

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**Σχολή Γεωπονικών Επιστημών**

**Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**Φυτιατρική και Περιβάλλον**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

Αξιολόγηση της Φωσφίνης στα Διάφορα Στάδια Ανάπτυξης του *Trogoderma granarium*

**Γκουργκούτα Μαρίνα**

**Βόλος, 2020**

Αξιολόγηση της Φωσφίνης στα Διάφορα Στάδια Ανάπτυξης του *Trogoderma granarium*

Γκουργκούτα Μαρίνα

**Επιβλέπων:**

Αθανασίου Χρήστος, Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Μέλη επιτροπής:**

Παπαδόπουλος Νικόλαος, Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Βέλλιος Ευάγγελος, Επίκουρος Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Copyright © ΓΚΟΥΡΓΚΟΥΤΑ ΜΑΡΙΝΑ, 2020.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

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

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

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Μετά την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής, αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω, πρώτα από όλους τον επιβλέποντα Καθηγητή μου, κ. Χρήστο Αθανασίου, Καθηγητή του Εργαστηρίου Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο ερευνητικό αντικείμενο καθώς και για την καθοδήγησή του, τις γνώσεις του και την ηθική του υποστήριξη σε όλη την διάρκεια την εκπόνησης της παρούσας μελέτης.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Καθηγητές του τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Νικόλαο Παπαδόπουλο και κ. Ευάγγελο Βέλλιο για την συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Θα ήταν παράλειψη μου αν δεν εξέφραζα τις ευχαριστίες μου στους φοιτητές και το προσωπικό του Εργαστηρίου, και ιδιαίτερα στην υποψήφια διδάκτορα Παρασκευή Αγραφιώτη για τη πολύτιμη βοήθειά της στην πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης, καθώς και για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που υπήρξε κατά τη διάρκεια εκπόνησής της.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου, για την αμέριστη υποστήριξη και ψυχολογική τους συμπαράσταση σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το είδος *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae), γνωστό διεθνώς ως khapra beetle, αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους εχθρούς των αποθηκευμένων προϊόντων παγκοσμίως, καθώς και έντομο καραντίνας για πολλές χώρες. Για το λόγο αυτό, κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική η μελέτη της αποτελεσματικότητας διάφορων μεθόδων για τον έλεγχο και την αντιμετώπισή του. Η εφαρμογή της φωσφίνης (PH<sub>3</sub>) φαίνεται να είναι από τις αποτελεσματικότερες μεθόδους για τον έλεγχο εντόμων αποθηκών και χρησιμοποιείται ευρέως τα τελευταία χρόνια. Έτσι, κρίθηκε αναγκαίο να εξετασθεί η αποτελεσματικότητά της για τον έλεγχο του εντόμου για όλα τα στάδια του βιολογικού του κύκλου. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής πρωτόκολλα: (α) έκθεση για 20 ώρες στα 30 ppm (πρωτόκολλο Food and Agriculture Organization, FAO) για όλα τα στάδια του εντόμου συμπεριλαμβανομένων και των προνυμφών που βρίσκονται σε διάπαυση, (β) έκθεση για 3 ημέρες σε διάφορες συγκεντρώσεις (50, 100, 200, 300, 500 και 1000 ppm) για όλα τα στάδια που αναφέρθηκαν παραπάνω, (τροποποιημένα πρωτόκολλα του FAO) και (γ) έκθεση από 2 έως 90 λεπτά (πρωτόκολλο της Detia Degesch GmbH, γνωστό και ως Detia Degesch Phosphine Tolerance Test Kit, DDPTTK), το οποίο βασίζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις, δηλ. 3000 ppm για ενήλικα και προνύμφες. Η αξιολόγηση της θνησιμότητας πραγματοποιήθηκε μετά από 7 και 14 ημέρες από την έκθεση. Με βάση τα αποτελέσματα της εργασίας, η φωσφίνη φαίνεται να αποτελεί κατάλληλο μέσο για τον έλεγχο του *T. granarium*, καθώς υψηλά επίπεδα θνησιμότητας σημειώθηκαν για όλα τα στάδια του εντόμου. Οι προνύμφες ήταν αρκετά πιο ανθεκτικές από τα ενήλικα καθώς χρειάστηκε σχεδόν διπλάσιος χρόνος για την ακινητοποίηση του συνόλου των ατόμων. Αυτό οδήγησε σε παρόμοια αποτελέσματα, 7 και 14 ημέρες μετά από την έκθεση, καθώς οι προνύμφες σημείωσαν υψηλά ποσοστά επιβίωσης ενώ τα ενήλικα πολύ χαμηλά. Σημαντικά βέβαια φαίνεται να επηρεάστηκε ο ρυθμός ανάπτυξης των προνυμφών που επέζησαν ύστερα από έκθεση στα 3000 ppm για 90 λεπτά και 30 ppm για 20 ώρες καθώς ελάχιστες κατάφεραν να περάσουν στο στάδιο της νύμφης συγκριτικά με τον μάρτυρα ύστερα από 7 ημέρες. Η επίδραση της φωσφίνης στις διαπαύουσες προνύμφες δεν φαίνεται να έχει σημαντική διαφορά σε σύγκριση με αυτή στις μη διαπαύουσες. Ύστερα από έκθεση για 3 ημέρες στα 3000 ppm φωσφίνης όλα τα στάδια του εντόμου εκτός από το στάδιο του αυγού ήταν νεκρά ακόμα και στις μικρότερες συγκεντρώσεις. Το στάδιο με την μεγαλύτερη αντοχή στη φωσφίνη φάνηκε να είναι αυτό του αυγού, καθώς για να επιτευχθεί 100 % θνησιμότητα, χρειάστηκε να γίνει έκθεση στα 1000 ppm φωσφίνης. Τα δεδομένα της παρούσας έρευνας αναμένεται να συμβάλλουν περαιτέρω στη χρήση της φωσφίνης για την αντιμετώπιση του *T. granarium*, ιδιαίτερα σε εφαρμογές καραντίνας.

**Λέξεις-κλειδιά:** απεντόμωση, έντομα αποθηκών, πρωτόκολλα αξιολόγησης, φωσφίνη, *Trogoderma granarium*

## SUMMARY

The khapra beetle, *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae), is a serious pest of stored products worldwide, and a quarantine insect for many countries. The use of phosphine gas has been proven to be effective against a wide range of stored-product insect species, but there is still inadequate information in the case of *T. granarium*. In the present study, we evaluated the effectiveness of phosphine in different life stages of this species, including its diapausing larvae. For this purpose, the protocols that were used were: a) exposure for 20 hours at 30 ppm for all life stages including the diapausing larvae (standard protocol, proposed by Food and Agriculture Organization, FAO), b) exposure for 3 days in different concentrations (50, 100, 200, 300, 500 and 1000 ppm) for the same life stages mentioned above (modified FAO protocol) and c) short exposures (e.g. 2-90 minutes) on high concentrations of phosphine (e.g. 3000 ppm), based on a protocol developed from Detia Degesch GmbH, known as Detia Degesch Phosphine Tolerance Test Kit (DDPTTK) for adults and larvae. Mortality assessment was made after 7 and 14 days after the termination of the exposure. Based on the current results phosphine seem to be a suitable method of control of *T. granarium*, as high mortality rates were observed for all stages of the insect. In general, some life stages were more sensitive than others. Larvae were considerably more tolerant than adults as it took twice as long for all the individuals to immobilize. This led to similar results after 7 and 14 days post exposure since larvae had high survival rates in contrast with adults. The growth rate of the larvae that had survived exposure to 3000 ppm for 90 minutes and 30ppm for 20 hours was significantly affected, as compared with the controls. The effect of phosphine on diapausing larvae does not appear to be significantly different from that of non-diapausing larvae. After three days of exposure, all life stages, with the exception of eggs, were dead, even at the lowest concentration. In contrast, egg mortality was 100 % only at the 1000 ppm, after 3 days of exposure. The data of the present study are considered to be particularly important for the control of this species, especially in the case of quarantine and pre-shipment treatments.

**Keywords:** fumigation, stored product insects, efficacy protocols, phosphine, *Trogoderma granarium*

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

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



## Περιεχόμενα

ΠΡΩΤΟ ΜΕΡΟΣ-Εισαγωγή .....	10
<b>1.1 Εισαγωγή</b> .....	10
<b>1.2 Βιολογία</b> .....	11
<b>1.3 Περιγραφή του εντόμου</b> .....	13
1.3.1 Αυγά .....	13
1.3.2 Προνύμφες .....	13
1.3.3 Νύμφες .....	15
1.3.4 Ενήλικα .....	16
<b>1.4 Γεωγραφική εξάπλωση</b> .....	17
<b>1.5 Έλεγχος και Αντιμετώπιση</b> .....	19
1.5.1 Εντομοκτόνα επαφής .....	19
1.5.2 Αέρια εντομοκτόνα .....	20
1.5.3 Ελεγχόμενες ατμόσφαιρες .....	20
1.5.4 Ακραίες θερμοκρασίες .....	21
1.5.5 Βιολογική καταπολέμηση .....	22
<b>1.6 Ανθεκτικότητα</b> .....	22
<b>1.7 Φωσφίνη</b> .....	23
<b>1.8 Σκοπός της παρούσας μελέτης</b> .....	24
ΔΕΥΤΕΡΟ ΜΕΡΟΣ- Υλικά και Μέθοδοι .....	25
2.1. Έντομα .....	25
2.2 1 <sup>η</sup> Βιοδοκιμή - Πρωτόκολλο DDPTTK .....	26
2.3 2 <sup>η</sup> Βιοδοκιμή- Πρωτόκολλο DDPTTK για 90 λεπτά .....	27
2.4 3 <sup>η</sup> Βιοδοκιμή- Πρωτόκολλο FAO .....	28
2.5 4 <sup>η</sup> Βιοδοκιμή- Τροποποιημένο πρωτόκολλο FAO .....	28
<b>2.6. Στατιστική ανάλυση</b> .....	29
ΤΡΙΤΟ ΜΕΡΟΣ- Αποτελέσματα .....	30
3.1 1 <sup>η</sup> Βιοδοκιμή- DDPTTK .....	30
3.2. 2 <sup>η</sup> Βιοδοκιμή- DDPTTK 90 λεπτά .....	32
3.3. 3 <sup>η</sup> Βιοδοκιμή- πρωτόκολλο FAO .....	33
3.4. 4 <sup>η</sup> Βιοδοκιμή- τροποποιημένο FAO .....	35
ΤΕΤΑΡΤΟ ΜΕΡΟΣ- Συζήτηση .....	37
Βιβλιογραφία .....	42

## ΠΡΩΤΟ ΜΕΡΟΣ-Εισαγωγή

### 1.1 Εισαγωγή

Το *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae), διεθνώς γνωστό με το κοινό όνομα khapra beetle, αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα έντομα καραντίνας σε πολλές χώρες (EPPO, 2013). Ο χαρακτηρισμός khapra, ο οποίος του έχει αποδοθεί προέρχεται από την Ινδία στην οποία το είδος είναι ενδημικό, σημαίνει κεραμίδι, τούβλο ή και καταστροφέας (Rahman et al., 1945; Harper, 1955; Aitken, 1975; EPPO, 2013; Athanassiou et al., 2019a). Οι χαρακτηρισμοί αυτοί μαρτυρούν αφενός την ανθεκτικότητα του εντόμου σε ακραίες συνθήκες, και αφετέρου τα υψηλά επίπεδα απωλειών που μπορεί να προκαλέσει. Στάδιο κλειδί του βιολογικού του κύκλου, στο οποίο οφείλεται η ανθεκτικότητά του, είναι αυτό της διαπαύουσας προνύμφης (Bell, 1994; Wilches, 2016). Οι υψηλές απώλειες που προκαλεί οφείλονται στο στάδιο των προνυμφών, καθώς τα ενήλικα δεν τρέφονται (Barnes and Grove, 1916; Pruthi and Singh, 1950). Οι προσβολές δεν επηρεάζουν μόνο την ποσότητα αλλά και την ποιότητα του προϊόντος. Σε πολλές περιπτώσεις, ενώ το *T. granarium* προσβάλλει μόλις το 5% της ποσότητας ενός αποθηκευμένου προϊόντος, μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τη ποιότητά του (Pasek, 1998).

Μπορεί να τραφεί σχεδόν με οποιοδήποτε είδος υλικού ακόμα και σε προϊόντα με λιγότερο από 2 % υγρασία, όπως το αποξηραμένο αίμα, το αποξηραμένο γάλα, το ιχθυάλευρο, το μαλλί, το δέρμα κατσίκας και πολλά άλλα, αλλά προτιμά τα δημητριακά και τα προϊόντα που παράγονται από αυτά (Hinton, 1945; Cotton, 1956; Dillon, 1968, Pasek, 1998). Πολύ γρήγορη αύξηση φαίνεται να έχει όταν βρεθεί στο σιτάρι και το τριτικάλε ενώ μικρότερη στη βρώμη, το κριθάρι και το καλαμπόκι (Athanassiou et al., 2016; Kavallieratos et al., 2019b). Το έντομο αδυνατεί να αναπτυχθεί και να παράξει απογόνους σε προϊόντα όπως το μαύρο πιπέρι, ο δυόσμος, ο βασιλικός, ο καπνός και το δέρμα κατσίκας, ή φρέσκα φρούτα όπως σύκα και ροδάκινα (Kavallieratos et al., 2019a).

Τα παραπάνω χαρακτηριστικά σε συνδυασμό με τους ταχείς ρυθμούς πολλαπλασιασμού του, καθώς μπορεί να ολοκληρώσει ακόμα και 10 γενεές σε ένα χρόνο (Athanassiou et al., 2016), το καθιστούν ένα από τα πιο επικίνδυνα έντομα εισβολείς παγκοσμίως (Lowe et al., 2000). Καθώς αποτελεί έντομο καραντίνας για πολλές χώρες, και συνεπώς δεν μπορεί να μελετηθεί σε πολλά εργαστήρια, τα στοιχεία που υπάρχουν για τον έλεγχο και την αντιμετώπισή του είναι λίγα. Τα στοιχεία αυτά αφορούν κυρίως χημικά εντομοκτόνα επαφής, αλλά γενικά η έρευνα για την αξιολόγηση της επίδρασης άλλων εντομοκτόνων (αερίων κτλ.) είναι ελλιπής (Athanassiou et al., 2019a).

## 1.2 Βιολογία

Τα στάδια του βιολογικού κύκλου του εντόμου είναι τέσσερα, δηλ. αυτά του αυγού, της προνύμφης, της νύμφης και του ενηλικού. Οι προνύμφες του *T. granarium*, όπως και άλλων Dermestidae, έχουν την ικανότητα να εισέρχονται σε διάπαυση. Η διάπαυση είναι το στάδιο κλειδί του βιολογικού κύκλου του εντόμου, καθώς σε αυτό οφείλεται η μακροζωία και η επιτυχημένη εισβολή και εγκατάστασή του σε νέες περιοχές (Athanassiou et al., 2019a). Οι προνύμφες που έχουν την ικανότητα αυτή, διαχωρίζονται γενετικά από εκείνες που δεν την έχουν, αλλά η διάκρισή τους μπορεί να γίνει μόνο όταν βρεθούν κάτω από τις συνθήκες που απαιτούνται για να προκαλέσουν την διάπαυση (CABI, 2005).

Η διάπαυση επιτυγχάνεται σε συνδυασμό με έναν ή περισσότερους από τους παρακάτω παράγοντες: χαμηλή θερμοκρασία, συνωστισμός προνυμφών και περιορισμένος χώρος, ενώ η φωτοπερίοδος δεν επηρεάζει τη διάπαυση τόσο όσο άλλα έντομα (Bell, 1994). Σε αυτές τις συνθήκες το έντομο σταματά να αναπτύσσεται ενώ μειώνεται και ο ρυθμός μεταβολισμού του (Burges, 1959; Beck, 1971). Οι διαπαύουσες προνύμφες είναι κρυμμένες και ακινητοποιημένες σε “καταφύγια”, γεγονός το οποίο αποτελεί πρόκληση για την ανίχνευσή τους και συμβάλλει στην αύξηση της συχνότητας των εισαγωγών σε χώρες στις οποίες το *T. granarium* αποτελεί έντομο καραντίνας (Bell, 1994). Επιπλέον, οι προνύμφες του *T. granarium* είναι ανθεκτικές σε πολλές χημικές και μη χημικές μεθόδους, ειδικά όταν βρίσκονται σε κατάσταση διάπασης (Bogs, 1976; Bell, 1994; Bell and Wilson, 1995; Ghimire et al., 2017; Kavallieratos et al., 2017; Athanassiou et al., 2019a). Το *T. granarium* μπορεί να εισέλθει σε διάπαυση όταν οι μέσες μηνιαίες θερμοκρασίες είναι τουλάχιστον 20 °C για τέσσερις διαδοχικούς μήνες με σχετική υγρασία (ΣΥ) <50 %, ενώ μέσες μηνιαίες θερμοκρασίες > 27 °C και ΣΥ <75% για δύο μήνες έχουν ως απόρροια την εκρηκτική αύξηση του πληθυσμού (Sinha and Utida, 1967).

Σε αντίθεση με άλλα είδη του γένους *Trogoderma* η διάπαυση του *T. granarium* δεν είναι υποχρεωτική. Περιστασιακά οι προνύμφες εγκαταλείπουν την διάπαυση για να τραφούν (Nair and Desai, 1973b; Denlinger, 1991; Bell, 1994; Wilches et al., 2016). Πολλές από αυτές γίνονται νύμφες, ενώ άλλες επιστρέφουν σε κατάσταση διάπασης. Ο κύκλος αυτός μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές και να διαρκέσει μέχρι και για διάστημα 8 ετών (Bell, 1994). Απουσία τροφής βέβαια, η διάπαυση μπορεί να διαρκέσει μέχρι και για 9 μήνες (CABI, 2005). Ο τερματισμός της διάπασης επιτυγχάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας, ενώ παραδόξως η διαθεσιμότητα τροφής είναι λιγότερο σημαντική (Shivananjappa, 2020). Σημαντικός παράγοντας όμως είναι η ποιότητα της τροφής καθώς το έντομο φαίνεται να εγκαταλείπει την διάπαυση όταν έρθει σε επαφή με νέα τροφή (Shivananjappa et al., 2020).

Ως ενήλικα, τα αρσενικά ζουν για 7 - 12 ημέρες, ένα θηλυκό που έχει συζευχθεί 4 - 7 ημέρες και ένα θηλυκό που δεν έχει συζευχθεί μπορεί να ζήσει μέχρι 20 - 30 ημέρες (Howe,

1952; Karnavar, 1972; Rees and Banks, 1999). Τα ενήλικα ωριμάζουν σεξουαλικά 2 ημέρες μετά την έξοδό τους. Αν το θηλυκό συζευχθεί μόνο μια φορά θα παράξει περίπου 60 αυγά, αλλά αν συζευχθεί μια δεύτερη φορά, στη συνέχεια, μπορεί να παράξει μέχρι 500 αυγά (Karnavar, 1972). Ωστόσο, κατά μέσο όρο παράγονται 50 - 90 αυγά εάν υπάρχει μεγάλη καθυστέρηση ανάμεσα στις ημερομηνίες σύζευξης (15 - 20 ημερών) (Karnavar, 1972). Τα θηλυκά που προέρχονται από προνύμφες οι οποίες έχουν εξέλθει από διάπαυση μπορούν να συζευχθούν επανειλημμένα και να παράγουν μέχρι και 130 αυγά το καθένα σε βέλτιστες εργαστηριακές συνθήκες (Karnavar, 1972). Από την άλλη η διάπαυση σε συνδυασμό με την απουσία τροφής μπορούν να προκαλέσουν μέχρι και 60 % μείωση στην γέννηση των αυγών (Rees and Banks, 1999). Τα θηλυκά αφήνουν τα αυγά τους στην επιφάνεια των σπόρων των σιτηρών, ή σε αυλακώσεις και ρωγμές που σχηματίζονται στα άκρα των σπόρων (Lindgren and Vincent, 1959). Το θηλυκό χρησιμοποιεί τις υπάρχουσες ρωγμές και δεν διεισδύει στο φλοιό ούτε βλάπτει τους σπόρους με οποιονδήποτε τρόπο (Hadaway, 1941). Η επαναλαμβανόμενη σύζευξη σε όλη την περίοδο ωοτοκίας δεν είναι απαραίτητη για την επίτευξη πλήρους δυναμικής γονιμότητας. Αν τα θηλυκά απομονωθούν από το αρσενικό μετά την έναρξη της ωοτοκίας, θα παράγουν τόσα αυγά όσα τα θηλυκά που έμειναν με αρσενικά σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους (Hadaway, 1956). Ο ρυθμός της ωοτοκίας και της γονιμότητας των αυγών παραμένει επίσης αμετάβλητος. Τέλος δεν απαιτείται η παρουσία ελεύθερου νερού πριν από την πραγματοποίηση της ωοτοκίας (Lindgren and Vincent, 1959).

Η ωοτοκία δεν μεταβάλλεται σημαντικά μεταξύ 27 και 35 °C, μειώνεται όμως με την αύξηση της υγρασίας και εκμηδενίζεται αν η θερμοκρασία είναι χαμηλότερη από 20 °C. (Odeyemi, 1993). Επομένως, η χαμηλή υγρασία και η υψηλή θερμοκρασία, είναι βασικές προϋποθέσεις για την ταχεία ανάπτυξη και εγκατάσταση αυτού του είδους. Το *T. granarium* είναι εξαιρετικά ανεκτικό σε πολύ υψηλές και πολύ χαμηλές θερμοκρασίες στις οποίες άλλα έντομα αδυνατούν να επιβιώσουν (Bogs, 1976; Borah, 1979; Wilches et al., 2017).

Οι βέλτιστες θερμοκρασίες για την ανάπτυξη του *T. granarium* είναι μεταξύ 20 και 35 °C (Lindgren et al., 1953; Lindgren and Vincent, 1959). Ο χρόνος που απαιτείται για την ανάπτυξή του από αυγό ως και το ενήλικο μπορεί να είναι 39-45 ημέρες στους 30 °C και ως 220 ημέρες στους 21 °C. Το *T. granarium* μπορεί να επιβιώσει αρκετές ημέρες στους 45° C και αρκετές ώρες στους 60 °C καθώς και στους -22 °C (Wilches, 2016). Τα όρια αυτά αναφέρονται στο στάδιο της διαπαύουσας προνύμφης, ενώ για τα υπόλοιπα στάδια η ανθεκτικότητα είναι μικρότερη. Το πιο ευαίσθητο στάδιο τόσο σε υψηλές όσο και σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι το αυγό (Wilches, 2016).

Οι προνύμφες μπορούν να περάσουν από 4-8 στάδια ανάλογα με τη θερμοκρασία (Hadaway, 1956). Η ανάπτυξή των προνυμφών μπορεί να ολοκληρωθεί σε λιγότερο από 15

ημέρες στους 35 °C και τα θηλυκά πραγματοποιούν συνήθως μία έκδυση περισσότερο από τα αρσενικά πριν γίνουν νύμφες (Burge, 1962). Οι Kavallieratos et al. (2017a) έδειξαν ότι η αύξηση του πληθυσμού του *T. granarium* στους 35 °C ήταν 10-250 φορές υψηλότερη από αυτή άλλων εντόμων αποθηκευμένων προϊόντων.

### 1.3 Περιγραφή του εντόμου

#### 1.3.1 Αυγά

Τα αυγά εναποτίθενται μεμονωμένα και χωρίς να περικλείονται από υπόστρωμα με εκκρίσεις. Ένα τυπικό αυγό είναι κυλινδρικό, με μέσες διαστάσεις που είναι 0.7 mm σε μήκος και 0.25 mm σε πλάτος (EPPO, 2004). Το ένα άκρο είναι στρογγυλεμένο ενώ το άλλο είναι περισσότερο μυτερό (Εικόνα 1.). Μόλις το αυγό εξέλθει από το ενήλικο, είναι γαλακτώδους, λευκού χρώματος, αλλά καθώς προχωράει η ανάπτυξη, παίρνει ένα χλωμό κιτρινωπό χρώμα. Όσο πλησιάζει ο χρόνος για την εκκόλαψη, οι καφέ τρίχες της αναπτυσσόμενης προνύμφης γίνονται ορατές ακτινικά, μέσω της διαφανούς μεμβράνης των αυγών. Το στρογγυλεμένο άκρο του αυγού γίνεται σκούρο καφέ λόγω της παρουσίας τριχών στο οπίσθιο τμήμα της προνύμφης και της μακράς "ουράς" που συσπειρώνεται μεταξύ της προνύμφης και του οπίσθιου άκρου της θήκης του αυγού (Εικόνα 1) (Hadaway, 1956).



**Εικόνες 1.** Αυγά του *Trogoderma granarium* (αριστερά) (προσωπικό αρχείο) και προνύμφη *T. granarium* λίγο πριν εκκολαφθεί (δεξιά) (προσωπικό αρχείο).

#### 1.3.2 Προνύμφες

Η προνύμφη εκκολάπτεται μέσω της μεμβράνης των αυγών. Σέρνει πρώτα την ελεύθερη κεφαλή και αφήνει πίσω της το λαμπερό διάφανο περίβλημα του αυγού. Μερικές φορές, ειδικά σε χαμηλές θερμοκρασίες, η προνύμφη παραμένει για κάποιο χρονικό διάστημα με την "ουρά" ακόμα μέσα στο αυγό (Hadaway, 1956). Η προνύμφη πρώτου σταδίου έχει συνολικό μήκος 1-6 έως 1-8 mm, λίγο περισσότερο από το ήμισυ του οποίου αποτελείται από μια μακρά "ουρά", η οποία αποτελείται από μία σειρά από τρίχες που εκπτύσσονται από το τελευταίο κοιλιακό

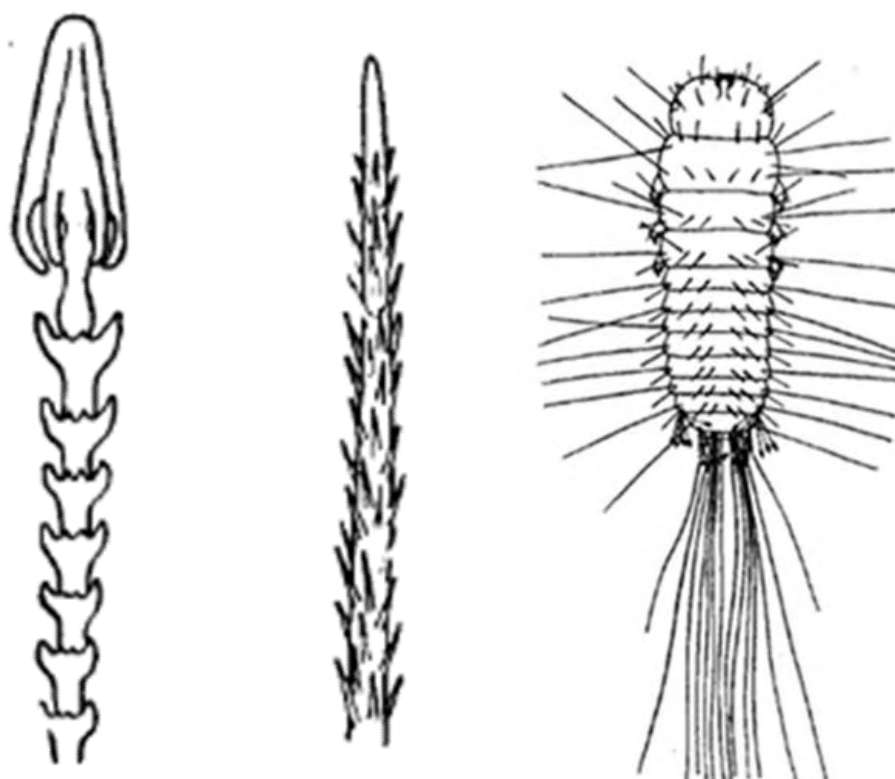
τμήμα. Το πλάτος του σώματος είναι 0.25 έως 0.3 mm. Έχει ομοιόμορφα κιτρινωπό λευκό χρώμα, εκτός από τις τρίχες κεφαλής και σώματος που είναι καστανές (Hadaway, 1956).

Η κεφαλή είναι καλώς ανεπτυγμένη με μασητικά στοματικά μέρη, ενώ η κάτω γνάθος είναι ευδιάκριτη από το σκοτεινό χρώμα της. Η κεφαλή φέρει μια σύντομη κεραία με τρία τμήματα και έξι απλούς οφθαλμούς σε κάθε πλευρά. Ο προθώρακας είναι μεγαλύτερος από κάθε ένα από τα υπόλοιπα τμήματα. Κάθε θωρακικό τμήμα φέρει ένα ζεύγος ποδιών. Οκτώ κοιλιακά τμήματα είναι ευδιάκριτα και υπάρχει επίσης ένα μικρό ένατο τμήμα (Kinslover, 1991). Χαρακτηριστικό γνώρισμα της προνύμφης είναι η παρουσία δύο ειδών τριχών του σώματος, που απεικονίζονται στην Εικόνα 2. Οι "απλές" τρίχες, των οποίων ο άξονας φέρει πολλές μικρές, δύσκαμπτες προς τα άνω κατευθυνόμενες μικρότερες τρίχες και οι "αγκαθωτές" τρίχες, στις οποίες ο άξονας συστέλλεται σε τακτά χρονικά διαστήματα, και των οποίων η κορυφή αποτελείται από μια αγκαθωτή κεφαλή. Η κεφαλή είναι όσο το σύνολο του μήκους των τεσσάρων από τα προηγούμενα από την κεφαλή τμήματα (Hadaway, 1956). Απλές τρίχες είναι διάσπαρτες πάνω στη ραχιαία επιφάνεια των τμημάτων της κεφαλής και του σώματος. Εκείνες που προβάλλουν πλευρικά είναι όσο το εύρος του σώματος. Η ουρά αποτελείται από δύο ομάδες μακριών απλών τριχών, που φέρονται στο ένατο κοιλιακό τμήμα. Οι αγκαθωτές τρίχες εντοπίζονται στην προνύμφη πρώτου σταδίου σε δύο ζεύγη θυσάνων, οι οποίες φέρονται στα πλευρικά περιθώρια του έβδομου και του όγδοου κοιλιακού τμήματος. Στην προνύμφη πρώτου σταδίου του *T. granarium* υπάρχουν 4 έως 10 τριχοειδείς τρίχες ανά θύσανο.

Σε κάθε έκδυση, το παλαιό έκδυμα των προνυμφών διασπάται κατά μήκος της μέσης ραχιαίας γραμμής από το οπίσθιο περιθώριο της κεφαλής, μέχρι το πέμπτο ή το έκτο κοιλιακό τμήμα. Η προνύμφη σέρνεται έξω, αφήνοντας το έκδυμα πίσω και αρχίζει να τρέφεται ξανά αμέσως. Τα εκδύματα μπορούν να φανούν σε έντονα μολυσμένους σπόρους. Ο αριθμός των σταδίων ποικίλει και δεν μπορεί να δοθεί συγκεκριμένος αριθμός για συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας. Στην πραγματικότητα, ο αριθμός ποικίλλει ακόμη και μεταξύ των ατόμων από την ίδια παρτίδα αυγών από ένα θηλυκό το οποίο διατηρήθηκε υπό τις ίδιες συνθήκες. Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, ο αριθμός των εκδύσεων ποικίλλει περισσότερο και είναι συχνά μεταξύ πέντε και οκτώ. Η περίοδος μεταξύ των εκδύσεων στους 35 °C είναι τέσσερις ή πέντε ημέρες, αλλά σε χαμηλότερες θερμοκρασίες γίνεται πολύ μεγαλύτερη, καθώς η προνύμφη μπορεί να εισέλθει σε κατάσταση διάπαυσης (Hadaway, 1956).



**Εικόνα 2.** Προνύμφες σε διάπαυση (προσωπικό αρχείο).



**Εικόνα 3.** Αριστερά: σύνθετη τρίχα προνύμφης *T. granarium*, στο κέντρο: απλή τρίχα προνύμφης *T. granarium* (Hadaway, 1956), δεξιά: προνύμφη *T. granarium* (Hadaway, 1956).

### 1.3.3 Νύμφες

Κατά την τελευταία έκδυση, το έκδυμα των προνυμφών διαχωρίζεται από το οπίσθιο μέρος της κεφαλής μέχρι τον πέμπτο ή έκτο κοιλιακό τμήμα, αλλά δεν αφαιρείται, ενώ η νύμφη παραμένει μέσα σε αυτό το δέρμα καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής της. Ο θώρακας και το

πρόσθιο τμήμα της κοιλιάς της νύμφης είναι ευρύτερα από τα αντίστοιχα τμήματα της προνύμφης και οι τελευταίες κοιλότητες του δέρματος των νυμφών είναι ανοιχτές έτσι ώστε να φαίνεται ένα τμήμα της ραχιαίας επιφάνειας της νύμφης το οποίο είναι πυκνά καλυμμένο με τρίχες (Εικόνα 4). Το αρσενικό είναι μικρότερο από το θηλυκό. Οι νύμφες συνήθως βρίσκονται κοντά στην επιφάνεια των σπόρων (Hadaway, 1956).



**Εικόνα 4.** Νύμφη *T. granarium* (προσωπικό αρχείο).

#### 1.3.4 Ενήλικα

Όταν εμφανιστεί το ενήλικο, το έκδυμα των νυμφών απομακρύνεται. Το ενήλικο παραμένει εγκλεισμένο μέσα στο έκδυμα των νυμφών για μικρό χρονικό διάστημα, κυμαινόμενο από μια ημέρα ή περισσότερο ανάλογα με τις συνθήκες, ενώ η επιδερμίδα σκληραίνει και αλλάζει χρώμα. Το φύλο των ενηλίκων ατόμων μπορεί να διακριθεί από το μέγεθος και τη μορφή της κεραίας τους. Το αρσενικό είναι μικρότερο από το θηλυκό, η κεραία του είναι πιο χαλαρή και αποτελείται από περισσότερα τμήματα ενώ το ακραίο τμήμα της κεραίας είναι διπλάσιο από το πλάτος. Στο θηλυκό οι δύο διαστάσεις είναι παρόμοιες (Kingslover, 1991). Το ενήλικο *T. granarium* έχει μήκος 1.6-3 mm και πλάτος 0.9-1.7 mm. Το αρσενικό και το θηλυκό έχουν μέσο μήκος 2 και 3 mm, αντίστοιχα (Hinton, 1945). Η κεφαλή είναι μικρή και συνήθως αποφρακτική, έτσι ώστε στην οπίσθια όψη το μεγαλύτερο μέρος της να κρύβεται κάτω από το προθώρακα (Εικόνα 5). Τα σύνθετα μάτια συνήθως είναι στρογγυλά. Παρόλο που και τα δύο φύλα έχουν πλήρως ανεπτυγμένες πτέρυγες, κανένα από τα δύο δεν έχει την ικανότητα πτήσης (Howe, 1952).





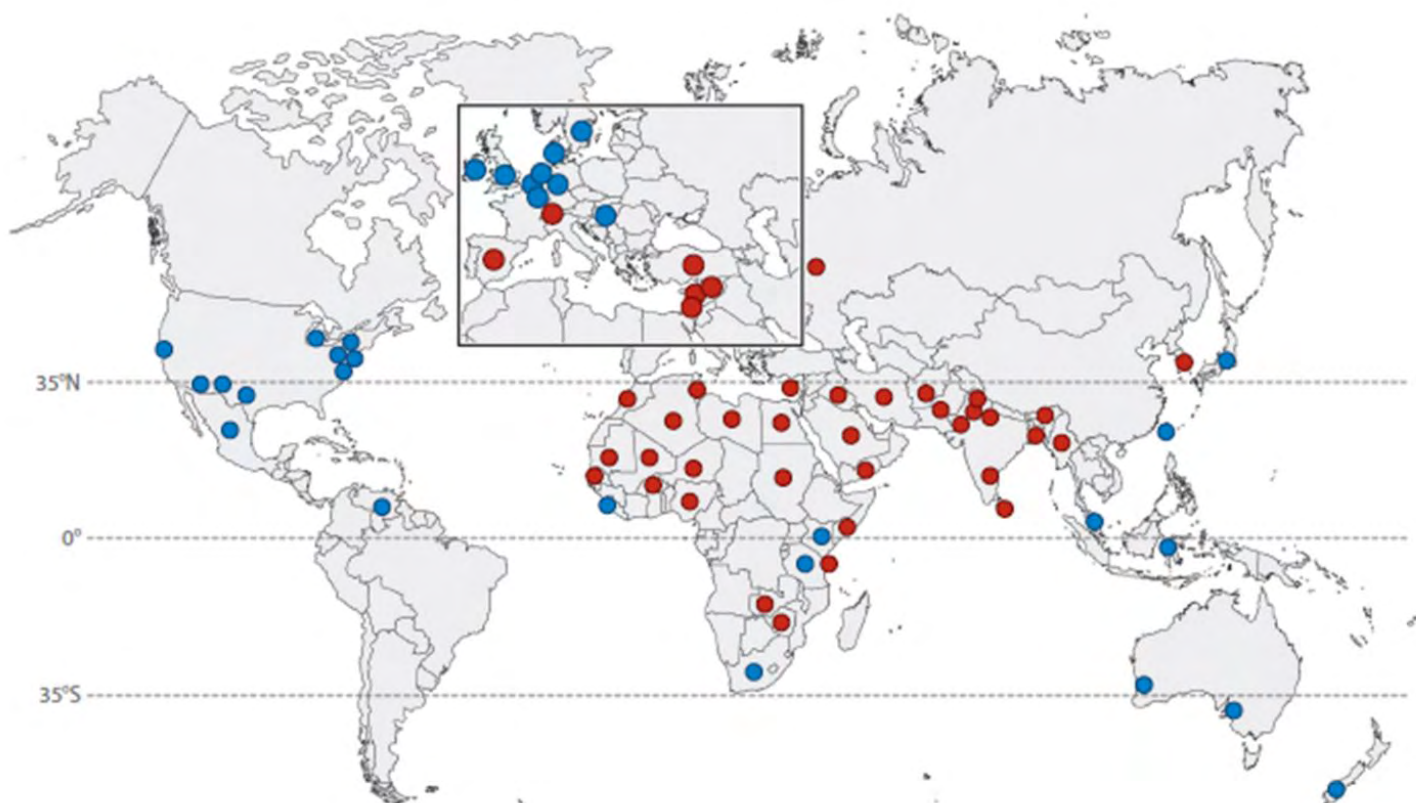
**Εικόνα 5.** Ενήλικο *T. granarium* (προσωπικό αρχείο).

#### **1.4 Γεωγραφική εξάπλωση**

Το είδος είναι ενδημικό στην Ινδία. Όπως για τα περισσότερα έντομα αποθηκών, η διασπορά του *T. granarium* έγινε μέσω του διεθνούς εμπορίου (Aitken, 1975). Καθώς είναι μορφολογικά παρόμοιο με άλλα είδη του γένους *Trogoderma*, η αναγνώριση και ο διαχωρισμός τους από αυτά είναι αρκετά δύσκολος και απαιτεί μοριακούς δείκτες και εξειδικευμένο προσωπικό (Olson et al., 2014; Sola et al., 2018).

Το έντομο βρέθηκε για πρώτη φορά στην Ευρώπη (Μ. Βρετανία) το 1920, στις ΗΠΑ (Καλιφόρνια) το 1953 ενώ στην Αυστραλία το 2007 (Mason et al., 1921, Allen and Linsley, 1954). Η τρέχουσα γεωγραφική κατανομή του εντόμου περιλαμβάνει πλήθος χωρών στην Ασία και την Αφρική, και λιγότερες στην Ευρώπη. Επιπλέον, αρκετές χώρες στην Ευρώπη, τη Βόρεια και Νότια Αμερική και την Ωκεανία έχουν ιστορικό επιβεβαιωμένων εισαγωγών του είδους (Εικόνα 6). Ο αριθμός των περιοχών στις οποίες το έντομο έχει καταγραφεί αλλά όχι εγκατασταθεί ακόμα αυξάνεται σταθερά τις τελευταίες δεκαετίες. Όλες οι χώρες, εκτός από δύο, στις οποίες το έντομο έχει εγκατασταθεί, εμπίπτουν στην περιοχή μεταξύ των 35° N και 35° S, ενώ πολλές χώρες στις οποίες στο έντομο έχει εντοπιστεί χωρίς να εγκατασταθεί, βρίσκονται εκτός αυτής της περιοχής. Αναφορές σχετικά με τις προσβολές του *T. granarium*

σε μια χώρα μπορούν να οδηγήσουν σε σοβαρούς εμπορικούς περιορισμούς (Athanassiou et al., 2019a).



**Εικόνα 6.** Χάρτης που απεικονίζει την διασπορά του εντόμου ως έχει μέχρι το 2019. Με κόκκινες κουκίδες έχουν σημειωθεί οι περιοχές στις οποίες το έντομο έχει εγκατασταθεί, ενώ με μπλε οι περιοχές στις οποίες το έντομο έχει βρεθεί αλλά δεν έχει εγκατασταθεί ακόμα (Athanassiou, 2019a).

Το *T. granarium* έχει χαρακτηριστεί ως ένα από τα 100 πιο επικίνδυνα είδη εισβολείς παγκοσμίως (Lowe et al., 2000). Παρόλου που τα έντομα αποθηκών, δεν χαρακτηρίζονται ως οργανισμοί καραντίνας λόγω της ευκολίας τους να διασπείρονται μέσω του διεθνούς εμπορίου, και της ικανότητάς να επιβιώνουν σε συνθήκες αποθήκευσης, εξαίρεση έγινε για το συγκεκριμένο έντομο. Έχει χαρακτηριστεί ως A2 οργανισμός καραντίνας από τον EPPO (OEPP/EPPO, 1981), και από άλλους οργανισμούς όπως ο CPPC, COSAVE, JUNAC, NAPPO και ο OIRSA (Botha et al., 2005). Μόλις το είδος εισέλθει σε μια νέα γεωγραφική περιοχή, μπορεί να εγκατασταθεί εύκολα λόγω της ταχείας αναπαραγωγής σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών αλλά και της αντοχής των διαπαυουσών προνυμφών στις δυσμενείς συνθήκες. Έτσι, σύμφωνα με τον EPPO, απαγορεύεται η εισαγωγή μολυσμένου σίτου και παρόμοιων σπόρων, όπως και τα προϊόντα που έχουν φτιαχτεί από αυτά, καθώς και συναφών προϊόντων από χώρες στις οποίες το είδος είναι ενδημικό, για την προστασία της εγχώριας παραγωγής σε

μια χώρα εισαγωγής και γενικά για την πρόληψη της εξάπλωσης του *T. granarium* (Athanassiou et al., 2019a). Όταν το έντομο εντοπισθεί σε μία περιοχή στην οποία έχει χαρακτηριστεί έντομο καραντίνας, ακολουθούν τα μέτρα που επιβάλλει η σχετική νομοθεσία (Εικόνα 7) (OEPP/EPPO, 1982, 1984).



Εικόνα 7. Σπίτι προσβεβλημένο από *T. granarium* στην δυτική Αυστραλία καλυμμένο με πλαστικό περίβλημα, για προετοιμασία εφαρμογής βρωμιούχου μεθυλίου (Day and White, 2016).

### 1.5 Έλεγχος και Αντιμετώπιση

Η έρευνα σε χημικές και μη χημικές μεθόδους για τον έλεγχο του *T. granarium* δεν είναι τόσο εκτεταμένη όσο για άλλα έντομα αποθηκευμένων προϊόντων, πιθανώς λόγω περιορισμών καραντίνας που εμποδίζουν την πρόσβαση από τα περισσότερα εργαστήρια σε χώρες που δεν έχει εγκατασταθεί το έντομο σε πληθυσμούς του είδους. Ως εκ τούτου, δεν υπάρχει πρόσφατη πληροφόρηση σχετικά με την αποτελεσματικότητα μερικών βασικών μεθόδων και νέων δραστικών ουσιών. Ωστόσο, η πρόσφατη έρευνα δείχνει ότι το *T. granarium* είναι ανθεκτικό σε πολλά από τα μέτρα ελέγχου που είναι συνήθως αποτελεσματικά για άλλα είδη εντόμων αποθηκευμένων προϊόντων (Athanassiou et al., 2019b).

#### 1.5.1 Εντομοκτόνα επαφής

Πλήθος δεδομένων υπάρχει για την επίδραση διάφορων εντομοκτόνων επαφής όπως οι πυρεθρίνες, τα οργανοφωσφορικά αλλά και η γη διατόμων. Τα ενήλικα φαίνεται να είναι αρκετά πιο ευαίσθητα από τις προνύμφες στην εφαρμογή των περισσότερων εντομοκτόνων επαφής. Επιπλέον, οι μεγάλες προνύμφες φαίνεται να είναι πιο ανθεκτικές από τις μικρές για τα περισσότερα εντομοκτόνα (Kavallieratos et al., 2016; Ghimire et al., 2017). Πολύ αποτελεσματικά φαίνεται να είναι το pyrimiphos methyl και το SilicoSec (γη διατόμων), τα οποία είναι ικανά να προκαλέσουν 100 % θνησιμότητα στις προνύμφες του *T. granarium* ακόμα και στη μισή από την προτεινόμενη από τον κατασκευαστή δόση (Kavallieratos et al., 2017b). Χαμηλότερα ποσοστά θνησιμότητας στις προνύμφες μπορεί να προκαλέσουν τα chlorfenapyr και a-cypermethrin (Athanassiou et al., 2015a; Kavallieratos et al., 2016; Ghimire et al., 2017). Άλλα εντομοκτόνα επαφής όπως τα spinosad, cypermethrin, beta-cyfluthrin, S-

methoprene και deltamethrin είναι ικανά να προκαλέσουν υψηλά ποσοστά θνησιμότητας στα ενήλικα αλλά όχι στις προνύμφες (Athanassiou et al., 2015a; Kavallieratos et al., 2016; Kavallieratos et al., 2017b; Ghimire et al., 2017). Λιγότερο αποτελεσματικά και για τα δύο στάδια είναι τα alpha-cypermethrin και thiametoxam, ενώ καμία αποτελεσματικότητα δεν παρουσίασε το pyriproxyfen τόσο σε ενήλικα όσο και σε προνύμφες (Athanassiou et al., 2015a; Kavallieratos et al., 2016).

### *1.5.2 Αέρια εντομοκτόνα*

Μέχρι πρόσφατα το αέριο εντομοκτόνο που χρησιμοποιούνταν για την αντιμετώπιση του συγκεκριμένου εντόμου ήταν το βρωμιούχο μεθύλιο παρά την ανθεκτικότητα την οποία το έντομο φαίνεται να παρουσίαζε σε αυτό (Bell, 1995). Η χρήση του βρωμιούχου μεθυλίου περιορίζεται σήμερα σε ειδικές περιπτώσεις καραντίνας, και ουσιαστικά αυτή η δραστική δεν χρησιμοποιείται πλέον, καθώς έχει καταργηθεί λόγω της αρνητικής επίδρασής της στο όζον (UNEP, 1997). Οι προτεινόμενες δόσεις ήταν δύο φορές μεγαλύτερες από ότι για άλλα έντομα αποθηκών (Bond, 1984). Επιπλέον η θερμοκρασία φαίνεται να είναι παράγοντας που επηρεάζει την αντοχή του εντόμου στο εντομοκτόνο αυτό. Οι διαπαύουσες προνύμφες δείχνουν μεγαλύτερη αντοχή στο βρωμιούχο μεθύλιο όταν η θερμοκρασία είναι σχετικά υψηλή, ενώ το αντίθετο φαίνεται να ισχύει για τη φωσφίνη (Lindgren and Vincent, 1960). Άλλα ουσίες που έχουν δείξει πιθανή αποτελεσματικότητα είναι οι acrylonitrile, ethylene chlorobromide, ethylene dibromide, ethylene oxide και hydrocyanic acid κανένα όμως από τα παραπάνω δεν είναι πλέον εγκεκριμένο για εφαρμογή (Lindgren et al., 1955).

Αυτό αφήνει τη φωσφίνη ως πρακτικά το μόνο οικονομικό εντομοκτόνο αέριο εντομοκτόνο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διάφορους τύπους εγκαταστάσεων και προϊόντων για τον έλεγχο αυτού του είδους. Τα στοιχεία που υπάρχουν για την επίδραση της φωσφίνης στο συγκεκριμένο έντομο, είναι ελάχιστα. Για να είναι η φωσφίνη αποτελεσματική σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του εντόμου, προϋπόθεση είναι η θερμοκρασία να είναι μεγαλύτερη από 15 °C (Hole et al., 1976). Το πιο ανθεκτικό στάδιο ανάπτυξης στην επίδραση της φωσφίνης είναι αυτό του αυγού (Bell and Wilson, 1995) και ακολουθεί το στάδιο της προνύμφης. Πειράματα που έγιναν σε διαπαύουσες προνύμφες έδειξαν ότι όσο μεγαλύτερος ήταν ο χρόνος που βρίσκονται σε διάπαυση οι προνύμφες, τόσο μεγαλύτερη ήταν η αντοχή των εντόμων στην φωσφίνη (Bell et al., 1984).

### *1.5.3 Ελεγχόμενες ατμόσφαιρες*

Οι ελεγχόμενες ατμόσφαιρες αποτελούν μία εναλλακτική μέθοδο αντιμετώπισης για διάφορα έντομα αποθηκών (Bailey and Banks, 1980). Η σύνθεση του ατμοσφαιρικού αέρα

μεταβάλλεται είτε με προσθήκη CO<sub>2</sub> ή N<sub>2</sub> ή αφαιρώντας O<sub>2</sub>. Υπάρχουν αρκετά στοιχεία τα οποία επαληθεύουν ότι το χαμηλό οξυγόνο ή το αυξημένο διοξείδιο του άνθρακα μπορούν να ελέγξουν με επιτυχία τον *T. granarium* (Spratt et al. 1985, Vassilakos et al. 2019). Σύμφωνα με έρευνα που αφορά την επίδραση ελεγχόμενων συνθηκών ατμόσφαιρας στο *T. granarium*, ποσοστό 60% CO<sub>2</sub> και 8% O<sub>2</sub> είναι ικανά να θανατώσουν ενήλικα και προνύμφες σε λιγότερο από 17 ημέρες (Bailey, 1976). Με την αύξηση του οξυγόνου όμως στο 21% παρατηρείται σημαντικό ποσοστό επιβίωσης των προνυμφών, οι οποίες αποτελούν και το πιο ανθεκτικό στάδιο, ακόμα και 18 ημέρες μετά. Έτσι, για τον έλεγχο του εντόμου σημαντικότερος παράγοντας φαίνεται να αποτελεί η μείωση των επιπέδων οξυγόνου παρά η αύξηση του CO<sub>2</sub> (Spratt et al., 1985). Επιπλέον οι Lindgren and Vincent (1970) ανέφεραν μικρότερη αποτελεσματικότητα όταν το CO<sub>2</sub> βρίσκεται στο 100% της ατμόσφαιρας σε σύγκριση ποσοστά 60%-80% CO<sub>2</sub>. Πολύ αποτελεσματική στον έλεγχο του εντόμου φαίνεται να είναι και η αύξηση του N<sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα, καθώς όλα τα στάδια του εντόμου θανατώθηκαν σε λιγότερο από 5 ημέρες έκθεσης, σε συνθήκες με 100% άζωτο (Williams et al., 1980). Σε χαμηλότερα ποσοστά N<sub>2</sub> βέβαια (75%) χρειάστηκαν 15 ημέρες έκθεσης για την θανάτωση όλων των σταδίων (Al-Hadidi, 2002).

#### 1.5.4 Ακραίες θερμοκρασίες

Το *T. granarium* είναι ίσως το πιο ανθεκτικό είδος εντόμων αποθηκευμένων προϊόντων στο ψύχος, παρά την υποτροπική του προέλευση (Wilches, 2016). Το πιο ανθεκτικότερο στάδιο του εντόμου τόσο σε υψηλές όσο και σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι η διαπαύουσα προνύμφη (Fields, 1992). Ο χρόνος που απαιτείται για να θανατωθούν οι διαπαύουσες στους -15° C εκτιμήθηκε στις 70 ημέρες ενώ ο αντίστοιχος χρόνος στους -15 ° C είναι οι 15 ημέρες στους -20° C (Wilches et al., 2016). Επιπλέον η θερμοκρασία εκτροφής των διαπαύουσων προνυμφών φαίνεται να επηρεάζει την αντοχή τους στο κρύο καθώς προνύμφες των οποίων η διάπαυση έγινε στους 15 °C φάνηκε να είναι πιο ανθεκτικές από αυτές στους 32 °C, όταν εκτέθηκαν στους -11 °C (Lindgren and Vincent, 1960).

Η έκθεση των περισσότερων ειδών εντόμων σε θερμοκρασία 50 °C, επιφέρει 100 % θάνατο σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα (ώρες ή και λιγότερο από μια ώρα) (Fields et al., 2002). Σημαντικά υψηλότερες θερμοκρασίες και μεγαλύτερα διαστήματα έκθεσης απαιτούνται όμως για τον έλεγχο του *T. granarium*. Οι διαπαύουσες προνύμφες βρέθηκαν να είναι το στάδιο με την μεγαλύτερη αντοχή στις υψηλές θερμοκρασίες (Wilches et al., 2016). Ο χρόνος έκθεσης που εκτιμήθηκε για να επιτευχθεί πλήρης έλεγχος των διαπαουσών προνυμφών ήταν 397 ώρες στους 45 °C, 7 ώρες στους 50 °C και 1.2 ώρες στους 60 °C (Wilches, 2016). Ως εκ τούτου, μια θερμική εφαρμογή για τον έλεγχο του *T. granarium* σε ένα σφραγισμένο και μονωμένο θάλαμο

θα πρέπει να είναι 50 °C ή υψηλότερη για αρκετές ώρες. Η αντοχή του *T. granarium* σε ακραίες θερμοκρασίες δημιουργεί σοβαρές προκλήσεις στον έλεγχο του με τη χρήση τυπικών μεταχειρίσεων θέρμανσης και ψύχους.

#### 1.5.5 Βιολογική καταπολέμηση

Με τις βιολογικές μεθόδους καταπολέμησης ο έλεγχος των εχθρών των αποθηκευμένων προϊόντων γίνεται μέσω της εγκατάστασης και ενσωμάτωσης φυσικών εχθρών στο σύστημα της αποθήκης. Οι φυσικοί εχθροί μπορεί να είναι διάφορα αρπακτικά, παρασιτοειδή ή παθογόνα του οργανισμού στόχου (Athanassiou and Arthur, 2018). Τα στοιχεία που υπάρχουν για την επίδραση των βιολογικών παραγόντων στο συγκεκριμένο έντομο είναι ελάχιστα αλλά αρκετά ελπιδοφόρα για τον έλεγχο του εντόμου.

Σύμφωνα με τον Al-Kirshi (1997) το παρασιτοειδές *Laelius pedatus* (Say) (Hymenoptera: Bethyridae) είναι κατάλληλο για τον έλεγχο του *T. granarium* καθώς έχει προκαλέσει 75-80% μείωση του πληθυσμού, σε λιγότερο από 8 εβδομάδες. Στελέχη του μύκητα *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales) προκάλεσαν 100 % θνησιμότητα σε προνύμφες του *T. granarium* μέσα σε 10 ημέρες, ενώ η επίδρασή τους στα ενήλικα δεν ήταν σημαντική (Khashaveh, 2011). Τέλος πολύ άμεσα αποτελέσματα μπορεί να επιφέρει ο νηματώδης *Steinernema masoodi* (Ali, et al., 2005) (Rhabditida: Steinernematidae), καθώς προκάλεσε 100 % θνησιμότητα στα ενήλικα του εντόμου σε διάστημα 48 ωρών (Ali et al., 2005).

#### 1.6 Ανθεκτικότητα

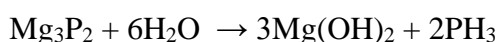
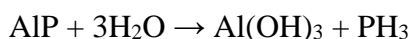
Το *T. granarium* έχει αναπτύξει ανθεκτικότητα σε διάφορα εντομοκτόνα επαφής όπως το malathion, το deltamethrin, το dichlorvos και το pirimiphos-methyl (Pasek, 1998, Champ and Dyte, 1976, Kumar, 2010). Επιπλέον σύμφωνα με τους Champ and Dyte (1976) έχουν καταγραφεί ανθεκτικοί πληθυσμοί στη φωσφίνη. Πιο πρόσφατα ευρήματα επαληθεύουν την ύπαρξη ανθεκτικών πληθυσμών στη φωσφίνη σε διάφορες χώρες (Borah and Chahal 1979; Bell and Wilson 1995, Ahmedani et al. 2007, Benhalima et al. 2004, Bell et al. 1984). Επιπλέον, υπάρχουν μελέτες που αποδεικνύουν την αδυναμία ελέγχου πληθυσμών *T. granarium* στην Ασία (Πακιστάν) σε περιοχές που συνήθως δεν αντιμετωπίζονται με αυτό το αέριο, υποδηλώνοντας ότι αυτή η ανθεκτικότητα μπορεί να είναι ένα φυσικό φαινόμενο και όχι μια γενετικά συνδεδεμένη ανθεκτικότητα (Ahmedani et al. 2007, Shakoori et al. 2016). Τα ποσοστά θνησιμότητας ατόμων που έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στη φωσφίνη έχει βρεθεί να είναι 5-12%, δηλαδή πολύ χαμηλά σε σύγκριση με τους ευαίσθητους πληθυσμούς (Borah and Chahal, 1976). Τέλος, το *T. granarium* φαίνεται να έχει αναπτύξει ανθεκτικότητα και στο

βρωμιούχο μεθύλιο του οποίου οι απαιτούμενες δόσεις για την θανάτωση του εντόμου είναι δύο φορές μεγαλύτερες σε σχέση με άλλα έντομα αποθηκών (Bond, 1984).

Αυτό θέτει σοβαρούς προβληματισμούς για τον έλεγχο του συγκεκριμένου εντόμου. Καθώς αποτελεί έντομο καραντίνας, επιτακτική είναι η ανάγκη για περαιτέρω έρευνα, σχετικά με την ανάπτυξη ανθεκτικότητας.

### 1.7 Φωσφίνη

Η φωσφίνη είναι άχρωμο αέριο με χαρακτηριστική οσμή σκόρδου. Το ειδικό βάρος της φωσφίνης είναι 1,17 (17% βαρύτερο από τον αέρα) (Chaudhry, 1997). Καθώς έχει πυκνότητα παρόμοια με εκείνη του αέρα και εξαπλώνεται ταχύτατα. Συνεπώς, ο υποκαπνισμός με φωσφίνη, δεν απαιτεί κάποιο σύστημα κυκλοφορίας για διανομή εντός του χώρου απολύμανσης (Weast, 1987). Στην πραγματικότητα λέγοντας φωσφίνη εννοούμε το φωσφορούχο υδρογόνο. Το φωσφορούχο υδρογόνο είναι το προϊόν αντίδρασης του φωσφορούχου αργιλίου (AIP) ή του φωσφορούχου μαγνησίου ( $Mg_3P_2$ ) με το νερό (υγρασία) του αέρα. Παρακάτω φαίνονται οι αντιδράσεις της φωσφίνης:



Κύρια παράγωγα της φωσφίνης από την οξείδωση της με το νερό είναι το υποφωσφορικό και το φωσφορικό οξύ (Wazer, 1958). Σε συνθήκες υψηλής υγρασίας μπορεί να προκαλέσει οξείδωση μετάλλων και ιδιαίτερα του χαλκού (Fluck, 1973). Η φωσφίνη είναι θερμικά σταθερή στις θερμοκρασίες του περιβάλλοντος και αποσυντίθεται μόνο όταν θερμαίνεται πάνω από 550 °C (Bond, 1984). Η φωσφίνη είναι ισχυρός αναστολέας της παραγωγής ενέργειας του κυττάρου. Παρεμβαίνει στην μεταφορά ηλεκτρονίων στο σύμπλοκο III, στην αντίδραση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια. Με τον τρόπο αυτό προκαλείται εξάντληση και στην συνέχεια θάνατος στο έντομο (Chefurka et al., 1975).

Η επίδρασή της στα έντομα αποθηκευμένων προϊόντων έχει μελετηθεί εκτενώς (Hole et al., 1976; Athanassiou et al., 2019a). Η φωσφίνη είναι πιο αποτελεσματική για τον έλεγχο των εντόμων αποθηκευμένων προϊόντων περισσότερο σε υψηλές παρά σε χαμηλές θερμοκρασίες. Αυτό πιθανόν οφείλεται στους χαμηλότερους μεταβολικούς δείκτες που έχουν τα έντομα σε χαμηλές θερμοκρασίες, αλλά και στη μη πλήρη αντίδραση του φωσφορούχου αργιλίου ή μαγνησίου για την παραγωγή του αερίου. Για να είναι αποτελεσματική η εφαρμογή της σε θερμοκρασία μικρότερη από 15 °C θα πρέπει να γίνει για χρόνο έκθεσης που ξεπερνά τη μια εβδομάδα (Hole et al., 1976). Επιπλέον, ο χρόνος έκθεσης φαίνεται να είναι σημαντικότερος παράγοντας από τη συγκέντρωση της φωσφίνης (Howe, 1973; Winks, 1984). Η φωσφίνη δεν αφήνει υπολείμματα και δεν επηρεάζει την ποιότητα των σπόρων (Lee, 1991). Έτσι είναι το

πιο συχνά χρησιμοποιούμενο αέριο εντομοκτόνο αντικαθιστώντας πολλά άλλα εντομοκτόνα (Halliday et al., 1983; Wang et al., 2006). Παρόλα αυτά, η εκτεταμένη χρήση της φωσφίνης, σε συνδυασμό με τις κακές πρακτικές υποκαπνισμού, συνέβαλε στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε αρκετά σημαντικά είδη εντόμων αποθηκευμένων προϊόντων (Daglish, 2008; Nayak et al., 2013; Agrafioti et al., 2019). Αρκετές περιπτώσεις ανθεκτικότητας στη φωσφίνη, έχουν καταγραφεί σε πολλές περιοχές της υφελίου. Στις ΗΠΑ, οι Opit et al. (2012) εντόπισαν ανάπτυξη ανθεκτικότητας στη φωσφίνη σε πληθυσμό του *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae) αλλά και του *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). Ανθεκτικοί πληθυσμοί του *R. dominica* έχουν βρεθεί επίσης σε Κίνα, Ινδία και Αυστραλία (Rajendran and Narasimhan, 1994; Song et al., 2011; Collins et al., 2005). Σύμφωνα με άλλες πρόσφατες έρευνες, ανθεκτικότητα στην φωσφίνη έχουν αναπτύξει πληθυσμοί των *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) (Holloway et al., 2016), *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae) (Pimentel and Guedes, 2010) και *Lasioderma serricorne* (F.) (Coleoptera: Anobiidae) (Saglam et al., 2015).

### 1.8 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το *T. granarium* αποτελεί ένα μεγάλο κίνδυνο για τα αποθηκευμένα δημητριακά. Η έλλειψη επαρκών στοιχείων για την αντιμετώπισή του το καθιστά ακόμα πιο επικίνδυνο. Η φωσφίνη αποτελεί το κύριο μέσο απεντόμωσης αποθηκευμένων προϊόντων τις αποθήκες και στις μονάδες επεξεργασίας τροφίμων, για ένα ευρύ φάσμα αποθηκευμένων προϊόντων (Daglish, 2004; Wang et al., 2006). Σημαντικό είναι λοιπόν να αξιολογηθεί η επίδρασή της και για το συγκεκριμένο έντομο.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να παρέχει στοιχεία αποτελεσματικότητας της φωσφίνης για το είδος αυτό, με σκοπό την αξιοποίησή τους σε πρωτόκολλα χρήσης της για την καταπολέμηση του είδους. Για το λόγο αυτό αρχικά θα πρέπει να γνωρίζουμε τις απαιτούμενες συγκεντρώσεις που είναι ικανές να θανατώσουν το κάθε στάδιο του εντόμου, συμπεριλαμβανομένου του σταδίου της διαπαύουσας προνύμφης της οποίας ο έλεγχος αποτελεί πρόκληση. Επίσης σημαντικό είναι να δούμε πως η άμεση επίδραση της φωσφίνης στο έντομο, επηρεάζει την καθυστερημένη επίδραση, δηλ. όχι μόνο πως επηρεάζονται τα έντομα όταν εκτεθούν στη φωσφίνη, αλλά και ενώ η έκθεση έχει σταματήσει. Για το λόγο αυτό, ένα ακόμα στοιχείο που πρέπει να γνωρίζουμε είναι ο χρόνος ακινητοποίησης των κινητών σταδίων του εντόμου, δηλαδή των ενηλίκων και των προνυμφών. Τέλος, απαραίτητο είναι να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα των κλασικών πρωτοκόλλων εφαρμογής, που χρησιμοποιούνται για άλλα έντομα αποθηκών.



## ΔΕΥΤΕΡΟ ΜΕΡΟΣ- Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1. Έντομα

Η εκτροφή του *T. granarium* έγινε σε μαλακό σιτάρι σε γυάλινα βάζα του 1 l τα οποία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ο οποίος ήταν ρυθμισμένος στους 32°C, 65% ΣΥ και συνεχές σκότος. Ο διαχωρισμός των ενηλίκων, των προνυμφών και των νυμφών από το σιτάρι έγινε με κόσκινο 850 μm (Woven Wire Sieve, Endecotts Ltd, UK). Στη συνέχεια η διαλογή του κάθε σταδίου έγινε με μαλακό πινέλο ζωγραφικής (Lineo, No.1, Mesko-Pinsel GmbH, Germany).

Για τη συλλογή των αυγών, μια μικρή ποσότητα αλευριού, περίπου 100 g κοσκινίστηκε με κόσκινο διαμέτρου 212 μm (Microplate Sieve, Woven Wire Sieve, Endecotts Ltd, UK) και τοποθετήθηκε σε γυάλινο βάζο των 500 ml (Εικόνα 8). Στη συνέχεια 100 ενήλικα άτομα, χωρίς να γίνει διαχωρισμός φύλου και ηλικίας, μεταφέρθηκαν στο ίδιο βάζο το οποίο τοποθετήθηκε στις ίδιες συνθήκες όπως και παραπάνω. Μετά από χρονικό διάστημα δύο ημερών, τα αυγά διαχωρίστηκαν από το αλεύρι με τη χρήση κόσκινου 212 μm, αφού πρώτα είχαν αφαιρεθεί τα ενήλικα με κόσκινο διαμέτρου 850 μm (Εικόνα 8). Τα αυγά στη συνέχεια συλλέχθηκαν με μαλακό πινέλο ζωγραφικής μίας τρίχας, και τοποθετήθηκαν σε γυάλινο φιαλίδιο των 5 ml με μία μικρή ποσότητα κοσκινισμένου αλευριού. Για την επίτευξη της διάπαυσης των προνυμφών αρχικά χίλιες προνύμφες συλλέχθηκαν και μεταφέρθηκαν σε γυάλινα βάζα του 1 l, με μία μικρή ποσότητα τροφής (μαλακό σιτάρι). Επιπλέον μέσα στο βάζο τοποθετήθηκαν μικρά κομμάτια χαρτονιού (Εικόνα 9). Το βάζο τοποθετήθηκε για τέσσερις ημέρες στους 25° C και στη συνέχεια μεταφέρθηκε για δύο εβδομάδες στους 20° C και μετά για τρεις εβδομάδες στους 15° C (Εικόνα 9). Οι διαπαύουσες προνύμφες εισήλθαν στα κομμάτια του χαρτονιού και τα έντομα συλλέχθηκαν από αυτά με μαλακό πινέλο ζωγραφικής.



**Εικόνα 8.** Αριστερά: κόσκινα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για το διαχωρισμό των αυγών από τα ενήλικα και το αλεύρι, στο κέντρο: βάζο στο οποίο τοποθετήθηκαν τα ενήλικα, δεξιά: αυγά *T. granarium* (προσωπικό αρχείο).



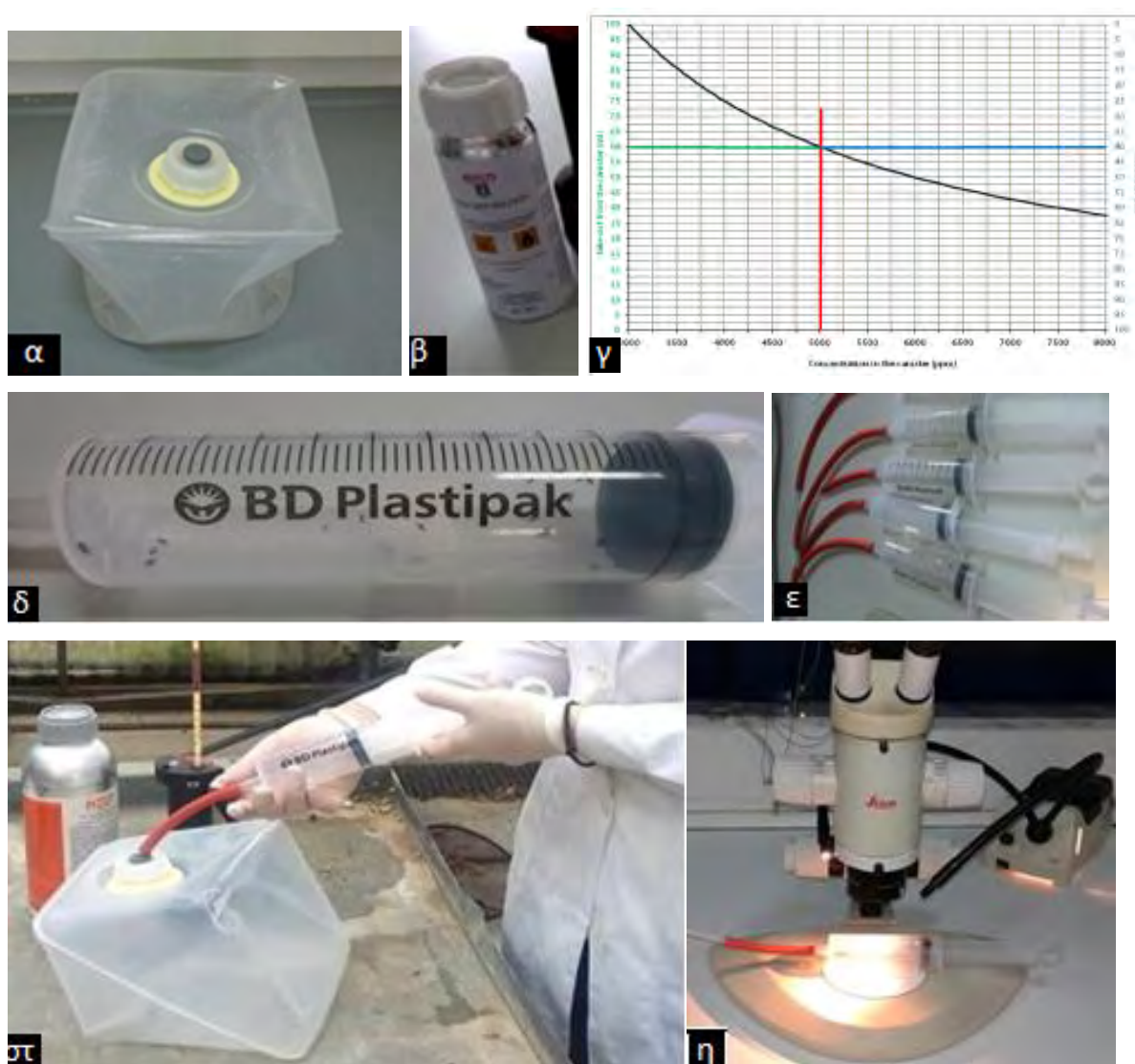
**Εικόνα 9.** Αριστερά: βάζο με διαπαύουσες προνύμφες, στο κέντρο: θάλαμος 15° C, Δεξιά: διαπαύουσες προνύμφες *T. granarium* (προσωπικό αρχείο).

## 2.2 1<sup>η</sup> Βιοδοκιμή - Πρωτόκολλο DDPTTK

Το πρώτο πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το τεστ ανθεκτικότητας Detia Degesch Phosphine Tolerance Test Kit (DDPTTK, Detia Degesch GmbH, Laudenbach, Germany) και χρησιμοποιήθηκε το αντίστοιχο πακέτο εξοπλισμού (Agrarioti et al., 2019). Σε κάνιστρο των 5 λίτρων (Εικόνα 10α) τοποθετήθηκαν 50 ml νερού και στη συνέχεια δύο δισκία φωσφίνης από το πακέτο (Εικόνα 10β). Τα στάδια ανάπτυξης τα οποία εξετάστηκαν σε αυτή τη βιοδοκιμή ήταν αυτά της μη διαπαύουσας προνύμφης και του ακμαίου. Δέκα άτομα από το κάθε στάδιο τοποθετήθηκαν μέσα σε σύριγγα των 100 ml (Εικόνα 10δ). Στη συνέχεια για την επίτευξη της επιδιωκόμενης συγκέντρωσης, η σύριγγα γέμισε με φωσφίνη από το κάνιστρο και συμπληρώθηκε με αέρα στην κατάλληλη αναλογία σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Εικόνα 10στ.). Η επιδιωκόμενη συγκέντρωση φωσφίνης για τη συγκεκριμένη βιοδοκιμή ήταν τα 3000 ppm. Σύριγγες με έντομα, στις οποίες εισάχθηκε μόνο αέρας χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Για τη διεκπεραίωση της βιοδοκιμής πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις και τρεις υπο-επαναλήψεις.

Ο έλεγχος και καταγραφή της κατάστασης των εντόμων γινόταν κάθε δύο λεπτά για χρονικό διάστημα μέχρις ότου να είναι στο σύνολό τους ακινητοποιημένα. Έτσι, κατά το διάστημα αυτό, τα έντομα αξιολογήθηκαν και κατατάχθηκαν ως ακινητοποιημένα και μη ακινητοποιημένα. Ως ακινητοποιημένα κρίθηκαν τα έντομα των οποίων η κίνηση είχε αποκλίσεις από το φυσιολογικό, δηλαδή δεν είχαν φυσιολογική βάδιση και κίνηση σε σύγκριση με το μάρτυρα. Μετά το πέρας του διαστήματος αυτού τα έντομα μεταφέρθηκαν σε τρυβλία εμβαδού 63.61 cm<sup>2</sup>, διαμέτρου 9 cm και ύψους 15 mm, με μία μικρή ποσότητα τροφής (σιτάρι). Καταγραφή της κατάστασής τους έγινε ύστερα από 7 και 14 ημέρες από τη μεταφορά τους. Για

τα ενήλικα καταγράφηκε αν είναι ακινητοποιημένα ή μη ακινητοποιημένα, ενώ για τις προνύμφες σημειώθηκε επιπλέον το στάδιο ανάπτυξης που βρισκόταν, για ζωντανά και νεκρά άτομα.



**Εικόνα 10.** α) κάνιστρο, β) δισκία φωσφίνης, γ) πίνακας υπολογισμού συγκέντρωσης, δ) σύριγγα με άτομα του εντόμου εντός, ε) σύριγγες, στ) εξαγωγή φωσφίνης από το κάνιστρο, η) αξιολόγηση κατάστασης εντόμων στο στερεοσκόπιο (από προσωπική συλλογή υποψήφιας διδάκτορα Αγραφιώτη Παρασκευής).

### 2.3 2<sup>η</sup> Βιοδοκιμή- Πρωτόκολλο DDPTTK για 90 λεπτά

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε βασίστηκε και πάλι στο DDPTTK. Η παραγωγή και η μέτρηση της φωσφίνης έγινε με τον τρόπο που περιεγράφηκε παραπάνω. Σε αυτή την βιοδοκιμή ενήλικα και μη διαπαύουσες προνύμφες εκτέθηκαν για 90 λεπτά στα 3000 ppm φωσφίνης. Μετά το πέρας του διαστήματος αυτού έγινε καταγραφή της κατάστασης των

εντόμων ως ακινητοποιημένα και μη ακινητοποιημένα. Στη συνέχεια, τα έντομα μεταφέρθηκαν σε τρυβλία, όπως και παραπάνω. Καταγραφή της κατάστασής τους έγινε ύστερα από 7 και 14 ημέρες μετά την έκθεση, με το ίδιο τρόπο όπως και στην πρώτη βιοδοκιμή για ενήλικα και προνύμφες αντίστοιχα. Για τη διεκπεραίωση της βιοδοκιμής πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις και τρεις υπο-επαναλήψεις.

#### *2.4 3<sup>η</sup> Βιοδοκιμή- Πρωτόκολλο FAO*

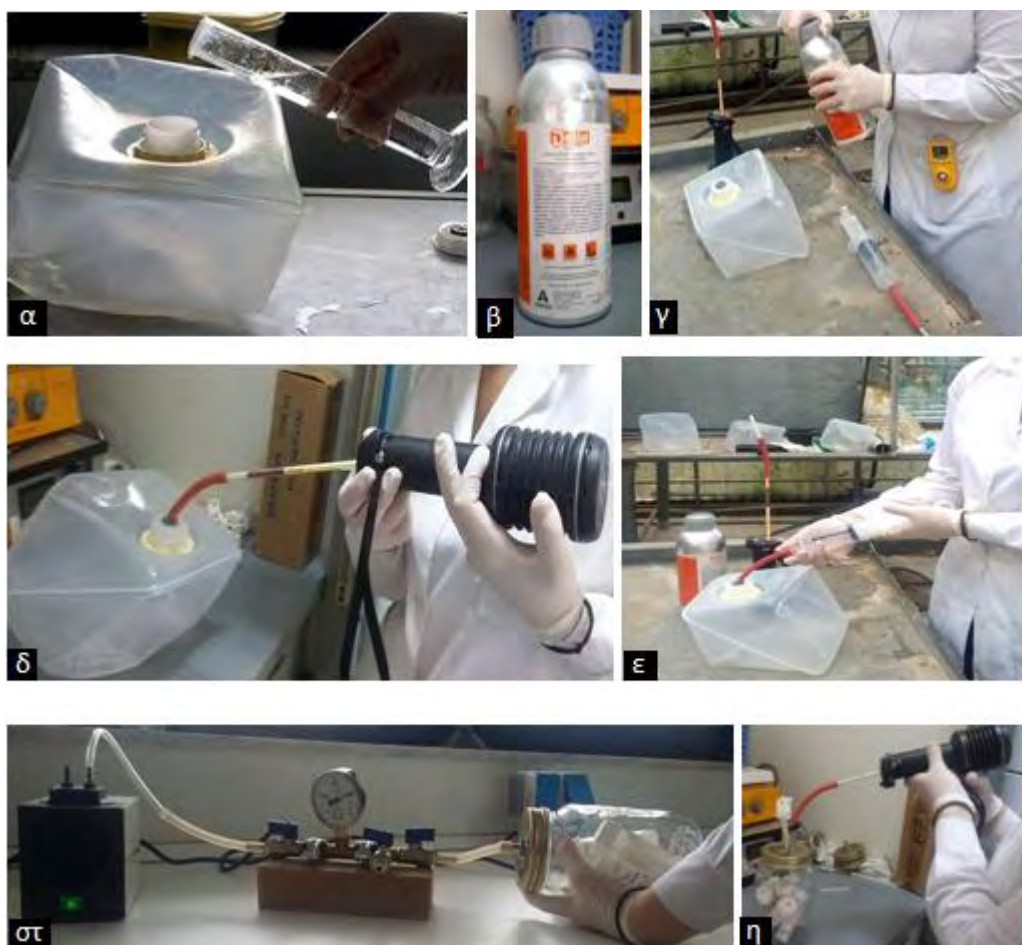
Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το πρότυπο πρωτόκολλο του FAO ως έχει περιγραφεί στο FAO Plant Protection Bulletin (Food and Agriculture Organization, 1975). Τα άτομα του υπό εξέταση πληθυσμού εκτέθηκαν στα 30 ppm φωσφίνης για 20 ώρες. Σε αυτή τη βιοδοκιμή εξετάστηκαν όλα τα στάδια του εντόμου. Η παραγωγή φωσφίνης έγινε με τον τρόπο που προαναφέρθηκε. Δέκα άτομα από το κάθε στάδιο, εκτός από αυτό των αυγών τοποθετήθηκαν σε κυλινδρικά φιαλίδια (διαμέτρου 2.5 cm, ύψους 9 cm, Scintillation vials made from PP with PE foam seal, PET, DWK Life Sciences, GmbH) με τούλι στο καπάκι. Τα αυγά τοποθετήθηκαν σε φιαλίδιο των 5ml (διαμέτρου 1.3 cm, 4 cm ύψος, Glass vials with rolled rim ROTILABO ND18/ND22, ROTH SELECTION, GmbH). Στη συνέχεια τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν σε γυάλινα βάζα του ενός λίτρου τα οποία στη συνέχεια ελέγχθηκαν για τυχόν διαρροές (εικόνα 18.στ). Στο καπάκι είχε δημιουργηθεί οπή στην οποία κολλήθηκε με ηλεκτροκόλληση μεταλλικός σωλήνας μήκους 5 cm και διαμέτρου 0.5 cm. Στους μικρούς αυτούς σωλήνες προστέθηκε ένα μικρό κομμάτι σιλικόνης στο οποίο τοποθετήθηκε ειδικό κλιπ με το οποίο το βάζο σφραγίστηκε.

Η μέτρηση και ο υπολογισμός της συγκέντρωσης φωσφίνης έγινε όπως και στις προηγούμενες βιοδοκιμές. Η εξαγωγή της φωσφίνης από το κάνιστρο έγινε με σύριγγα 100 ml. Στη συνέχεια η φωσφίνη μεταφέρθηκε στα βάζα, με διάτρηση στο σημείο της σιλικόνης (Εικόνα 11η). Τα βάζα μεταφέρθηκαν σε θάλαμο στους 28 °C και 65% ΣΥ για 20 ώρες. Ύστερα από το πέρας του διαστήματος αυτού έγινε αποσφράγιση και αερισμός των βάζων σε εξωτερικό χώρο. Τα στάδια του ακμαίου και της προνύμφης αξιολογήθηκαν ως ακινητοποιημένα και μη ακινητοποιημένα, ενώ τα υπόλοιπα στάδια τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με μία μικρή ποσότητα τροφής για να αξιολογηθούν ύστερα από 7 και 14 ημέρες. Για τη διεκπεραίωση της βιοδοκιμής πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις και τρεις υπο-επαναλήψεις.

#### *2.5 4<sup>η</sup> Βιοδοκιμή- Τροποποιημένο πρωτόκολλο FAO*

Στη συγκεκριμένη βιοδοκιμή ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του FAO, με κάποιες παραλλαγές. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν ακριβώς η ίδια με τη διαφορά πως όλα τα άτομα εκτέθηκαν για τρεις ημέρες στα 50, 100, 200, 500 και 1000 ppm. Επίσης, για όλα τα

στάδια μικρή ποσότητα τροφής (κοσκινισμένο αλεύρι για τα αυγά και μαλακό σιτάρι για όλα τα υπόλοιπα στάδια) τοποθετήθηκε στα φιαλίδια, όταν τοποθετήθηκαν σε αυτά και τα έντομα.



**Εικόνα 11.** α) εισαγωγή νερού στο κάνιστρο, β) σκεύασμα φωσφίνης, γ) τοποθέτηση δισκίων εντός του κάνιστρώ, δ) μέτρηση ppm φωσφίνης, ε) εξαγωγή φωσφίνης από το κάνιστρο, στ) έλεγχος απωλειών των βάζων, η) εισαγωγή φωσφίνης στο βάζο (από προσωπική συλλογή υποψήφιας διδάκτορα Αγραφιώτη Παρασκευής).

## 2.6. Στατιστική ανάλυση

Η επεξεργασία δεδομένων έγινε με το στατιστικό πακέτο SPSS version 25.0 software (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Για την 1<sup>η</sup> βιοδοκιμή εφαρμόστηκε Probit-Analysis με σκοπό την εύρεση των τιμών  $LT_{50}$ ,  $LT_{95}$  και  $LT_{99}$  για ενήλικα και προνύμφες οι οποίες εκτέθηκαν στα 3000 ppm φωσφίνης. Επιπλέον, έγινε  $t$ -test με σκοπό τη σύγκριση της καθυστερημένης επίδρασης της φωσφίνης σε ενήλικα και προνύμφες για 7 και 14 ημέρες μετά την εφαρμογή. Το  $t$ -test χρησιμοποιήθηκε επίσης για την σύγκριση της επίδρασης της

φωσφίνης στην ανάπτυξη προνυμφών που επιβίωναν από την έκθεση, σε σχέση με αυτές που δεν εκτέθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας.

Για την 2<sup>η</sup> βιοδοκιμή εφαρμόστηκε t-test με σκοπό τη σύγκριση των μέσων όρων των ακινητοποιημένων εντόμων των υπό εξέταση σταδίων δηλαδή, ενηλίκων και προνυμφών, τα οποία εκτέθηκαν στα 3000 ppm φωσφίνης για 90 λεπτά. Η σύγκριση έγινε για την κάθε αξιολόγηση ξεχωριστά, δηλ. αμέσως μετά την έκθεση και ύστερα από 7 και 14 ημέρες από την έκθεση.

Για την 3<sup>η</sup> βιοδοκιμή οι μέσοι όροι θνησιμότητας για το κάθε στάδιο συγκρίθηκαν μεταξύ τους σε ανάλυση διακύμανσης (ANOVA). Ομοίως, και για την 4<sup>η</sup> βιοδοκιμή, οι μέσοι όροι θνησιμότητας για κάθε στάδιο του εντόμου, σε κάθε συγκέντρωση (50, 100, 200, 500, 1000 ppm) και χρονικό διάστημα, υποβλήθηκαν σε ανάλυση διακύμανσης (ANOVA), προκειμένου να εντοπιστούν οι διαφορές τις επίδρασης μεταξύ των διάφορων συγκεντρώσεων φωσφίνης στο κάθε στάδιο, για την κάθε αξιολόγηση.

Σε όλες τις περιπτώσεις, οι πολλαπλές συγκρίσεις των μέσων όρων έγιναν σύμφωνα με το κριτήριο Tukey-Kramer HSD σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ( $P < 0.05$ ). Επιπλέον, για την εύρεση των τιμών για  $LC_{50}$ ,  $LC_{95}$  και  $LC_{99}$  για αυγά τα οποία εκτέθηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις φωσφίνης για 3 ημέρες πραγματοποιήθηκε Probit-Analysis.

## **ΤΡΙΤΟ ΜΕΡΟΣ- Αποτελέσματα**

### **3.1 1<sup>η</sup> Βιοδοκιμή- DDPTTK**

Η εκτέλεση του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου έδειξε, πως ανάμεσα στα δύο κινητά στάδια του εντόμου, οι μη διαπαύουσες προνύμφες παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντοχή στην φωσφίνη. Ο απαιτούμενος χρόνος για την ακινητοποίηση όλων των ατόμων στις προνύμφες έφτασε ακόμα και τα 20 λεπτά, διπλάσιο χρόνο δηλαδή από αυτόν που απαιτήθηκε για τα ενήλικα. Ύστερα από υποβολή των δεδομένων σε ανάλυση Probit το  $LT_{99}$  ήταν 8.9 και 15.9 λεπτά για ενήλικα και προνύμφες, αντίστοιχα (Πίνακας 1). Ένα σημαντικό ποσοστό επιβίωσης σημειώθηκε για τα ενήλικα 7 ημέρες μετά την έκθεση, το οποίο οδηγήθηκε σε πλήρη θνησιμότητα ύστερα από 14 ημέρες από την έκθεση. Αντίθετα, υψηλό ποσοστό επιβίωσης προνυμφών σημειώθηκε 7 αλλά και 14 ημέρες μετά από την έκθεση (Πίνακας 2). Σε ό,τι αφορά την επίδραση της φωσφίνης στην ανάπτυξη των προνυμφών που επιβίωσαν, δεν φάνηκε να υπάρχει σημαντική διαφορά σε σύγκριση με το μάρτυρα τόσο στις 7 όσο και στις 14 ημέρες (Πίνακας 3).

**Πίνακας 1.** Probit analysis για LT<sub>50</sub>, LT<sub>95</sub> και LT<sub>99</sub> (διαστήματα εμπιστοσύνης) ενηλίκων και προνυμφών ύστερα από έκθεση στα 3000 ppm φωσφίνης για το *T. granarium*, εκφρασμένο ως λεπτά για ακινητοποίηση χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο DDTTK. Το *df* είναι 3 για τα ενήλικα και 8 για τις προνύμφες, αντίστοιχα.

Στάδιο ανάπτυξης	LT <sub>50</sub>	LT <sub>95</sub>	LT <sub>99</sub>	Κλίση	$\chi^2$	<i>P</i>
Ενήλικο	5.0 (3.3-6.0)	7.7 (6.6-10.7)	8.8 (7.4-13.2)	3.4 ± 0.1	0.5	0.91
Προνύμφη	7.5 (5.1-9.2)	13.5 (11.6-16.6)	15.9 (13.6-20.3)	5.0 ± 0.1	2.2	0.97

**Πίνακας 2.** Σύγκριση μέσων όρων θνησιμότητας (% ± τυπικό σφάλμα) των ενηλίκων και προνυμφών, 7 και 14 ημέρες μετά την έκθεση. Το *df* είναι 16 και για τις 7 και για τις 14 ημέρες.

Στάδιο ανάπτυξης	Χρονικό διάστημα μετά την έκθεση	
	7 ημέρες	14 ημέρες
Ενήλικο	85.5 ± 5.3	100.0 ± 0.0*
Προνύμφη	5.5 ± 3.4	26.7 ± 4.1
<i>t</i>	12.72	17.96
<i>P</i>	<0.01	<0.01

\*διαφέρουν σημαντικά σύμφωνα με το *t*-test

**Πίνακας 3.** Μέσος όρος ατόμων (%  $\pm$  τυπικό σφάλμα) από προνύμφες, νύμφες και ενήλικα *T. granarium*, 7 και 14 ημέρες μετά την έκθεση προνυμφών στα 3000 ppm φωσφίνης για 20 και 90 λεπτά, και τα αντίστοιχα δεδομένα για μη εκτεθειμένες προνύμφες (για κάθε περίπτωση, σε κάθε γραμμή προνύμφες + νύμφες + ενήλικα = 100%).

Χρονικό διάστημα έκθεσης	20 λεπτά			90 λεπτά		
	προνύμφες	νύμφες	ενήλικα	προνύμφες	νύμφες	ενήλικα
Χρονικό διάστημα μετά την έκθεση	7 ημέρες					
Εκτεθειμένες προνύμφες	1.1 $\pm$ 1.1	81.1 $\pm$ 6.5	17.7 $\pm$ 6.6	29.9 $\pm$ 6.5*	70.0 $\pm$ 6.5*	0.0 $\pm$ 0.0*
Μάρτυρας	0.0 $\pm$ 0.0	80.0 $\pm$ 8.8	20.0 $\pm$ 8.8	0.0 $\pm$ 0.0	85.0 $\pm$ 4.7	14.2 $\pm$ 4.7
<i>t</i>	1.00	0.10	-0.20	4.57	-1.85	-3.14
<i>P</i>	0.332	0.919	0.842	<0.01	0.083	0.006
Χρονικό διάστημα μετά την έκθεση	14 ημέρες					
Εκτεθειμένες προνύμφες	0.0 $\pm$ 0.0	9.1 $\pm$ 5.2	90.8 $\pm$ 5.2	22.2 $\pm$ 8.5*	41.8 $\pm$ 12.2*	35.9 $\pm$ 6.3*
Μάρτυρας	0.0 $\pm$ 0.0	7.5 $\pm$ 3.4	92.4 $\pm$ 3.4	0.0 $\pm$ 0.0	4.9 $\pm$ 2.7	95.0 $\pm$ 2.70
<i>t</i>	-	0.26	- 0.26	2.58	2.92	-8.58
<i>P</i>	-	0.797	0.797	0.020	0.010	<0.010

\*Οι μέσοι με αστερίσκους, που αντιστοιχούν σε εκτεθειμένες στη φωσφίνη προνύμφες, παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με τους μέσους που αντιστοιχούν στις μη εκτεθειμένες προνύμφες (μάρτυρας) για κάθε χρονικό διάστημα μετά την έκθεση, για διαπαύουσες και μη διαπαύουσες προνύμφες σύμφωνα με το *t*-test για 0.05.

### 3.2. 2<sup>η</sup> Βιοδοκιμή- DDPTTK 90 λεπτά

Το 100% των ενηλίκων ήταν ακινητοποιημένα ύστερα από έκθεση στα 3000 ppm φωσφίνης για 90 λεπτά ενώ το ποσοστό επιβίωσης προνυμφών ήταν αμελητέο (Πίνακας 4). Ύστερα από διάστημα 7 ημερών από την έκθεση στην φωσφίνη τα ενήλικα παρουσιάζουν μεγαλύτερο αριθμό μη ακινητοποιημένων ατόμων από τις μη διαπαύουσες προνύμφες, γεγονός που αντιστρέφεται βέβαια 7 ημέρες αργότερα (Πίνακας 4). Επιπλέον 7 ημέρες μετά από την έκθεση περίπου το ένα τρίτο των προνυμφών που επιβίωσαν από αυτή εξακολουθούν να βρίσκονται στο στάδιο της προνύμφης ενώ οι προνύμφες που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας έχουν μεταμορφωθεί σε νύμφες. Επιπροσθέτως, καμία από τις προνύμφες οι οποίες εκτέθηκαν



στην φωσφίνη δεν είχε εξελιχθεί σε ενήλικο. Δεκατέσσερις ημέρες μετά την έκθεση, οι προνύμφες του μάρτυρα είχαν φτάσει σχεδόν όλες στο στάδιο του ενηλικού σε αντίθεση με τις εκτεθειμένες στην φωσφίνη προνύμφες πολλές από τις οποίες βρίσκονταν στο στάδιο της νύμφης και της προνύμφης (Πίνακας 3).

**Πίνακας 4.** Μέσος όρος (%  $\pm$  τυπικό σφάλμα) ακινητοποιημένων ατόμων για ενήλικα και προνύμφες που εκτέθηκαν 90 λεπτά στα 3000 ppm φωσφίνης, αμέσως μετά την έκθεση, 7 ημέρες μετά και 14 ημέρες μετά. Το *df* είναι 16 για όλες τις συγκρίσεις.

Στάδιο	90 λεπτά	7 ημέρες	14 ημέρες
Ενήλικα	100.0 $\pm$ 0.0	30.0 $\pm$ 8.8*	97.8 $\pm$ 1.5
Προνύμφες	98.9 $\pm$ 1.1	72.2 $\pm$ 7.2*	61.1 $\pm$ 6.5
t	1.0	-3.7	5.4
P	0.332	0.002	<0.001

\*διαφέρουν σημαντικά σύμφωνα με το *t*-test για 0.05.

### 3.3. 3<sup>η</sup> Βιοδοκιμή- πρωτόκολλο FAO

Όλα τα άτομα των κινητών σταδίων του εντόμου φαίνεται να είναι ακινητοποιημένα ύστερα από έκθεση 20 ωρών στα 30 ppm φωσφίνης (Πίνακας 5). Σημαντικές διαφορές καθυστερημένης επίδρασης στην θνησιμότητα των διάφορων σταδίων παρατηρήθηκαν 7 και 14 ημέρες μετά την έκθεση. Το 100% των ενηλικών ήταν νεκρά 7 αλλά και 14 ημέρες μετά την έκθεση το ίδιο και οι νύμφες. Περίπου το 52% των μη διαπαυσών προνυμφών ήταν ακόμα ζωντανές 7 ημέρες μετά την έκθεση, ποσοστό το οποίο στη συνέχεια μειώθηκε στο 38% 7 ημέρες αργότερα (Πίνακας 5). Το 65% των μη διαπαυσών προνυμφών ήταν ακόμα ζωντανές 7 ημέρες αργότερα, ποσοστό του παρέμεινε ζωντανό μέχρι και το τέλος των παρατηρήσεων (14 ημέρες). Η ανάπτυξη των ατόμων που επιβίωσαν από την έκθεση επηρεάστηκε σημαντικά συγκριτικά με τον μάρτυρα. Η έκθεση στη φωσφίνη φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τις προνύμφες σε σχέση με το μάρτυρα τόσο μετά από 7 αλλά και μετά από 14 ημέρες μετά την έκθεση καθώς μόνο ένα μικρό ποσοστό κατάφερε να φτάσει στο στάδιο του ενηλικού (Πίνακας 5). Αντιθέτως, οι διαπαύουσες προνύμφες σημείωσαν μία αρκετά υψηλή επιβίωση ύστερα από 7 και 14 ημέρες. Μετά από το διάστημα των 7 ημερών, όλα τα άτομα που επιβίωσαν πέρασαν στο στάδιο της νύμφης και ύστερα από 14 ημέρες στο στάδιο του ενηλικού. Ένα μικρό ποσοστό αυγών (22 %) που επιβίωσε από την έκθεση στην φωσφίνη, οδηγήθηκε σε εκκόλαψη των

προνυμφών που παρατηρήθηκαν 7 ημέρες αργότερα και ελαφρώς μειώθηκαν στις 14 ημέρες (Πίνακας 4).

**Πίνακας 5.** Μέσος αριθμός θνησιμότητας ατόμων (%  $\pm$  τυπικό σφάλμα) από ενήλικα, προνύμφες, νύμφες, διαπαύουσες προνύμφες και αυγά, ύστερα από 20 ώρες έκθεσης στα 30 ppm φωσφίνης, και ύστερα από 7 και 14 ημέρες από την έκθεση. Το *df* είναι 4,29 για όλες τις συγκρίσεις (20 ώρες, 7 ημέρες, 14 ημέρες).

Στάδιο ανάπτυξης	20 ώρες	7 ημέρες	14 ημέρες
Ενήλικο	100.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0c	100.0 $\pm$ 0.0c
Προνύμφες	100.0 $\pm$ 0.0	48.3 $\pm$ 4.7c	61.6 $\pm$ 10.1c
Διαπαύουσες προνύμφες		35.0 $\pm$ 2.2a	35.0 $\pm$ 2.2b
Νύμφες		100.0 $\pm$ 0.0a	100 $\pm$ 0.0a
Αυγά		78.3 $\pm$ 7.0b	70.0 $\pm$ 6.86b
F		57.24	24.6
P		<0.001	<0.001

**Πίνακας 6.** Μέσος όρος ατόμων (%  $\pm$  τυπικό σφάλμα) από προνύμφες, νύμφες και ενήλικα *T. granarium*, 7 και 14 ημέρες μετά την έκθεση διαπαυουσών και μη διαπαυουσών προνυμφών στα 30 ppm φωσφίνης για 20ώρες, και τα αντίστοιχα δεδομένα για μη εκτεθειμένες προνύμφες (για κάθε περίπτωση, σε κάθε γραμμή προνύμφες + νύμφες + ενήλικα = 100%).

	Μη διαπαύουσες προνύμφες			Διαπαύουσες προνύμφες		
	7 ημέρες					
	προνύμφες	νύμφες	ενήλικα	προνύμφες	νύμφες	ενήλικα
Εκτεθειμένες προνύμφες	35.8 $\pm$ 14.4*	58.9 $\pm$ 13.8	5.1 $\pm$ 3.2*	0.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Μάρτυρας	1.6 $\pm$ 1.6	73.7 $\pm$ 1.8	24.5 $\pm$ 3.1	0.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
<i>t</i>	2.35	-1.06	-4.23	-	-	-
<i>P</i>	0.041	0.313	<0.002	-	-	-

	14 ημέρες					
Εκτεθειμένες προνύμφες	48.8 ± 11.4*	24.2 ± 11.8	26.9 ± 9.2*	0.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Μάρτυρας	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
<i>t</i>	4.26	2.03	-7.90	-	-	-
<i>P</i>	<0.002	0.069	<0.001	-	-	-

\*Οι μέσοι με αστερίσκους, που αντιστοιχούν σε εκτεθειμένες στη φωσφίνη προνύμφες, παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με τους μέσους που αντιστοιχούν στις μη εκτεθειμένες προνύμφες (μάρτυρας) για κάθε χρονικό διάστημα μετά την έκθεση, για διαπαύουσες και μη διαπαύουσες προνύμφες σύμφωνα με το t-test για 0.05.

Σε ό,τι αφορά τις μη διαπαύουσες προνύμφες οι οποίες επιβίωσαν από την έκθεση στη φωσφίνη παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με το μάρτυρα τόσο 7 όσο και 14 ημέρες μετά την έκθεση. Σε αντίθεση, στη περίπτωση των διαπαυουσών προνυμφών, τα ποσοστά των ατόμων που έφτασαν το στάδιο της νύμφης και του ακμαίου ήταν παρόμοια με αυτά του μάρτυρα 7 και 14 ημέρες μετά (Πίνακας 6).

#### 3.4. 4<sup>η</sup> Βιοδοκιμή- τροποποιημένο FAO

Σε αντίθεση με το προηγούμενο πρωτόκολλο, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα θνησιμότητας μεταξύ των διαφόρων σταδίων του εντόμου. Τα κινητά στάδια του εντόμου, δηλαδή τα ενήλικα και οι μη διαπαύουσες προνύμφες. Για όλα τα στάδια, εκτός από αυτό του αυγού, παρατηρήθηκε πλήρης θνησιμότητα (Πίνακας 7). Για τα αυγά, υπήρξε ένα μικρό ποσοστό επιβίωσης ύστερα από έκθεση στα 50 ppm το οποίο μειώθηκε σταδιακά στα 100, 200 και 500 ppm και μηδενίστηκε στα 1000 ppm έκθεσης (Πίνακας 7). Η απαραίτητη συγκέντρωση για τη θανάτωση των αυγών φαίνεται στον Πίνακα 8.

**Πίνακας 7.** Μέσος αριθμός (% ± τυπικό σφάλμα) από ενήλικα, προνύμφες, διαπαύουσες προνύμφες, νύμφες και αυγά, τα οποία βρέθηκαν ακινητοποιημένα ύστερα από 3 ημέρες στα 50, 100, 200, 500 και 1000 ppm φωσφίνης και ύστερα από 7 και 14 ημέρες από την έκθεση. Το *df* για τα αυγά είναι 4,29 και για τις 7 και για τις 14 ημέρες.

Στάδιο ανάπτυξης	Συγκέντρωση	3 ημέρες	7 ημέρες	14 ημέρες
Ενήλικα	50 ppm	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	100 ppm	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	200 ppm	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	500 ppm	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	1000 ppm	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0

Νύμφες	50 ppm		100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	100 ppm		100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	200 ppm		100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	500 ppm		100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	1000 ppm		100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
Προνύμφες	50 ppm	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	100 ppm	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	200 ppm	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	500 ppm	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	1000 ppm	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
Διαπαύουσες προνύμφες	50 ppm		100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	100 ppm		100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	200 ppm		100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	500 ppm		100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	1000 ppm		100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
Αυγά	50 ppm		86.6 ± 8.8	86.6 ± 8.8
	100 ppm		95.0 ± 5.0	90.0 ± 5.1
	200 ppm		96.6 ± 2.1	96.6 ± 2.1
	500 ppm		96.6 ± 3.3	97.1 ± 3.3
	1000 ppm		100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
F			1.05	1.25
P			0.399	0.316

**Πίνακας 8.** Probit analysis για LC<sub>50</sub>, LC<sub>95</sub> και LC<sub>99</sub> (διάστημα εμπιστοσύνης) για το στάδιο του αυγού, ύστερα από έκθεση στα 50, 100, 200, 500, 1000 ppm φωσφίνης, για 7 και 14 ημέρες μετά την έκθεση.

Καθυστερημένη επίδραση	LC <sub>50</sub>	LC <sub>95</sub>	LC <sub>99</sub>	Κλίση	x <sup>2</sup>	P
7 ημέρες	3.0*	150.8*	762.1*	2.9 ± 0.3	60.7	<0.01
14 ημέρες	4.4 (0.0-22.5)	185.7 (79.4-6477)	874.3*	3.2 ± 0.3	52.0	<0.01

\* Δεν κατέστη δυνατό να υπολογιστούν τα διαστήματα εμπιστοσύνης.

## ΤΕΤΑΡΤΟ ΜΕΡΟΣ- Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία αξιολογήθηκε η επίδραση της φωσφίνης στα διάφορα στάδια ανάπτυξης του *T. granarium*. Η φωσφίνη είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο αέριο εντομοκτόνο σε χώρους αποθήκευσης δημητριακών και άλλων ξηρών προϊόντων (Bell, 2000). Η αποτελεσματικότητά της για τον έλεγχο διάφορων εντόμων που προσβάλλουν αποθηκευμένα προϊόντα, έχει μελετηθεί εκτενώς (Hole et al., 1976; Collins et al., 2005; Aulicky et al., 2015). Παρά την ευρεία χρήση της τα στοιχεία αξιολόγησης της επίδρασης που έχει στο *T. granarium* είναι ελλιπή, πιθανώς λόγω των περιορισμών καραντίνας για το συγκεκριμένο έντομο (EPPO, 2016). Η συγκεκριμένη μελέτη επικεντρώνεται στην σημαντικότητα της αξιολόγησης της επίδρασης της φωσφίνης στα διάφορα στάδια του *T. granarium*, λαμβάνοντας υπόψη το υψηλό επίπεδο σπουδαιότητας αυτού του είδους καραντίνας.

Τα αποτελέσματα από την εφαρμογή του DDPTTK, έδειξαν πως ο απαιτούμενος χρόνος για την ακινητοποίηση ενηλίκων ατόμων του *T. granarium*, ήταν παρόμοιος με αυτόν που απαιτείται και για άλλα έντομα αποθηκών (Athanassiou et al., 2019b). Ωστόσο στην συγκεκριμένη έρευνα για τον υπολογισμό του χρόνου ακινητοποίησης των εξεταζόμενων ειδών, οι συγγραφείς εξέτασαν αρκετούς εργαστηριακούς πληθυσμούς. Η εξέταση ενός μόνο πληθυσμού δεν μπορεί να οδηγήσει σε ασφαλή αποτελέσματα για τη διάγνωση ανάπτυξης ανθεκτικότητας. Επιπλέον βρέθηκε πως ο χρόνος που απαιτείται για την ακινητοποίηση των προνυμφών είναι μεγαλύτερος από αυτόν για τα ενήλικα. Για πολλά είδη εντόμων που προσβάλλουν τα αποθηκευμένα προϊόντα, οι προνύμφες είναι πιο ανθεκτικές από τα ενήλικα. Ωστόσο για το *Trogoderma inclusum* LeConte (Coleoptera: Dermestidae) βρέθηκε ότι ενήλικα και προνύμφες είναι το ίδιο ανθεκτικά (Athanassiou et al., 2020). Τα διαστήματα έκθεσης που εξετάστηκαν βέβαια ήταν αρκετά μεγαλύτερα από αυτά που εξετάστηκαν με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο στην παρούσα έρευνα.

Η καθυστερημένη επίδραση της φωσφίνης προκάλεσε υψηλή θνησιμότητα στα ενήλικα και έφτασε στο 100% αποδεικνύοντας ότι τα ενήλικα επηρεάζονται σημαντικά ακόμα και σε μικρά διαστήματα έκθεσης που πραγματοποιήθηκαν στις βιοδοκιμες. Σημαντικό είναι βέβαια τα επισημάνουμε πως τα ενήλικα του συγκεκριμένου είδους, ζουν για μικρό χρονικό διάστημα (Athanassiou, 2019a) και συνεπώς, η υψηλή θνησιμότητα ήταν ως ένα βαθμό αναμενόμενη.

Η ανάνηψη των προνυμφών ήταν υψηλή παρά το γεγονός ότι η θνησιμότητά τους αυξήθηκε με το πέρασμα του χρόνου μετά την έκθεση. Οι συνθήκες στις οποίες τοποθετήθηκαν οι προνύμφες μετά την έκθεση, ήταν κατάλληλες για την ανάπτυξη και την ολοκλήρωση του βιολογικού τους κύκλου. Θερμοκρασίες μικρότερες των 30° C πιθανόν να αναγκάσουν τις

προνύμφες να εισέλθουν σε διάπαυση, αντί να συνεχίσουν την κανονική τους ανάπτυξη και να μεταμορφωθούν σε νύμφες (Wilches et al., 2016).

Αρκετά ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός πως η ανάπτυξη των προνυμφών, οι οποίες εκτέθηκαν για 90 λεπτά στη φωσφίνη, επηρεάστηκε σημαντικά, παρά την επιβίωσή τους από την έκθεση. Οι προνύμφες αυτές παρέμειναν προνύμφες για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε σύγκριση με το μάρτυρα. Επιπροσθέτως, λίγες έγιναν ενήλικα ακόμα και 14 ημέρες μετά από την έκθεση. Οι Nayak et al. (2003) παρατήρησαν μικρή καθυστερημένη εκκόλαψη προνυμφών από αυγά ευαίσθητου πληθυσμού του *Liposcelis bostrychophila* Badonnel (Psocoptera: Liposcelididae) και αρκετά μεγαλύτερη καθυστέρηση στην εκκόλαψη αυγών ανθεκτικού πληθυσμού του ίδιο είδους όταν εκτέθηκαν σε ίδιες συγκεντρώσεις φωσφίνης. Παρόλα αυτά, δεν είναι σίγουρο το πώς επηρέασε η φωσφίνη την επιβίωση των ατόμων αυτών καθώς η τελευταία παρατήρηση έγινε 14 ημέρες μετά την έκθεση. Η καθυστέρηση της ανάπτυξης πιθανόν σχετίζεται με συγκεκριμένους μηχανισμούς επιβίωσης και προσαρμογής, οι οποίοι επιτρέπουν την προσαρμογή της ανάπτυξης όταν οι συνθήκες δεν είναι κατάλληλες. Επιπλέον, μία προσωρινή καθυστέρηση μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα αύξηση της επιβίωσης ύστερα από εφαρμογή φωσφίνης, απόρροια της οποίας μπορεί να είναι η αύξηση του πληθυσμού από τα άτομα που επιβίωσαν.

Η παρούσα εργασία παρέχει τα πρώτα δεδομένα για την εκτίμηση της επίδρασης της φωσφίνης σε ενήλικα και προνύμφες του *T. granarium* για μικρό χρονικό διάστημα έκθεσης. Λαμβάνοντας υπόψη τη χρήση του DDPTTK βρήκαμε πως ο χρόνος που απαιτείται για την ακινητοποίηση των ατόμων είναι παρόμοιος με αυτό για άλλα είδη. Επιπλέον, όταν η έκθεση αυξήθηκε στα 90 λεπτά, βρήκαμε μια ενδιαφέρουσα αναπτυξιακή ανασταλτική επίδραση της φωσφίνης στις εκτεθειμένες προνύμφες, που αξίζει πρόσθετη έρευνα, με βάση την υπόθεση μιας πιθανής βιολογικής προσαρμογής κατά τη διάρκεια της έκθεσης ή μετά από θανατηφόρες εκθέσεις.

Από την εφαρμογή των πρωτοκόλλων του FAO και του τροποποιημένου FAO, επισημάνθηκε η αυξημένη ευαισθησία των ενηλίκων, των νυμφών και των προνυμφών στην φωσφίνη, αφού για τα στάδια αυτά, η θνησιμότητα έφτασε το 100% ακόμα και στις μικρότερες συγκεντρώσεις των 50 ppm. Από πρακτικής άποψης τα ευρήματα της παρούσας μελέτης αποδεικνύουν ότι σε εγκαταστάσεις στις οποίες αποθηκευμένα προϊόντα είχαν προσβληθεί από το συγκεκριμένο έντομο και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε απεντόμωση με φωσφίνη είναι πιθανόν, μερικά αυγά να έχουν επιβιώσει και να οδηγήσουν σε εκ νέου ανάπτυξη πληθυσμού μερικές βδομάδες ή μήνες μετά από τον τερματισμό της απεντόμωσης.

Η εξέταση περισσότερων σταδίων ανάπτυξης, όπως αυτό του αυγού, είναι ο μόνος τρόπος η μελέτη να παρέχει έγκυρα αποτελέσματα και αξιόλογες προτάσεις αντιμετώπισης. Η

μειωμένη ευαισθησία των αυγών διαφόρων ειδών που προσβάλλουν αποθηκευμένα προϊόντα, σε αέρια εντομοκτόνα, είναι σύνηθες φαινόμενο το οποίο έχει εξακριβωθεί από πλήθος ερευνών. Για παράδειγμα αυγά από Psocoptera που προσβάλλουν αποθηκευμένα προϊόντα απαιτούν ορισμένες φορές υψηλότερες συγκεντρώσεις από το αέριο sulfuryl fluoride (Athanassiou et al. 2012) ή το βρωμιούχο μεθύλιο (Athanassiou et al. 2015b) για την επίτευξη 100% θνησιμότητας σε σύγκριση με προνύμφες και ακμαία. Οι Gautam et al. (2016) χρησιμοποίησαν αυγά για τον διαχωρισμό ανθεκτικών και ευαίσθητων πληθυσμών *T. castaneum* και *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) στην φωσφίνη, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι και για τα δύο είδη το στάδιο του αυγού ήταν το δυσκολότερο να θανατωθεί.

Σε μια πρόσφατη μελέτη, οι Athanassiou et al. (2020) πραγματοποίησαν παρόμοια πειράματα για να εξετάσουν την ευαισθησία διαφορετικών σταδίων ζωής του *T. inclusum* και του *Dermestes maculatus* (DeGeer) (Coleoptera: Dermestidae). Σε αυτή τη μελέτη, οι συγγραφείς διαπίστωσαν ότι ένα μικρό ποσοστό ενηλίκων και προνυμφών αυτών των δύο ειδών θα μπορούσαν να επιβιώσουν στα 50 ppm για 5 ημέρες, αλλά, για το ίδιο διάστημα, τα αυγά χρειάζονταν μεταξύ 300 και 400 ppm για 100% θνησιμότητα. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι, αν και τα δεδομένα δεν είναι άμεσα συγκρίσιμα με τα αποτελέσματά μας, τα ενήλικα και οι προνύμφες του *T. granarium* ήταν πιο ευαίσθητοι από αυτούς των *T. inclusum* και *D. maculatus*. Αντίθετα, τα αυγά του *T. granarium* είναι ίσως πιο ανθεκτικά από αυτά των άλλων δύο ειδών.

Το πρωτόκολλο έκθεσης 20 ωρών του FAO χρησιμοποιήθηκε ως το «τυπικό» πρωτόκολλο για την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας, παρά το γεγονός ότι η διαδικασία αξιολόγησης μπορεί να επιταχυνθεί χρησιμοποιώντας πρωτόκολλα υψηλών συγκεντρώσεων (Agrafioti et al. 2019). Ωστόσο, τα δεδομένα που είναι διαθέσιμα για το *T. granarium* για τη χρήση του πρωτοκόλλου FAO είναι περιορισμένα και ένας από τους στόχους μας στις παρούσες βιοδοκιμές είναι να εργαστούμε με την συγκέντρωση των 30 ppm ως συγκέντρωση «εκκίνησης» (Agrafioti et al. 2019). Για τα ενήλικα και τις νύμφες, η έκθεση των 20 ωρών στην φωσφίνη προκάλεσε θνησιμότητα 100%, ακόμη και μετά τον τερματισμό της έκθεσης. Αντίθετα, για τις προνύμφες, η επιβίωση ήταν σημαντική και κυμαινόταν μεταξύ 52 και 65% του συνολικού αριθμού των ατόμων που εκτέθηκαν. Προφανώς, έχοντας χρησιμοποιήσει μόνο έναν πληθυσμό *T. granarium*, θα πρέπει να αποφεύγονται γενικεύσεις σχετικά με τη χρήση της συγκέντρωσης των 30 ppm ως διαγνωστική για την ανίχνευση ανθεκτικότητας, εκτός εάν αυτή η συγκέντρωση δοκιμάζεται για διάφορους πληθυσμούς με διαφορετικά επίπεδα αντοχής στη φωσφίνη.

Οι μη διαπάρουσες προνύμφες παρουσίασαν μεγαλύτερη ευαισθησία στην φωσφίνη σε σχέση με τις διαπάρουσες προνύμφες στην εφαρμογή του πρωτοκόλλου FAO. Αυτό επαληθεύει τα αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών για την αποτελεσματικότητα της φωσφίνης στις διαπάρουσες προνύμφες του *T. granarium* (Bell, 1984). Ωστόσο, και οι δύο κατηγορίες προνυμφών είχαν παρόμοιο επίπεδο ευαισθησίας όταν εκτέθηκαν σε φωσφίνη για 3 ημέρες, υποδηλώνοντας ότι οι μεγαλύτερες εκθέσεις είναι θανατηφόρες ανεξάρτητα από την διάπαυση. Παρόλο που η πρόκληση προνυμφών *T. granarium* σε διάπαυση υπό εργαστηριακές συνθήκες είναι μια απαιτητική διαδικασία (Burgess 1962, Nair and Desai 1973a, Wilches, 2016), η τεχνική που ακολουθήθηκε στην εργασία μας απέδωσε ένα σημαντικό ποσοστό ατόμων σε διάπαυση. Υπό το πρίσμα των ευρημάτων μας, είδαμε ότι οι προνύμφες χωρίς διάπαυση, παρουσίασαν καθυστερημένη ανταπόκριση όσον αφορά την ολοκλήρωση της βιολογίας τους για να φτάσουν στο στάδιο των ενηλίκων. Αντίθετα, οι διαπάρουσες προνύμφες που επιβίωσαν από την έκθεση στην φωσφίνη δεν παρουσίασαν καθυστέρηση στην περαιτέρω ανάπτυξή τους και έφτασαν στο στάδιο του ενηλίκου το ίδιο σύντομα με τις προνύμφες οι οποίες δεν εκτέθηκαν στη φωσφίνη, όταν τοποθετήθηκαν σε συνθήκες που τερμάτισαν τη διάπαυση. Αυτό σημαίνει ότι ένας πληθυσμός προνυμφών που είχε επιβιώσει από τη φωσφίνη, είναι σε θέση να ανταποκριθεί αμέσως στον τερματισμό της διάπαυσης και στην έντονη αύξηση του πληθυσμού, όταν οι συνθήκες είναι κατάλληλες, το οποίο θα πρέπει να εξεταστεί περαιτέρω στις στρατηγικές ελέγχου του είδους με βάση τη φωσφίνη. Ωστόσο, οι μεγαλύτερες εκθέσεις σε φωσφίνη μπορεί να εξαλείψουν αυτό το φαινόμενο.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της παρούσας πτυχιακής εργασίας έδειξαν την υψηλή εντομοκτόνο δράση της φωσφίνης εναντίον όλων των σταδίων ανάπτυξης του *T. granarium*. Τα αποτελέσματα αυτά θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά τον σχεδιασμό της στρατηγικής αντιμετώπισης των εντόμων αποθηκών, προκειμένου να προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις και τα χρονικά διαστήματα εφαρμογής, σε απεντομώσεις με φωσφίνη. Η μελέτη μας επικεντρώνεται στην αξιολόγηση της φωσφίνης για τον έλεγχο του *T. granarium*, λαμβάνοντας υπόψη το υψηλό επίπεδο σπουδαιότητας αυτού του είδους καραντίνας, και στοχεύοντας στον σχεδιασμό ενός ορθού σχεδίου υποκαπνισμού. Τα αποτελέσματα υπογραμμίζουν ότι ορισμένα αυγά είναι πιθανό να επιβιώσουν σε αυξημένες συγκεντρώσεις, αλλά όχι τα άλλα στάδια ανάπτυξης, συμπεριλαμβανομένων και των προνυμφών σε διάπαυση. Σε εφαρμογές σε πραγματικές συνθήκες, αυτό μπορεί λανθασμένα να θεωρηθεί ως επιτυχής απεντόμωση, αλλά στην πράξη μπορεί να οδηγήσει σε μελλοντικές προσβολές, λαμβάνοντας υπόψη τις μερικές ανασταλτικές επιδράσεις στην εκκόλαψη που αναφέρθηκαν παραπάνω. Σε απεντομώσεις προϊόντων τα οποία βρίσκονται υπό μετακίνηση, αυτή η καθυστερημένη εμφάνιση προνυμφών από επιζώντα αυγά μπορεί να είναι καταστροφική, καθώς τα επιζώντα άτομα που δεν ήταν



ορατά στο σημείο αναχώρησης, ενδέχεται να εμφανίζονται στο σημείο προορισμού, αυξάνοντας τον κίνδυνο για περαιτέρω εξάπλωση. Ωστόσο, δεν γνωρίζουμε το ποσοστό των προνυμφών που προκύπτουν από τα εκτεθειμένα αυγά που τελικά δεν επηρεάζονται και μπορούν να ολοκληρώσουν με επιτυχία τον βιολογικό τους κύκλο.

## Βιβλιογραφία

- Agrafioti P., Athanassiou C.G., Nayak, M.K., 2019. Detection of phosphine resistance in major stored-product insects in Greece and evaluation of a field resistance test kit. *J. Stored Prod. Res.* 82, 40–47.
- Ahmed, K.S., Khatun, M., Rahman, M.M., 1991. Biological notes on *Xylocoris flavipes* (Reuter) (Hemiptera: Anthocoridae). *J. Asiat. Soc. Bangladeshi Sci.* 17, 65-67.
- Aitken AD., 1975. Insect travellers. Tech. Bull. 31, Minist. Agric., Fisheries Food, London, UK.
- Al-Hadidi, I.K., 2002. The life of beetles *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) (Herbst) and *Trogoderma granarium* Everts (Coleopteran: Dermestidae) in some local wheat products and its sensitivity to low pressure, carbon dioxide and nitrogen. Master's Thesis, Univ. Mosul, Mosul, Iraq.
- Ali, S.S., Shaheen, A., Pervez, R., Hussain, M.A. 2005. *Steinernema masoodi* sp. n. and *S. seemae* sp. n. (Nematoda: Rhabditida: Steinernematidae) from India. *International Journal of Nematology*, 15(1): 89–99.
- Ali, S.S., Sirvastava, M., Shankar, P., 2011. First report on susceptibility of khapra beetle (*Trogoderma granarium*) against *Stienernema masoodi* and its in vivo production. *Trends Biosci.* 4, 140-41.
- Al-Kirshi, A., Gabbar, A., Reichmuth, C., Bochow, H., 1997. Potential of the larval parasitoid *Lalius pedatus* for the control of the khapra beetle *Trogoderma granarium* Everts in grain. *Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Entomol.* 111, 367-72.
- Allen, P., Linsley, E.G., 1954. *Proceedings Pacific Coast Entomological Society.* Pan-Pacific Ent. 30, 89-90.
- Annis P.C., Morton R., 1997. The acute mortality effects of carbon dioxide on various life stages of *Sitophilus oryzae*. *J. Stored Prod. Res.* 33, 115-124.
- Athanassiou, C.G. Phillips T.W, Arthur F.H., Aikins, M.J., Agrafioti P., Hartzler, K.L. 2020. Efficacy of phosphine fumigation for different life stages of *Trogoderma inclusum* and *Dermestes maculatus* (Coleoptera: Dermestidae). *J. Stored Prod. Res.* 86, 101556.
- Athanassiou, C.G., Arthur, F.H., 2018. *Recent Advances in Stored Product Protection.* Springer-Verlag GmbH Germany.
- Athanassiou, C.G., Hasan, M.M., Phillips, T.W., Aikins, M.J., and Throne, J.E. 2015b. Efficacy of methyl bromide for control of different life stages of stored product psocids. *J. Econ. Entomol.* 108, 1422-1428.

- Athanassiou, C.G., Kavallieratos, N.G., Boukouvala, M.C., 2016. Population growth of the khapra beetle, *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae) on different commodities. J. Stored Prod. Res. 44, 69, 72-77.
- Athanassiou, C.G., Kavallieratos, N.G., Boukouvala, M.C., Mavroforos, M.E., Kontodimas, D.C., 2015a. Efficacy of alpha-cypermethrin and thiamethoxam against *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae) and *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) on concrete. J. Stored Prod. Res. 62, 101-107.
- Athanassiou, C.G., Kavallieratos, N.G., Brabec, D.L., Agrafioti, P., Sakka, M., Campbell, J.F., 2019b. Using immobilization as a quick diagnostic indicator for resistance to phosphine. J. Stored Prod. Res. 82, 17-26.
- Athanassiou, C.G., Phillips, T.W., Aikins, M.J., Hasan, M.M., and Throne, J.E. 2012. Effectiveness of sulfuryl fluoride for control of different life stages of stored-product psocids (Psocoptera). J. Econ. Entomol., 105, 282-287
- Athanassiou, C.G., Phillips, T.W., Wakil, W., 2019a. Biology and Control of the Khapra Beetle, *Trogoderma granarium*, a Major Quarantine Threat to Global Food Security. Annu. Rev. Entomol. 64, 131-148.
- Aulicky, R., Stejskal, V., Frydova, B., Athanassiou, C.G., 2015. Susceptibility of two strains of the confused flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae) following phosphine structural mill fumigation: effects of concentration, temperature and flour deposits. J. Econ. Entomol. 186, 2823-2830.
- Bailey, S., Banks, H., 1980. A review of recent studies of the effects of controlled atmospheres on stored product pests. In: Shejbal, J. (Ed.), Controlled Atmosphere Storage of Grains. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, 10-118.
- Bailey, S.W., 1965. Airtight storage of grain: its effect on insect pests-VI. *Rhyzoperfha dominica* (F.) and some other coleopteran that infest stored grain. J. stored Prod. Res. 1, 25-33.
- Banks, H.J., 1977. Distribution and establishment of *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae): climatic and other influences. J. Stored Prod. Res. 13, 183-202.
- Barnes, J.H., Grove, A.J., 1916. The insects attacking stored wheat in the Punjab and the methods of combating them, including a chapter on the chemistry of respiration. Mem. Dep. Agric. India Chem. 4, 165-280
- Bell, C.H. 1994. A Review of Diapause in Stored-product Insects. J. Stored Prod. Res. 30, 99-120.
- Bell, C.H., 2000. Fumigation in the 21st century. Crop Protect. 19, 563-569.

- Bell, C.H., Wilson, S.M. and Banks, H.J., 1984. Studies on the toxicity of phosphine to tolerant stages of *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae). J. Stored Prod. Res. 20, 111-117.
- Bell, C.H., Wilson, S.M., 1995. Phosphine tolerance and resistance in *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae). J. Stored Prod. Res. 31, 199-205.
- Bogs, D., 1976. Effectiveness of methyl bromide against storage pests at low temperatures. Nachrichtenblatt für den Pflanzenschutz in der DDR 30, 221-222.
- Borah, B., Chahal, C.G., 1979. Development of resistance in *Trogoderma granarium* Everts to phosphine in the Punjab. Plant Prot. Bull. 27, 77-80.
- Burges, H.D., 1959. Studies on the dermestid beetle *Trogoderma granarium* Everts: III Ecology in malt stores. Ann. Appl. Biol. 47, 445-62
- Burges, H.D., 1962a. Diapause, pest status and control of the khapra beetle, *Trogoderma granarium* Everts. Ann. Appl. Biol. 50, 614-617.
- Burges, H.D., 1962b. Studies on the dermestid beetle *Trogoderma granarium* Everts. V. Reactions of diapause larvae to temperature. Bull. Entomol. Res. 53, 193-213.
- CABI. 2005. Crop Protection Compendium International. United Kingdom:Wallingford.
- Canning, E.U., 1964. Observations on the life history of *Mattesia trogodermae* sp. n., a schizogregarine parasite of the fat body of the khapra beetle, *Trogoderma granarium* Everts. J. Insect Pathol. 6, 305-17.
- Champ, B.R., Dyte, C.E., 1976. Report of the FAO Global Survey of Pesticide Susceptibility of Stored Grain Pests FAO Plant Product Protection, Ser. 5. Rome, Italy: Food Agriculture. Organization U.N.
- Chaudhry, M.Q., 1997. A Review of the Mechanisms Involved in the Action of Phosphine as an Insecticide and Phosphine Resistance in Stored-Product Insects Pestic. Sci. 1997, 49, 213-228
- Chefurka, W., Kashi, K.P., Bond, E.J., 1976. The effect of phosphine on electron transport in mitochondria. Pestic. Biochem. Physiol. 6, 65-84.
- Collins, P.J., Daglish, G.J., Pavic, H., Kopitkee, R.A., 2005. Response of mixed-age cultures of phosphine-resistant and susceptible strains of lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*, to phosphine at a range of concentration and exposure periods. J. Stored Prod. Res. 41, 373-385.
- Cotton, R.T., 1956. Pests of stored grain and grain products. Burgess Publishing Company Minneapolis.

- Day, C., and White, B. 2016. Khapra beetle, *Trogoderma granarium* Interceptions and Eradications in Australia and Around the World. SARE Working Paper 1609. Crawley: School of Agricultural and Resource Economics.
- Dillon, K., 1968. Report on visit to USA and Canada by Mr. K. Dillon, Plant Quarantine Entomologist, To investigate all aspects of khapra beetle *Trogoderma granarium*, Aug - Sept. 1968, AQIS Plant Quarantine Branch, Canberra, Australia. 83pp
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), 2013, PM 7/13 (2) *Trogoderma granarium*, EPPO Bull., 43, 431–48.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), 2015. A2 list of pests recommended for regulation as quarantine pests. *Trogoderma granarium*.
- Fields, P.G., 1992. The control of stored product insects and mites with extreme temperatures. J. Stored Prod. Res. 28, 89-118.
- Fields, P.G., White N.D.G., 2002. Alternatives to methyl bromide treatments for stored-product and quarantine insects, Annu. Rev. Entomol. 47, 331-59.
- Fluck, E., 1973. The chemistry of phosphine. Fortschr. Chim.Forsch., 35, 1-64.
- Food and Agriculture Organization, 1975. Tentative method for adults of some major pest species of stored cereals with methyl bromide and phosphine, FAO method no. 16. FAO Plant Prot. Bull. 23, 12-25.
- Ghimire, M.N., Myers, S.W., Arthur, F.H., Phillips, T.W., 2017. Susceptibility of *Trogoderma granarium* Everts and *Trogoderma inclusum* LeConte (Coleoptera : Dermestidae ) to residual contact insecticides. J. Stored Prod. Res. 72, 75-82.
- Hadaway, A. B., 1956. The Biology of the Dermestid Beetles, *Trogoderma granarium* Everts and *Trogoderma versicolor* (Creutz.). Bull. Entomol. Res. 46, 781–96.
- Halliday, D., Harris, A.H., Taylor, R. W.D., 1983. Recent developments in the use of phosphine as a fumigant for grain and other durable agricultural produce. Chem. Ind. 12, 468-471.
- Harper, R. W., 1955. Khapra beetle and Mexican fruit fly. Agriculture Bull. 44, 17-28.
- Hole, B.D., Bell, C.H., Mills, K.A., Goodship, G., 1976. The toxicity of phosphine to all developmental stages of thirteen species of stored product beetles. J. Stored Prod. Res. 12, 235-244
- Holloway, J., Falk, M.J., Emery, R.N., Nayak, M.K., 2016. Resistance to phosphine in *Sitophilus oryzae* in Australia: a national analysis of trends and frequencies over time and geographical spreads. J. Stored Prod. Res. 69, 129-137.
- Howe, R.W., 1958. A theoretical evaluation of the potential range and importance of *Trogoderma granarium* Everts in North America. In Proceedings of the 10th International Congress of Entomology, pp. 23–28. Ottawa, Can.: Mortimer.

- Howe, R.W., Lindgren D.L., 1957. How much can the khapra beetle spread in the USA. *J. Econ. Entomol.* 50, 374–75.
- Karnavar, G.K., 1972. Mating behaviour and fecundity in *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae), *J. Stored Prod. Res.* 8, 65-69.
- Kavallieratos, N.G, Athanassiou, C.G, Boukouvala, M.C., 2017a. Invader competition with local competitors: displacement or coexistence among the invasive khapra beetle, *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae), and two other major stored-grain beetles *Front. Plant Sci.* 8, 1837
- Kavallieratos, N.G, Athanassiou, C.G, Boukouvala, M.C., Tsekos, T.T., 2019a. Influence of different non-grain commodities on the population growth of *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae). *J. Stored Prod. Res.* 81, 31-39.
- Kavallieratos, N.G, Athanassiou, C.G, Diamantis, G.C., Gioukari, H.G., Boukouvala, M.C., 2017b. Evaluation of six insecticides against adults and larvae of *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae) on wheat, barley, maize and rough rice. *J. Stored Prod. Res.* 71, 81-92.
- Kavallieratos, N.G., Athanassiou, C.G., Barda, M.S., Boukouvala, M.C., 2016. Efficacy of five insecticides for the control of *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae) larvae on concrete. *J. Stored Prod. Res.* 66:18-24.
- Kavallieratos, N.G., Karagianni, E.S., Papanikolaou, N.E, 2019b. Life history of *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae) on peeled barley, peeled oats and triticale. *J. Stored Prod. Res.* 84,101515.
- Khashaveh A., Safaralizadeh, M.H., Ghosta, Y., 2011. Pathogenicity of Iranian isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) (Ascomycota: Hypocreales) against *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae). *Biharean Biol.* 5, 51–5.
- Kingsolver, J.M. 1991. Dermestidae, Coleoptera. In: *Insect and Mite Pests in Food. An Illustrated Key. Agriculture Handbook No. 655*, 115-136.
- Kumar, M., Srivastava, C., Garg, A., 2010. In vitro selection of deltamethrin resistant strain of *Trogoderma granarium* and its susceptibility to insecticides. *Ann. Plant Prot. Sci.* 18, 26-30.
- Lee, M. L., Choi, M. Y., Choi, K. S., 1991. Effects of controlling *Galleria mellonella* in honey bee combs with aluminium phosphide, its residues and safety to honey bees. *Korean J. Apiculture* 6, 12-15.
- Lindgren, D. L. and Vincent, L. E., 1959. Biology and Control of *Trogoderma granarium* Everts<sup>1</sup>, *J. Econ. Entomol.* 52, 312-319.

- Lindgren, D. L., Vincent, L. E. and Krohne, H. E., 1955. The khapra beetle, *Trogoderma granarium* Everts, *Hilgardia* 24, 1-36.
- Lindgren, D. L., Vincent, L. E., 1960. Response of Quiescent khapra beetle larvae to Fumigation and to Low Temperatures, *J. Econ. Entomol.* 53, 698-699.
- Lindgren, D.L., Vincent, L.E., 1970. Effect of atmospheric gases alone or in combination on the mortality of granary and rice weevils. *J. Econ. Entomol.* 63, 19-26.
- Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S., De Poorter, M., 2000. 100 of the World's Worst Invasive Alien Species: A Selection from the Global Invasive Species Database. Auckland, NZ: Invasive Species Spec. Group, World Conserv. Union, Int. Union Conserv. Nat. [http://www.issg.org/pdf/publications/worst\\_100/english\\_100\\_worst.pdf](http://www.issg.org/pdf/publications/worst_100/english_100_worst.pdf)
- Mahmood, T., Ahmad, M.S, Ahmad, H., 1996. Dispersion of stored grain insect pests in a wheat-filled silo. *Int. J. Pest Manag.* 43, 321–24.
- Mason, F.A., 1921. The destruction of stored grain by *Trogoderma khapra*, Arrow. A new pest in Great Britain. *Bur. Bio-Technol. Leeds Bul.* 2, 27–38.
- Nair, K.S.S., Desai, A.K. 1973a. Studies on the isolation of diapause and non-diapause strains of *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera, Dermestidae). *J. Stored Prod. Res.*, 9: 181-188.
- Nair, K.S.S., Desai, A.K., 1973b. The termination of diapause in *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae). *J. Stored Prod. Res.* 8, 275-90.
- Nayak, M. K., Collins P. J., Pavic H. , Kopittke R. A., 2003. Inhibition of egg development by phosphine in the cosmopolitan pest of stored products *Liposcelis bostrychophila* (Psocoptera: Liposcelididae). *Pest Manag. Sci.* 59,1191-1196.
- Nayak, M.K., 2012. Managing resistance to phosphine in storage pests: challenges and opportunities' In: Navarro, S., Banks, H.J., Jayas, D.S., Bell, C.H., Noyes, R.T., Ferizli, A.G., Emekci, M., Isikber, A.A., Alagusundaram, K. (Eds.), *Proc 9th. Int. Conf. On Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products*, Antalya, Turkey. 15 -19 October 2012, ARBER Professional Congress Services, Turkey Pp: 609-619.
- Nayak, M.K., Collins, P.J., 2008. Influence of concentration, temperature and humidity on toxicity of phosphine against strongly phosphine-resistant psocid *Liposcelis bostrychophila* Badonnel (Psocoptera: Liposcelididae). *Pest Manag. Sci.* 64, 971-976.
- Nayak, M.K., Collins, P.J., Holloway, J.K., Emery, R.N., Pavic, H., Bartlet, J., 2013. Strong resistance to phosphine in the rusty grain beetle, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) (Coleoptera: Laemophloeidae): its characterization, a rapid assay for diagnosis and its distribution in Australia. *Pest Manag. Sci.* 69, 48-53.

- Odeyemi, O.O., Hassan, A.T. 1993. Influence of temperature, humidity and photoperiod on oviposition and larval development in *Trogoderma*, Appl. Entomol. Zool., 28, 275–81.
- Olson, R.L.O., Farris R.E., Barr, N.B., and Cognato A.I. 2014. Molecular identification of *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae) using the 16s gene. J. Pest Sci. 87: 701–10.
- Opit, G.P., Phillips, T.W., Aikins, M.J., Hasan, M.M., 2012. Phosphine resistance in *Tribolium castaneum* and *Rhyzopertha dominica* from stored wheat in Oklahoma. J. Econ. Entomol. 105, 1107-1114.
- Pasek, J.E., 1998. Khapra Beetle (*Trogoderma granarium* Everts): Pest-Initiated Pest Risk Assessment. Raleigh, NC: USDA-APHIS.
- Pimentel, M.A.G., Guedes, R.N.C., 2010. Spread of phosphine among Brazilian populations of three species of stored products insects. Neotrop. Entomol. 39,101-107.
- Pretheep, Kumar, P., Mohan S, Balasubramanian P., 2010. Insecticide Resistance—Stored-Product Insects: Mechanism and Management Strategies. Saarbrucken, Ger.: Lambert Acad. Publ.
- Pruthi, H.S., Singh, M., 1950. Pests of stored grain and their control. Indian J. Agric.
- Rahman, K.A, Sohi, G.S, Sapra, A.N., 1945. Studies on stored grain pests in the Punjab. VI. Biology of *Trogoderma granarium* Everts, Ind. J. Agric. Sci. 15, 85-92
- Rahman, K.A., 1942. Insect pests of stored grain in the Punjab and their control. Ind. J. Agric. Sci. 12, 564-87.
- Rahman, M.M., Islam, W., Ahmad, K.N., 2009. Functional response of the predator *Xylocoris flavipes* to three stored product insect pests. Int. J. Agric. Biol. 11, 316-20.
- Rajendran, S., Narasimhan, K.S., 1994. Phosphine resistance in the cigarette beetle *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae) and overcoming control failures during fumigation of stored tobacco. Int. J. Pest Manag. 40, 207e210.
- Rambeau, M.,D. Benitz, S. Dupuis, Ducom, P., 2000. Hydrogen Cyanide as an Immediate Alternative to Methyl Bromide for Structural Fumigations. In: Fresno Conference Abstracts, International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products, Fresno, California.
- Rees, D.P., Banks, H.J., 1999. The Khapra Beetle, *Trogoderma Granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae), a Quarantine Pest of Stored Products: Review of Biology, Distribution, Monitoring and Control, CSIRO.
- Saglam, O., Edde, P.A., Phillips, T.W., 2015. Resistance of *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: anobiidae) to fumigation with phosphine. J. Econ. Entomol. 108, 2489-2495.
- Sci. 18 (4), 1-88.



- Shivananjappa, S., Fields, P., Laird R.A, Floate, K. D. Contributions of diet quality and diapause duration to the termination of larval diapause in khapra beetle, *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae). J. Stored Prod. Res.101-535
- Sinclair, B.J., Ferguson, L.V., Salehipour-Shirazi, G., MacMillan, H.A., 2013. Cross-tolerance and cross-talk in the cold: relating low temperatures to desiccation and immune stress in insects. Integr. Comp. Biol. 53, 545-56.
- Singh, P., Saud, J. N., Krishnamurthy, K., 1967. Phosphine-a versatile fumigant. Bull. Grain Tech. 5, 3.
- Sinha, R.N., Utida, S. 1967. Climatic areas potentially vulnerable to stored product insects in Japan. Appl. Entomol. Zool. 2, 124–32.
- Solà, M., Riudavets, J., and Agustí, N. 2018. Detection and identification of five common internal grain insect pests by multiplex PCR. Food Control. 84, 246–254.
- Spratt, E., Dignan, G., Banks, H. J., 1985. The effects of high concentrations of carbon dioxide in air on *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera:Dermestidae). 21, 41-46.
- Stibick, J. 2007. New Pest Response Guidelines: Khapra Beetle. USDA–APHIS–PPQ–Emergency and Domestic Programs, Riverdale, Maryland. 2, 8.
- (UNEP) United Nations Environment Programme. 1997. Report of the ninth meeting of the parties to the Montreal Protocol on substances that deplete the ozone layer, UNEP/OzL.Pro.9/12, Montreal, September, 1997.
- Vassilakos, T. N., Riudavets, J., Castañé, C., Iturralde-Garcia, R. D., Athanassiou, C. G., 2019. Efficacy of Modified Atmospheres on *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae) and *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). J. Econ. Entomol. 5, 2450-2457.
- Wang, D., Collins, P.J., Gao, X., 2006. Optimizing indoor phosphine fumigation of paddy rice bag-stacks under sheeting for control of resistant insects. J. Stored Prod. Res. 42, 207-217.
- Wazer, J.W., Phosphorus and Its Compounds, 1958. Chemistry, vol. 1. Interscience, New York, 187-367.
- Weast, R. C. (ed.), 1987. Handbook of Chemistry and Physics,67th edn. CRC Press Inc., Boca Raton FL.
- Wilches C.D.M., 2016. Effects of extreme temperatures on the survival of the quarantine stored-product pest, *Trogoderma granarium* (Khapra Beetle) and on its associated bacteria. Master’s Thesis, Univ. Lethbridge, Lethbridge, Can.
- Wilches C.D.M., Laird R.A., Floate K.D., Fields P.G., 2016. A review of diapause and tolerance to extreme temperatures in dermestids (Coleoptera). J. Stored Prod. Res. 68, 50-62.

- Williams, J.O., S.A. Adesuyi, J. Shejbal., 1980. Susceptibility of the life stages of *Sitophilus zeamais* and *Trogoderma granarium* larvae to nitrogen atmosphere storage of grains. In: Controlled Atmosphere Storage of Grains, Elsevier Sci. Publ. Co., Amersterdam, Holland, 93-100.
- Winks, R. G., 1984. The toxicity of phosphine to adults of *Tribolium castaneum* (Herbst): Time as a dosage factor. *J. Stored.Prod. Res.* 20, 45-56.