρεφόμενο με την αφίδα *M. persicae* σε καπνό ανατολικού τύπου 22,2 ημέρες. Οι Ferran & Larroque (1977) είχαν βρει ότι το *H. undecimnotata* χρειάζεται 14,57 ημέρες στους 20°C για τα τέσσερα προνυμφικά στάδια τρεφόμενο με την αφίδα *M. persicae*. Οι διαφορές που έχουν βρεθεί στη διάρκεια ανάπτυξης και στην θνησιμότητα πιθανόν να εξηγούνται όπως αναφέρουν οι Okmar & Srivastava (2003) για το *C. septempunctata* στη διαφορετική περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες για το κάθε είδος αφίδας και (ή) την υψηλή κατανάλωση αφίδων, η οποία οφείλεται στη <<νοστιμάδα>> τους. Οι Giles *et al.* (2002) βρήκαν ότι αλλαγή στην πυκνότητα του πληθυσμού των αφίδων, αλλαγή στην πρόσβαση τους από το αρπακτικό και αλλαγή στην καταλληλότητα ή επιδεκτικότητα του θηράματος μπορεί να έχουν δραματική επίδραση στο αρπακτικό. Τα βιοχημικά συστατικά του φυτού μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την τοξικότητα ή τη φτωχή διατροφική αξία του θηράματος και έτσι να αυξηθεί η θνησιμότητα, να μειωθεί ο ρυθμός ανάπτυξης και αύξησης και μειωμένη γονιμότητα.

Πίνακας 2. Διάρκεια ανάπτυξης (ημέρες) για το *H. variegata* *H. undecimnotata* σε πέντε σταθερές θερμοκρασίες και το *C. septempunctata* σε μια θερμοκρασία και L16 : D8 (E= αριθμός επαναλήψεων, οι αριθμοί στην παρένθεση συμβολίζουν το τυπικό σφάλμα SE). Το είδος τρέφονταν με αφίδες *M. persicae*.

Στάδιο ζωής	Θερμοκρασία (°C)										F
	17		20		23		26		29		
	E	Ημέρες	E	Ημέρες	E	Ημέρες	E	Ημέρες	E	Ημέρες	
<i>H. variegata</i>											
Ωο	18	5,3 (0,1)a	22	4,2 (0,1)b	27	3,3 (0,1)cA	24	2,5 (0,1)d	21	1,9 (0,1)e	129,7*
Προνύμφη	18	24,9 (0,5)a	22	16,4 (0,5)b	27	14,7 (0,4)cA	24	9,8 (0,5)d	21	8,2 (0,5)e	173,5*
Νύμφη	18	10,3 (0,2)a	22	7,1 (0,1)b	27	5,1 (0,1)cA	24	3,8 (0,1)d	21	2,3 (0,1)e	429,8*
Ενήλικο	18	40,6 (0,6)a	22	27,7 (0,5)b	27	23,0 (0,5)cA	24	16,0 (0,5)d	21	12,4 (0,5)e	442,6*
<i>H. undecimnotata</i>											
Ωο	20	7,2 (0,1)a	23	5,0 (0,1)b	20	4,5 (0,1)cB	22	2,7 (0,1)d	21	2,1 (0,1)e	449,7*
Προνύμφη	20	29,5 (0,3)a	23	21,4 (0,3)b	20	16,5 (0,3)cB	22	13,8 (0,3)d	21	9,5 (0,3)e	618,2*
Νύμφη	20	11,9 (0,1)a	23	8,9 (0,1)b	20	7,7 (0,1)cB	22	4,7 (0,1)d	21	2,8 (0,1)e	670,6*
Ενήλικο	20	48,5 (0,3)a	23	35,2 (0,3)b	20	28,6 (0,3)cB	22	21,2 (0,3)d	21	14,4 (0,3)e	1579,2*
<i>C. septempunctata</i>											
Ωο	-	-	-	-	45	5,9 (0,04)C	-	-	-	-	-
Προνύμφη	-	-	-	-	45	17,62 (0,61)C	-	-	-	-	-
Νύμφη	-	-	-	-	45	6,51 (0,11)C	-	-	-	-	-
Ενήλικο	-	-	-	-	45	30,16 (0,21)C	-	-	-	-	-

Οι μέσοι όροι που ακολουθούνται από διαφορετικό μικρό γράμμα στις γραμμές και από διαφορετικό κεφαλαίο γράμμα στις στήλες διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά (P<0.05, Duncan test).

Βάρος ενηλίκων

Από την Ανάλυση Παραλλακτικότητας προκύπτει ότι η επίδραση της θερμοκρασίας ήταν σημαντική στο βάρος μόνο στο είδος *H. undecimnotata* (Πίνακες 3, 4).

Πίνακας 3. Μεταβολή του βάρους (σε mg) για το *H. undecimnotata* και *H. variegata* σε πέντε σταθερές θερμοκρασίες και για το *C. septempunctata* στους 23 °C και L16 : D8 (E= αριθμός επαναλήψεων, οι αριθμοί στην παρένθεση, συμβολίζουν το τυπικό σφάλμα SE). Το είδος τρέφονταν με αφίδες *M. persicae*.

Είδος	Θερμοκρασία (°C)									
	E	17	E	20	E	23	E	26	E	29
<i>H. undecimnotata</i>	20	17,2 (0,5)a	23	19,9 (0,5)b	20	18,7 (0,6)abB	22	17,8 (0,6)a	21	20,3 (0,4)b
<i>H. variegata</i>	18	8,6 (0,4)a	22	8,0 (0,6)a	27	8,8 (0,3)aC	24	7,6 (0,5)a	21	7,9 (0,5)a
<i>C. septempunctata</i>	-	-	-	-	45	30,5 (0,6)A	-	-	-	-

Οι μέσοι όροι που ακολουθούνται από διαφορετικό μικρό γράμμα στις γραμμές και από διαφορετικό κεφαλαίο γράμμα στις στήλες διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ($P < 0.05$, Duncan test).

Τα βάρους των ενηλίκων του είδους *H. undecimnotata* διέφεραν μεταξύ των διαφόρων θερμοκρασιών (Πίνακας 7). Το μέσο βάρος κυμάνθηκε από 17,2 mg στους 20 °C έως 20,3 mg στους 29 °C. Το βάρος που παρατηρήθηκε ήταν στατιστικώς μεγαλύτερο στους 29 °C και 20 °C απ'ότι στους 17 °C και 26 °C. Όσον αφορά τα ενήλικα του *H. variegata* το μέσο βάρος κυμάνθηκε μεταξύ 7,6 mg (26 °C) και 8,8 mg (23 °C), δε διέφερε σημαντικά μεταξύ των πέντε θερμοκρασιών. Ανάμεσα στα τρία είδη υπήρχαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στο βάρος τους στους 23 °C ($F = 463,66$; $df=2, 89$; $p < 0.001$).

Πίνακας 4. Αποτελέσματα της Ανάλυσης Παραλλακτικότητας για την επίδραση της θερμοκρασίας και του φύλου στο βάρος των *H. variegata* και *H. undecimnotata*.

	<i>H. variegata</i>			<i>H. undecimnotata</i>		
	df	F	p	df	F	p
Θερμοκρασία	4	1,607	NS	4	9,35	<0,05
Φύλο	1	32,295	<0,05	1	225,74	<0,05
Θερμοκρασία x Φύλο	4	0,541	NS	4	1,76	NS
Σφάλμα	109			96		

Σημαντική ήταν η επίδραση του φύλου στο βάρος των ενηλίκων ατόμων του *C. septempunctata* ($F = 66,28$; $df=1, 43$; $p<0.001$), *H. undecimnotata* και του *H. variegata*, αφού και στα τρία είδη τα ενήλικα θηλυκά είχαν σημαντικά υψηλότερο βάρος από τα αρσενικά (Πίνακας 4).

Θερμοκρασιακές απαιτήσεις και αναλογία φύλου

Η κάτω ουδός ανάπτυξης (οι τιμές της θερμοκρασίας πάνω από τις οποίες μπορεί να υπάρξει ανάπτυξη), υπολογίσθηκε για κάθε στάδιο ανάπτυξης και για τη συνολική ανάπτυξη (ωό έως ενήλικο) των δυο ειδών (Πίνακας 5). Η κάτω ουδός ανάπτυξης της νύμφης ήταν η υψηλότερη από όλες τις άλλες τιμές και βρισκόταν στους 14,8 °C για το *H. variegata*, και στους 14,9 °C για το *H. undecimnotata*. Και στα δυο είδη η κάτω ουδός ανάπτυξης των προνυμφών ήταν χαμηλότερη από αυτή όλων των άλλων σταδίων, στους 11,7 °C για το *H. variegata* και *H. undecimnotata*.

Πίνακας 5. Ουδός ανάπτυξης (D_{th}) και απαιτήσεις σε ημεροβαθμούς (DD) για τα Κολεόπτερα *H. variegata* και *H. undecimnotata*.

Στάδιο ζωής	D_{th}	DD	Εξίσωση	R^2 (df)	P
<i>H. variegata</i>					
Αυγό	12,1	31,7	$Y=-0.38027X+0.03151$	0,64 (1, 112)	<0.05
Προνύμφη	11,7	141,3	$Y=-0.08303X+0.00707$	0,79 (1, 112)	<0.05
Νύμφη	14,8	36,1	$Y=-0.40889X+0.02767$	0,81 (1, 112)	<0.05
Ωό-ενήλικο	12,5	211,1	$Y=-0.05938X+0.00474$	0,88 (1, 112)	<0.05
<i>H. undecimnotata</i>					
Αυγό	13,0	34,8	$Y=-0.37524X+0.02877$	0,83 (1,105)	<0.05
Προνύμφη	11,7	176,2	$Y=-0.06628X+0.00567$	0,90 (1,105)	<0.05
Νύμφη	14,9	44,5	$Y=-0.33462X+0.02250$	0,76 (1,105)	<0.05
Ωό-ενήλικο	12,7	256,5	$Y=-0.04947X+0.00390$	0,92 (1,105)	<0.05

Οι απαιτήσεις σε ημεροβαθμούς προκειμένου το είδος *H. variegata* να συμπληρώσει την ανάπτυξη από το αυγό έως το ενήλικο βρέθηκε πως ήταν 211 DD πάνω από θερμοκρασία ανάπτυξης 12,5 °C. Η κάτω ουδός ανάπτυξης του *H. undecimnotata* βρέθηκε πως ήταν λίγο ψηλότερη (12,7 °C), όμως χρειαζόταν 256 DD για να ολοκληρωθεί η ανάπτυξή του. Πρέπει να

αναφερθεί ότι και στα δυο είδη (*H. variegata* και *H. undecimnotata*) δεν είχαμε εκκόλαψη των ωών στους 14 °C και 60%RH. Οι Katsarou *et al.* (2005) είχαν βρει ότι στο *C. septempunctata* η κάτω ουδός ανάπτυξης ήταν 10,7 °C τρεφόμενο με την αφίδα του καπνού *M. persicae*.

Στο είδος *H. undecimnotata* το 61% και το 57% των ενηλίκων ατόμων ήταν θηλυκά στους 20 °C και 29 °C, αντίστοιχα, όμως μόνο το 40%, 41% και το 55% ήταν θηλυκά στους 17 °C, 26 °C και 23 °C (Πίνακας 6). Στο είδος *H. variegata* υπήρχε επίσης διαφορά μεταξύ των θερμοκρασιών. Το υψηλότερο ποσοστό θηλυκών ατόμων παρατηρήθηκε στους 17 °C και 20 °C (56% και 55% ανάλογα), ενώ στους 23 °C, 26 °C και 29 °C τα θηλυκά αποτελούσαν κατ' αντιστοιχία το 52%, 46% και 43% του συνόλου. Στο *C. septempunctata* στους 23 °C μόνο το 42% ήταν θηλυκά άτομα. Ωστόσο δεν παρουσιάστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των πέντε θερμοκρασιών, τόσο για το *H. variegata* ($\chi^2=1,04$, $p<0,904$) όσο και για το *H. undecimnotata* ($\chi^2=3,21$, $p<0,524$). Αυτό σημαίνει πως ο ρυθμός πολλαπλασιασμού, στο βαθμό που εξαρτάται από την αναλογία αρσενικών και θηλυκών, είναι το ίδιο έντονος στο εύρος των θερμοκρασιών που εξετάστηκαν.

Πίνακας 6. Ποσοστό (%) θηλυκών και αρσενικών ατόμων των *H. undecimnotata* και *H. variegata* σε πέντε σταθερές θερμοκρασίες και του *C. septempunctata* στους 23 °C και L16: D8.

Θερμοκρασία (°C)	<i>H. undecimnotata</i>		<i>H. variegata</i>		<i>C. septempunctata</i>	
	E	Θηλυκά (%)	E	Θηλυκά (%)	E	Θηλυκά (%)
17	20	40	18	55,5	-	-
20	23	60,9	22	54,5	-	-
23	20	55	27	51,8	45	42
26	22	40,9	24	45,8	-	-
29	21	57,1	21	42,9	-	-
	$\chi^2=3,21$ df=4, $P<0,524$		$\chi^2=1,04$ df=4, $P<0,904$			

Κατανάλωση αφίδων

Η επίδραση της θερμοκρασίας και των προνυμφικών σταδίων στην κατανάλωση αφίδων ήταν στατιστικώς σημαντική και στα δυο αρπακτικά. Η αλληλεπίδραση θερμοκρασίας με το προνυμφικό στάδιο ήταν επίσης σημαντική (Πίνακας 7).

Πίνακας 7. Αποτελέσματα της Ανάλυσης Παραλλακτικότητας για την επίδραση της θερμοκρασίας και των προνυμφικών σταδίων στην συνολική και ημερήσια κατανάλωση αφίδων από το *H. variegata* και το *H. undecimnotata*.

Πηγή Παραλλακτικότητας	Συνολική κατανάλωση αφίδων				Ημερήσια κατανάλωση αφίδων		
	df	MS Effect	F	p	MS Effect	F	p
<i>H. variegata</i>							
Θερμοκρασία	4	207	10,815	0	682,25	165,242	0
Προνυμφικό στάδιο	3	79020,4	4127,85	0	6675,91	1616,924	0
Θερμοκρασία Χ Προνυμφικό στάδιο	12	341,7	17,847	0	393,79	95,378	0
Σφάλμα	428						
<i>H. undecimnotata</i>							
Θερμοκρασία	4	1216,77	288,22	0	1414,2	76,01	0
Προνυμφικό στάδιο	3	6248,64	1480,16	0	151860,4	8161,9	0
Θερμοκρασία Χ Προνυμφικό στάδιο	12	296,76	70,3	0	523	28,11	0
Σφάλμα	404						

Η επίδραση της θερμοκρασίας στη συνολική και ημερήσια κατανάλωση αφίδων ήταν όμοια και στα δυο είδη Coccinellidae. Και τα δυο Κολεόπτερα κατανάλωσαν σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό αφίδων κατά τη διάρκεια των προνυμφικών τους σταδίων στους 26 °C απ' ότι στις υπόλοιπες θερμοκρασίες (Πίνακες 8, 9). Το *H. variegata* κατανάλωσε συνολικά 84,0 αφίδες στους 26 °C και μόνο 69 αφίδες στους 17 °C. Το *H. undecimnotata*

στους 26°C κατανάλωσε 129 αφίδες, ενώ στους 17 °C μόνο 94. Επιπρόσθετα, η μέση ημερήσια κατανάλωση αφίδων ήταν υψηλότερη στις υψηλότερες θερμοκρασίες και στα δυο είδη. Στο *H. variegata* παρατηρήθηκε συνολική κατανάλωση 8,7 αφίδων στους 26 °C και μόλις 2.8 αφίδων στους 17 °C, ενώ η αντίστοιχη κατανάλωση του *H. undecimnotata* ήταν 13.6 αφίδες στους 29 °C και 3.2 στους 17 °C (Πίνακες 8, 9).

Διαφορές στην κατανάλωση των αφίδων βρέθηκαν μεταξύ των δυο ειδών, καθώς το *H. undecimnotata* παρουσιάζει μεγαλύτερη συνολική και ημερήσια κατανάλωση αφίδων κατά τη διάρκεια των προνυμφικών του σταδίων από το *H. variegata* σε όλες τις εξεταζόμενες θερμοκρασίες, εκτός από τους 20°C (Πίνακες 8, 9).

Η κατανάλωση αφίδων διέφερε μεταξύ των τεσσάρων προνυμφικών σταδίων και στα τρία είδη. Το τέταρτο προνυμφικό στάδιο κατανάλωσε σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό αφίδων σε όλες τις θερμοκρασίες (Πίνακες 10-11). Τα δυο είδη *H. undecimnotata* και *H. variegata* διέφεραν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους στην συνολική κατανάλωση αφίδων ($F = 779,21; df=1, 208; p<0.001$) και στην ημερήσια κατανάλωση αφίδων ($F = 138,72; df=1, 208; p<0.001$). Η αλληλεπίδραση της θερμοκρασίας με το είδος κολεοπτέρου ήταν σημαντική τόσο στην συνολική κατανάλωση αφίδων ($F = 13,19; df=4, 208; p<0.001$) όσο και στην ημερήσια κατανάλωση αφίδων ($F = 48,85; df=4, 208; p<0.001$).

Η κατανάλωση αφίδων *M. persicae* ήταν στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερη και για τα δυο είδη (*H. undecimnotata* και *H. variegata*) στις υψηλότερες θερμοκρασίες (26°C και 29°C) αποδεικνύοντας ότι και τα δυο είδη μπορούν να είναι πιο αποτελεσματικά σε υψηλές θερμοκρασίες. Σε όλες τις θερμοκρασίες το *H. undecimnotata* κατανάλωνε περισσότερες αφίδες από το *H. variegata*, ενώ στους 23°C το *C. septempunctata* κατανάλωσε σημαντικά περισσότερες αφίδες *M. persicae* από τα άλλα δυο εξεταζόμενα είδη. Οι Katsarou *et al.* (2005) είχαν βρει ότι το *C. septempunctata* στους 23°C η μέση ημερήσια κατανάλωση και ο μέσος συνολικός αριθμός κατανάλωσης ενήλικων άπτερων παρθενογενετικών θηλυκών του *M. persicae* ήταν 12,4 και 157,7 αντίστοιχα. Και τα δυο Κολεόπτερα (*H. undecimnotata* και *H. variegata*) κατανάλωσαν μεγαλύτερο αριθμό αφίδων κατά τη διάρκεια των προνυμφικών τους σταδίων στους 26 °C και 29 °C. Η αύξηση της κατανάλωσης ήταν

Πίνακας 8. Μέσος συνολικός αριθμός (SD) ενήλικων άπτερων παρθενογενετικών ατόμων του *M. persicae* που καταναλώθηκαν από προνύμφες του *H. variegata* και *H. undecimnotata*, οι οποίες αναπτύχθηκαν σε πέντε σταθερές θερμοκρασίες και του *C. septempunctata* σε μια θερμοκρασία και φωτοπερίοδο L16 : D8.

Στάδιο ζωής	Θερμοκρασία (°C)									
	17		20		23		26		29	
	N	Αφίδες	N	Αφίδες	N	Αφίδες	N	Αφίδες	N	Αφίδες
<i>H. variegata</i>										
L1	18	2,7(0,16)Aa	22	2,5(0,19)aA	27	2,6(0,16)aA	24	2,2(0,26)aA	21	1,9(0,21)aA
L2	18	5,8(0,44)aB	22	5,8(0,38)aB	27	5,4(0,36)aB	24	4,0(0,38)bA	21	5,8(0,41)aB
L3	18	11,1(0,79)aC	22	10,6(0,71)aC	27	11,0(0,64)aC	24	10,0(0,68)aB	21	9,8(0,73)aC
L4	18	49,5(1,84)aD	22	54,6(1,67)bD	27	58,7(1,50)bD	24	68,0(1,60)cC	21	65,4(1,71)cD
L1-L4		69,1(2,18)a		73,5(1,97)ab		77,6(1,78)bc		84,2(1,88)d		82,9(2,01)cd
<i>H. undecimnotata</i>										
L1	20	5,2(0,26)aA	23	3,8(0,24)bA	20	3,8(0,26)bA	22	5,7(0,24)aA	21	7,8(0,25)cA
L2	20	8,0(0,49)aB	23	6,9(0,46)aB	20	7,5(0,49)aB	22	9,7(0,47)bB	21	11,0(0,48)bB
L3	20	11,6(0,89)aC	23	10,0(0,83)aC	20	12,4(0,89)aC	22	16,6(0,85)bC	21	17,1(0,87)bC
L4	20	69,4(1,62)aD	23	77,3(1,51)bD	20	87,4(1,62)cD	22	97,1(1,54)eD	21	92,0(1,58)dD
L1-L4		94,2(2,00)a		98,0(1,87)a		111,1(2,00)b		129,1(1,91)c		127,9(1,95)c
<i>C. septempunctata</i>										
L1					45	8,8 (0,32)A				
L2					45	12,9 (0,40)B				
L3					45	24,6 (0,94)C				
L4					45	143,7 (2,43)D				
L1-L4					45	190,0 (2,80)				

Οι μέσοι όροι που ακολουθούνται από διαφορετικό μικρό γράμμα στις γραμμές και από διαφορετικό κεφαλαίο γράμμα στις στήλες διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά (P<0.05, Duncan test)

Πίνακας 9. Μέση ημερήσια κατανάλωση (SD) ενήλιων άπτερων παρθενογενετικών θηλυκών του *M. persicae* που καταναλώθηκαν από προνύμφες του *H. variegata* και *H. undecimnotata*, οι οποίες αναπτύχθηκαν σε πέντε σταθερές θερμοκρασίες και του *C. septempunctata* σε μια θερμοκρασία και φωτοπερίοδο L16 : D8.

Στάδιο ζωής	Θερμοκρασία (°C)									
	17		20		23		26		29	
	N	Αφίδες	N	Αφίδες	N	Αφίδες	N	Αφίδες	N	Αφίδες
<i>H. variegata</i>										
L1	18	0,4(0,09)aA	22	0,6(0,08)abA	27	0,7(0,08)bA	24	1,0(0,08)cA	21	0,9(0,09)cA
L2	18	1,2(0,20)aB	22	1,7(0,18)abB	27	1,7(0,17)abB	24	2,0(0,18)bA	21	3,3(0,19)cB
L3	18	2,2(0,30)aC	22	3,1(0,27)bC	27	3,4(0,24)bC	24	4,5(0,26)cB	21	5,2(0,27)cB
L4	18	7,4(0,88)aD	22	12,2(0,80)bD	27	14,0(0,72)bD	24	23,2(0,76)cC	21	30,8(0,82)dC
L1-L4		2,8(0,26)a		4,6(0,23)b		5,3(0,21)c		8,7(0,22)d		8,2(0,24)d
<i>H. undecimnotata</i>										
L1	20	0,7(0,10)aA	23	0,7(0,09)aA	20	0,9(0,10)aA	22	1,6(0,10)bA	21	3,0(0,10)cA
L2	20	1,2(0,18)aB	23	1,4(0,17)aB	20	2,2(0,18)bB	22	3,7(0,18)cB	21	5,5(0,18)dB
L3	20	1,7(0,35)aC	23	2,1(0,32)aC	20	3,7(0,35)bC	22	5,6(0,33)cC	21	9,7(0,34)dC
L4	20	8,7(0,83)aD	23	11,9(0,77)bD	20	15,9(0,83)cD	22	21,7(0,79)dD	21	32,2(0,81)eD
L1-L4		3,2(0,21)a		4,6(0,19)b		6,8(0,21)c		9,4(0,20)d		13,6(0,20)d
<i>C. septempunctata</i>										
L1					45	1,7 (0,07)A				
L2					45	4,1 (0,16)B				
L3					45	6,5 (0,26)C				
L4					45	26,3 (0,78)D				
L1-L4					45	10,9 (0,22)				

Οι μέσοι όροι που ακολουθούνται από διαφορετικό μικρό γράμμα στις γραμμές και από διαφορετικό κεφαλαίο γράμμα στις στήλες διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά (P<0.05, Duncan test).

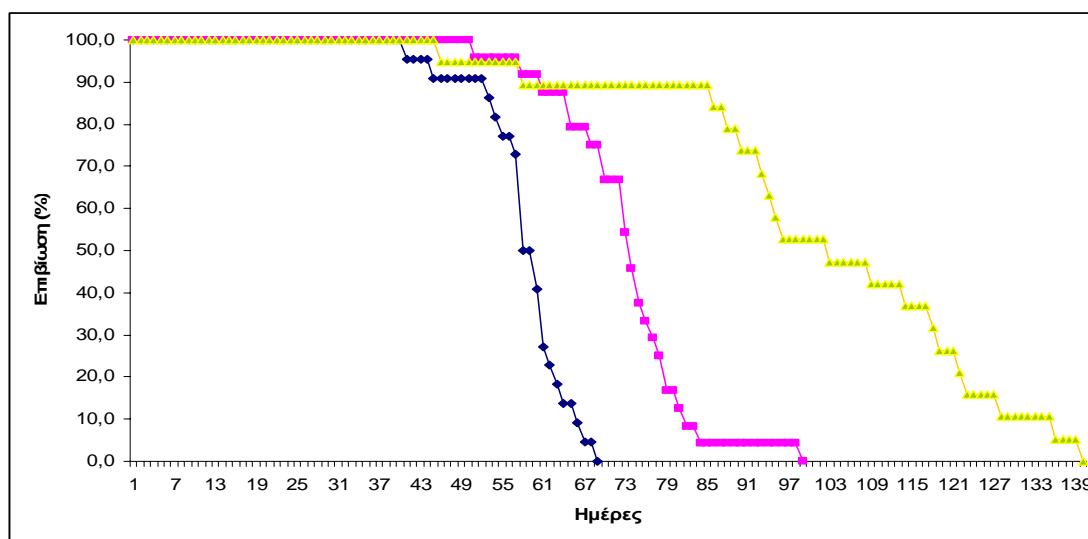
σταδιακή από τους 17 °C στους 26 °C. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι τα αρπακτικά που αναπτύσσονται σε χαμηλές θερμοκρασίες παρουσιάζουν χαμηλότερους ρυθμούς μεταβολισμού, ενώ αυτά στις υψηλότερες θερμοκρασίες έχουν έναν υψηλότερο μεταβολισμό. Επιπλέον, η θρεπτική ποιότητα των αφίδων μπορεί να μεταβάλλεται, ανάλογα με τη θερμοκρασία και να επηρεάζει με τον τρόπο αυτό την ανάπτυξη των Κολεοπτέρων. Το βάρος των ενήλικων αφίδων, το οποίο συνδέεται άμεσα με τη θρεπτική τους αξία, έχει βρεθεί πως αυξάνεται προοδευτικά με τη θερμοκρασία μεταξύ 11,5 και 23,5 °C (Tsitsipis & Mittler 1976). Συνεπώς οι χαμηλές θερμοκρασίες δρουν αρνητικά στη βελτίωση της θρεπτικής ποιότητας των αφίδων.

Δημογραφικά χαρακτηριστικά

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 10 και το Σχήμα 1 παρατηρείται ότι τα θηλυκά του είδους *C. septempunctata* ζουν κατά μέσο όρο 102,16 ημέρες έναντι 74,41 ημερών του *H. undecimnotata* και 57,59 ημέρες του *H. variegata*. Οι διαφορές μεταξύ διάρκειας ζωής των θηλυκών του είδους *C. septempunctata*, *H. undecimnotata* και *H. variegata* βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές ($F = 47,12$; $df=2, 62$; $p<0.001$). Τα θηλυκά του είδους *C. septempunctata* και *H. undecimnotata* παρουσίασαν πολύ μεγαλύτερη περίοδο πρωτοκίας (16,11 και 15,75 ημέρες αντίστοιχα) από τα θηλυκά του είδους *H. variegata* (4,77 ημέρες). Η διαφορά μεταξύ των περιόδων πρωτοκίας των τριών ειδών βρέθηκε στατιστικά σημαντική ($F = 21.20$; $df=2, 62$; $p<0.001$). Τα θηλυκά του είδους *H. variegata* και *H. undecimnotata* παρουσίασαν μικρότερη περίοδο ωοτοκίας (47,59 και 50,38 ημέρες αντίστοιχα) από τα θηλυκά του είδους *C. septempunctata* (72,32 ημέρες). Η διαφορά μεταξύ των περιόδων ωοτοκίας των τριών ειδών βρέθηκε στατιστικά σημαντική ($F = 24.01$; $df=2, 62$; $p<0.001$). Επίσης, η περίοδος μεταωοτοκίας βρέθηκε στατιστικά σημαντική ($F = 10.22$; $df=2, 62$; $p<0.001$) ανάμεσα στο *C. septempunctata* και τα *H. variegata* και *H. undecimnotata*.

Το Σχήμα 2 απεικονίζει τη συχνότητα των κατανομών της περιόδου πρωτοκίας στα τρία αρπακτικά. Φαίνεται ότι οι τιμές για τα *H. variegata* και *C. septempunctata* κατανέμονται περί το μέσο όρο (4,77 και 16,11 ημέρες

αντίστοιχα), δηλαδή, υπάρχει μικρή παραλλακτικότητα, το αντίθετο από ότι συνέβη με το *H. undecimnotata*, όπου το 37,5% των θηλυκών είχαν περίοδο πρωτοκίας μεγαλύτερη από 15 ημέρες. Τέτοια πρότυπα έχουν επίσης αναφερθεί τόσο σε παλαιαρτικούς πληθυσμούς, όσο και νεαρτικούς πληθυσμούς Coccinellidae (*C. septempunctata* και *Propylea quatuordecimpunctata* L.) (Phoofolo & Obrycki 1995, 2000). Οι συγγραφείς αυτοί αναφέρουν, ότι η έκφραση μεγάλης διακύμανσης σε βιολογικά χαρακτηριστικά, που σχετίζονται με την ωοπαραγωγή, όπως π.χ. η περίοδος πρωτοκίας, μπορεί να είναι μερικοί από τους παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για την ικανότητα εξάπλωσης ή και εισβολής του είδους αυτού. Από τα τρία είδη το *H. undecimnotata* είχε μεγάλη διακύμανση στην περίοδο πρωτοκίας, με αποτέλεσμα να έχει μεγαλύτερη ικανότητα εξάπλωσης ή και εισβολής, επιβίωσης και επίσης να μπορεί να εκμεταλλευτεί σε μεγαλύτερο βαθμό τους πόρους κάθε ενδιαιτήματος. Αντίθετα οι περίοδοι πρωτοκίας για τα *H. variegata* και *C. septempunctata* κατανέμονται περί τον μέσο όρο δηλαδή, υπάρχει μικρή παραλλακτικότητα, που πιθανώς οφείλεται στη μακρά περίοδο αποικισμού των ειδών αυτών στον καπνό.



Σχήμα 1. Επιβίωση θηλυκών ατόμων των *H. undecimnotata* (■)*H. variegata* (◆) και *C. septempunctata* (▲), που εκτράφηκαν με *M. persicae* στους 23 °C.

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 10 φαίνεται ότι τα ζεύγη αρσενικών και θηλυκών ατόμων του είδους *C. septempunctata* που εξετάστηκαν, κατανάλωσαν κατά μ.ο. 3404 ενήλικες αφίδες *M. persicae* στη διάρκεια των

πρώτων πενήντα ημερών του ενήλικου σταδίου τους. Τα ζεύγη του είδους *H. undecimnotata* και *H. variegata* κατανάλωσαν κατά μ.ο. 3242 και 2381 ενήλικες αφίδες *M. persicae* αντίστοιχα, ενώ μεταξύ τους παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($F = 49.74$; $df=1, 49$; $p<0.001$). Σημαντικές διαφορές βρέθηκαν και μεταξύ των μέσων ημερήσιων καταναλώσεων αφίδων κατά τη διάρκεια του ενήλικου σταδίου της ζωής των ζευγών αρσενικών και θηλυκών ατόμων του *C. septempunctata* με τα *H. undecimnotata* και *H. variegata* ($F = 77.15$; $df=2, 62$; $p<0.001$). Τα ζεύγη του είδους *C. septempunctata* κατανάλωσαν κατά μέσο όρο 68,27 ενήλικες αφίδες *M. persicae* ανά ημέρα, δηλαδή σχεδόν μιάμιση φορά το αριθμό αφίδων από τα ζεύγη του είδους *H. undecimnotata* και *H. variegata* (45,27 και 41,53 αφίδες ανά ημέρα αντίστοιχα).

Πίνακας 10. Δημογραφικά χαρακτηριστικά (μ.ό±Τ.Σ.) πληθυσμών των αρπακτικών *H. undecimnotata* (H U) και *H. variegata* (H V) και *C. septempunctata* (C S). N = αριθμός εξετασθέντων ατόμων.

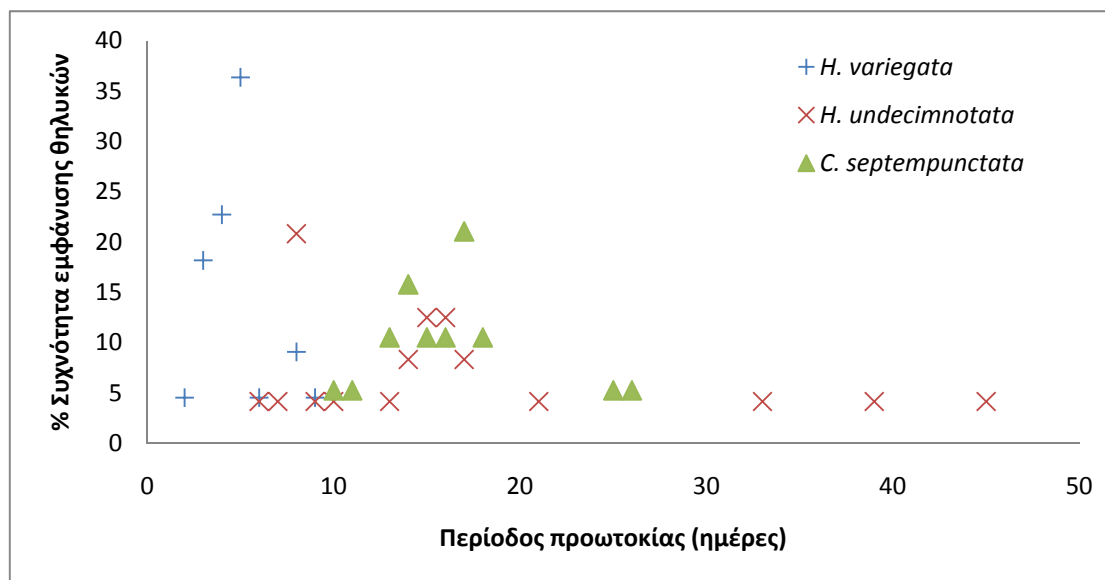
Παράμετρος	H U	H V	C S	Τιμή κριτηρίου F
N	24	22	19	
Κατανάλωση Αφίδων	3241,54 (84,36)a	2381,27 (88,11)b	3403.84 (121.18)*	$F_{1,44} = 49,736$
Διάρκεια ζωής (Θ)	72,41 (1,68)b	57,59 (1,76)c	102,16 (5,59)a	$F_{2,62} = 47,12$
Γονιμότητα (ωοπαραγωγή) (αβγά/Θ)	655,8 (30,58)b	881,73 (31,94)a	585,68 (35,62)b	$F_{2,62} = 22,08$
Περίοδος προωτοκίας (ημέρες)	15,75 (1,49)a	4,77 (1,56)b	16,11 (0,91)a	$F_{2,62} = 21,20$
Περίοδος ωοτοκίας (ημέρες)	50,38 (1,65)b	47,59 (1,72)b	72,32 (5,41)a	$F_{2,62} = 24,01$
Περίοδος μεταωοτοκίας (ημέρες)	6,29 (0,77)b	5,23 (0,80)b	12,63 (1,68)a	$F_{2,62} = 10,22$
Ενδογενής ρυθμός αύξησης (r_m , Θ/Θ/ημέρα)	0,084b	0,129a	0,061c	$F_{2,59} = 314847$
Μέση διάρκεια γενιάς (T, ημέρες)	59,1b	42,4a	69,3c	$F_{2,59} = 69860$
Καθαρός αναπαραγωγικός ρυθμός (R_o , Θ/Θ)	142,7b	241,9a	67,3c	$F_{2,59} = 46000$
Χρόνος διπλασιασμού πληθυσμού (DT, ημέρες)	8,3b	5,4a	11,4c	$F_{2,59} = 167851$

Οι μέσοι όροι που ακολουθούνται από διαφορετικό μικρό γράμμα στις γραμμές διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ($P<0.05$, Duncan test).

* Η μέτρηση έγινε για τις 50 πρώτες ημέρες.

Τα πειραματικά δεδομένα της μελέτης αυτής αποκάλυψαν σημαντικές διαφορές στη γονιμότητα ανάμεσα στα τρία είδη. Σημαντικές διαφορές βρέθηκαν και μεταξύ των ωών που γεννηθήκαν κατά τη διάρκεια ζωής των

ζευγών θηλυκών ατόμων του *H. variegata* με τα *H. undecimnotata* και *C. septempunctata* ($F = 22.08$; $df=2, 62$; $p<0.001$) με το *H. variegata* να γεννά κατά μέσο όρο 882 ωά ενώ τα *H. undecimnotata* και *C. septempunctata* 656 και 586 ωά αντίστοιχα.



Σχήμα 2. Κατανομή συχνοτήτων περιόδων προωτοκίας σε πληθυσμούς των αρπακτικών *H. undecimnotata* (χ), *H. variegata* (+) και *C. septempunctata* (▲), που εκτράφηκαν με *M. persicae* στους 23 °C.

Επίσης, από τα τρία είδη, η μεγαλύτερη τιμή ενδογενούς ρυθμού αύξησης πληθυσμού (r_m) παρατηρήθηκε στο *H. variegata* με το *H. undecimnotata* να έχει το αμέσως επόμενο μεγαλύτερο και τέλος το μικρότερο από τα τρία είδη είχε το *C. septempunctata*. Η μέση διάρκεια γενιάς (T) ήταν μεγαλύτερη στο *C. septempunctata* έναντι των *H. variegata* και *H. undecimnotata*. Ο καθαρός αναπαραγωγικός ρυθμός (R_0) ήταν μεγαλύτερος στο *H. variegata* (241,9) έναντι των *H. undecimnotata* (142,7) και *C. septempunctata* (67,3). Ο χρόνος διπλασιασμού του πληθυσμού ήταν μεγαλύτερος στο *C. septempunctata* (11,4 ημέρες), μικρότερο στο *H. variegata* (5,4 ημέρες) ενώ στο *H. undecimnotata* ο χρόνος διπλασιασμού του πληθυσμού βρέθηκε να είναι 8,3 ημέρες.

Οι Lanzoni *et al.* (2004) ανέφεραν για το *H. variegata* στους 25 °C, όταν τρεφόταν με *M. persicae*, είχε διάρκεια ζωής 36,9 ημέρες, σχεδόν ίδιο αριθμό

παραγωγής ωών (841,7 έναντι 881,7), μικρότερη περίοδο προωτοκίας και ωοτοκίας 2,1 και 32,2 ημέρες αντίστοιχα με τη διαφορά αυτή να οφείλεται πιθανώς στην διαφορετική θερμοκρασία διεξαγωγής του πειράματος. Οι ElHag & Zaitoon (1996) στη Σαουδική Αραβία, για το *H. variegata*, όταν τρεφόταν με την αφίδα *Brevicoryne brassicae* (L.) στους 25 °C, είχε διάρκεια ζωής 71,8 ημέρες, μικρότερο αριθμό παραγωγής ωών (276,3) και μικρότερη περίοδο ωοτοκίας (26,0 ημέρες), ενώ για το *C. septempunctata* αναφέρουν μικρή διάρκεια ζωής 36,9 ημέρες, μικρότερο αριθμό παραγωγής ωών (200,5 ωα) και μικρότερη περίοδος ωοτοκίας (16,3 ημέρες). Ο Ζαρπας (2006) είχε βρει για το *C. septempunctata*, που τρεφόταν με την αφίδα του βάμβακος *Aphis gossypii* στους 23°C, διάρκεια ζωής για τα θηλυκά άτομα 51,1 ημέρες, παραπλήσια περίοδο προωτοκίας (15,8 ημέρες) και μικρότερη ωοπαραγωγή (417,0 ωα ανά θηλυκό).

Συγκρίνοντας τα αποτελεσμάτά μας με αυτά από άλλες μελέτες (πχ Zarpas *et al*, 2007, ElHag & Zaitoon 1996, Lanzoni *et al*. 2004) αποδεικνύουν ότι παράγοντες, όπως το είδος της αφίδας που τρέφεται το αρπακτικό κολεόπτερο και συνθήκες εκτροφής μπορεί να επιδρούν στην διάρκεια ανάπτυξης, επιβίωση και διάρκεια ζωής των ενηλίκων. Επιπλέον, όπως προτείνει ο Francis *et al*. (2000, 2001) για το *Adalia bipunctata* και οι Giles *et al*. (2002) για το *C. septempunctata* είναι σημαντικό τα βιολογικά χαρακτηριστικά των αρπακτικών Coccinellidae να χαρακτηρίζονται σαν ένα τριτροφικό σύστημα. Πραγματικά, σύμφωνα με τον Kalushkov (1998), ο όποιος μελέτησε τη διάρκεια ανάπτυξης, θνησιμότητας και το βάρος των ενηλίκων, βρήκε ότι η καταλληλότητα της αφίδας *A. fabae* ως τροφή για το *A. bipunctata* εξαρτάται από το φυτό ξενιστή της αφίδας. Επίσης, η διάρκεια ανάπτυξης, θνησιμότητα και το μέγεθος των ενηλίκων του *C. septempunctata* εμφανίζεται να μεταβάλλεται από την βιοχημική αντίδραση μεταξύ της αφίδας θήραμα και του φυτού ξενιστή (Giles *et al*. 2002). Όπως προτείνουν οι Francis *et al*. (2000, 2001) οι αλληλοχημικές ενώσεις που περιέχει το φυτό - ξενιστής, μπορεί να μην επηρεάζει μόνο την αφίδα αλλά και το αρπακτικό.

Αξιολόγηση των αρπακτικών

Τα αποτελέσματα των εργαστηριακών πειραμάτων παρέχουν πληροφορίες για τη σχετική αποτελεσματικότητα του κάθε αρπακτικού κολεοπτέρου που εξετάστηκε. Τα είδη *H. undecimnotata* και *H. variegata* βρέθηκαν να έχουν ίδιες περίπου χαμηλές τιμές θνησιμότητας ωών, γεγονός που βοηθά τα δυο αυτά αρπακτικά στην πρόωρη εγκαταστασή τους στον αγρό. Το *H. variegata* βρέθηκε να χρειάζεται το μικρότερο χρόνο ενηλικίωσης, ένα χαρακτηριστικό που μπορεί να θεωρηθεί ως συγκριτικό πλεονέκτημα σε σχέση με τα άλλα δυο είδη, αφού η νύμφη είναι ακίνητη και επιρρεπής σε διαειδική θήρευση και κανιβαλισμό. Οι προνύμφες του *H. undecimnotata*, αλλά κυρίως του *C. septempunctata*, εξαιτίας της αδηφαγίας τόσο των προνυμφών τους όσο και των ενηλίκων τους, μπορούν να ελέγξουν αποτελεσματικότερα πληθυσμούς αφίδων από ότι αυτές του *H. variegata*.

Η μελέτη αυτή βοηθά στην εξακρίβωση της σημασίας των τριών αυτών αρπακτικών κολεοπτέρων στο έλεγχο της αφίδας της ροδακινιάς σε καλλιέργεια καπνού. Συμπερασματικά και τα τρία είδη αποτελούν δυνητικά αποτελεσματικούς θηρευτές του *M. persicae*, όπως έχει αναφερθεί και για άλλα είδη αφίδων (Hodek and Honek 1996, El Habi *et al.* 2000). Ακόμα, η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης και για τα δύο είδη που μελετήθηκαν και στις πέντε θερμοκρασίες ήταν 26°C καθώς παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη κατανάλωση αφίδων, γρήγορη ανάπτυξη και χαμηλή θνησιμότητα. Ενώ η μεγάλη περίοδος προωτοκίας του *H. undecimnotata* αντανακλά στην έμφυτη ικανότητα του είδους για αναπαραγωγική διάπαυση ακόμα και αν υπάρχουν ιδανικές συνθήκες για αναπαραγωγή. Τέλος, και τα δυο είδη δείχνουν να μπορούν να μειώσουν τους πληθυσμούς του *M. persicae* σε φυτείες καπνού, αλλά χρειάζεται περισσότερη έρευνα σε συνθήκες αγρού.

Από τη σύγκριση των δημογραφικών παραμέτρων των ειδών *C. septempunctata*, *H. undecimnotata* και *H. variegata* με το *M. persicae* (στοιχεία από Nikolakakis *et al.* 2003) παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών της ίδιας παραμέτρου μεταξύ των τεσσάρων ειδών. Το είδος *M. persicae* χαρακτηρίζεται από πολύ μεγαλύτερη ταχύτητα αύξησης πληθυσμού συγκριτικά με τα τρία είδη Κολεοπτέρων, που φαίνεται από την τιμή του ενδογενούς ρυθμού αύξησης του πληθυσμού του (0,269 απόγονοι/θηλυκό/ ημέρα). Η τιμή r_m του είδους *M. persicae* σε συνδυασμό με την

αντοχή του είδους στις χαμηλότερες θερμοκρασίες της άνοιξης, του επιτρέπει να αυξάνει τους πληθυσμούς του με ταχύ ρυθμό, αν η ποιότητα ξενιστή (καπνός) είναι καλή και δε λαμβάνονται υπ' όψη οι φυσικοί εχθροί του είδους. Η τιμή r_m του είδους *M. persicae* είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη τιμή του είδους *H. variegata* (0,129), *H. undecimnotata* (0,084) και πολύ μεγαλύτερη από την τιμή r_m του είδους *C. septempunctata* (0,061). Αναμένεται επομένως ότι σε δεδομένο χρονικό διάστημα το είδος *H. variegata* θα δώσει μεγαλύτερο αριθμό γενιών και τελικά θα παρουσιάσει ταχύτερη αύξηση των πληθυσμών του συγκριτικά με τα είδη *C. septempunctata* και *H. undecimnotata*. Το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό αποτελεί πλεονέκτημα για το είδος *H. variegata* στον ανταγωνισμό με το είδος *C. septempunctata* και *H. undecimnotata*, αν οι πληθυσμοί του είδους *M. persicae* δεν αποτελούν περιοριστικό παράγοντα.

Γενικά και τα τρία είδη αρπακτικών μπορεί να παίξουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του πληθυσμού των αφίδων στον καπνό, αφού είναι ικανά να καταναλώσουν ένα μεγάλο αριθμό αφίδων κάτω από κατάλληλες συνθήκες.

Πολλοί βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες, εκτός από τις απαιτήσεις σε θερμοκρασία και διατροφή είναι δυνατόν να επηρεάσουν την αποδοτικότητα των τριών αυτών Κολεοπτέρων, ως παράγοντες ελέγχου των πληθυσμών των αφίδων στον καπνό. Για παράδειγμα η ικανότητα αναζήτησης αφίδων σε φυσικές συνθήκες, είναι πολύ χαμηλότερη σε σχέση με αυτήν του εργαστηρίου λόγω της διασποράς των αφίδων στα φύλλα, της ύπαρξης άλλων αρπακτικών ή λόγω της μορφολογίας των φυτών που μπορεί να δημιουργούν φυσικά εμπόδια.

Το απλοποιημένο περιβάλλον που δημιουργήσαμε στις συνθήκες του εργαστηρίου, δε μας προσφέρει μια ακριβή εκτίμηση της αρπακτικής ικανότητας των τριών εξεταζομένων Κολεοπτέρων κάτω από φυσικές συνθήκες αγρού, συνεπώς απαιτείται περαιτέρω μελέτη. Ενδεχομένως θα ήταν χρήσιμο να εξετασθούν και υψηλότερες θερμοκρασίες από τις μελετηθείσες, αφού αποτελούν συνθήκες που επικρατούν στον αγρό. Η καλύτερη κατανόηση της δυναμικής των πληθυσμών των αρπακτικών και της αλληλεπίδρασής τους με τα επιζήμια έντομα, θα συμβάλει στην πρόοδο των προγραμμάτων ολοκληρωμένης αντιμετώπισης των εχθρών του καπνού και κυρίως θα μας βοηθήσει να εκτιμήσουμε την πραγματική επίδραση που ασκούν τα αρπακτικά αυτά στις αφίδες του καπνού στον αγρό.

Μέρος V

Μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας πληθυσμών του αρπακτικού *Coccinella septempunctata* L.,

Εισαγωγή

Ο σκοπός του βιολογικού ελέγχου είναι να μειώσει την πυκνότητα του εχθρού, μέσω της χρήσης αρπακτικών, παρασίτων ή παθογόνων. Τα αρπακτικά έντομα της οικογένειας Coccinellidae, οι κοινές παπαδίτσες, είναι από πρακτικής άποψης η οικογένεια που περιλαμβάνει πολλούς σημαντικούς φυσικούς εχθρούς των αφίδων και των ακάρεων. Τα αρπακτικά της οικογένειας αυτής απαντιούνται από την Αλάσκα μέχρι την Αργεντινή, από τη Σκανδιναβία μέχρι τη Νότια Αφρική, στην Άπω Ανατολή και την Αυστραλία (Irperti 1999).

Η πρόοδος στην γενετική έχει ήδη συνεισφέρει αρκετά στην αντίληψη μας για τον βιολογικό έλεγχο ενώ σε συνδυασμό ότι τα γενομικά εργαλεία που γίνονται διαθέσιμα για περισσότερα είδη, η πρόοδος αυξάνεται εκθετικά (Ashburner *et al.* 1998, Ehler *et al.* 2004, Unruh & Woolley 1999). Τρεις είναι οι σημαντικοί τομείς έρευνας για του γενετιστές, να δημιουργήσουν γενετικούς δείκτες για να εξακριβώσουν την καταγωγή κάθε είδους και εξάπλωση, την απομόνωση γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη, αναπαραγωγή και συμπεριφοράς και τέλος την ανάπτυξη τεχνολογίας μεταφοράς γονιδίων (Roderick & Navajas 2003).

Δυο από τους δημοφιλέστερους δείκτες που χρησιμοποιούνται σε μελέτες μοριακής εξέλιξης, είναι το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) και το ευκαριωτικό ριβοσωμικό DNA (rDNA), με μικρές διαφορές στις ιδιότητες τους που μπορούν να μεταφραστούν ως συνέπεια των μεταλλάξεων, της εξέλιξης, μετανάστευσης και επιλογή προτύπων γεωγραφικής ποικιλομορφίας και μοριακής απόκλισης.

Το mtDNA είναι από τα περισσότερα και καλύτερα μελετημένα τμήματα του ζωικού γονιδιώματος, καθώς τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του προσφέρουν αρκετά πλεονεκτήματα στις πληθυσμιακές μελέτες. Υποθέτοντας ίση αναλογία φύλων, το δραστικό μέγεθος του πληθυσμού του mtDNA είναι το 1/4 σε σύγκριση με το πυρηνικό DNA. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη

μεγαλύτερη γενετική διαφοροποίηση εξαιτίας των φαινομένων της γενετικής παρέκκλισης και έτσι το καθιστά πιο ικανό στην αποκάλυψη ειδικών πληθυσμιακών δεικτών. Από φυλογενετική σκοπιά, η έλλειψη ανασυνδυασμού σημαίνει ότι οι δείκτες του mtDNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να διαπιστωθεί εάν τα άτομα των πληθυσμών είναι οργανωμένα σε μητριαρχικές σειρές. Οι λόγοι αυτοί καθιέρωσαν το mtDNA, ως το δημοφιλέστερο γενετικό υλικό για τη μελέτη της δομής πληθυσμών, της γονιδιακής ροής, των ζωνών υβριδισμού, της βιογεωγραφίας και των φυλογενετικών σχέσεων σε ενδοειδικό και διειδικό επίπεδο (Loxdale & Lushai, 1998).

Στα έντομα η ανάλυση της παραλλακτικότητας του mtDNA έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη ταξινομικών και πληθυσμιακών γενετικών μελετών σε βιότυπους αφίδων των σιτηρών (Powers *et al.* 1989), σε Δίπτερα των φρούτων (fruit flies) (Gasparich *et al.* 1997), παρασιτοειδή Υμενόπτερα (Heimpel *et al.* 1997), για την μελέτη μιμητισμού σε Λεπιδόπτερα (Brower 1996), γενετικής παραλλακτικότητας σε ακρίδες (Charco *et al.* 1994), μέλισσες (Crozier & Crozier, 1993), μελέτες μητριαρχίας σε μυρμήγκια και της κίνησης τους μεταξύ των φωλιών (Stille & Stille, 1992), μελέτη ενδοσυμβιωτικών βακτηρίων των εντόμων (Aksoy, 1995).

Η χρησιμοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), η οποία επιτρέπει την ενίσχυση επιλεγμένων περιοχών του DNA, σε συνδυασμό με τη χρήση κατάλληλων ανιχνευτών του mtDNA, έκανε την εξέταση της ποικιλότητας του mtDNA σημαντικά ευκολότερη και ταχύτερη, από ότι στο παρελθόν. Σήμερα, υπάρχουν διαθέσιμοι αρκετοί "παγκόσμιοι εκκινητές" (universal primers), δηλαδή εκκινητές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον πολλαπλασιασμό της ίδιας περιοχής του mtDNA, για ένα αριθμό διαφορετικών ειδών (Simon *et al.* 1994).

Το ενδιαφέρον για την καταγωγή, τις φυλογενετικές σχέσεις και τα συστατικά ενός είδος, κάποιου αρπακτικού κολεοπτέρου εξηγείται από την φαινοτυπική ετερογένεια και την γεωγραφική κατανομή τους (Majerus 1994). Πολλά είδη αρπακτικών κολεοπτέρων είναι πολυμορφικά με κύριο εκφραστή το χρώμα στα έλυτρα και το pronώτο, ενώ υπάρχουν αναφορές σε ορισμένα είδη, για την σχέση μεταξύ της πληθυσμιακής δομής και τα οικολογικά χαρακτηριστικά στα ενδιαιτήματα τους (Palenko *et al.* 2004).

Μπορούμε με επιτυχία να υπολογίσουμε την γενετική απόσταση μεταξύ ειδών αλλά και της δομής των πληθυσμών, συγκρίνοντας την νουκλεοτιδική τους αλληλουχία (Davis and Nixon 1992). Η ανάλυση της φυλογένεσης πληθυσμών μέσα σε ένα είδος με μοριακούς δείκτες (πχ με ανάλυση της παραλλακτικότητας του μιτοχονδριακού DNA) είναι να χρήσιμο μέσο για να αποσαφηνίσει ιστορικές και φυλογενετικές σχέσεις που υποκρύπτουν πληθυσμιακές διαφορές.

Το ευκαριωτικό ριβοσωμικό DNA (rDNA) αποτελείται χαρακτηριστικά από αρκετά διαδοχικά επαναλαμβανόμενα αντίγραφα της μονάδας μεταγραφής, η οποία κωδικοποιεί τα γονίδια 18S, 5.8S, και 28S, με τα δύο εσωτερικά μεταγραφόμενα διαστήματα, ITS1 και ITS2. Αλληλουχίες πυρηνικού rDNA έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον υπολογισμό φυλογενέσεων για πολλούς οργανισμούς, με το ITS1 να είναι ευρέως χρησιμοποιούμενο στο επίπεδο πληθυσμού και είδους λόγω του υψηλού επιπέδου παραλλακτικότητας που εμφανίζει η περιοχή αυτή. (Vogler & DeSalle 1994, Miller *et al.* 1996, Fabry *et al.* 1999, Schulenberg *et al.* 1999)

Υλικά με Μέθοδοι

Δείγματα ενηλίκων *C. septempunctata*, που χρησιμοποιήθηκαν για αυτή τη μελέτη συλλέχτηκαν από διάφορες περιοχές τις Ελλάδας και του εξωτερικού. Οι περιοχές που συλλέχτηκαν τα δείγματα είναι η περιοχή Μελίκη για τη Βόρεια Ελλάδα, Βελεστίνο και Λεχώνια για την Κεντρική Ελλάδα και Προσύμνη Αργολίδος για τη Νότια Ελλάδα, ενώ επιπλέον συλλέχτηκαν δείγματα από το Ηράκλειο Κρήτης (Επισκοπή Πεδιάδος). Τα δείγματα από το εξωτερικό συλλεχτήκαν από την περιοχή Λευκωσίας Κύπρου, από την Battipaglia της Βόρειας Ιταλίας και την περιοχή Βελιγραδίου της Σερβίας. Τα δείγματα μετά την αναγνώριση τους στο Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας διατηρήθηκαν σε καθαρή αλκοόλη ή σε θερμοκρασία -20 °C μέχρι και την χρησιμοποίησή τους.

Γενετική ανάλυση (*Genetic analysis*)

Η εξαγωγή του mtDNA έγινε με τη χρήση πρωτεΐνάσης K σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται από τους Margaritoroulos *et al.* (2007): το έντομο αρχικά λιώνεται ελαφρά και στη συνέχεια προστίθενται 300 μl διαλύματος πέψης (που αποτελείται από: 40 mM Tris, pH 8.5, 10 mM EDTA, 200 mM NaCl, 1% SDS και 100mg/ml πρωτεΐνάσης K). Στη συνέχεια γίνεται σχολαστική λειοτρίβηση και τοποθέτηση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο στους 37° C για τέσσερις ώρες. Κάθε μισή ώρα γίνεται ανάδευση των δειγμάτων. Τα στάδια που ακολουθήθηκαν στη συνέχεια ήταν τα εξής: Προστέθηκαν 100μl οξικού νατρίου NaOAc 3M, pH 5,2 και το φιαλίδιο τοποθετήθηκε στους -20° C για 15-20 λεπτά. Κατόπιν, τα φιαλίδια φυγοκεντρήθηκαν στις 13000 στροφές για 5 λεπτά και το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκε σε νέο φιαλίδιο. Ακολούθησαν διαδοχικές εκχυλίσεις με φαινόλη, φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1; V:V:V) και χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη (24:1; V:V) και φυγοκέντριση στις 13800 στροφές για 20, 5 και 5 λεπτά αντίστοιχα. Πριν τις φυγοκεντρίσεις γινόταν έντονη ανάδευση στο vortex. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο περιέκτη, όπου προστέθηκε 1ml ισοπροπανόλης, όπου παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντριση στις 13000 στροφές, για 20 λεπτά. Αφού απορρίφθηκε προσεκτικά το υπερκείμενο, ώστε να παραμείνει το ίζημα, προστέθηκε 1ml αλκοόλη 70% και ακολούθησε φυγοκέντρισή στις 13000 στροφές για 5 λεπτά. Τέλος, έγινε προσεκτική απόρριψη του υπερκειμένου υγρού, ώστε να παραμείνει το ίζημα και ακολούθησε στέγνωμα του DNA στον κλίβανο, για 15 λεπτά στους 37° C. Στη συνέχεια προστέθηκαν 100μl ddH₂O και τα DNA τοποθετήθηκαν στο ψυγείο (8°C).

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση της περιοχής 16s RNA του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, μήκους 570 περίπου βάσεων. Για τον πολλαπλασιασμό της περιοχής 16s RNA του μιτοχονδριακού DNA χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω ζεύγος των εκκινητών (Palumbi *et al.* 1991) με σκοπό να ενισχύσουν ένα τμήμα 570 bp στην περιοχή αυτή: L2510: 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3' και H3080: 5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'. Ενώ για τον πολλαπλασιασμό της περιοχής IT1S DNA χρησιμοποιήθηκε αρχικά το

παρακάτω ζεύγος των εκκινητών (Harris & Crandall, 2000), με σκοπό να ενισχύσουν ένα τμήμα 1650 bp περίπου: ITS1F: 5-GTAAAAGTCGTAACAAGG -3' και ITS1R: 5'-TCCTCCGCTWAWTGATATGC-3' ενώ στη συνέχεια, με τη βοήθεια της αλληλουχίας, δημιουργήθηκαν εκκινητές με σκοπό να ενισχύσουν ένα τμήμα 1300 bp περίπου. Οι εκκινητές αυτοί είναι οι ITS1FPS : 5-AAGAACCGATACATTCGCTCATCG -3' και ITS1RPS: 5-CGCCGCTTCAGACCTAAGAGCA-3'

Ο πολλαπλασιασμός του δίκλωνου DNA πραγματοποιήθηκε σε όγκους αντιδράσεων των 50μl σύμφωνα με τις συνθήκες που έχουν περιγραφεί από τους Martinez-Torres *et al.* (1999) και με μερικές τροποποιήσεις με 1,5 Taq DNA πολυμεράση HighTest, 5 μl ρυθμιστικό διάλυμα Taq 10 × (500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl pH 9), 2,0 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, περίπου 100 pmoI από κάθε εκκινητή και 1μl (περίπου 100 ng) από DNA κάθε ατόμου.

Οι συνθήκες ενίσχυσης περιελάμβαναν μια προκαταρκτική αποδιάταξη του DNA στους 95° C για 4 λεπτά, ένα σύνολο 35 κύκλων των 40 δευτερολέπτων στους 95° C, 40 δευτερόλεπτων στους 56° C {45 δευτερόλεπτα στους 55° C για το IT1S}, 40 δευτερόλεπτων {90 δευτερόλεπτα για το IT1S} στους 72° C. Τέλος το πρόγραμμα της αντίδρασης ολοκληρωνόταν με ένα τελικό στάδιο συμπληρωματικής επιμήκυνσης στους 72°C για δέκα λεπτά.

Μετά τον πολλαπλασιασμό, ο έλεγχος της επιτυχίας της PCR γινόταν σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης 2% που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο 0,5 μl ml⁻¹ σε διάλυμα TAE. Η εξέταση των ζωνών του DNA έγινε κάτω από λυχνία υπεριώδους ακτινοβολίας. Όταν τα αποτελέσματα ήταν θετικά, ακολουθούσε καθαρισμός του προϊόντος της PCR με το PCR DNA και Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences) και απευθείας έγινε αλληλούχιση από την Macrogen Inc., χρησιμοποιώντας έναν αυτόματο sequencer ABI Prism 3730XL DNA (Perkin Elmer Corporation). Σε όλα τα προϊόντα έγινε αναγνώριση της αλληλουχίας και από τις δύο πλευρές.

Στατιστική Ανάλυση (*Statistical analysis*)

Η ανάλυση έγινε ξεχωριστά για τα δυο γονίδια (16S rRNA και IT1S). Το DNAsp (Rozas *et al.* 2003) χρησιμοποιήθηκε για να βρεθούν οι σταθεροί δείκτες γενετικής ποικιλίας, όπως ο αριθμός των διαφορετικών απλότυπων που βρέθηκαν σε κάθε δείγμα, η ποικιλία απλότυπου (h) (η πιθανότητα ότι δύο τυχαία επιλεγμένοι απλότυποι να είναι διαφορετικοί στο δείγμα), η ποικιλία νουκλεοτιδίου (P_i) (η πιθανότητα ότι δύο τυχαία επιλεγμένα ομόλογα νουκλεοτίδια να είναι διαφορετικά) (Nei 1987) και ο μέσος αριθμός των διαφορών στα νουκλεοτίδια (k). Για να ελεγχθεί η απόκλιση από την ουδετερότητα χρησιμοποιήθηκε το τεστ Tajima (D) (Tajima 1989). Σημειώνεται ότι οι σημαντικές τιμές D μπορεί να οφείλονται σε παράγοντες και όχι σε επιλεκτικά φαινόμενα, όπως επέκταση του πληθυσμού, κυκλοφοριακή συμφόρηση ή ετερογένεια των ρυθμών μεταλλαγής (Tajima 1993, 1996, Aris-Brosou and Excoffier 1996). Η σύγκριση μεταξύ των πληθυσμών έγινε με το πρόγραμμα Arlequin 3.11 (Kumar *et al.* 2004) όπου και υπολογίστηκε και το F_{ST} .

Το φυλογενετικό δένδρο κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας τη μέγιστη πιθανότητα. Η διαδικτυακή εφαρμογή FINDMODEL και η εφαρμογή της MODELTEST V3.7 (Posada & Crandall 1998) χρησιμοποιήθηκαν για να βρεθεί το μοντέλο της συχνότητας υποκατάστασης και διαδοχικότητας, την συχνότητα μεταστροφής/μετάπτωσης (TS:TV), και η παράμετρος γ -shape (α). Τα δένδρογράμματα κατασκευάστηκαν με το πρόγραμμα PAUP v4.0 (Swofford 2000).

Αποτελέσματα – Συζήτηση

Στο 16S rRNA βρέθηκαν συνολικά 28 πολυμορφικές θέσεις από τις 29 αλληλουχίες των 504 βάσεων. Η συχνότητα εμφάνισης των νουκλεοτιδίων για αυτό το γονίδιο ήταν 0.39, 0.091, 0.364 και 0.155 για T, C, A και G αντίστοιχα. Από τα 29 δείγματα που αναλύθηκαν, 20 απλότυποι βρέθηκαν από τους οποίους οι 17 ήταν μοναδικοί. Ο πιο κοινός απλότυπος ήταν ευρέως διαδεδομένος και εκπροσωπούσε το 24.13% από τα συνολικά δείγματα που αναλύθηκαν. Η ποικιλία απλοτύπου και νουκλεοτιδίου ήταν $0,938 \pm 0,034$ και $0,00646 \pm 0,00087$ αντίστοιχα για όλα τα δείγματα συνολικά. Οι περισσότεροι

απλότυποι βρέθηκαν στην Κρήτη – Κύπρο. Η ποικιλία απλοτύπου και νουκλεοτιδίου ανά περιοχή παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.

Το τεστ Tajima (D) για επιλεκτική ουδετερότητα για την αλληλουχία του γονιδίου 16S rRNA ήταν αρνητικό ($D=-2,19638$ και διέφερε στατιστικώς σημαντικά από το μηδέν, όταν όλα τα δείγματα αναλυθούν όλα μαζί ($p < 0.001$, όπου p είναι η πιθανότητα να λαμβάνουν οι παρατηρούμενες D τιμές πάνω από ουδέτερης μετάλλαξης υπόθεσης).

Στο γονίδιο 16s rRNA ανάμεσα στις 3 διαφορετικές περιοχές της ανάλυσης (AMOVA) έδειξε σημαντική μεταφορά γονιδίων μεταξύ αυτών των περιοχών – κρατών ($F_{ST}=0.17122$). Η ανάλυση της μοριακής παραλλακτικότητας αποκάλυψε την μη γενετική κατασκευή σε επίπεδο ιεραρχικό, με το 82.9% της παραλλακτικότητας να βρίσκεται σε επίπεδο της κάθε περιοχής – κράτος, ενώ το 17.1% της παραλλακτικότητας ήταν μεταξύ των διαφόρων περιοχών – κρατών. Οι τιμές των συνδυασμών F_{ST} μεταξύ των περιοχών ήταν μικρές (Πίνακας 2).

Το F81 μοντέλο παρέχει το καλύτερο μοντέλο αντικατάστασης του DNA : οι υπολογισμένοι παράμετροι ήταν 0,36405 (A), 0,09120 (C), 0,15517 (G), 0,38957 (T), $TS:TV=0,363$ και $\alpha=0,011$. Το δένδρογραμμα παρουσιάζεται στην Εικόνα 1 Α. Δείγματα από την ίδια περιοχή δεν ομαδοποιήθηκαν.

Στο IT1S rDNA βρέθηκαν συνολικά 58 πολυμορφικές θέσεις από τις 30 αλληλουχίες των 1304 βάσεων. Ήταν μεγαλύτερο σε μέγεθος από ότι σε άλλα κολεόπτερα όπως πχ *Diabrotica virgifera*, το οποίο είχε μέγεθος 550 bp (Szalanski *et al.* 1999, Επίσης για τις αλληλουχίες του γονιδίου IT1S rDNA από Κολεόπτερα της οικογένειας Chrysomelidae, που είναι στη βάση δεδομένων EMBL/GenBank). Η συχνότητα εμφάνισης των νουκλεοτιδίων για αυτό το γονίδιο ήταν 0.244, 0.245, 0.226 και 0.285 για T, C, A και G αντίστοιχα, τυπικές τιμές για το IT1S rDNA στα αρπακτικά κολεόπτερα (Hinrich *et al.* 2001). Από τα 30 δείγματα που αναλύθηκαν, 16 απλότυποι βρέθηκαν, από τους οποίους οι 12 ήταν μοναδικοί. Οι δυο πιο κοινοί απλότυποι ήταν ευρέως διαδεδομένοι και εκπροσωπούσαν το 20% αντίστοιχα από τα συνολικά δείγματα που αναλύθηκαν. Η ποικιλία απλοτύπου και νουκλεοτιδίου ήταν $0,915 \pm 0,031$ και $0,00428 \pm 0,00131$ αντίστοιχα για όλα τα δείγματα συνολικά. Η ποικιλία απλοτύπου και νουκλεοτιδίου ανά περιοχή παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.

Στο γονίδιο IT1S rDNA, ανάμεσα στις τρεις διαφορετικές περιοχές της ανάλυσης (AMOVA), έδειξε μεταφορά γονιδίων μεταξύ αυτών των περιοχών – κρατών ($F_{ST}= 0.05816$). Η ανάλυση της μοριακής παραλλακτικότητας αποκάλυψε την μη γενετική κατασκευή σε επίπεδο ιεραρχικό, με το 94.2% της παραλλακτικότητας να βρίσκεται σε επίπεδο της κάθε περιοχής – κράτος, ενώ το 5.8% της παραλλακτικότητας ήταν μεταξύ των διαφόρων περιοχών – κρατών. Οι τιμές των συνδυασμών F_{ST} μεταξύ των περιοχών ήταν μικρές (Πίνακας 2).

Το τεστ Tajima (D) για επιλεκτική ουδετερότητα για την αλληλουχία του γονιδίου IT1S ήταν αρνητικό ($D=-2,34898$) και διέφερε στατιστικώς σημαντικά από το μηδέν, όταν τα δείγματα αναλυθούν όλα μαζί ($p < 0.001$, όπου p είναι η πιθανότητα να λαμβάνουν οι παρατηρούμενες D τιμές πάνω από ουδέτερης μετάλλαξης υπόθεσης).

Το F81+G μοντέλο παρέχει το καλύτερο μοντέλο αντικατάστασης του DNA : οι υπολογισμένοι παράμετροι ήταν 0,2278 (A), 0,2433 (C), 0,2813 (G), 0,2475 (T), $TS:TV= 0,637$ και $\alpha=0,011$. Το δένδρογραμμα παρουσιάζεται στην Εικόνα 1 Β. Δείγματα από την ίδια περιοχή δεν ομαδοποιήθηκαν.

Το mtDNA είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για να διασαφηνίζει τις γενετικές διαφορές ανάμεσα σε ένα είδος αλλά και σε διαφορετικά είδη (Krusse & Sperling 2001). Στο 16S rRNA η συχνότητα A+T που βρέθηκε για αυτό το γονίδιο είναι η τυπική για τα έντομα (Brower & DeSalle 1998). Η ποικιλία των απλοτύπων που βρέθηκε για αυτό το γονίδιο ήταν από τα μεγαλύτερα που έχουν αναφερθεί (Vandewoestijne *et al.* 2004 και οι πηγές του), ενώ η ποικιλία νουκλεοτιδίων ήταν ενδιάμεση σε σχέση με άλλες μελέτες. Μέση προς υψηλή ποικιλία απλοτύπων σε συνδυασμό με χαμηλή ποικιλία νουκλεοτιδίων προσδιορίζει μια γρήγορη δημογραφική επέκταση από έναν μικρό αποτελεσματικό μικρό πληθυσμό (Hundertmark *et al.* 2002). Υψηλή ποικιλία απλοτύπων μπορεί επίσης να προσδιορίζει πολλαπλά καταφύγια (refuges) και δευτερεύουσες επικοινωνίες μεταξύ των καταφυγίων αυτών (Fry & Zink 1998).

Πίνακας 1. Ο αριθμός ατόμων που εξετάστηκαν (N), αριθμός (N_h) διαφορετικών απλότυπων που βρέθηκαν σε κάθε περιοχή δειγματοληψίας, απλότυπος (h) και η νουκλεοτιδική ποικιλομορφία (Pi), μέσος αριθμός διαφορών ανά νουκλεοτίδιο (k), Tajima D τεστ για την ουδετερότητα.

Περιοχή - Κράτος	Αριθμός	Αριθμός	Ποικιλία	Ποικιλία	k	D	SSD	P
	Δειγμάτων	Απλοτύπων	Απλοτύπων (h)	Νουκλεοτιδίων (Pi)				
	(N)	(N _h)						
IT1S rDNA								
Κρήτη	6	4	0,800 ± 0,172	0,00686 ± 0,00395	8,933	-1,35908 ^{NS}	0,0996671	0,05
Ιταλία	5	5	1,000 ± 0,126	0,00184 ± 0,00041	2,4	-1,14554 ^{NS}	0,0425044	0,45
Ελλάδα-Σερβία	16	10	0,933 ± 0,040	0,00438 ± 0,00130	5,7	-1,61580 ^{NS}	0,0201657	0,65
Σύνολο	30	16	0,915 ± 0,031	0,00428 ± 0,00131	5,577	-2,34898*	0,0272975	0
16s rRNA								
Ιταλία	8	6	0,893 ± 0,111	0,00454 ± 0,00108	2,286	-1,25337 ^{NS}	0,015324	0,8
Κύπρος – Κρήτη	10	9	0,978 ± 0,054	0,00750 ± 0,00136	3,778	-1,53712 ^{NS}	0,0070398	0,9
Ελλάδα- Σερβία	11	6	0,800 ± 0,114	0,00476 ± 0,00127	2,4	-1,26449 ^{NS}	0,01396694	0,8
Σύνολο	29	20	0,938 ± 0,034	0,00646 ± 0,00087	3,249	-2,19638*	0,0019813	0,8

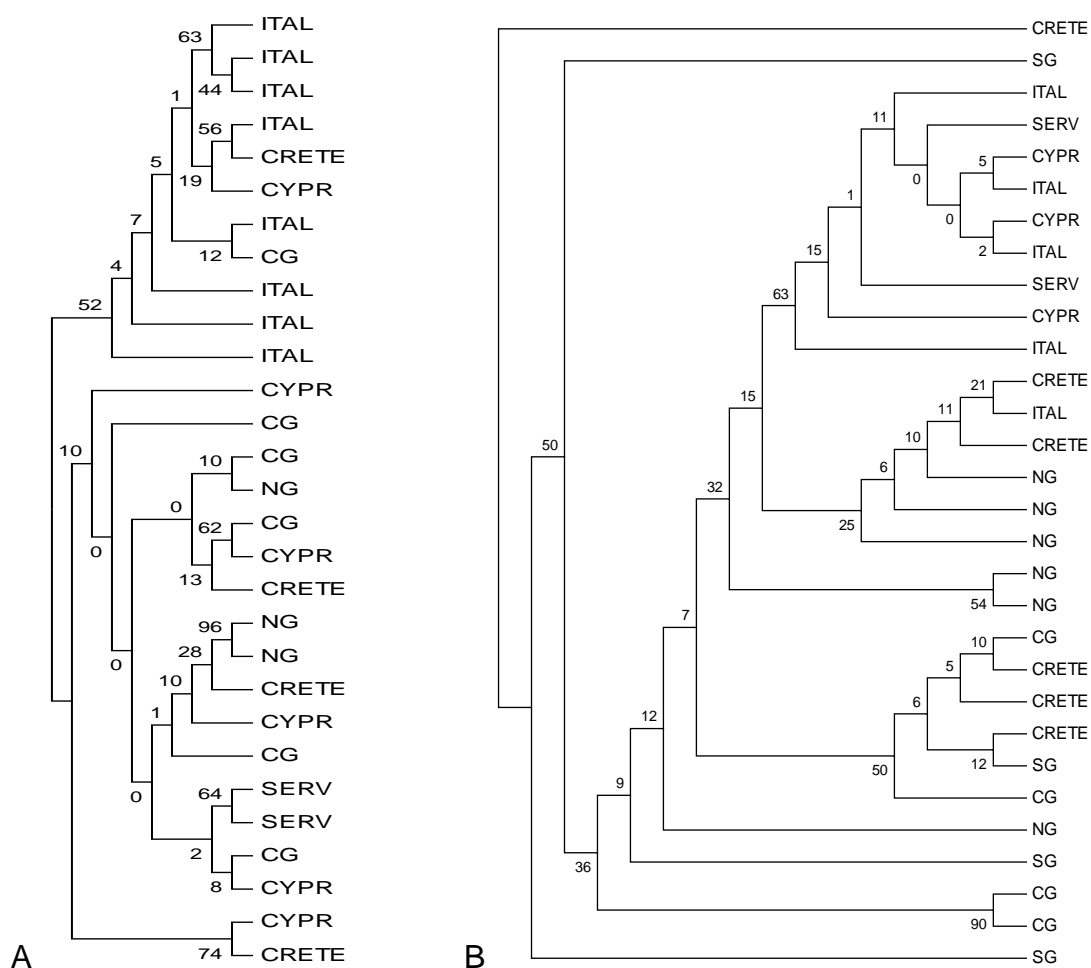
P<0.001

Πινάκας 2. Συνδυασμοί F_{ST} μεταξύ των περιοχών για το 16S rRNA και το IT1S.

16sRNA			
	Κύπρος – Κρήτη	Ελλάδα – Σερβία	Ιταλία
Κύπρος – Κρήτη	0.00000		
Ιταλία	0.19840*	0.00000	
Ελλάδα – Σερβία	0.04262*	0.29501*	0.00000

IT1S			
	Ελλάδα – Σερβία	Κρήτη	Ιταλία
Ελλάδα – Σερβία	0.0000		
Κρήτη	0.7413 ^{NS}	0.0000	
Ιταλία	0.2426 ^{NS}	0.1646 ^{NS}	0.0000

(NS = No Significant, * $p < 0,05$)



Εικόνα 1. Δενδρόγραμμα μέγιστης πιθανότητας για (A) 16s rRNA και (B) IT1S rDNA.

Γενική Συζήτηση – Συμπεράσματα

Η παρούσα μελέτη συνέβαλε στην επιπλέον κατανόηση της βιοοικολογίας της αφίδας *Myzus persicae* τόσο στον πρωτεύοντα ξενιστή του όσο και σε δευτερεύοντες ξενιστές. Επίσης, μελετήθηκε για πρώτη φορά σε τόσο μεγάλη έκταση στην Ελλάδα, άλλα και όλη την Ευρώπη η ανθεκτικότητα της αφίδας *M. persicae* σε αντιπροσωπευτικά από όλες τις ταξείες εντομοκτόνα, τόσο με άπλες βιοδοκιμές άλλα και με βιοχημικά και μοριακά τεστ ελέγχου της ανθεκτικότητας. Μελετήθηκαν τα βιολογικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά στα τρία είδη αρπακτικών Κολεοπτέρων της οικογένειας Coccinellidae, *Coccinella septempunctata* L., *Hippodamia variegata* (Goeze) και *Hippodamia (Semiadalia) undecimnotata* (Schneider) με λεία την αφίδα *M. persicae*. Επιπλέον, για πρώτη φορά σχεδόν σε όλη την Ελλάδα καταγράφηκαν τα αρπακτικά Κολεόπτερα της οικογένειας Coccinellidae, σε καλλιέργειες ροδακινιάς, καπνού άλλα και σε παρακείμενες καλλιέργειες προς αυτές και σε ζιζάνια. Τέλος, για πρώτη φορά στην Ελλάδα μελετήθηκε η γενετική πληθυσμών στο είδος *Coccinella septempunctata* L. στα γονίδια 16S rRNA και IT1S.

Τα αποτελέσματα της μελέτης της ανθεκτικότητας της αφίδας *M. persicae* στην Ελλάδα με τη μέθοδο της στιγμιαίας εμβάπτισης (dip test) δείχνουν ότι ισχυρή ανθεκτικότητα έχει αναπτυχτεί σε όλη την Ελλάδα σε οργανοφωσφορικά, καρβαμιδικά και πυρεθροειδή εντομοκτόνα. Αντίθετα, στα νεονικοτεινοειδή εντομοκτόνα έχει αναπτυχτεί μικρή ανοχή μέχρι σήμερα.

Το νέο στοιχείο που προκύπτει από την παρούσα διατριβή είναι ότι για το imidacloprid και δευτερευόντως το acetamiprid, που χρησιμοποιούνται για δυο δεκαετίες στην Ελλάδα και στο εξωτερικό και δεν έχουν αναφερθεί αποτυχημένοι ψεκασμοί, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι υπάρχει σε μεγάλο βαθμό ανάπτυξη μέσου επιπέδου ανθεκτικότητας, όπου από το σύνολο των δειγμάτων, το 32,8% και 49% παρουσίασαν τιμές συντελεστή ανθεκτικότητας μεταξύ 10 και 20 για το imidacloprid και acetamiprid αντίστοιχα. Το 15,9% και 3,7% των πληθυσμών για το imidacloprid και acetamiprid αντίστοιχα παρουσίασαν συντελεστή ανθεκτικότητας με τιμές μεγαλύτερες από 20, (με όλα τα δείγματα στην περίπτωση του imidacloprid να προέρχονται από

καπνό) αποδεικνύοντας την ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Αντίθετα, οι πληθυσμοί που προέρχονταν από ροδακινίες, δεν εμφάνισαν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας, ειδικά οι πληθυσμοί που προέρχονταν από περιοχές που δεν συνυπάρχουν οι καλλιέργειες της ροδακινιάς με αυτή του καπνού.

Η ανθεκτικότητα της αφίδας *M. persicae* σε πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα είχε καταγραφεί στην Ευρώπη (Field *et al.* 1997, Foster *et al.* 1998, Field & Foster 2002, Mazzoni & Cravedi 2002, Guillemaud *et al.* 2003, Nauen & Elbert 2003, Anstead *et al.* 2004, Fenton *et al.* 2005, Zamoum *et al.* 2005) τις ΗΠΑ, την Χιλή και την Ιαπωνία (Field *et al.* 1997, Fuentes- Contreras *et al.* 2004). Εξαιτίας των μικρών αριθμών δειγμάτων από τις μελέτες αυτές, δε μπορούσαν να βγουν ασφαλή συμπεράσματα τόσο σε επίπεδο πληθυσμών όσο και σε επίπεδο ατομικών δειγμάτων κλώνων. Η μελέτη αυτή είναι η πιο ολοκληρωμένη σε Ελλάδα και Ευρώπη στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα μέχρι αυτή τη στιγμή και ανέδειξε το σημαντικό πρόβλημα της ανθεκτικότητας της αφίδας *M. persicae* στην ομάδα αυτή των εντομοκτόνων.

Ομοίως, η μελέτη αυτή ανέδειξε το σημαντικό πρόβλημα που υπάρχει στον έλεγχο της αφίδας *M. persicae* με τα οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά εντομοκτόνα. Η αλόγιστη χρήση οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών εντομοκτόνων τα προηγούμενα έτη είχε ως αποτέλεσμα την ισχυρή ανάπτυξη ανθεκτικότητας με αποτέλεσμα ο έλεγχος της αφίδας της ροδακινιάς να αποτυγχάνει, να αυξάνεται το κόστος παραγωγής, να μειώνεται η ποιότητα του προϊόντος άλλα και να επιβαρύνεται το περιβάλλον με μεγάλες ποσότητες εντομοκτόνων.

Η παρούσα μελέτη δείχνει την ανάγκη παρακολούθησης (monitoring) της ανθεκτικότητας της αφίδας και τη χρησιμοποίηση του κατάλληλου κάθε φορά εντομοκτόνου, την ορθολογική χρήση των νεονικοτινοειδών εντομοκτόνων, την αποφυγή περιττών επεμβάσεων. Η εφαρμογή του imidacloprid στον καπνό με το νερό της μεταφύτευσης, προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως η αποφυγή δυσμενών επιπτώσεων στους φυσικούς εχθρούς της αφίδας. Περισσότερη μελέτη χρειάζεται, ωστόσο, για να διαπιστωθεί αν αυτή η εφαρμογή, λόγω συνεχούς πίεσης επιλογής και μεγαλύτερης δόσης στους πληθυσμούς της αφίδας, μπορεί να οδηγήσει

γρηγορότερα σε καταστάσεις ανάπτυξης ανοχής/ανθεκτικότητας από ότι προγράμματα ψεκασμών φυλλώματος. Γενικά, τα έως τώρα αποτελέσματα δείχνουν πιο ανθεκτικούς πληθυσμούς στον καπνό από ότι στη ροδακινιά, όχι μόνο στο imidacloprid αλλά και σε άλλες ομάδες εντομοκτόνων. Αυτό συμβαίνει, λόγω της επιλογής των ανθεκτικών γενοτύπων που ξεκινά από την εμφάνιση των πληθυσμών στη ροδακινιά και συνεχίζεται όταν μεταναστεύσουν στον καπνό.

Η παρούσα διατριβή ανέδειξε για πρώτη φορά την κατάσταση της ανθεκτικότητας των φυσικών εχθρών της αφίδας *M. persicae*, των αρπακτικών Κολεοπτέρων της οικογένειας Coccinellidae, *Coccinella septempunctata* L., *Hippodamia variegata* (Goeze) και *Hippodamia (Semiadalia) undecimnotata* (Schneider) και το αρπακτικό *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) στο εντομοκτόνο imidacloprid. Ένα μεγάλο ποσοστό κλώνων επιβίωσαν σε επίπεδα του εντομοκτόνου imidacloprid, όπου όλοι οι παραπάνω φυσικοί τους εχθροί θα πέθαιναν. Ωστόσο, περισσότεροι παράγοντες πρέπει να επιδρούν στην ανθεκτικότητα των φυσικών έχθρων της αφίδας *M. persicae* στο αγρό, όπως ο τρόπος χρήσης του εντομοκτόνου κ.α.

Η παρούσα διατριβή ανέδειξε σημαντικά βιολογικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά ελληνικών πληθυσμών τριών σημαντικών αρπακτικών Κολεοπτέρων. Συμπερασματικά, και τα τρία είδη αποτελούν δυνητικά αποτελεσματικούς θηρευτές του *M. persicae*, όπως έχει αναφερθεί και για άλλα είδη αφίδων (Hodek and Honek 1996, El Habi *et al.* 2000). Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης και για τα δύο είδη που ελέχθησαν σε όλες τις θερμοκρασίες, ήταν 26°C καθώς παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη κατανάλωση αφίδων, γρήγορη ανάπτυξη και χαμηλή θνησιμότητα. Η μεγάλη περίοδος προωτοκίας του *H. undecimnotata* πιθανώς να αντανakλά την έμφυτη ικανότητα του είδους για αναπαραγωγική διάπαυση ακόμα και αν υπάρχουν ιδανικές συνθήκες για αναπαραγωγή. Ο ενδογενής ρυθμός αύξησης του *H. variegata* είναι ελαφρά μεγαλύτερος από αυτόν που είχε βρεθεί στην Ιταλία (Lanzoni *et al.* 2004). Η μικρή περίοδος προωτοκίας του *H. variegata* δείχνει μια μακρά περίοδο αποικισμού. Και τα τρία είδη δείχνουν να μπορούν να μειώσουν τους πληθυσμούς του *M. persicae* σε φυτείες καπνού και

ροδακινιάς, αλλά χρειάζεται περισσότερη έρευνα στον αγρό και η μελέτη των μοντέλων αφίδα – αρπακτικά - ξενιστής.

Η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη λεπτομερή προσέγγιση της καταγραφής και δευτερευόντως της διακύμανσης σημαντικών αρπακτικών Coccinellidae, της αφίδας της ροδακινιάς στον κύριο όσο και στον σημαντικότερο δευτερεύοντα ξενιστή (καπνό) της, σχεδόν σε όλη την Ελλάδα. Σε δειγματοληψίες στις καλλιέργειες αυτές με σκοπό την καταγραφή των ειδών που επικρατούν στην Ελλάδα βρέθηκε ότι τα *C. septempunctata*, *H. undecimnotata*, και *H. variegata* ήταν τα πιο συχνά εμφανιζόμενα. Η γνώση της ποικιλότητας και της εποχικής εμφάνισης των αρπακτικών που εμφανίζονται σε μια καλλιέργεια σε συνδυασμό με άλλα βιολογικά χαρακτηριστικά τους μπορεί να βοηθήσει προς την κατεύθυνση της ανάπτυξης φιλικότερων προς το περιβάλλον, τον παραγωγό και τον καταναλωτή προγραμμάτων καταπολέμησης στα πλαίσια της Ολοκληρωμένης Διαχείρισης των Εχθρών των καλλιεργειών, και ειδικότερα των αφίδων.

Τα βιολογικά χαρακτηριστικά που βρέθηκαν στην μελέτη αυτή εξηγούν σε κάποιο βαθμό το λόγο που το *C. septempunctata* εμφανίζεται πρώτο περί της αρχής Μαρτίου, στην Ελλάδα. Οι Katsarou *et al.* (2005) είχαν βρει ότι η ουδός ανάπτυξης είναι 10,7 ενώ για τα άλλα δυο είδη *H. undecimnotata* και *H. variegata* βρέθηκε η ουδός ανάπτυξης περί το 12,7 και 12,5 αντίστοιχα. Στην συνέχεια, όμως το *H. undecimnotata*, λόγω της γρηγορότερης αναπτυξής του σε συνδυασμό με το μεγαλύτερο ενδογενή ρυθμό αύξησης επικρατεί στον καπνό έναντι του *C. septempunctata*.

Η διατριβή αυτή αποτελεί την πρώτη προσπάθεια να αποτιμηθεί η γενετική ετερογένεια πληθυσμών του αρπακτικού κολεοπτέρου των αφίδων, *C. septempunctata* από την Ελλάδα, την Κύπρο, την Ιταλία και την Σερβία.

Συνοψίζοντας, τονίζουμε ότι το πρόβλημα της ανθεκτικότητας της αφίδας *M. persicae* στην Ελλάδα είναι ιδιαίτερα σημαντικό και τα τελευταία χρόνια έχει λάβει ανησυχητικά επίπεδα. Η πράσινη αφίδα της ροδακινιάς έχει αναπτύξει ισχυρή ανθεκτικότητα σε οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά, με

αποτελεσμα σε αυτές τις δύο κατηγορίες να αναμένεται αποτυχία της χρησιμότητας αυτών των εντομοκτόνων. Ανθεκτικότητα επίσης, έχει αναπτυχθεί στα πυρεθροειδή αν και όχι στο ίδιο βαθμό με τις δύο προηγούμενες κατηγορίες εντομοκτόνων. Τα νεονικοτινοειδή φαίνεται ότι είναι τα μόνα εντομοκτόνα που μπορούν να ελέγξουν αποτελεσματικά τους πληθυσμούς της αφίδας τόσο στη ροδακινιά όσο και στον καπνό. Ωστόσο, διαπιστώθηκε ότι σε ορισμένους πληθυσμούς αναπτύσσεται ανοχή/ανθεκτικότητα. Συνεπώς, χρειάζεται ορθολογική χρήση και προγραμματισμός διαχείρισης της ανθεκτικότητας του εντομοκτόνου. Αποφυγή περιπτώσεων επεμβάσεων είναι ένα μέτρο προς τη σωστή κατεύθυνση. Η εφαρμογή του imidacloprid στον καπνό με το νερό της μεταφύτευσης, προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως η αποφυγή δυσμενών επιπτώσεων στους φυσικούς εχθρούς της αφίδας. Περισσότερη μελέτη χρειάζεται, ωστόσο, για να διαπιστωθεί αν αυτή η εφαρμογή, λόγω συνεχούς πίεσης επιλογής στους πληθυσμούς της αφίδας, μπορεί να οδηγήσει γρηγορότερα σε καταστάσεις ανάπτυξης ανοχής/ανθεκτικότητας από ότι προγράμματα ψεκασμών φυλλώματος. Γενικά, τα έως τώρα αποτελέσματα δείχνουν πιο ανθεκτικούς πληθυσμούς στον καπνό από ότι στη ροδακινιά, όχι μόνο στο imidacloprid, αλλά και σε άλλες ομάδες εντομοκτόνων. Μικρότερες δόσεις του εντομοκτόνου imidacloprid ίσως να ευνοούν την συμπληρωματική δράση εντομοκτόνου – φυσικού εχθρού αξιοποιώντας την ανάπτυξη μικρού βαθμού ανθεκτικότητας. Αυτό συμβαίνει, λόγω της επιλογής των ανθεκτικών γενοτύπων που ξεκινά από την εμφάνιση των πληθυσμών στη ροδακινιά και συνεχίζεται όταν μεταναστεύσουν στον καπνό.

Η μελέτη των βιολογικών και δημογραφικών χαρακτηριστικών των αρπακτικών εντόμων σε συνθήκες εργαστηρίου δίνουν μια βασική εικόνα άλλα χρειάζονται πειράματα αγρού για να βγουν περισσότερα συμπεράσματα ως προς την δυναμική του κάθε ενός.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης έδειξαν ότι το *M. persicae* είναι είδος, που στην Ελλάδα έχει ανάπτυξη ανθεκτικότητα σε όλες τις ομάδες (ή σε μερικά σκευάσματα από την κάθε ομάδα) εντομοκτόνων εκτός από τα νεονικοτινοειδή. Ο πολυμορφισμός στο βιολογικό κύκλο, η

παραλλακτικότητα σε διάφορα χαρακτηριστικά της βιολογίας του είναι παράγοντες που συνεισφέρουν στην γρήγορη ανάπτυξη ανθεκτικότητας του *M. persicae*. Η καταγραφή των αρπακτικών Κολεοπτέρων του *M. persicae* σε καλλιέργειες καπνού και ροδακινιές έδειξε ότι διαφέρει το κυρίαρχο αρπακτικό σε κάθε περίπτωση. Τα αρπακτικά Κολεόπτερα που μελετήθηκαν έδειξαν ότι μπορούν να μειώσουν τον πληθυσμό της αφίδας *M. persicae* με αποτέλεσμα της μείωσης των αριθμών των επεμβάσεων αλλά της ποσότητας των εντομοκτόνων. Επίσης, η ανοχή - ανθεκτικότητα που έχουν αποκτήσει σε μικρό βαθμό οι φυσικοί εχθροί μπορεί να χρησιμοποιηθεί στον έλεγχο της αφίδας *M. persicae*.

Η παρούσα μελέτη συνέβαλλε στη γνώση για το έλεγχο του *M. persicae* τόσο σε εθνικό όσο και σε παγκόσμιο επίπεδο. Με την χρήση διαφόρων τεχνικών (dip test, τοπικές εφαρμογές εντομοκτόνου, βιοχημικά test, μοριακά test και αλληλούχιση μέρος του DNA) μελετήθηκε σε τόσο μεγάλο βαθμό αν έχει ανάπτυξη ανθεκτικότητα και σε τι μέγεθος σε όλες της ομάδες των εντομοκτόνων, που επιτρέπονται για τον χημικό έλεγχο της αφίδας *M. persicae*. Καταγράφηκαν για πρώτη φορά σχεδόν σε όλη την Ελλάδα τα αρπακτικά Κολεόπτερα, φυσικοί εχθροί της αφίδας *M. persicae*, σε σημαντικές καλλιέργειες για την χώρα μας, όπως είναι ο καπνός και οι ροδακινιές, ενώ μελετήθηκαν σε ορισμένα από αυτά τα βιολογικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά τους. Τέλος, αποκτήθηκε γνώση σχετικά με την γενετική παραλλακτικότητα πληθυσμών του αρπακτικού *C. septempunctata* από διαφορές περιοχές της Ευρώπης.

Βιβλιογραφία

- Aksoy, S. 1995.** Molecular analysis of the endosymbionts of tsetse flies : 16S rDNA locus and overexpression of a chaperonin, *Insect Molecular Biology*, 4: 23-29.
- Albuquerque, G.S., Tauber, C.A. & Tauber M.J. 1994.** *Chrysoperla externa* (Neuroptera : Chrysopidae) : Life history and potential for biological control in Central and South America. *Biological Control*, 4: 8-13.
- Anstead JA, Mallet J, & Denholm I. 2007.** Temporal and spatial incidence of alleles conferring knockdown resistance to pyrethroids in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera : Aphididae), and their association with other insecticide resistance mechanisms. *Bulletin of Entomological Research*, 97(3):243-252.
- Anstead, J.A., Williamson, M.S., Eleftherianos, I.G. & Denholm, I. 2004.** High-throughput detection of knockdown resistance in *Myzus persicae* using allelic discriminating quantitative PCR. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34: 869-875.
- Anthony N, Unruh T, Ganser D, ffrench-Constant R.1998.** Duplication of the Rdl GABA receptor subunit gene in an insecticide-resistant aphid, *Myzus persicae*. *Molecular and General Genetics*, 260(2-3):165-75.
- Aris-Brosou, S. & Excoffier, L. 1996.** The impact of population expansion and mutation rate heterogeneity on DNA sequence polymorphism. *Molecular Biology and Evolution*, 13: 494–504.
- Ashburner, M., Hoy, M. A. & Peloquin, J. J. 1998.** Prospects for the genetic transformation of arthropods. *Insect Molecular Biology* 7, 201–213.
- Avise, J.C., J. Arnold, R.M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J.E. Neigel, C.A. Reeb and N.C. Saunders, 1987.** Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics, *Annual Review of Ecological Systems*, 18: 489–522.
- Baxter, G.D., Barker, S.C., 1998.** Acetylcholinesterase cDNA of the cattle tick, *Boophilus microplus*: characterization and role in organophosphate resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28, 581–589.
- Birch L.C. 1948.** The intrinsic rate of natural increase of an insect population. *Journal of Animal Ecology*, 17: 15 - 26.
- Bizzaro D., Mazzoni, E. Barbolini, E. Giannini, S. Cassanelli, S. Pavesi, F. Cravedi, P. Manicardi, G.C., 2005.** Relationship among expression, amplification, and methylation of FE4 esterase genes in Italian populations of *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae), *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 81: 51–58.
- Blackman, R.L. 1971.** Variation in the photoperiodic response within natural populations of *Myzus persicae* (Sulzer). *Bulletin of Entomological Research*, 60, 533-546.

- Blackman, R. L. 1974.** Life cycle variation of *Myzus persicae* (Sulz.) (Hom., Aphididae) in different parts of the world, in relation to genotype and environment. *Bulletin of Entomological Research*, 63: 595-607.
- Blackman, R. L. 1980.** Chromosomes and parthenogenesis in aphids. pp. 133-148. *In*: Blackman, R. L., Hewitt, G. M. & Ashburner M. (Eds), *Insect Cytogenetics*. 10th Symposium of the Royal Entomological Society of London, Blackwell, Oxford.
- Blackman, R. L. 1987.** Morphological discrimination of a tobacco-feeding form from *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae), and a key to New World *Myzus* (*Nectarosiphon*) species. *Bulletin of Entomological Research*, 77: 713–730.
- Blackman, R.L. 1988.** Rearing and Handling Aphids. *In* : A.K. Minks and P. Harrewijn (Editors). *World Crop Pests*, 2B. Aphids, Their Biology, Natural Enemies and Control. Volume B. Elsevier. pp 59-68.
- Blackman RL, Eastop VF 1984.** *Aphids on the World's Crops: an identification and information guide*. John Wiley and Sons: Chichester.
- Blackman, R. L. & Eastop, V. F. 2000.** *Aphids of the World's Crops: An Identification and Information Guide*. Second edition. John Wiley & Sons Publications, London.
- Blackman, R. L. & V. F. Eastop. 2006.** *Aphids on the World's Herbaceous Plants and Shrubs*. Two volumens. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, U.S.A. 1024 pp.
- Blackman, R. L. & V.F. Eastop. 2007.** Taxonomic issues. H.F. van Emden and R. Harrington (eds.). *Aphids as crop pests*. CABI Publishing, Wallingford, UK. 716 pp.
- Blackman RL, Malarky G, Margaritopoulos JT and Tsitsipis JA, 2007.** Distribution of common genotypes of *Myzus persicae* in Greece, in relation to life cycle and host plant. *Bulletin of Entomological Research*, 97:253–263.
- Blackman, R. L Spence J. M, Field L. M. & Devonshire, A.L. 1995.** Chromosomal location of the amplified esterase genes conferring resistance to insecticides in *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Heredity*, 75, 297-302.
- Blackman, R. L., J. M. Spence, L. M. Field, N. Javed, G. J. Devine & Devonshire, A. L. 1996.** Inheritance of the amplified esterase genes responsible for insecticide resistance in *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Heredity*, 77: 154-167.
- Blackman, R. L., J. M. Spence, L. M. Field & Devonshire, A. L. 1999.** Variation in the chromosomal distribution of amplified esterase (*FE4*) genes in Greek field populations of *Myzus persicae* (Sulzer). *Heredity*, 82: 180-186.
- Bonner, J. T. 1988.** *The Evolution of Complexity by Means of Natural Selection*. Princeton: Princeton University Press. 272pp.

- Booth, R.G., 1997.** A review of the species of *Calvia* (Coleoptera: Coccinellidae) from the Indian subcontinent, with descriptions of two new species. *Journal of Natural History*, 31: 917-934.
- Börner, C. 1939.** Anfälligkeit, Resistenz und Immunität der Reben gegen Reblaus. Allgemeine Gesichtspunkte zur Frage der Spezialisierung von Parasiten; die harmonische Beschränkung des Lebensraums. *Zeitschrift für Hygiene Zoologie Schädlingsbekämpfung*, 31: 274-258.
- Brain, C.K. 1942.** The tobacco aphid. *Rhodesia Agricultural Journal*, 39: 241–243.
- O'Brien, P.J., Y.A. Abdel-Aal, J.A. Ottea and J.B. Graves 1992.** Relationship of insecticide resistance to carboxyl-esterases in *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) from mid-south cotton. *Journal of Economic Entomology*, 85: 651-657.
- Brower, A.V.Z. 1996.** Parallel race formation and the evolution of mimicry in *Heliconius* butterflies: a phylogenetic hypothesis from mitochondrial DNA sequences. *Evolution*, 50:195-221.
- Brower, A.V.Z., DeSalle, R., 1998.** Patterns of mitochondrial versus nuclear DNA sequence divergence among nymphalid butterflies: the utility of wingless as a source of characters for phylogenetic inference. *Insect Molecular Biology*, 7: 73–82.
- Brun, J. & Ipert, G. 1978.** Influence de l'alimentation sur la fécondité des coccinelles aphidiphages. *Annales de Zoologie Ecologie Animale*, 10: 449–452.
- Brochier, L., Pontie, Y., Willson, M., Estrada-Mondaca, S., Czaplicki, J., Kläbe, A. and Fournier, D. 2001.** Involvement of deacylation in activation of substrate hydrolysis by *Drosophila* acetylcholinesterase, *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 18296–18302.
- Brogdon, W.G. 1989.** Biochemical resistance detection: an alternative to bioassay. *Parasitology Today*, 5: 56-60.
- Brogdon, W.G. & Barber A.M. 1990.** Microplate assay of glutathione S-transferase activity for resistance detection in single-mosquito homogenates. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 96: 339-42.
- Brogdon, W.G. & McAllister, J.C. 1997.** Heme peroxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 13: 233-7.
- Brun, J. and G. Ipert, 1978.** Influence de l'alimentation sur la fécondité des coccinellides. aphidiphages. *Annales de Zoologie – Ecologie Animale*, 10: 449-452.
- Butt, F.H. 1951.** Feeding habitats and mechanism of the Mexican bean beetle. *Cornell University Agricultural Experimental Station Memories* 306, 32 pp., Ithaca, New York.

- Bwye, A.M., Proudlove, W., Berlandier, F.A. and Jones, R.A.C. (1997).** Effects of applying insecticides to control aphid vectors and cucumber mosaic virus in narrow leafed lupins (*Lupinus angustifolius*). Australian Journal of Experimental Agriculture, 37: 93–102.
- Cahill M, Gorman K, Day S, Denholm I, Elbert A and Nauen R, 1996.** Baseline determination and detection of resistance to imidacloprid in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). Bulletin of Entomological Research, 86: 343–349.
- Carver M, 1987.** Biological control of aphids, in *Aphids: Their Biology, Natural Enemies and Control*, Vol. A, ed. by MinksAK and Harrewijn P. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 141–166.
- Cassanelli, S., Cerchari, B., Giannini, S., Bizzaro, D., Mazzoni, E., Manicardi, C., 2005.** Use of the RFLP-PCR diagnostic test for characterizing MACE and *kdr* insecticide resistance in the peach potato aphid *Myzus persicae*. Pest Management Science, 61: 91-96.
- Chapco W, Litzengerger C, Kuperus WR. 2001.** A molecular biogeographic analysis of the relationship between North American melanoploid grasshoppers and their Eurasian and South American relatives. Molecular Phylogenetics and Evolution, 18: 460–466.
- Clements, K.M., Sorenson, C.E., Wiegmann, B.M., Neese, P.A. and Roe, R.M. 2000a.** Genetic, biochemical and behavioral uniformity among populations of *Myzus nicotianae* and *Myzus persicae*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 95: 269–281.
- Clements, K.M., Wiegmann, B.M., Sorenson, C.E., Smith, C.F., Neese, P.A. and Roe, R.M. 2000b.** Genetic variation in the *Myzus persicae* complex (Homoptera: Aphididae): evidence for a single species. Annals of the Entomological Society of America, 93: 31–46.
- Cox, D., Denholm, I. & Devonshire, A. 2004.** Monitoring of insecticide resistance in *Myzus persicae* from Greece. pp. 275-280 in Simon, J.-C., Dedryver, C.A., Risper, C. & Hullé, M. (Eds.) *Aphids in a new millennium*. INRA Editions, Paris.
- Croft BA and Brown AWA, 1975.** Responses of arthropod natural enemies to insecticides. Annual Review of Entomology, 20: 285-335.
- Crowson R.A., 1981.** The Biology of the Coleoptera. - Academic Press, London. pp. 694-698.
- Crozier, R. H., and Y. C. Crozier. 1993.** The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. Genetics, 113: 97-117.
- Davis, J.I. and K.C. Nixon. 1992.** Populations, genetic variation, and the delimitation of phylogenetic species. Systematic Biology, 41: 421-435.
- DeBach, P. & Rosen, D. 1991.** Biological Control by Natural Enemies, 2nd ed., Cambridge University Press, Cambridge, 440pp.

- Delucci D., 1954.** *Pullus impexus* (Muls.) (Coleoptera, Coccinellidae), a predator of *Adelges piceae* (Ratz.) (Hemiptera, Adelgidae), with notes on its parasites. *Bulletin of Entomological Research*, 45: 243-278.
- Denholm, I., Cahill, M., Dennehy, T.J. and A.R. Horowitz. 1998.** Challenges with managing insecticide resistance in agricultural pests, exemplified by the whitefly, *Bemisia tabaci*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London series B*, 353: 1757-1767.
- Denholm, I. & Devine, G. 2001.** Insecticide resistance. In: *Encyclopedia of Biodiversity* (Ed. by S.A.Levin), pp. 465-477. San Diego: Academic Press.
- Denholm, I. & Jespersen, J. B. 1998.** Insecticide resistance management in Europe: recent developments and prospects. *Pesticide Science*, 52: 153-159.
- Devonshire, A., Field, L. M., Foster, S. P., Moores, G. D., Williamson, M. S. & Blackman, R. L. 1998.** The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London series B*, 353: 1677-1684.
- Devonshire, A.L. and Moores G. D. 1982.** A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 18: 235-246.
- Devonshire, A.L., Moores, G.D., French-Constant, R.H., 1986.** Detection of insecticide resistance by immunological estimation of carboxylesterase activity in *Myzus persicae* (Sulzer) and cross reaction of the antiserum with *Phorodon humuli* (Schrank) (Hemiptera, Aphididae). *Bulletin of Entomological Research*, 76: 97-107.
- Devonshire, A. L., Devine, G. J. & Moores, G. D. 1992.** Comparison of microplate esterase assays and immunoassay for identifying insecticide resistant variants of *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research*, 82: 459-463.
- Devine, G.J., Harling, Z.K., Scarr, A.W. & Devonshire, A.L. 1996.** Resistance to lethal and sublethal effects of imidacloprid in nicotine tolerant *Myzus nicotianae* and *Myzus persicae*. *Pesticide Science*, 48: 57-62.
- De Wilde, J. 1970.** Hormones and insect diapause. In *Hormones and the Environment* (ed. G. K. Benson and J. G. Phillips, *Memories of the Society for Endocrinology*), no. 18, pp. 487-514. Cambridge University Press.
- Dixon A.F.G. 1959.** An experimental study of the searching behaviour of the predator coccinellid beetle *Adalia decempunctata* L.. *Journal of Applied Ecology*, 28: 259-281.
- Dixon, A. F. G. 1966.** The effect of the population density and nutritive status of the host on the summer reproductive activity of the sycamore aphid, *Drepanosiphum platanooides* (Suchr.). *Journal of Animal Ecology* 35: 105-112.
- Dixon, A.F.G. 1973.** *Biology of Aphids*. London: Edward Arnold 58 pp

- Dixon, A. F. G. 1998.** *Aphid Ecology*. Second Edition. Chapman and Hall, London, U.K.
- Dixon, A. F. G. 2000.** *Insect Predator-prey Dynamics Ladybird Beetles and Biological Control*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, pp 268.
- Dixon, A.F.G. & Kundu, R. 1994.** Ecology of host alternation in aphids. *European Journal of Entomology*, 91: 63-70.
- Dixon A.F.G. & Wrattens .D. 1971:** Laboratory studies on aggregation, size and fecundity in the black bean aphid, *Aphis fabae* Scop. *Bulletin of Entomological Research*, 61: 97-111.
- Eastop, V.F. and Blackman, R.L. 2005.** Some new synonyms in Aphididae. *Zootaxa*, 1089: 1–36.
- Edelson J, Duthie J. and Roberts W., 2002.** Toxicity of biorational insecticides: activity against the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Pest Management Science*, 58: 255–260.
- Ehler, L. E., Sforza, R. & Mateille, T. 2004.** *Genetics, Evolution, and Biological Control* CABI, New York, 288 pp
- El Habi, M., A. Sekkat, L. El Jadd and A. Boumezzough, 2000.** Biologie d' *Hippodamia variegata* Goeze (Coleoptera, Coccinellidae) et possibilité's de son utilisation contre *Aphis gossypii* Glov (Homoptera: Aphididae) sous serres de concombre. *Journal of Applied Entomology*, 124: 365–374.
- El Hag, E.T.A. & A.A. Zaitoon. 1996.** Biological parameters for four Coccinellid species in Central Saudi Arabia. *Biological Control*, 7: 316-319.
- Elbert A, and Nauen R., 2000.** Resistance of *Bemisia* spp. (Homoptera: Aleyrodidae) to insecticides in Southern Spain with special reference to neonicotinoids. *Pesticide Science*, 56: 60–64.
- Eleftherianos, I.G., Williamson, M.S., Foster, S.P. & Denholm, I. 2002.** Behavioural consequences of pyrethroid resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Brighton Crop Protection Conference-Pests and Diseases*, 1: 745-749.
- Eleftherianos, I., Foster, S.P., Williamson, M.S. & Denholm, I. 2008** Characterization of the M918T sodium channel gene mutation associated with strong resistance to pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Bulletin of Entomological Research*, 98: 183–191.
- Eskanderi, F., Sylvester, E.S. and Richardson, J. 1979.** Evidence for lack of propagation of potato leaf roll virus in *Myzus persicae*. *Phytopathology*, 68: 45–47.
- Elliott H.J. & de Littke D.W. 1980.** Laboratory studies on predation of *Chrysophtharta bimaculata* (Olivier) (Coleoptera: Chrysomelidae) eggs by the coccinellids *Cleobara mellyi* Mulsant and *Harmonia conformis* (Boisduval). *General & Applied Entomology*, 12: 33–36.
- Fabry, S., A. Kohler, and A. W. Coleman. 1999.** Intraspecies analysis: comparison on ITS sequence data and gene intron sequence data with

- breeding data for a worldwide collection of *Gonium pectorale*. *Journal of Molecular Evolution*, 48: 94–101.
- FAO 1979.** Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides; Method for adult aphids-FAO method No 17. *FAO Plant Protection Bulletin*, 27: 29-32.
- Farnham, A.W. & Khambay, B.P.S. 1995a.** The pyrethrins and related compounds. Part XXXIX - Structure activity relationships of pyrethroidal esters with cyclic side chains in the alcohol component against resistant strains of house fly (*Musca domestica*). *Pesticide Science*, 44: 269-275.
- Farnham, A.W. & Khambay, B.P.S. 1995b.** The pyrethrins and related compounds. Part XL - Structure activity relationships of pyrethroidal esters with acyclic side chains in the alcohol component against resistant strains of house fly (*Musca domestica*). *Pesticide Science*, 44: 277-281
- Fenton, B., Malloch, G., Woodford, J.A.T., Foster, S.P., Anstead, J., Denholm, I., King, L. & Pickup, J. 2005.** The attack of the clones: tracking the movement of insecticide resistant peach-potato aphids, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research*, 95: 483-494.
- Fenton, B., Woodford, J.A.T. and Malloch, G. 1998.** Analysis of clonal diversity of the peach–potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer), in Scotland, UK and evidence for the existence of a predominant clone. *Molecular Ecology*, 7: 1475–1487.
- Fereres, A. & Collar, J.L. 2001.** Analysis of noncirculative transmission by electrical penetration graphs. In *Virus-Insect-Plant Interactions*. Edited by K. F. Harris, O. P. Smith & J. E. Duffus. San Diego, CA: Academic Press.
- Ferran, A. and M. M. Larroque 1977.** Study of host-predator relations: the consumption and utilization of an aphid, *Myzus persicae* Sulz., by different larval stages of the Coccinellidae *Semiadalia undecimnotata* Sch. (Coleoptera: Coccinellidae). *Annals Zoological Ecologies Animally* 9: 665–691.
- Ferran, A., Cruz de Boelpepe, M.O. Buscarlet, L.A. Larroque M.M. and Schanderl, H. 1984.** Les relations trophiques entre les larves de la coccinelle *Semiadalia undecimnotata* Schn. et le puceron *Myzus persicae* Sulz.: généralisation à d'autres couples proie-prédateur et influence des conditions d'élevage de l'auxiliaire. *Oecologia*, 5: 85–97.
- Field, L. M., Anderson, A. P., Denholm, I., Foster, S.P., Harling, Z.K., Javed, N., Martinez-Torres, D., Moores, G.D., Williamson, M.S., Devonshire, A.L., 1997.** Use of biochemical and DNA diagnostics for characterising multiple mechanisms of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* Sulzer. *Pesticide Science*, 51: 283-289.
- Field, L. & Blackman, R. 2003.** Insecticide resistance in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer): chromosome location and epigenetic effects on esterase gene expression in clonal lineages. *Biological Journal of the Linnean Society*, 79: 107–113.

- Field, L.M., Blackman, R.L., Tyler-Smith, C., Devonshire, A.L., 1999.** Relationship between amount of esterase and gene copy number in insecticide-resistant *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochemical Journal*, 339, 737–742.
- Field, L. M., Crick, S.E. & Devonshire, A. L. 1996a.** Polymerase chain reaction-based identification of insecticide resistance genes and DNA methylation in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Insect Molecular Biology*, 5: 197-202
- Field, L.M. and Devonshire, A.L. 1997.** Structure and organisation of amplicons containing the E4 esterase genes responsible for insecticide resistance in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochemical Journal*, 322. 867-871.
- Field, L. M. & Devonshire, A. L. 1998.** Evidence that the E4 and FE4 esterase genes responsible for insecticide resistance in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer) are part of a gene family. *Biochemical Journal*, 330: 169-173.
- Field LM, Devonshire AL, Tyler-Smith C. 1996b.** Analysis of amplicons containing the esterase genes responsible for insecticide resistance in the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochemical Journal*, 313: 543–547.
- Field L and Foster SP, 2002.** Amplified esterase genes and their relationship with other insecticide resistance mechanisms in English field populations of the aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Pest Management Science*, 58: 889–894.
- Field, L.M., Javed, N., Stribley, M.F. and Devonshire, A.L. 1994.** The peach–potato aphid, *Myzus persicae*, and the tobacco aphid, *M. nicotianae*, have the same esterase-based mechanism of insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*, 3: 143–148.
- Field LM, Williamson MS, Moores GD, Devonshire AL. 1993.** Cloning and analysis of the esterase genes conferring insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochemical Journal*, 294: 569–574.
- Flint, M.L. & Dreistadt, S.H. 1998.** *Natural enemies' handbook: the illustrated guide to biological pest control*. California, University of California Press.
- Foster, S.P., Denholm, I., Harling, Z.K., Moores, G.D., Devonshire, A.L., 1998.** Intensification of insecticide resistance in UK field populations of the peach–potato aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) in 1996. *Bulletin of Entomological Research*, 88: 127–130.
- Foster, S. P., Denholm, I., and A. L. Devonshire 2000.** The ups and downs of insecticide resistance in peach – potato aphids (*Myzus persicae*) in the UK. *Crop Protection*, 19: 873–879.
- Foster S, Harrington R, Devonshire AL, Denholm I, Devine GJ, Kenward MG Bale JG, 1996.** Comparative survival of insecticide- susceptible and resistant peach–potato aphids, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera:

- Aphididae), in low temperature field trials. *Bulletin of Entomological Research*, 86: 17–27.
- Foster, S. P., Harrington, R., Devonshire, A. L., Denholm, I., Clark, S. J., and M. A. Mugglestone 1997.** Evidence for a possible fitness trade off between insecticide resistance and the low temperature movement that is essential for survival of UK populations of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research* 87: 573–579.
- Foster SP, Harrington R, Dewar AM, Denholm I and Devonshire AL, 2002.** Temporal and spatial dynamics of insecticide resistance in *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Pest Management Science*, 58: 895–907.
- Foster, S. P., Denholm, I. & Thompson, R. 2003.** Variation in response to neonicotinoid insecticides in peach-potato aphids, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Pest Management Science*, 59: 166–173.
- Foster SP and Devonshire AL, 1999.** Field-simulator study of insecticide resistance by esterase-, MACE-, and kdr-based mechanisms in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Pesticide Science*, 55: 810–814.
- Foster SP, Woodcock CM, Williamson MS, Devonshire AL, Denholm I, Thompson R., 1999.** Reduced alarm response by peach-potato aphids, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae), with knock-down resistance to insecticides (kdr) may impose a fitness cost through increased vulnerability to natural enemies. *Bulletin of Entomological Research*, 89: 133–138.
- Fournier, D., Bride, J.M., Hoffmann, F. and Karch, F. 1992.** Acetylcholinesterase. Two types of modifications confer resistance to insecticide. *The Journal of biological chemistry*, 267: 14270–14274.
- Fournier, D. and Mutero, A. 1994.** Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. *Comparative biochemistry and physiology*, 108C: 19–31.
- Francis, F. Haubruge, E. Gaspar, Ch. 2000.** Influence of host plants on specialist/generalist aphids and on the development of *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *European Journal of Entomology*, 97: 481–483.
- Francis F. Haubruge E. Hastir P. Gaspar C. 2001.** Effect of aphid host plant on development and reproduction of the third trophic level, the predator *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Environmental Entomology*, 30(5): 947–952.
- Frazer, B.D. 1988.** Coccinellidae. pp 231-247 in A.K. Minks and P. Harrewijn (Eds) *World Crop Pests, 2B. Aphids, Their Biology, Natural Enemies and Control. Volume B.* Elsevier.
- Fry, A.J., Zink, R.M., 1998.** Geographic analysis of nucleotide diversity and song sparrow (Aves: Emberizidae) population history. *Molecular Ecology*, 7: 1303–1313.
- Fuentes-Contreras, E., Figueroa, C. C., Reyes, M., Briones, L. M. & Niemeyer, H. M. 2004.** Genetic diversity and insecticide resistance of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) populations from tobacco in Chile:

- evidence of a single predominant clone, *Bulletin of Entomological Research*, 94: 11-18.
- Gasparich, G.E., Silva, J.G., Han, H.Y., McPheron, B.A., Steck, G.J. & Sheppard, W.S. 1997.** Population genetic structure of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) and implications for worldwide colonisation patterns. *Annals of the Entomological Society of America*, 90: 790–797.
- Georgieva, I.D. 1998.** Possible relation between tobacco resistance to aphids (*Myzus nicotianae* Blackman) and phenolic compounds in glandular trichomes and leaf epidermis. *Annales du Tabac (Section 2)* 30: 3–9.
- Georghiou, G.P., 1983.** Management of resistance in arthropods. In: Georghiou, G.P., Saito, T. (Eds.), *Pest Resistance to Pesticides*. Plenum, New York, pp. 769–792.
- Giles, K.L., Madden, R.D., Stockland, R., Payton, M.E. & Dillwith, J.W. 2002.** Host plants affect predator fitness via the nutritional value of herbivore prey: investigation of a plant-aphid-ladybeetle system. *BioControl*, 47: 1– 21.
- Gorman K, Devine D, Bennison J, Coussons P, Punchard N and Denholm I, 2007.** Report of resistance to the neonicotinoid insecticide imidacloprid in *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Pest Management Science*, 63: 555–558.
- Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., R.C. & Gelbart, W.M. 2002.** *An Introduction to Genetic Analysis*, 7th Edition, W.H. Freeman and Company, New York, pp. 626-627.
- Guillemaud, T., Brun, A., Anthony, N., Sauge, M.-L., Boll, R., Delorme, R., Fournier, D., Lapchin, L. and Vanlerberghe-Masutti, F. 2003.** Incidence of insecticide resistance alleles in sexually-reproducing populations of the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) from southern France. *Bulletin of Entomological Research*, 93, 289-297.
- Hagen, K.S. 1962.** Biology and ecology of predaceous Coccinellidae. *Annual Review of Entomology*, 7: 289-326.
- Hall, L.M. Spierer, P. 1986.** The Ace locus of *Drosophila melanogaster*: structural gene for acetylcholinesterase with an unusual 50 leader, *EMBO Journal*, 5: 2949–2954.
- Harel, M. Kryger, G. Rosenberry, T.L. Mallender, W.D. Lewis, T. Fletcher, R.J. Guss, J.M. Silman, I. Sussman, J.L. 2000.** Three dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors, *Protein Science*, 9: 1063–1072.
- Harpaz, I. 1958.** Bionomics of the 11-spotted ladybird beetle, *Coccinella undecimpunctata* L., in a subtropical climate. 10. *International Congress Entomology Montreal 1956*, 2: 657-659.
- Harris DJ, Crandall KA, 2000.** Intragenomic variation within ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes (Decapoda: Cambaridae): implications for phylogenetic and microsatellite studies. *Molecular Biology and Evolution*, 17:284–291

- Heie O.E. 1980.** From Ilharco F.A.& A. Van Harten 1987. Systematics. In: A.K. Minks and P. Harrewijn (Editors), *World Crop Pests, 2A. aphids, Their biology, Natural enemies and Control*. Vol. A. Elsevier, pp.51-57.
- Heimpel, G.E., Antolin, M.F., Franqui, R.A. & Strand, M.R. 1997.** Reproductive isolation and genetic variation between two 'Strains' of *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control*, 9: 149–156.
- Heinz, K. M. and F. G. Zalom. 1996.** Performance of the predator *Delphastus pusillus* on *Bemisia* resistant and susceptible tomato lines. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 81: 345-352.
- Hille, R. & Lambers, D. 1953.** Contribution to a monograph of the Aphididae of Europe. V. *Temminckia*, 9: 1-176.
- Hinrich Graf von der Schulenburg J., Hancock, J.M. Pagnamenta A., Sloggett, J.J. Majerus, M.E.N. & Hurst, G. D. D. 2001.** Extreme Length and Length Variation in the First Ribosomal Internal Transcribed Spacer of Ladybird Beetles (Coleoptera: Coccinellidae), *Molecular Biology and Evolution*, 18(4): 648–660.
- Hodek, I. 1960.** The influence of various aphid species as food for the ladybirds *Coccinella 7-punctata* L. and *Adalia bipunctata* L. *Symp. Orthogenetic Dev. of Insects*, Prague 1959. Academic Press, London & NY. p. 314-16.
- Hodek I. 1973.** *Biology of Coccinellidae*. Junk, The Hague.
- Hodek I. 1986.** Life cycle strategies, diapause and migration in aphidophagous Coccinellidae (minireview). In: *Ecology of Aphidophaga*, Hodek I. (Editor), Academia, Prague and Dr W. Junk, The Hague.
- Hodek, I. & Honek, A. 1996.** *Ecology of Coccinellidae*. London, Kluwer Academic Publishers.
- Honek, A. and F. Kocourek 1988.** Thermal requirements for development of aphidophagous Coccinellidae (Coleoptera), Chrysopidae, Hemerobiidae (Neuroptera), and Syrphidae (Diptera): some general trends. *Oecologia*, 76: 455–460.
- Hopper KR, 2003.** United States Department of Agriculture- Agricultural Research Service research on biological control of arthropods. *Pest Management Science*, 59: 643–653.
- Hosoda, A., H. Hama, K. Suzuki and S. Ando. 1992.** Insecticide resistance in cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae). I. Aliesterase activity and organophosphorus-susceptibility of populations on eggplants and cucumbers. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*, 36: 101-111 (in Japanese with English summary).
- Howland D.E. & Hewitt G.M. 1995.** Phylogeny of the Coleoptera based on mitochondrial cytochrome oxidase I sequence data. *Insect Molecular Biology*, 4: 203–215.
- Hundertmark, K.J., Shields, G.F., Udina, I.G., Bowyer, R.T., Danilkin, A.A., Schwartz, C.C., 2002.** Mitochondrial phylogeography of Moose

- (*Alces alces*): late Pleistocene divergence and population expansion. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 22: 375–387.
- Hutchison WD, Burkness EC, Pahl G and Hurley TM, 2004.** Integrating novel technologies for cabbage IPM in the USA: value of on-farm research. *Proc 4th Int Workshop on the Management of Diamondback Moth and Other Crucifer Pests*, 26–29 November 2001, University of Melbourne, Australia, pp. 371–379.
- Iperti, G. 1999.** Biodiversity of predaceous Coccinellidae in relation to bioindication and economic importance. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 74: 323-342.
- Istock, C. A. 1967.** The evolution of complex life history phenomena: an ecological perspective. *Evolution*, 21: 211-234.
- Jafari, S., Zadeh, J. H., Sendi, J. J., Hoseini, R. 2002.** Effect of temperature on biological factors of *Hippodamia variegata* (Col.: Coccinellidae) in laboratory conditions. *Journal of Entomological Society of Iran*, Vol. 22:(1) 13-28.
- Javed, N., Viner, R., Williamson, M.S., Field, L.M., Devonshire, A.L. and Moores, G.D. 2003.** Characterization of acetylcholinesterases, and their genes, from the hemipteran species *Myzus persicae* (Sulzer), *Aphis gossypii* (Glover), *Bemisia tabaci* (Gennadius) and *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood). *Insect Molecular Biology*, 12: 613–620.
- de Jong, J.K. 1929.** *Enkele resultaten van het onderzoek naar de biologie van der tabaksluis, Myzus persicae Sulzer*. Bulletin Deli van het Proefstation te Medan, no. 28: 36 pp.
- Johnson MW and Tabashnik BT, 1999.** Enhanced biological control through pesticide selectivity, in *Handbook of Biological control*, ed. by Bellows TS and Fisher TW. Academic, San Diego, CA, pp. 297–317.
- Jones, M. G. 1942.** A description of *Aphis (Doralis) rumicis*, L. and comparison with *Aphis (Doralis) fabae*, Scop. *Bulletin of Entomological Research*, 33: 5-20.
- Kalushkov, P. 1998.** Ten aphid species (Sternorrhyncha: Aphididae) as prey for *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *European Journal of Entomology*, 95(3): 343-349.
- Kanavaki O. M., Margaritopoulos J. T., Katis N. I., Skouras P., Tsitsipis J. A., 2006.** Transmission of Potato virus Y in tobacco plants by *Myzus persicae nicotianae* and *M. persicae* s.str. *Plant Disease*, 90: 777-782.
- Karagounis C, Kourdoumbalos AK, Margaritopoulos JT, Nanos GD and Tsitsipis JA, 2006.** Organic farming-compatible insecticides against the aphid *Myzus persicae* (Sulzer) in peach orchards. *Journal of Applied Entomology*, 130:150–154.
- Katis, N., Chryssochoou, A. & Woods, R. 1993.** Tobacco viruses in Greece. in Abstract volume of Coresta Congress, Spain, p. 159.
- Katsarou, I., Margaritopoulos, J.T., Tsitsipis, J.A., Perdikis, D.Ch. & Zarpas, K.D. 2005.** Effect of temperature on development, growth and

- feeding of *Coccinella septempunctata* and *Hippodamia convergens* reared on the tobacco aphid, *Myzus persicae nicotianae*. *BioControl*, 50: 565-588.
- Katsoyannos P. 1976.** Étude d' un prédateur; *Exochomus quadripustulatus* L. (Coleoptera:Coccinellidae) en vue d' une eventuelle utilization contre: *Saissetia oleae* (Homoptera:Coccoidea-Coccidae) dans les oliveraies de la Grece. These Docteur d' Ingenieur de l' Universite des Sciences Et Technique du Languedoc, Montpellier, France, 144pp.
- Katsoyannos P., Kontodimas D.C. & Stathas G.J. 1997a:** Phenology of *Hippodamia undecimnotata* (Col.: Coccinellidae) in Greece. *Entomophaga*, 42: 283–293.
- Katsoyannos P., Stathas G.J., & Kontodimas D.C. 1997b.** Phenology of *Coccinella septempunctata* Linnaeus (Coleoptera:Coccinellidae) in Greece. *Entomophaga*, 42: 435-444.
- Kavallieratos, N. G., Athanassiou, C. G., Stathas, G. J. & Tomanovic, Ž. 2002.** Aphid parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) on citrus: seasonal abundance, association with the species of host plant and sampling indices. *Phytoparasitica*, 30: 365–377.
- Kavallieratos, N. G., Athanassiou, C. G., Tomanovic Ž., Papadopoulos G.D. & Vayias B.J. 2004.** Seasonal abundance and effect of predators (Coleoptera: Coccinellidae) and parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) on *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphidoidea) densities on tobacco: a two-year study from Central Greece. *Biologia*, 59: 613–619.
- Kennedy, J.S., Day, M.F. & Eastop V.F. 1962.** A Conspectus of Aphids as Vectors of Plant Viruses. Commonwealth Institute of Entomology, London, 114pp.
- Kesten, U. 1969.** Zur Morphologie und Biologie von *Anatis ocellata* (L.) (Coleoptera, Coccinelladae). *Zeitschrift für angewandte Entomologie*, 63: 412-445.
- Kontodimas D.C. & Stathas G.J. 2005.** Phenology, fecundity and life table parameters of the predator *Hippodamia variegata* reared on *Dysaphis crataegi*. *BioControl*, 50: 223–233
- Kozaki, T. Shono, T. Tomita, T. Kono, Y. 2001.** Fenitroxon insensitive acetylcholinesterases of the housefly, *Musca domestica* associated with point mutations, *Insect biochemistry and molecular biology*, 10: 991– 997.
- Kruse, J. J. & F. A. H. Sperling 2001.** Molecular phylogeny within and between species of the *Archips argyrospila* complex (Lepidoptera: Tortricidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 94(2): 166–173.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004.** MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5, 150–163.
- Kundu, R. & Dixon, A. F. G. 1995.** Evolution of complex life cycles. *Journal of Animal Ecology*, 64: 245-255.

- Labrie, G., Lucas, E. & Coderre, D. 2006.** Can developmental and behavioral characteristics of the multicolored Asian lady beetle *Harmonia axyridis* explain its invasive success? *Biological Invasions*, 8: 743–754.
- Lanzoni, A., Accinelli, G. Bazzocchi, G.G. and Burgio G. 2004.** Biological traits and life table of the exotic *Harmonia axyridis* compared with *Hippodamia variegata*, and *Adalia bipunctata* (Col., Coccinellidae). *Journal of Applied Entomology*, 128: 298-306.
- Lees, A. D. 1966.** The Control of polymorphism in aphids. *Advances Insect Physiology*, 3: 207-277.
- Liu ZW, Williamson MS, Lansdell SJ, Denholm I, Han ZJ and Millar NS, 2005.** A nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (brown planthopper). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 102: 8420–8425.
- Loxdale, H.D. & Lushai, G. 1998.** Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research*, 88: 577-600.
- Mackenzie, A & Dixon, A. F. G. 1990.** Host alternation in aphids: constraint versus optimization. *American Naturalist*, 136: 132-134.
- Majerus M.& P. Kearns 1989.** *Ladybirds*. The Richmond Publishing Co. Ltd Great Britain.
- Margaritopoulos, J. T., R. L. Blackman, J. A. Tsitsipis and L. Sannino 2003.** Coexistence of different host-adapted forms of *Myzus persicae* in the region of Caserta in South Italy. *Bulletin of Entomological Research*, 93: 131–135.
- Margaritopoulos, J.T., Gotosopoulos, B., Mamuris, Z., Skouras, P.J., Voudouris, K.C., Bacandritsos, N., Fantinou A.A., Tsitsipis J.A., 2007.** Genetic variation among Mediterranean populations of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) as revealed by RFLP mtDNA analysis. *Bulletin of Entomological Research*, 3: 299-308.
- Margaritopoulos, J.T., Mamuris, Z. and Tsitsipis, J.A. 1998.** Attempted discrimination of *Myzus persicae* (Sulzer) and *Myzus nicotianae* Blackman (Homoptera: Aphididae) by Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction technique. *Annals of the Entomological Society of America*, 91: 602–607.
- Margaritopoulos, J.T., Skouras, P.J., Nikoloaidou, P., Manolikaki, J., Maritsa, K., Tsamadani, K., Kanavaki, O.M., Bacandritsos, N., Zarpas, K.D. and Tsitsipis, J.A., 2007.** Insecticide resistance status of *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) populations from peach and tobacco in mainland Greece. *Pest Management Science*, 63(8): 821-829.
- Margaritopoulos, J.T., Tsitsipis, J.A., Goundoudaki, S. & Blackman, R.L. 2002.** Life cycle variation of *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) in Greece. *Bulletin of Entomological Research*, 92: 309-320.

- Margaritopoulos, J.T., Tsitsipis, J.A., Zintzaras, E. and Blackman, R.L. 2000.** Host-correlated morphological variation of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) populations in Greece. *Bulletin of Entomological Research*, 90: 233–244.
- Martinez-Torres D, Foster SP, Field LM, Devonshire AL and Williamson MS,. 1999.** A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Insect Molecular Biology*, 8: 339–346.
- Mazzoni, E., Cravedi, P., 2002.** Analysis of insecticide-resistant *Myzus persicae* (Sulzer) populations collected in Italian peach orchards. *Pest Management Science* 58: 975–980.
- McCaffery, A. & Nauen R. 2006.** The Insecticide Resistance Action Committee (IRAC): Public responsibility and enlightened industrial self-interest. *Outlooks on Pest Management*, February 2006: 11-14.
- Meyer A. 1993.** Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Vol. 2 (Eds P.W. Mochachka, & T.P. Mommsen), pp. 1-38. Elsevier, Amsterdam.
- Miler, B. R., M. B. Cratree, and H. M. Savage. 1996.** Phylogeny of fourteen *Culex* mosquito species, including the *Culex pipiens* complex, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Insect Molecular Biology*, 5: 93–107.
- Miller, J.C. 1983.** Ecological relationships among parasites and the practice of biological control. *Environmental Entomology*, 12 : 620-624.
- Miller, J.C. 1992.** Temperature – dependent development of the convergent lady beetle (Coleoptera : Coccinellidae). *Environmental Entomology*, 21: 197-201.
- Mills, N J. 1982.** Voracity, cannibalism and coccinellid predation. *Annals of Applied Biology*, 101: 144–148.
- Mistic and Clark, 1979.** W.J. Mistic, Jr. and G.B. Clark, Green peach aphid injury to flue-cured tobacco leaves. *Tobacco Science*, 23: 23–24.
- Móller, F.P. 1958.** Bionomische Rassen der grünen Pfirsichblattlaus *Myzus persicae* (Sulz.). *Archiv der Freunde der NaturGeschichte in Mecklenberg*, 4: 200–233.
- Moore, G. D., Devine, G. J. & Devonshire, A. L., 1994a.** Insecticide-insensitive acetylcholinesterase can enhance esterase-based resistance in *Myzus persicae* and *Myzus nicotianae*. *Pesticides Biochemical Physiology*, 49: 114-20.
- Moore, G. D., Devine, G. J. & Devonshire, A.L. 1994b.** Insecticide resistance due to insensitive acetylcholinesterase in *Myzus persicae* and *Myzus nicotianae*. pp. 413-418. *In Brighton Crop Protection Conference: Pests and Diseases*, Bracknell, UK, BCPC.

- Moran, N.A. 1983.** Seasonal shifts in host usage in *Uroleucon gravicorne* (Hemiptera: Aphididae) and implications for the evolution of host alternation in aphids. *Ecological Entomology*, 8: 371-382.
- Moran, N. A. 1988.** The evolution of host-plant alternation in aphids: evidence for specialisation as a dead end. *American Naturalist*, 132: 681-706
- Moran, N. A. 1990.** Aphid life cycles: two evolutionary steps. *American Naturalist*, 136: 135-138.
- Mordvilko, A. K. 1928.** The evolution of cycles and the origin of heteroecy (migrations) in plant-lice. *Annals and Magazine Natural History (Series 10)*, 2: 570-582.
- Moritz, C., Dowling T.E. & Brown. W.M. 1987.** Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecological Systems*, 18: 269-292.
- Müller, F. P. 1954.** Holozyklie und Anholozyklie bei der grünen Pfirsichblattlaus *Myzodes persicae* (Sulzer). *Zeitschrift für angewandte Entomologie*. 36: 369- 380.
- Müller, F. P. 1958.** Binomische Rassen der grünen Pfirsichblattlaus *Myzus persicae* (Sulzer). *Arch. Freunde NatGesch. Mecklenb.* 4: 200-233.
- Müller, F.P. 1986.** The role of subspecies in aphids for affairs of applied entomology. *Journal of Applied Entomology*, 101: 295–303.
- Mumford, J.D. & Knight, J.D. 1997.** Injury, damage and threshold concepts. pp. 203-220 in Dent, D.R. & Walton, M.P. (Eds) *Methods in ecological and Agricultural Entomology*. Wallingford, UK, CAB International
- Mutero, A., Pralavorio, M., Bride, J.M. and Fournier, D. 1994.** Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 91: 5922–5926.
- Nabeshima T, Kozaki T, Tomita T, Kono Y. 2003.** An amino acid substitution on the second acetylcholinesterase in the pirimicarb-resistant strains of the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Biochemical and biophysical research communications*, 307:15-22
- Naranjo, S.E., Gibson, R.L. & D.D. Walgenbach. 1990.** Development, survival, and reproduction of *Scymnus frontalis* (Coleoptera: Coccinellidae), an imported predator of Russian wheat aphid, at four fluctuating temperatures. *Annals of the Entomological Society of America*, 83: 527-531.
- Nauen R and Denholm I, 2005.** Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: current status and future prospects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 58:200–215.
- Nauen, R. & Elbert, A. 1997.** Apparent tolerance of a field-collected strain of *Myzus nicotianae* to imidacloprid due to strong antifeeding responses, *Pesticide Science*, 49: 252-258.
- Nauen, R. & Elbert, A. 2003.** European monitoring of resistance to insecticides in *M. persicae* and *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) with

- special reference to imidacloprid. *Bulletin of Entomological Research*, 93: 47-54.
- Nauen, R., Strobel, J., Otsu, K., Tietjen, K., Erdelen, C. & Elbert, A. 1996.** Aphicidal activity of imidacloprid against a carbamate and organophosphate resistant Japanese strain of the tobacco feeding form of *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) closely related to *Myzus nicotianae*. *Bulletin of Entomological Research*, 86: 165-171.
- Nault L.R. 1997.** Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. *Annals of the Entomological Society of America* 90: 521 – 548.
- Nei, M. 1987.** *Molecular Evolutionary Genetics*. 512 pp. New York, Columbia University Press.
- Noda, I. 1959.** The emergence of winged viviparous female in aphid VII. On the rareness of the production of the winged offsprings from the mothers of the same form. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*, 3: 272-280.
- Obrycki, J.J. & Kring, T.J. 1998.** Predaceous Coccinellidae in biological control. *Annual Review of Entomology*, 43: 295-321.
- Obrycki, J.J. & M.J. Tauber. 1978.** Thermal requirements for development of *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae) and its parasite *Perilitus coccinellae* (Hymenoptera : Braconidae). *Canadian Entomologist*, 110: 404-412.
- Obrycki, J.J. & M.J. Tauber. 1981.** Phenology of three coccinellid species : thermal requirements for development. *Annals of the Entomological Society of America*, 74: 31-36.
- Omkar and S. Srivastava. 2003.** Influence of prey species on certain biological attributes of a ladybird beetle, *Coccinella septempunctata* Linnaeus. *BioControl*, 48: 379–393.
- Ono M, Swanson JJ, Field LM, Devonshire AL, Seigfried BD,. 1999.** Amplification and methylation of an esterase gene associated with insecticide-resistance in greenbugs, *Schizaphis graminum* (Rondani) (Homoptera: Aphididae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29: 1065–1073.
- Orr, C.J. & J.J. Obrycki. 1990.** Thermal and dietary requirements for development of *Hippodamia parenthesis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Environmental Entomology*, 19(5): 1523-1527.
- Palenko M. V., Mukha D. V., and I. A. Zakharov 2004.** Intraspecific and interspecific variation of the mitochondrial gene of cytochrome oxidase I in ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae). *Russian Journal of Genetics*, 40: 148-151.
- Palumbi, S.R., Martin, A., Romano, S., McMillan, W.O., Stice, L. & Grabowski, G. 1991.** *The simple tool's guide to PCR*. 46 pp. Honolulu, Hawaii, Department of Zoology, University of Hawaii.

- Perring TM, Gruenhagen NM and Farra CA, 1999.** Management of plant viral diseases through chemical control of insect vectors. *Annual Review of Entomology*, 44: 457–481.
- Phoofolo, M.W. and J.J. Obrycki, 1995.** Comparative life-history studies of Nearctic and Palearctic populations of *Coccinella septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Environmental Entomology*, 24: 581–587.
- Phoofolo, W. & J.J. Obrycki. 2000.** Demographic analysis of reproduction in Nearctic and Palearctic populations of *Coccinella septempunctata* and *Propylea quatuordecimpunctata*. *BioControl*, 45: 25-43.
- Ponsen, M.B. 1972.** The site of potato leafroll virus multiplication in its vector, *Myzus persicae*. An anatomical study. *Mededlingen Landbouwhogeschool Wageningen*, 72(16): 1–147.
- Pope, R.D. 1973.** The species of *Scymnus* (s.str.), *Scymnus* (Pullus) and *Nephus* (Coleoptera: Coccinellidae) occurring in the British Isles. *Entomologist's Monthly Magazine*, 109: 3-39.
- Pope, R. D. and J. F. Lawrence 1990.** A preliminary review of *Scymnodes* Blackburn (Coleoptera: Coccinellidae), with the description of a new Australian species and its larva. *Systematic Entomology*, 15: 241-252.
- Posada D, Crandall KA. 1998.** Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817–818
- Powers, T.O., Jensen, S.G., Kindler, S.D., Stryker, C.J. & Sandall, L.J. 1989.** Mitochondrial divergence among greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes. *Annals of the Entomological Society of America*, 82: 298–302.
- Price, P.W. 1997.** *Insect Ecology*. New York, John Wiley & Sons.
- Putman, W.L. 1955.** Bionomics of *Stethorus punctillum* Weise (Coleoptera: Coccinellidae) in Ontario. *Canadian Entomologist*, 86: 9-33.
- Rand D.M. 1996.** Neutrality tests of molecular markers and the connection between DNA polymorphism, demography, and conservation biology. *Conservation Biology*, 10: 665-671.
- Rauch N and Nauen R, 2003.** Identification of biochemical markers linked to neonicotinoid cross resistance in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Archives of Inset Biochemistry and Physiology*, 54: 165–176.
- Remaudière, G. & Remaudière., M. 1997.** *Catalogue of the World's Aphididae (Hemiptera, Aphidoidea)*. INRA, Paris.
- Reyes, M., Franck, P., Charmillot, P.J., Ioriatti, C., Olivares, J., Pasqualini, E. & Sauphanor, B. 2007.** Diversity of insecticide resistance mechanisms and spectrum in European populations of the Codling moth, *Cydia pomonella*. *Pest Management Science* 63: 890–902.
- Ripper WE, 1956.** Effect of pesticides on balance of arthropod populations. *Annual Review of Entomology*, 1: 403–438.
- Riudavets J. & Castañé C. 1998.** Identification and Evaluation of Native predators of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera:Thripidae) in the Mediteranean. *Environmental Entomology*, 27(1): 86-93.

- Robinson, A.G. 1951.** Annotated list of predators of tetranychid mites in Manitoba. Annual Report of the Entomological Society of Ontario, 82: 33-37.
- Roehrdanz, R.L. & Degrugillier M.E. 1998.** Long sections of mitochondrial DNA amplified from 14 orders of insects using conserved PCR primers. Annals of the Entomological Society of America, 91: 771–778.
- Rozas J., Sánchez-DelBarrio J.C., Messegyer X., Rozas R. 2003.** DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics, 19: 2496-2497.
- Saito, T. 1989.** Insecticide resistance of the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae). I. Susceptibility to several insecticides and esterase activity of field populations collected in Shizuoka prefecture. Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology, 33: 204-210 (in Japanese with English summary).
- Schulenberg, J. H. G. V. D., U. English, and J. W. Wägele. 1999.** Evolution of ITS1 rDNA in the *Digenea* (Platyhelminthes: Trematoda): 39 end sequence conservation and its phylogenetic utility. Journal of Molecular Evolution, 48: 2–12.
- Semtner, P.J., Reed, T.D., Barnes, M.L. and Wilkinson, W.B., III 1990.** Triazuron and other insecticides applied as foliar sprays for the control of the tobacco aphid on flue-cured tobacco. Tobacco Science, 34: 39–43.
- Shands, W.A., Simpson, G.W. and Wave, H.E. 1969.** *Canada Plum*, *Prunus nigra* Aiton, as a Primary Host of the Green Peach Aphid, *Myzus persicae* (Sulzer), in North-eastern Maine. Technical Bulletin of University of Maine 39, 32 pp.
- Shaposhnikov, G. C. 1951.** Evoljucija nekotorych grup teij v svyazi sz evoljuciej rozocvetnych (Evolution of some groups of aphids associated with the Rosaceae). Izdattel'stuo Akademii Nauk SSr, 1: 23-60.
- Shaposhnikov, G.C. 1956.** Filogeneticeskoe obosnovane sistemy korolkochvon stych teij (Anuraphidina) ucetom ich sujazej s rasteniami (The phylogenetic basis of the systematics of the sort-tailed aphids (Anuraphidina) with reference to their relationships with hosts). Trudy Zoologiceskogo Instituta Akademii Nauk SSSR, 23, 215-320.
- Shaposhnikov, G.C. 1987.** Evolution of aphids in relation to evolution of plants. pp. 409-414. In Minks, A. K. & Harrewijn, P. (Eds), *Aphids their Biology, Natural Enemies and Control* 2A. Elsevier, Amsterdam.
- Simon, S., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. & Flook, P. 1994.** Evolution, weighting, phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Annals of the Entomological Society of America, 87: 651–701.
- Slade, N. A. & Wassersung, R. J. 1975.** On the evolution of complex life cycles. Evolution, 29: 568-571.

- Smith, R.F. & Reynolds, H.T. 1966.** Principles, definitions and scope of integrated pest control. pp. 11-17 in *Proceedings of FAO Symposium on Integrated Pest Control*, Rome 1965.
- Stark JD, Jepson PC and Mayer DF, 1995.** Limitations to use of topical toxicity data for predictions of pesticide side effects in the field. *Journal of Economic Entomology*, 88: 1081-1088.
- Steichen, J. C. & Ffrench-Constant, R. H. 1994.** Amplification of specific cyclodiene insecticide resistance alleles by the polymerase chain reaction. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 48: 1-7.
- Stewart L A, Dixon AFG, Ruzicka Z, Iperti I 1991.** Clutch and egg size in ladybird beetles. *Entomophaga*, 36: 329 - 333.
- Stille, M, and Stille, B. 1993.** Intrapopulation nestclusters of maternal mtDNA lineages in the polygynous ant *Leptothorax acervorum* (Hymenoptera: Formicidae). *Insect Molecular Biology*, 1:117–121.
- Sudderuddin, K. I. 1973.** Studies of insecticide resistance in *Myzus persicae* (Sulz.) (Hem., Aphididae). *Bulletin of Entomological Research*, 62: 533-539.
- Sun Y, Feng G, Yuan J, Zhu P, Gong K. 1970.** Biochemical mechanism of resistance of cotton aphids to organophosphorus insecticides. *Acta Entomologica Sinica* 30:13–20.
- Sunnucks, P. & Hales, D.E. 1996.** Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). *Molecular Biology and Evolution*, 13: 510-524.
- Suzuki, K. and H. Hama., 1998.** Carboxylesterase of the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae). Isoelectric point variants in an organophosphorus insecticide resistant clone. *Applied Entomology and Zoology*, 33: 11-20.
- Swofford, D.L., 2000.** PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Szalanski, A. L., R. L. Roehrdanz, D. B. Taylor, and L. Chandler. 1999.** Genetic variation in geographical populations of western and Mexican corn rootworm. *Insect Molecular Biology*, 8: 519–525.
- Tajima, F. 1989.** Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585–595.
- Tajima, F. 1993.** Measurement of DNA polymorphism. pp. 37–59 in Takahata, N. & Clark, A.G. (Eds) *Mechanisms of molecular evolution. Introduction to molecular Paleopopulation Biology*. Tokyo, Sunderland, MA, Japan Scientific Societies Press, Sinauer Associates, Inc.
- Tajima, F. 1996.** The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites. *Genetics*, 143: 1457–1465.
- Takada, H. 1979.** Esterase variation in Japanese populations of *Myzus persicae* (Sulzer), with special reference to resistance to

- organophosphorus insecticides. *Applied Entomology and Zoology*, 14: 245–255.
- Takada, H. 1986.** Genotypic composition and insecticide resistance of Japanese populations of *Myzus persicae* (Sulzer) (Hom., Aphididae). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 102: 19–38.
- Toda, S., S. Komazaki, T. Tomita and Y. Kono 2004.** Two amino acid substitutions in acetylcholinesterase associated with pirimicarb and organophosphorus insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae). *Insect Molecular Biology*, 13: 549–553.
- Tomita, T. Hidoh, O. Kono, Y. 2000.** Absence of protein polymorphism attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 325–333.
- Tsitsipis, J.A. & T.E. Mittler. 1976.** Development, Growth, Reproduction and Survival of apterous virginoparae of *Aphis fabae* at different temperatures. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 19: 1-10.
- Tsitsipis, J. A., Lykouressis, D., Katis, N., Avgelis, A. D., Gargalianou, J., Papapanayotou, A. & Kokinis, G. M. 1998.** Aphid species diversity demonstrated by suction trap captures in different areas in Greece. pp. 495-501. In Nieto J.M. Nafria & Dixon, A. F. G. (Eds.), *Aphids in natural and managed ecosystems*. Universidad de León (Secretariado de publicaciones), León (Spain).
- Unruh, T. R. & Woolley, J. B. 1999.** in *Handbook of Biological Control* (eds Bellows, T. S. & Fisher, T. W. Academic Press, San Diego, California, 57–85 pp.
- Vandewoestijne S, Baguette M, Brakefield PM, Saccheri IJ. 2004.** Phylogeography of *Aglais urticae* (Lepidoptera) based on DNA sequences of the mitochondrial COI gene and control region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31: 630–646.
- Van Emden, H.F., Eastop, V.F., Hughes, R.D. & Way, M.J. 1969.** The ecology of *Myzus persicae*. *Annual Review of Entomology*, 14: 197-270.
- Vogler, A. P., and R. Desalle. 1994.** Evolution and phylogenetic information content of the ITS-1 region in the tiger beetle, *Cicindela dorsalis*. *Molecular Biology and Evolution*, 11: 393–405.
- Vökl W, Mackauer M, Pell JK, Brodeur J. 2007.** Predators, parasitoids and fungal pathogens. In: Harrington R, van Emden H (eds) *Aphids as Crop Pests*. CABI International, pp 187–233.
- Vontas J., Hejazi M. J., Hawkes N. J., Cosmidis, N., Loukas M. & Hemingway, J. 2002.** Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Insect Molecular Biology*, 11: 329-336.
- Waage, J.K. & Mills, N.J. 1992.** Biological control. pp 412-430 in Crawley, M. (Ed.) *Natural Enemies*. Oxford, Blackwell.

- Waldhauer, W. 1953.** Über Rassendifferenzierung im Formenkreis der Grünen Pfirsichblattlaus (*Myzodes persicae* Sulzer). NachrBl. dt. PflSchutzdienst, Berl. 7: 95-99.
- Waldhauer, W. 1957.** Untersuchungen an Klonen der Grünen Pfirsichblattlaus *Myzodes persicae* (Sulzer) zur Frage ihrer virginogenen Überwinterung. (Inaug. Diss.) 115 pp. Bonn, Pfirsichblattlaus (*Myzodes persicae* Sulzer) Rheinische Friedrich Wilhelms-Universität.
- Walsh, S.B., Dolden, T.A., Moores, G.D., Kristensen, M., Lewis, T., Devonshire, A.L. and Williamson, M.S. 2001.** Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. *Biochemical Journal*, 359: 175–181.
- Wang, E., Wang, R., deParasis, J., Loughrin, J.H., Gan, S. and Wagner, G.J. 2001.** Suppression of a P450 hydroxylase gene in plant trichome glands enhances natural-product-based aphid resistance. *Nature Biotechnology*, 19: 371–374.
- Watson M.A. Healy M.J.R. 1953.** The spread of beet yellows and beet mosaic viruses in the sugarbeet root crop II. The effect of aphid numbers on disease incidence. *Annals of Applied Biology*, 40: 38–59.
- Way, M. J. and C. J. Banks. 1968.** Population studies on the active stages of the black bean aphid, *Aphis fabae* Scop., on its winter host *Euonymus europaeus* L. *Annals of Applied Biology*, 62, 177-197.
- Williams IS, Dixon AFG. 2007.** Life cycles and polymorphism. In: *Aphids as Crop Pests*—van Emden H, Harrington R, eds. (2007) Wallingford (UK): CAB International. 69–86.
- Williams, I. S., Dewar, A. M. Dixon A. F. G. and A. Thornhill. 2000.** Alate production by aphids on sugar beet: how likely is the evolution of sugar beet-specific biotypes?. *Journal of Applied Ecology*, 37: 40-51.
- Wilson, A.C., Can, R.L., Carr, S.M., George, M., Gyllensten, U.B., Helm-Bychowski, K.M., Higuchi, R.G., Palumbi, S.R., Prager, E.M., Sage, R.D., Stoneking, M., 1985.** Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal Linnaeus Society*, 26: 375-400.
- Weed, C.L. 1896.** The hibernation of aphids. *Psyche*, 7: 351-362.
- Wells, M.L. & McPherson. R.M. 1999.** Population dynamics of three Coccinellids in flue-cured tobacco and functional response of *Hippodamia convergens* (Coleoptera : Coccinellidae) feeding on tobacco aphids (Homoptera : Aphididae). *Environmental Entomology*, 28: 768-773.
- Wilbur, H. M. 1980.** Complex life cycles. *Annual Review of Ecological Systems*, 11: 67-93.
- Yu SJ, 1988.** Selectivity of insecticides to the spined soldier bug (Heteroptera: Pentatomidae) and its lepidopterous prey. *Journal of Economic Entomology*, 81: 119–122.
- Zamoum, T., Simon, J.-C., Crochard, D., Ballanger, Y., Lapchin, L. & Vanlerberghe-Masutti, F. 2005.** Does insecticide resistance alone account

for the low genetic variability of asexually reproducing populations of the peach-potato aphid *Myzus persicae*?. Heredity, 94: 630-639.

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Ζάρπας, Κ.Δ. 2006.** Μελέτη της δυναμικής πληθυσμών της αφίδας *Aphis gossypii* Glover. *Διδακτορική Διατριβή*. Νέα Ιωνία Μαγνησίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Ιωαννίδης Φ.Μ. 1999.** Προβλήματα ανθεκτικότητας των εντόμων στα εντομοκτόνα στην Ελλάδα. Πρακτικά Συμποσίου: Αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας των εντόμων στα εντομοκτόνα. Αγρότυπος, σελ 272.
- Μαργαριτόπουλος, Ι. 2001.** Μελέτη της βιολογίας πληθυσμών του συμπλόκου είδους *Myzus persicae*. *Διδακτορική Διατριβή*. Νέα Ιωνία Μαγνησίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Σκούρας, Π.Ι., Μαργαριτόπουλος, Ι., Ζάρπας Κ.Δ. και Τσιτσιπής, Ι. 2007** Μελέτη δημογραφικών παραμέτρων σε αρπακτικά είδη της οικογένειας Coccinellidae. *Πρακτικά 12^{ου} Πανελληνίου Εντομολογικού Συνεδρίου*, 13-16 Νοεμβρίου 2007, Λάρνακα, Κύπρος (υπό εκτύπωση).
- Τζανακάκης, Μ.Ε. & Κατσόγιαννος, Β.Ι. 1998.** *Έντομα Καρποφόρων Δένδρων και Αμπέλου*. Αθήνα, ΑγρόΤυπος Α.Ε.
- Τσιτσιπής, Ι. 1999.** Γενική Εντομολογία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Βόλος.

Abstract

The modern population management of aphids is made within the framework of Integrated Pest Management (IPM) aiming at protecting the crop and limiting the achieves effect on the consumer and the environment. However, the development and application of such systems presuppose knowledge in fundamental aspects of the ecology of insect pests and the monitoring of the development of resistance in the pest.

The aim of the present work was the study of the genetics and the biology of populations of the aphid *Myzus persicae* Sulzer, the resistance status to insecticides with emphasis on neonicotinoids and pyrethroids, as well as the recording, study of the biology and the resistance to insecticides of, natural enemies of aphids. The two aphid subspecies (*Myzus persicae nicotianae* and *Myzus persicae* s.str.) are important enemies of tobacco, peach tree and other herbaceous cultures, and they cause important direct and indirect damage. In the framework of this thesis, bioassays with the method of dip test and topical application were made in population samples of the *M. persicae* that derived from peach tree orchards and tobacco fields. Emphasis was given to the dip test method in imidacloprid, while other insecticides, acetamiprid, pirimicarb, methamidophos, bifenthrin, deltamethrin and chlorpyrifos methyl were also examined. The populations from Greece ranged from north to south. Neonicotinoids and pyrethroids, were mainly study as it is known that the aphid has developed strong resistance to other classes of insecticides. The results showed the development of resistance of *M. persicae* to organophosphates, pyrethroids and carbamates. Low tolerance/resistance was found to aphid neonicotinoids as well as the natural enemies of aphids total.

Bioassay results by dip test and topical application were compared with results of biochemical and molecular methods, while the cDNA that codes two AChE were isolated from the aphid *M. persicae*. The ACE1 was orthologous and the ACE2 was paralogous with ace *Drosophila melanogaster*. However no mutation of clones resistant to pirimicarb was found. Further research is required. During the years 2005, 2006 and 2007 the biological cycle of 967

clones the *M. persicae*, collected from various hosts and regions of Northern, Central, Greece and Peloponnesus was examined. The overwintering strategy and the correlation of biological circle with the resistance were evaluated. There was found a geographic diversity in the life cycle category of clones collected from tobacco related with the presence of the primary host, the peach tree. In Northern Greece, where is the peach tree cultivated extensively, the percentage of holocyclis genotypes was above 50% and in certain cases it reached 100%. On the contrary, in regions where the peach tree is not cultivated extensively (Central Greece, Peloponnesus) it ranged from 0% to 23,5%. A geographic diversity in the aphids color was observed, that tobacco, collected aphids were proportional with life cycle category. More red clones were collected in regions where anholocycle genotypes. Genotypes coming from the primary host, peach tree, were green of color.

Predatory species of Coccinellidae are considered important biocontrol agents of aphid populations and other pest of cultivated plants. Several species of such as *Coccinella septempunctata* and *Hippodamia convergens* are characteristic natural enemies in many agroecosystems. There are very few studies on the predatory species Coleoptera present in important crops in Greece such as tobacco and peach tree. In samplings in this crops it was found that the *C. septempunctata*, *Hippodamia undecimnotata*, *H. convergens* and *H. variegata* were the most frequent. The knowledge of the diversity and the seasonal appearance of the predators present in the crops in combination with their biological characteristics can help to develop an aphid population management program friendlier to the environment, the producer and the consumer.

In the present study the developmental period of the immature stages of the predatory coccinellids *H. variegata* and *H. undecimnotata* and the larval aphid consumption were examined in five constant temperatures (17, 20, 23, 26, and 29 °C) and at 23 °C for *C. septempunctata* at L16:D8. A red *M. persicae* clone on tobacco leaves was used as prey. In addition, the demographic parameters of the two predators were examined at 23°C.

The preimaginal mortality in *H. undecimnotata* was 59% at 17°C, while it was 62% in *H. variegata* at 20°C. The preimaginal developmental period ranged from 12.4 days at 29°C to 40,6 days at 17°C in *H. variegata*, while in *H. undecimnotata* the corresponding period ranged from 14,4 days at 29°C to 48,5 days at 17°C. *C. septempunctata* preimaginal developmental period was 30.2 days. In *H. variegata* and *H. undecimnotata* the developmental temperature threshold was 12.5°C and 12.7 °C respectively. The day-degree requirements for the preimaginal development were 211 and 257 in *H. variegata* and *H. undecimnotata*, respectively. In *H. variegata* the total and daily larval consumption were 84.2 and 8.7 aphids at 26°C, respectively. The corresponding values in *H. undecimnotata* were 129.1 and 9.4 aphids.

The mean lifespan and pre-oviposition period of the adult *H. variegata* females were 57.6 and 4.8 days at 23°C, respectively. The corresponding values in *H. undecimnotata* were 74.4 and 15.75 days and in *C. septempunctata* 102,2 και 16,1 days. The mean fecundity in *H. variegata*, *H. undecimnotata* and *C. septempunctata* was 882, 664 and 586 eggs, respectively. The oviposition period was 48 days in *H. variegata*, 50 days in *H. undecimnotata* and 72 days in *C. septempunctata*. The intrinsic rate of increase (r_m , female/female/day), the mean generation time (T, days), the net reproductive rate (R_o female/female) and the population duplication time (DT, days) in *H. variegata* was 0,129, 42,4, 241,9 and 5,4 respectively, while the corresponding values in *H. undecimnotata* were 0,084, 59,1, 142,7 and 8,3 and finally for *C. septempunctata* they were 0,061, 69,3, 67,3 and 11,4. The total aphid consumption by a pair of adult male and female was 2,381 and 3,242 aphids in *H. variegata* and *H. undecimnotata*, respectively.

Finally, we compared patterns of intraspecific polymorphism of two markers with contrasted modes of evolution, nuclear ribosomal DNA (rDNA) and mitochondrial DNA (mtDNA), in the aphid predator *C. septempunctata*. The first internal transcribed spacer (IT1S) of rDNA and a fragment in the mtDNA gene coding for 16sRNA, were PCR-amplified and sequenced in samples of various geographical origins distributed worldwide. IT1S or 16sRNA showed no phylogeographical structure.