

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Μελέτη της βιο-οικολογίας της καρπόκαψας του μήλου
Cydia pomonella και της ανθεκτικότητας της σε
εντομοκτόνα**



Κωνσταντίνος Χ. Βουδούρης

Διδακτορική Διατριβή

Λάρισα, 2009



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Μελέτη της βιο-οικολογίας της καρπόκαψας του μήλου
***Cydia pomonella* και της ανθεκτικότητας της σε**
εντομοκτόνα

Κωνσταντίνος Χ. Βουδούρης

Διδακτορική Διατριβή

Λάρισα, 2009



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 7384/1
Ημερ. Εισ.: 15/10/2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
634.119
ΒΟΥ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087182

Μελέτη της βιο-οικολογίας της καρπόκαψας του μήλου *Cydia pomonella* και της ανθεκτικότητας της σε εντομοκτόνα

Κωνσταντίνος Χ. Βουδούρης
Διδακτορική Διατριβή

Η διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

<i>Τριμελής εξεταστική επιτροπή</i>		
Ζ. Δ. Μαμούρης	Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών	Επιβλέπων
Ι. Α. Τσιτσιπής	Καθηγητής Εντομολογίας	Μέλος
Δ. Κ. Σταμόπουλος	Καθηγητής Εφαρμοσμένης Εντομολογίας-Ζωολογίας	Μέλος
<i>Επταμελής εξεταστική επιτροπή</i>		
Ζ. Δ. Μαμούρης	Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών	Επιβλέπων
Ι. Α. Τσιτσιπής	Καθηγητής Εντομολογίας	Μέλος
Δ. Κ. Σταμόπουλος	Καθηγητής Εφαρμοσμένης Εντομολογίας-Ζωολογίας	Μέλος
Δ. Προφήτου-Αθανασιάδου	Καθηγήτρια Εφαρμοσμένης Εντομολογίας	Μέλος
Δ. Κωβαίος	Καθηγητής Γενικής και Εφαρμοσμένης Ακαρολογίας και Εντομολογίας,	Μέλος
Κ. Μαθιόπουλος	Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας	Μέλος
Α. Φαντινού	Επίκουρη Καθηγήτρια Οικολογίας Εντόμων	Μέλος

Λάρισα, 2009

Στην Οικογένεια μου

Περιεχόμενα

Πρόλογος	5
Ευχαριστίες	6-7
Περίληψη	8-11
Α'. Γενικό Μέρος	12
1. Στοιχεία βιο-οικολογίας του <i>Cydia pomonella</i>	13
1.1. Ταξινόμηση και μορφολογία	13-16
1.2. Ξενιστές	16-17
1.3. Βιολογικός κύκλος	17-19
1.4. Πληθυσμιακή διακύμανση	19-20
1.5. Φερομόνες φύλου	21-22
1.6. Γεωγραφική εξάπλωση	22-23
2. Διαχείριση του <i>Cydia pomonella</i>	23
2.1. Ζημίες	23-24
2.2. Ολοκληρωμένη διαχείριση	24-25
2.2.1. Μοντέλα πρόγνωσης	25-26
2.2.2. Απολύμανση καρπών	26
2.2.3. Παρεμπόδιση σύζευξης	27
2.2.4. Εξόντωση των αρσενικών	27-28
2.2.5. Μαζική παγίδευση	28
2.2.6. Εξαπόλυση στειρωμένων αρσενικών ατόμων	28
2.2.7. Βιολογική καταπολέμηση	29-30
2.2.8. Χημική καταπολέμηση	30-32
3. Ανθεκτικότητα	33
3.1. Ανάπτυξη ανθεκτικότητας	33
3.2. Επίπεδο ανθεκτικότητας	34
3.3. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας	34
3.3.1. Ηθολογική ανθεκτικότητα	34-35
3.3.2. Φυσιολογική ανθεκτικότητα	35
3.3.3. Μείωση ευαισθησίας στόχου δράσης	35
3.3.3.1. Ακετυλοχονιστεράση (AChE)	35-36
3.3.3.2. Πρωτεϊνικό κανάλι μεταφοράς νατρίου Na ⁺	36
3.3.3.3. Υποδοχέας του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA).	36-37
3.3.3.4. Νικοτινεργικοί υποδοχείς της ακετυλοχολίνης (nAChR)	37
3.3.4. Βιοχημική ανθεκτικότητα	37-38
3.3.4.1. Καρβοξυλεστεράσες	38
3.3.4.2. Οξειδάσες μικτής λειτουργίας (MFO)	38-39
3.3.4.3. S-Τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GST)	39
4. Πληθυσμιακή γενετική	39-40
4.1. Μοριακοί δείκτες	40-41
4.1.1. Αλλοένζυμα	41
4.1.2. Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLPs)	41
4.1.3. Τυχαία ενισχυμένο πολυμορφικό DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPDs)	41-42
4.1.4. Πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένων τμημάτων	42

(Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLPs)	
4.1.5. SWAPP (Sequencing With Arbitrary Primer Pairs)	42
4.1.6. Ανάλυση πολυμορφισμών διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP)	42-43
4.1.7. Μικροδορυφόροι (microsatellites)	43-44
4.1.8. Μιτοχονδριακό DNA	44
Σκοπός της εργασίας	45
B'. Ειδικό μέρος	46
5. Αξιολόγηση μοντέλων πρόγνωσης εμφάνισης του <i>Cydia romonella</i> και μελέτη φαινολογίας	47
5.1. Εισαγωγή	47-48
5.2. Υλικά και Μέθοδοι	49-50
5.3. Αποτελέσματα	51-58
5.4. Συμπεράσματα	58-60
6. Αξιολόγηση δύο τεχνητών σιτηρεσιών για μαζική εκτροφή προνυμφών <i>Cydia romonella</i>	61
6.1. Εισαγωγή	61-62
6.2. Υλικά και Μέθοδοι	62
6.2.1. Σιτηρέσια	62-63
6.2.2. Συνθήκες εκτροφής	63-65
6.2.3. Στατιστική ανάλυση	65-66
6.3. Αποτελέσματα	66
6.3.1. Βάρος νυμφών	66-67
6.3.2. Χρόνος ολοκλήρωσης προνυμφικών σταδίων	67-68
6.3.3. Θνησιμότητα	68-69
6.4. Συμπεράσματα	69-71
7. Μελέτη της ανθεκτικότητας του <i>Cydia romonella</i> σε εντομοκτόνα	72
7.1. Εισαγωγή	72-75
7.2. Υλικά και Μέθοδοι	75
7.2.1. Συλλογή δειγμάτων - Συνθήκες εκτροφής	75-77
7.2.2. Εύρεση διαγνωστικών δόσεων	77
7.2.2.1. Νεαρές προνύμφες	77-78
7.2.2.2. Προνύμφες πέμπτου σταδίου	78
7.2.3. Βιοδοκιμές	79
7.2.3.1. Στάδιο του ωού	79
7.2.3.2. Νεαρές προνύμφες	80
7.2.3.3. Προνύμφες πέμπτου σταδίου	80-81
7.2.3.4. Διαπαύουσες προνύμφες	81
7.2.4. Βιοχημικές δοκιμές	81
7.2.4.1. Απομόνωση ενζύμων	82
7.2.4.2. Καρβοξυλεστεράσες (EST)	82
7.2.4.3. Τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST)	82-83
7.2.4.4. Οξειδάσες μικτής λειτουργίας (MFO)	83
7.2.5. Μοριακές δοκιμές	83
7.2.5.1. Απομόνωση DNA	83-84
7.2.5.2. <i>Kdr</i> ανθεκτικότητα και τροποποιημένη AChE	84-85
7.2.5.3. Στατιστική ανάλυση	85
7.3. Αποτελέσματα	85
7.3.1. Διαγνωστικές δόσεις	85-86
7.3.2. Βιοδοκιμές	87

7.3.2.1. Σταδιο του ωού	87
7.3.2.2. Νεαρές προνύμφες	87-88
7.3.2.3. Αναπτυγμένες προνύμφες πέμπτου σταδίου	88-91
7.3.2.4. Διαπαύουσες προνύμφες	92-95
7.3.2.5. Σύγκριση βιοδοκιμών σε διαφορετικά στάδια του εντόμου	95-97
7.3.3. Βιοχημικές και μοριακές δοκιμές	97
7.3.3.1. Αναπτυγμένες προνύμφες πέμπτου σταδίου	97-101
7.3.3.2. Διαπαύουσες προνύμφες	102-106
7.3.3.3. Βιοχημικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας σε πληθυσμούς από οπωρώνες με διαφορετική καταπολέμηση	106
7.4. Συζήτηση	107
7.4.1. Επίπεδο Ανθεκτικότητας	107-108
7.4.2. Διασταυρούμενη Ανθεκτικότητα	108-109
7.4.3. Βιοχημική Βάση Ανθεκτικότητας	109-111
7.4.4. Βιοχημικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του εντόμου	111-112
7.4.5. Μοριακή Βάση ανθεκτικότητας	112
7.4.6. Ανθεκτικότητα σε πληθυσμούς από οπωρώνες με διαφορετική καταπολέμηση	113
7.4.7. Πρακτικές προεκτάσεις	113
8. Ικανότητα διασποράς της καρπόκαψας και γενετική δομή πληθυσμών της	114
8.1. Εισαγωγή	114-117
8.2. Υλικά και Μέθοδοι.	117
8.2.1. Αξιολόγηση ικανότητας διασποράς με εξαπόλυση σημασμένων ατόμων	117
8.2.1.1. Πειραματικό σχέδιο έτους 2007	117-119
8.2.1.2. Πειραματικό σχέδιο έτους 2008	119-121
8.2.1.3. Στατιστική ανάλυση	121
8.2.2. Αξιολόγηση ικανότητας διασποράς με χρήση μικροδορυφόρων	121
8.2.2.1. Συλλογή δειγμάτων	121-123
8.2.2.2. Δείκτες μικροδορυφορικού DNA	123-125
8.2.2.3. Ισορροπία Hardy-Weinberg	125
8.2.2.4. Ανάλυση συγγένειας (kinship analysis)	126
8.2.2.5. Αριθμός συζευγμένων θηλυκών	126-127
8.2.2.6. Διασπορά συζευγμένων θηλυκών	127
8.2.3. Συγκριτική μελέτη πληθυσμών από Ελλάδα και Γαλλία	128
8.2.3.1. Συλλογή δειγμάτων	128
8.2.3.2. Ανάλυση δεικτών μικροδορυφορικού DNA	128
8.2.3.3. Συχνότητες αλληλομόρφων, ισορροπία Hardy-Weinberg και ανισορροπία σύνδεσης	128-130
8.2.3.4. Μπαγεσουανή ανάλυση ομαδοποίησης και ταξινόμησης	130-131
8.2.3.5. Ανάλυση μοριακής διακύμανσης, γενετικές αποστάσεις	132
8.3. Αποτελέσματα	132
8.3.1. Μελέτη διασποράς με εξαπόλυση σημασμένων ατόμων	132
8.3.1.1. Έτος 2007	132-133

8.3.1.2. Έτος 2008	134-136
8.3.2. Μελέτη συγγένειας και διασποράς με χρήση δεικτών μικροδορυφορικού DNA	136
8.3.2.1. Γενετική ποικιλότητα και ισορροπία Hardy-Weinberg	136-138
8.3.2.2. Εκτίμηση συγγένειας	139-141
8.3.3. Συγκριτική μελέτη πληθυσμών από Ελλάδα και Γαλλία	141-142
8.3.3.1. Γενετική ποικιλομορφία πληθυσμών	142-144
8.3.3.2. Γενετική διαφοροποίηση πληθυσμών	145-152
8.4. Συζήτηση	152
8.4.1. Διασπορά του <i>Cydia pomonella</i>	152-156
8.4.2. Γενετική παραλλακτικότητα και γονιδιακή ροή μεταξύ πληθυσμών	156-159
8.4.3. Πρακτικές προεκτάσεις	159-160
9. Γενική Συζήτηση	161-164
10. Βιβλιογραφία	165-186
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	187-207

Πρόλογος

Στην παρούσα διατριβή μελετούνται σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα των προγραμμάτων ολοκληρωμένης διαχείρισης του εντόμου της καρπόκαψας.

Η διατριβή αποτελείται από δυο μέρη. Στο γενικό μέρος γίνεται μερική επισκόπηση της βιο-οικολογίας της καρπόκαψας. Επίσης, αναφέρονται μέθοδοι διαχείρισης του εντόμου καθώς και ορισμένα στοιχεία για την ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα και για μεθόδους μελέτης της γενετικής των πληθυσμών του. Στο ειδικό μέρος περιγράφονται οι πειραματικές εργασίες που πραγματοποιήθηκαν στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και στο Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Τμήματος Γεωπονίας και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Αναλύονται τα αποτελέσματα που βρέθηκαν, συγκρίνονται και εξάγονται συμπεράσματα.

Ευχαριστίες

Στην πραγματοποίηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής συνέβαλαν διάφοροι άνθρωποι τόσο από τον ακαδημαϊκό χώρο όσο και έξω από αυτόν, τους οποίους θέλω να ευχαριστήσω για την πολύτιμη βοήθεια και την αμέριστη συμπαράσταση τους.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα Καθηγητή μου, τον κ. Ζήση Δ. Μαμούρη, Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την πολύτιμη βοήθεια και το πραγματικό ενδιαφέρον του όλα αυτά τα χρόνια της συνεργασίας μας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή μου, τον κ. Ιωάννη Αθ. Τσιτσιπή Καθηγητή Εντομολογίας του Τμήματος Γεωπονίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας που μου έδειξε τα πρώτα βήματα στην επιστήμη της Εντομολογίας, μου δίδαξε τον επιστημονικό τρόπο σκέψης και συνέβαλε στην επιστημονική μου κατάρτιση.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες εκφράζονται στην εξεταστική επιτροπή: στον Καθηγητή Εφαρμοσμένης Εντομολογίας-Ζωολογίας, κ. Δ. Κ. Σταμόπουλο, στην Καθηγήτρια Εφαρμοσμένης Εντομολογίας, κα. Δ. Προφήτου-Αθανασιάδου, στον Καθηγητή Γενικής και Εφαρμοσμένης Ακαρολογίας και Εντομολογίας κ. Δ. Κωβαίο, στον Επίκουρο Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας κ. Κ. Μαθιόπουλο και στην Επίκουρη Καθηγήτρια Οικολογίας Εντόμων κα. Α. Φαντινού, για τις υποδείξεις και διορθώσεις της διατριβής.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρα Ιωάννη Μαργαριτόπουλο για την καθοδήγηση, το ενδιαφέρον του και τις συμβουλές κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων όπως επίσης και κατά τη συγγραφή της διατριβής.

Ευχαριστίες εκφράζονται στον Δρα Κων/νο Ζάρπα για τη βοήθεια του στην εκτροφή και συντήρηση των εντόμων. Σημαντική ήταν η βοήθεια της Δρα Ευαγγελία Μόρου που με εκπαίδευσε στις βιοχημικές τεχνικές, όπως και του υποψηφίου διδάκτορα Παναγιώτη Σκούρα για τη βοήθειά του στη συλλογή των δειγμάτων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Λέκτορα Λιλίκα Σαραφίδου και τον υποψήφιο διδάκτορα Κων/νο Σταμάτη για τη βοήθειά τους στις μοριακές τεχνικές.

Ευχαριστίες εκφράζονται στη Γενική Γραμματρία Έρευνας και Τεχνολογίας της Ελλάδας και στην Επιτροπή της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τη συμβολή τους στη χρηματοδότηση της έρευνας δια μέσου του ερευνητικού προγράμματος ΠΕΝΕΔ 2003 «Καταγραφή της ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα τεσσάρων εντόμων μέγιστης οικονομικής σημασίας (του δάκου της ελιάς, της πράσινης αφίδας της ροδακινιάς, της μύγας της Μεσογείου και της καρπόκαψας του μήλου), διερεύνηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας και μελέτη στοιχείων της βιο-οικολογίας τους».

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, την αδερφή μου, την υποψηφία διδάκτορα Ευαγγελία Κουτσογιαννούλη και τον προπτυχιακό φοιτητή Στυλιανό Μπουλινάκη για τη συμπαράσταση, την ενθάρρυνση και την κατανόηση που έδειξαν όλο αυτό το διάστημα.

Περίληψη

Η καρπόκαψα των μηλοειδών, *Cydia pomonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Tortricidae), είναι ο σημαντικότερος εχθρός της μηλιάς. Είναι είδος διαδεδομένο σχεδόν σε όλο τον κόσμο και εμφανίζει μεγάλη ικανότητα προσαρμογής σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες. Παρόλο που στην Ελλάδα η καρπόκαψα είναι εχθρός μεγίστης οικονομικής σημασίας, δεν υπάρχει καμία ολοκληρωμένη μελέτη σχετικά με την οικολογία και την καταπολέμηση της.

Στο γενικό μέρος της διατριβής γίνεται βιβλιογραφική επισκόπηση της βιοοικολογίας της καρπόκαψας, *C. pomonella*. Επίσης, αναφέρονται μέθοδοι διαχείρισης του εντόμου, ορισμένα στοιχεία για την ανθεκτικότητα των εντόμων στα εντομοκτόνα και μέθοδοι μελέτης της γενετικής των πληθυσμών τους. Το πειραματικό μέρος αφορά στη μελέτη σημαντικών παραγόντων που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα των προγραμμάτων ολοκληρωμένης διαχείρισης του εντόμου. Συγκεκριμένα, αξιολογήθηκαν τρία μοντέλα πρόγνωσης εμφάνισης του εντόμου και δύο σιτηρέσια, για την μαζική εκτροφή προνυμφών σε εργαστηριακές συνθήκες. Επίσης, μελετήθηκε η ανθεκτικότητα σε διάφορα εντομοκτόνα σε πληθυσμούς από διαφορετικούς ξενιστές και περιοχές της Ελλάδας. Διερευνήθηκε η ικανότητα πτήσης του εντόμου καθώς και ο αριθμός των γενεών του σε κύριες μηλοπαραγωγικές περιοχές της Ελλάδας. Τέλος μελετήθηκε η γενετική δομή πληθυσμών της καρπόκαψας από διάφορες περιοχές και ξενιστές.

Αξιολογήθηκαν τρία μοντέλα πρόγνωσης εμφάνισης της καρπόκαψας στην περιοχή Αγιάς Λάρισας και Ζαγοράς Μαγνησίας. Κανένα από τα τρία μοντέλα δεν μπόρεσε να προσομοιώσει με ακρίβεια την εμφάνιση των φυσικών πληθυσμών του εντόμου στις δυο περιοχές. Από τις συλλήψεις αρσενικών σε φερομονικές παγίδες διαπιστώθηκε ότι στην Αγιά υπάρχουν τέσσερις γενεές το έτος, ενώ στη Ζαγορά τρεις ή τέσσερις γενεές ανάλογα με το έτος. Σε εργαστηριακά πειράματα, διαπιστώθηκε ότι το σιτηρέσιο «Manduca Premix-Heliothis Premix» ήταν καταλληλότερο από το σιτηρέσιο Ivaldi-Sender για την μαζική εκτροφή των προνυμφών της καρπόκαψας.

Με την εφαρμογή διαγνωστικών δόσεων, σε διάφορα στάδια του εντόμου, διερευνήθηκε η ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε δέκα εντομοκτόνα σε πληθυσμούς από κύριες μηλοπαραγωγικές περιοχές της Ελλάδας. Διαπιστώθηκε μειωμένη αποτελεσματικότητα των περισσότερων από τα εντομοκτόνα εκτός του

methoxyfenozide. Διασταυρούμενη ανθεκτικότητα παρουσιάστηκε μεταξύ οργανοφωσφορικών, πυρεθροειδών και ρυθμιστών ανάπτυξης. Βρέθηκε ότι ο κύριος μηχανισμός που εμπλέκεται στην ανθεκτικότητα στους ελληνικούς πληθυσμούς είναι η αυξημένη δραστηριότητα των οξειδασών μικτής λειτουργίας (MFO), ενώ δεν ανιχνεύθηκε *kdr* ανθεκτικότητα και τροποποιημένη ακετυλχολινεστεράση (AChE).

Η ικανότητα πτήσης του εντόμου μελετήθηκε με εξαπόλυση σημασμένων αρσενικών και θηλυκών ενηλίκων και επανασύλληψη σε παγίδες τύπου Δέλτα που περιείχαν καίρομόνη και σεξουαλική φερομόνη (Mark-Release-Capture, MRR). Επιπλέον, η διασπορά της καρπόκαψας μελετήθηκε με την ανάλυση συγγένειας (kinship analysis) σε δείγματα από μηλεώνες με τη χρήση 11 μικροδορυφορικών δεικτών DNA. Διαπιστώθηκε και με τις δύο μεθόδους ότι η πλειονότητα των ατόμων μετακινείται σε σχετικά μικρή απόσταση (40m με την MRR και 80m με την ανάλυση συγγένειας). Λίγα μόνο άτομα συνελήφθησαν σε απόσταση 80m, ενώ με την ανάλυση συγγένειας βρέθηκε ότι ορισμένα θηλυκά μετακινήθηκαν και σε απόσταση 240m.

Με την χρήση 11 μικροδορυφορικών δεικτών DNA διερευνήθηκε η γενετική δομή εννιά Ελληνικών και έξι Γαλλικών πληθυσμών της καρπόκαψας από τρεις ξενιστές (μηλιά, αχλαδιά, καρυδιά). Οι πληθυσμοί διαχωρίστηκαν σε δύο γενετικές ομάδες, η μια περιελάμβανε τους πληθυσμούς από την Ελλάδα και η άλλη αυτούς από τη Γαλλία. Δεν διαπιστώθηκε σημαντική γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των Ελληνικών πληθυσμών που συλλέχθηκαν από διάφορες περιοχές και ξενιστές. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στους Γαλλικούς πληθυσμούς. Η υψηλή γονιδιακή ροή που παρατηρήθηκε μεταξύ των πληθυσμών σε κάθε χώρα δεν μπορεί να ερμηνευθεί από την ικανότητα διασποράς του εντόμου, γιατί όπως διαπιστώθηκε το έντομο δεν μετακινείται συνήθως σε μεγάλες αποστάσεις. Οι πιθανότερες αιτίες του φαινομένου αυτού είναι ανθρώπινη δραστηριότητα και το εμπόριο.

Abstract

The codling moth, *Cydia pomonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Tortricidae), is the major pest of apple cultivation in many parts of the world. The species has achieved a nearly global distribution due to its successful adaptation to different environmental conditions. Although codling moth is an economically important insect pest in Greece, there is not any detailed study on its ecology and control.

The aim of the present thesis was the study of various factors that influence the effectiveness of Integrated Pest Management programs. Particularly, the insecticide resistance in various populations from mainland Greece was examined along with aspects of the species population genetics and its dispersal ability. In addition, the reliability of three phenology models was evaluated and the moth phenology was investigated in major apple growing regions of Greece. Lastly, the suitability of two artificial diets in codling moth mass rearing systems was evaluated.

Laboratory experiments revealed that «Manduca Premix-Heliothis Premix» media was more suitable for larval mass-rearing than Ivaldi-Sender, as larvae grew faster and attained higher weight at the pupal stage. None of the three phenology models examined simulated accurately the phenology of codling moth in two major apple-growing regions, i.e., Aghia, Larissa and Zagora, Magnesia. The flight curves showed the existence of four generations in Aghia and three or four in Zagora.

The resistance of codling moth populations to ten insecticides of various chemical classes was explored by the application of discriminating doses to different developmental stages of the insect. Various levels of resistance were observed in almost all the insecticides examined and with methoxyfenozide being the most efficient one. In addition, cross-resistance was observed between organophosphates pyrethroids and growth regulators. Biochemical assays revealed that the main mechanism involved in resistance in Greek populations is the elevated activity of mixed-function oxidases (MFOs). On the other hand, no *kdr* resistance or Ache mutations were found in the populations examined.

The flight capacity of both male and female moths was studied through mark-release-recapture experiments (MRR) using pheromone and kairomone-baited delta traps. In addition, the moth dispersal was examined by kinship analysis of

collected larvae based on microsatellite genotyping DNA analysis. Both approaches demonstrated a low dispersal distance for the majority of individuals (40m and 80m for MRR method and kinship analysis, respectively). Only a low percentage of individuals appear to disperse in longer distance, reaching either 80m (MRR method) or 240m (kinship analysis).

Finally the genetic variation and structure of codling moth populations from different hosts (apple, peach, and walnut) and regions of Greece and France as well as from different hosts was investigated by the application of 11 microsatellite DNA markers. Results showed that populations can be distinguished in two main groups. The first included the samples from Greece and the second those from France. The analysis also revealed that the populations from Greece were not genetically differentiated. The same was observed in populations from France. Although these results imply the occurrence of extensive gene flow, they cannot be interpreted by the insect dispersal that has been determined to be very limited. Therefore, this gene-flow could be attributed to man activities including commerce

Α'. Γενικό Μέρος

1. Στοιχεία βιο-οικολογίας του *Cydia pomonella*

1.1. Ταξινόμηση και μορφολογία

Η πρώτη αναφορά για την καρπόκαψα δημοσιεύτηκε το 1635 από τον Netherlander Lean Goedaerdt και περιείχε απεικονίσεις της προνύμφης και των ενηλίκων. Το 1747 δόθηκε στο έντομο το όνομα «codling moth» από τον Wilkes. Η ταξινόμηση του είδους *Cydia pomonella* (Linnaeus) είναι η ακόλουθη:

Βασίλειο: Animalia

Κλάση: Insecta

Υπόκλαση: Endopterygota

Τάξη: Lepidoptera

Υπεροικογένεια: Tortricoidea

Οικογένεια: Tortricidae

Το είδος έχει $2n = 56$ χρωμοσώματα με το θηλυκό άτομο να έχει δύο διαφορετικά φυλετικά χρωμοσώματα (WZ) και το αρσενικό δύο ίδια (ZZ).

Το ενήλικο έχει μήκος 7-10cm και άνοιγμα πτερύγων 14-24mm. Το σώμα και τα εξαρτήματά του (πτέρυγες, πόδια και κεραίες) καλύπτονται από χαρακτηριστικές πεπλατυσμένες τρίχες που ονομάζονται λέπια. Έχουν χιτίνισμένο εξωσκελετό, εύκαμπτο και μαλακό και σώμα σαφώς διακρινόμενο σε κεφάλι, θώρακα και κοιλιά. Η κεφαλή είναι μικρή και φέρει στοματικά μόρια διαμορφωμένα σε μυζητική προβοσκίδα που σχηματίζεται με επιμήκυνση και συνένωση των εξωτερικών λοβών των κάτω γνάθων. Οι κεραίες είναι ροπαλοειδείς και οι σύνθετοι οφθαλμοί καλά αναπτυγμένοι (Horak 1991). Φέρει τέσσερις μεμβρανοειδείς πτέρυγες κατάλληλες για πτήση που στο κέντρο τους σχηματίζεται μεγάλο δυσειδές κύτταρο από το οποίο προβάλλουν 10 νεύρα της πρόσθιας και εξι της οπίσθιας πτέρυγας (Εικόνα 1.1.).

Οι πρόσθιες πτέρυγες, που είναι μεγαλύτερες από τις οπίσθιες, έχουν χρώμα τεφρό ή τεφροκαστανό και λεπτές εγκάρσιες ή καστανόμαυρες γραμμώσεις. Σε πολλά άτομα το βασικό 1/3 περίπου μέρος των πρόσθιων πτερύγων είναι σαφώς πιο σκοτεινό από το μεσαίο. Κοντά στην κορυφή και προς την πυγαία γωνιά τους, οι πρόσθιες πτέρυγες έχουν μια σχετική σκοτεινόχρωμη κηλίδα, το speculum. Η χαρακτηριστική αυτή κηλίδα έχει χρώμα καστανό και πλαισιώνεται από δύο μπρούτζινες και λαμπερές γραμμές σε σχήμα παρένθεσης. Η εσωτερική (προς το

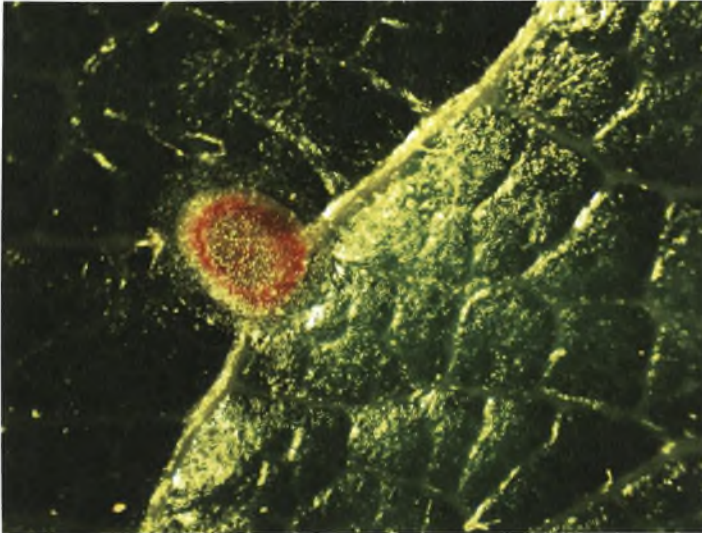
κέντρο της πτέρυγας) γραμμή έχει δίπλα και κατά μήκος της μια στενή μαύρη ζώνη. Κατά μήκος της πρόσθιας παρυφής (costa) των πρόσθιων πτερυγών, υπάρχουν μικρές σκοτεινές καμπύλες γραμμές σε σχήμα κόμματος, που γίνονται πιο έντονες στο ακραίο ήμισυ της πτέρυγας. Οι κροσσοί είναι χρώματος χρυσαφί. Οι οπίσθιες πτέρυγες έχουν χρώμα καστανό προς χαλκόχρωμο με χρυσιζουσες ανταύγιες. Είναι σκοτεινότερες προς την περίμετρο και έχουν στη βάση του cubitus μια ομάδα μακριών σκοτεινών τριχών σε σχήμα λαβίδας. Και τα δύο ζεύγη πτερυγών στην κοιλιακή επιφάνειά τους, έχουν στο θηλυκό το ίδιο χρώμα, τεφροκαστανό με χαλκόχρωμες ανταύγιες, ενώ στο αρσενικό οι πρόσθιες πτέρυγες έχουν στη μέση και προς τα εμπρός μια σκοτεινόχρωμη κηλίδα σχεδόν ορθογώνιου σχήματος (Τζανακάκης 1995).



Εικόνα 1.1. Ενήλικο άτομα του *Cydia pomonella*.

Τα πόδια είναι μακριά, λεπτά, με επιμήκη ισχία και με ταρσούς με 5 άρθρα. Η κοιλιά αποτελείται από 10 τμήματα. Στο θηλυκό το 9^ο και το 10^ο τμήμα ενώνονται σε συσταλτό όργανο που καλείται ωσθέτης. Στα αρσενικά το 9^ο κοιλιακό τμήμα έχει σκληρυνθεί και διαφοροποιηθεί ώστε να αποτελέσει το γενετικό σπλισμό. Η κοιλιά καταλήγει σε πυγαίο θύσανο (Horak 1991).

Τα αυγά έχουν την μορφή «φακών». Κατά την εναπόθεση από το θηλυκό είναι διαφανή, αργότερα χρωματίζονται εκρού ενώ 2-3 ημέρες πριν την εκκόλαψη εμφανίζεται ένας κόκκινος δακτύλιος και αμέσως πριν εκκολαφθεί είναι ορατό το μαύρο κεφάλι της προνύμφης (Εικόνα 1.2.).



Εικόνα 1.2. Γονιμοποιημένο αυγό.

Οι προνύμφες έχουν σώμα επίμηκες, κυλινδρικό που συνίσταται από την κεφαλή, 3 θωρακικά και 10 κοιλιακά τμήματα. Έχουν μέγεθος 16-20mm. Το σώμα έχει χρώμα ροζ και η κεφαλή, που είναι χιτίνισμένη με μασητικά στοματικά μόρια, στα τέσσερα πρώτα προνυμφικά στάδια είναι μαύρη και στο πέμπτο γίνεται καφέ (Εικόνα 1.3.).



Εικόνα 1.3. Προνύμφη πέμπτου σταδίου.

Οι νύμφες έχουν χρώμα κιτρινωπό-καφέ. Οι θηλυκές έχουν μεγαλύτερο βάρος (21-52mg) από τις αρσενικές (7-34mg) και φέρουν τρία κοιλιακά διαφράγματα, ενώ οι αρσενικές τέσσερα (Howell 1991), (Εικόνα 1.4.).



Εικόνα 1.4 Νύμφες του *Cydia pomonella*, A = αρσενικό και Θ = θηλυκό άτομο.

1.2. Ξενιστές

Σύμφωνα με τον Bovey (1966), η προσβολή του δέντρου από την καρπόκαφα είναι αποτέλεσμα της επιλογής θέσης ωτοκίας. Με βάση την συχνότητα με την οποία συγκεκριμένα είδη ξενιστών υφίστανται ζημιά, ο Bovey (1966) διέκρινε τρεις τύπους ξενιστών: α) κύριος (μηλιά, αχλαδιά και κυδωνιά), β) εναλλακτικοί (βερικοκιά, δαμασκηλιά, ροδακινιά, αμυγδαλιά και καρυδιά) και γ) τυχαίοι (λωτοί, σορβιά, καστανιά, μουσμουλιά, ροδιά και πορτοκαλιά).

Ο Wildbolz (1958) διαπίστωσε ότι οι πτητικές ουσίες που εκλύουν οι καρποί των μήλων είναι ο καθοριστικός παράγοντας για την επιλογή της θέσης ωτοκίας. Συγκεκριμένα, ταυτοποίησε την πτητική ουσία *a-farnesene*, στο φλοιό των καρπών του μήλου, η οποία δρα ως καΐρομόνη προσελκύοντας τα θηλυκά για την ωτοκία τους. Η ποσότητα της *a-farnesene* εξαρτάται από το μέγεθος των καρπών και αυξάνει το επίπεδο προσέλκυσης των παρθένων θηλυκών και τη διάθεση για ωτοκία ενώ δεν έχει καμιά επίδραση στα αρσενικά. Η ίδια πτητική ουσία διαπιστώθηκε επίσης στην αχλαδιά και στην κυδωνιά.

Ο Quayle (1926) ανέφερε για πρώτη φορά στην Καλιφόρνια, προσβολή καλλιεργειών καρυδιάς σε ποσοστό 1% που ήταν παρακείμενες με οπωρώνες μηλιάς. Τα ποσοστά προσβολής σε δέντρα καρυδιάς είναι χαμηλά γιατί ο φλοιός,

των νεαρών κυρίως δέντρων, είναι λείος και δεν προσφέρει καταφύγια για τις διαπαύουσες προνύμφες. Ομοίως, το έντομο δεν αναπτύσσεται σε οπωρώνες ροδακινιάς και αμυγδαλιάς, με συνέπεια οι προσβολές αυτών να προέρχονται από γειτονικούς οπωρώνες αχλαδιάς ή μηλιάς (Barnes 1991).

1.3. Βιολογικός κύκλος

Το *Cydia pomonella* έχει όλα τα αρχέγονα χαρακτηρίστηκα της υπό-οικογένειας *Olethreutinae*, δηλαδή ωτοκία αυγών σε απομονωμένα μέρη, αποκλειστική διατροφή στο εσωτερικό των καρπών και διαχείμαση ως πλήρως αναπτυγμένη προνύμφη. Ο βιολογικός κύκλος του εντόμου παρουσιάζει δύο ιδιαίτερα χαρακτηριστικά:

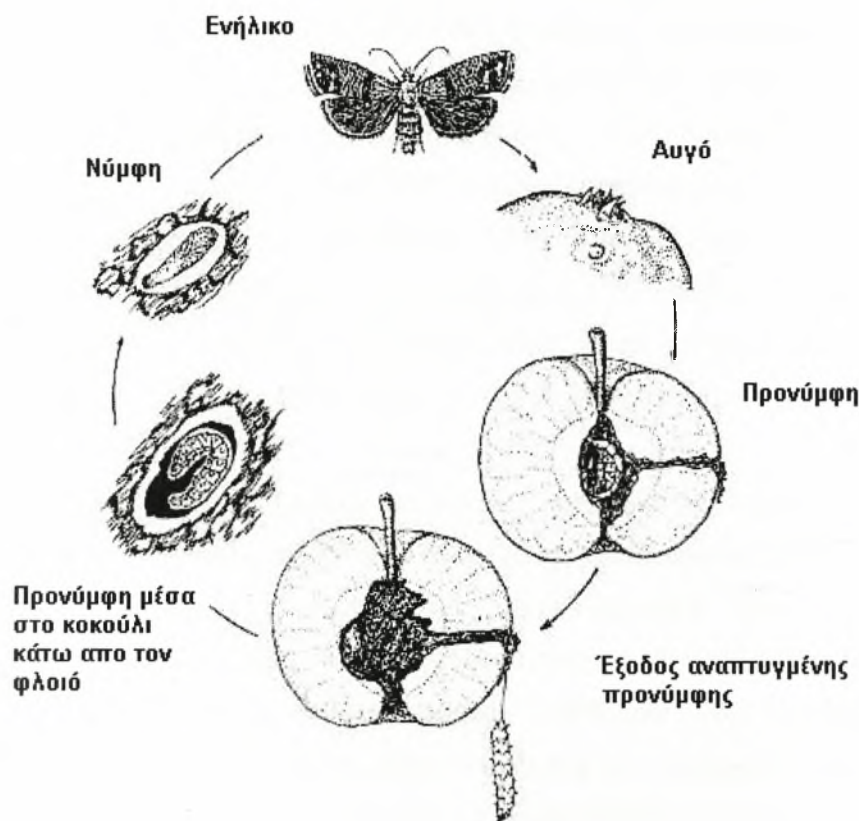
α) Διαχειμάζει στο στάδιο της αναπτυγμένης προνύμφης πέμπτου σταδίου σε βομβύκιο προφυλαγμένο στο έδαφος ή στο δέντρο.

β) Ο αριθμός των ετήσιων γενεών ποικίλει από 1 έως 5.

Ο αριθμός των ετησίων γενεών εξαρτάται από τις κλιματικές συνθήκες της περιοχής και κυρίως από τη θερμοκρασία της άνοιξης και του καλοκαιριού με αποτέλεσμα να εμφανίζει στενή συσχέτιση με το γεωγραφικό πλάτος και μήκος ενώ μερικές φορές εξαρτάται και από το φυτό-ξενιστή. Η συχνή απουσία καρπού κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της δεύτερης γενεάς στη βερικοκιά, έχει άμεση επίδραση στην αποτροπή της ανάπτυξης της προνύμφης καθώς και έμμεση επίδραση στην βαθμιαία παραγωγή είδους με μεγαλύτερη αναλογία διαπαυόμενων προνυμφών στην πρώτη γενεά (Audemard 1991).

Ο βιολογικός κύκλος του εντόμου περιλαμβάνει τέσσερα στάδια: ενήλικο, αυγό, προνύμφη, νύμφη (Εικόνα 1.5.). Η διάρκεια ζωής των ενηλίκων κυμαίνεται από 15 έως 18 ημέρες. Πετούν στο λυκόφως (εσπερόβιο είδος) αναζητώντας νέκταρ και άλλες υδαρείς σακχαρούχες ή μη ουσίες. Η πτήση τους αναστέλλεται όταν η θερμοκρασία της ατμόσφαιρας είναι μικρότερη των 15°C. Σε ευνοϊκές συνθήκες θερμοκρασίας (15°C και άνω) τα θηλυκά συζεύγονται, κατά τη διάρκεια της πτήσης και στη συνέχεια ωτοκοούν. Η εναπόθεση των αυγών γίνεται κυρίως στα φύλλα και σπανιότερα στον καρπό. Κάθε θηλυκό γεννάει 30-50 αυγά και η διάρκεια της εκκόλαψης κυμαίνεται από 6 έως 10 ημέρες. Στη συνέχεια, οι νεαρές προνύμφες της πρώτης γενεάς εισέρχονται στον καρπό, συνήθως από τον κάλυκα και προχωρούν προς το κέντρο του όπου τρέφονται με τους σπόρος και τη σάρκα. Μερικές φορές, ιδίως όταν ο καρπός ακουμπά σε γειτονικό καρπό, φύλλο ή

βλαστό, είναι δυνατόν η είσοδος να γίνει και από άλλα σημεία. Οι προνύμφες των επόμενων γενεών εισέρχονται στον καρπό συνήθως από το σημείο επαφής του με άλλον καρπό, βλαστό ή φύλλο. Η προνύμφη έχει πέντε στάδια και η διάρκεια της ολοκλήρωσής τους είναι 20-30 ημέρες (Bovey 1966).



Εικόνα 1.5. Ο βιολογικός κύκλος του *Cydia pomonella* (Linnaeus).

Η πλήρως αναπτυγμένη προνύμφη εξέρχεται από τον καρπό και νυμφώνεται πάντα σε υπόλευκο βομβύκιο, κάτω από ξερούς κλάδους και μερικές φορές στο έδαφος. Η διάρκεια της νυμφικής ανάπτυξης είναι από 20 έως 28 ημέρες (Bovey 1966).

Η διάρκεια της φωτόφασης δρα ως έναυσμα κινητοποίησης του μηχανισμού της διάπαυσης. Οι αναπτυγμένες προνύμφες εισέρχονται σε διάπαυση με την μείωση της φωτόφασης. Επίσης, στο μηχανισμό της διάπαυσης επιδρούν η θερμοκρασία, η διατροφή (ποικιλία καρπών) και ο συνωστισμός. Μια άλλη οικολογική

προσαρμογή του εντόμου είναι η αύξηση του ποσοστού των ατόμων που εισέρχονται σε διάπαυση σε περιόδους που οι καρποί-ξενιστές του έχουν αυξημένη ωριμότητα (Jermy 1967).

1.4. Πληθυσμιακή διακύμανση

Η πληθυσμιακή πυκνότητα της καρπόκαψας επηρεάζεται, εκτός από τις ανθρώπινες ενέργειες, από το είδος των ξενιστών που μπορούν να προσβληθούν μέσα σε ένα βιότοπο. Οι όψιμες ποικιλίες αχλαδιών και κυδωνιάς προσβάλλονται λιγότερο από νεαρές προνύμφες της πρώτης γενεάς (Audemard & El Idrissi 1979, Audemard 1984) ενώ στην καρυδιά η θνησιμότητα του εντόμου είναι υψηλότερη σε σχέση με άλλους ξενιστές (Roehrich 1963). Ένας δεύτερος παράγοντας είναι ο ενδοανταγωνισμός, κυρίως των προνυμφών, για τη διαθέσιμη τροφή καθώς και για τα καταφύγια στα οποία θα νυμφωθούν. Έτσι, το πιο συνηθισμένο φαινόμενο είναι ότι σε κάθε καρπό ολοκληρώνει την ανάπτυξή της μια μόνο προνύμφη (Audemard 1976).

Οι μεταβολές των κλιματικών συνθηκών μιας περιοχής, κυρίως της θερμοκρασίας και των βροχοπτώσεων, επηρεάζουν τους πληθυσμούς γιατί επηρεάζουν τις πτήσεις των ενηλίκων, τη σύζευξη των δύο φύλων και το χρόνο ολοκλήρωσης των γενεών. Σε περιοχές με εύκρατο κλίμα υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των παραπάνω παραγόντων και της γονιμότητας (Wildbolz 1970, Wearing 1979).

Επιπλέον, μεγάλη επίδραση στην πυκνότητα του πληθυσμού μπορούν να έχουν και οι βιοτικοί παράγοντες, κυρίως σε τρεις χρονικές στιγμές στη διάρκεια του βιολογικού κύκλου του εντόμου: κατά την εκκόλαψη, το στάδιο των νεαρών προνυμφών από την έξοδο από το αυγό μέχρι την είσοδο στον καρπό και τις διαπαύουσες προνύμφες (MacLellan 1969). Στον Πίνακα 1.1. παρουσιάζονται οι κυριότεροι βιοτικοί παράγοντες που ελέγχουν τους πληθυσμούς της καρπόκαψας (Falcon & Huber 1991).

Πίνακας 1.1. Οι κυριότεροι βιοτικοί παράγοντες περιορισμού του *Cydia pomonella*

Είδος	Στάδια βιολογικού κύκλου
Πουλιά	
<i>Parus major</i>	Π ¹ , Δ ² , Π., Ν ³ .
<i>Parus atricapillus</i>	Π., Δ. Π., Ν.
<i>Parus caeruleus</i>	Π., Δ. Π., Ν.
<i>Dendrocopus pubescens medianus</i>	Π., Δ. Π., Ν.
<i>Dendrocopus villosus villosus</i>	Π., Δ. Π., Ν.
Αράχνες	
<i>Theridion muriarium</i>	Α ⁴ , Π., Δ. Π., Ν., Ε ⁵ .
<i>Araniella displicata</i>	Α., Π., Δ. Π., Ν., Ε.
<i>Philodromus rufus</i>	Α., Π., Δ. Π., Ν., Ε.
Αρπακτικά Έντομα	
<i>Monomorium minimum</i>	Π.
<i>Tetramorium caespitum</i>	Π.
<i>Aphaenogaster fulvostriata</i>	Π.
<i>Haplothrips faurei</i>	Α., Π.
<i>Leptothrips mali</i>	Α., Π.
<i>Orius insidiosus</i>	Α., Π.
<i>Deraeocoris nebulosus</i>	Α., Π.
<i>Anthocorus nemorum</i>	Α., Π.
Παρασιτοειδή Έντομα	
<i>Ascogaster quadridentata</i>	Α.
<i>Cryptus sexmaculatus</i>	Π.
<i>Elodia tragica</i>	Π.
<i>Pimpla turionellae</i>	Ν.
Νηματώδεις	
<i>Steinemema feltiae</i>	Δ. Π.
Βακτήρια	
<i>Bacillus cereus</i>	Π.
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Π.
Μύκητες	
<i>Beauveria bassiana</i>	Π.
Πρωτόζωα	
<i>Pleistophora carposcapae</i>	Π., Ν.
Ιοίς	
Granulosis virus (CpGV)	Π.

1: Προνύμφη, 2: Διαπαύουσα προνύμφη, 3: Νύμφη, 4: Αυγά, 5: Ενήλικα

1.5. Φερομόνες φύλου

Τα έντομα αναγνωρίζουν το έμβιο και μη περιβάλλον τους με βάση χημικά, οπτικά, ηχητικά, μηχανικά και άλλα ερεθίσματα που δέχονται από αυτό. Τα χημικά ερεθίσματα (σηματοχημικές ουσίες) παίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο. Όταν το άτομο-πομπός μιας σηματοχημικής ουσίας ανήκει στο ίδιο είδος με το άτομο-δέκτη της χημικής πληροφορίας, η ουσία αυτή ονομάζεται φερομόνη. Υπάρχουν φερομόνες συνάθροισης, διασποράς, σεξουαλικές, ωτοκοκίας, συναγερμού και κοινωνικής συμπεριφοράς ενώ τα αισθητήρια που δέχονται τις σεξουαλικές ελκυστικές φερομόνες εντοπίζονται στις κεραίες (Τζανακάκης 1995).

Το κύριο συστατικό της σεξουαλικής φερομόνης της καρπόκαψας είναι η (E,E)-8,10-dodecadien-1-ol (E8E10-12:OH) που αποτελείται από ακόρεστες αλκοόλες με 12 άτομα άνθρακα και ενώνεται με δύο διπλούς δεσμούς. Η προσέλκυση των θηλυκών για σύζευξη και η ανταπόκριση των αρσενικών εξαρτάται, εκτός από την έκλυση των φερομονών φύλου, από περιβαλλοντικούς παράγοντες και κυρίως από την ένταση του φωτός και πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της πρώτης ώρας μετά από το ηλιοβασίλεμα (Castrovillo & Carde 1979).

Η σύζευξη μπορεί να αρχίσει την πρώτη ημέρα μετά την εμφάνιση των ενηλίκων παρόλο που η παραγωγή φερομονών φθάνει πιθανώς στο μέγιστό της την τρίτη ημέρα (Geier 1981). Μόλις τα θηλυκά συζευχθούν παύουν να είναι πλέον ελκυστικά στα αρσενικά, πιθανώς επειδή παράγουν φερομόνες αποτροπής σύζευξης (Rothschild 1982). Σε φυσικές συνθήκες τα θηλυκά ζευγαρώνουν συνήθως μια φορά αν και έχει παρατηρηθεί ότι προς το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου ζευγαρώνουν με περισσότερα αρσενικά (Gehring & Madsen 1963).

Η σεξουαλική φερομόνη της καρπόκαψας χρησιμοποιείται με επιτυχία ως προσελκυστική ουσία σε κολλητικές παγίδες τύπου Δέλτα για την παρακολούθηση των πληθυσμών αλλά και για την καταπολέμηση των εντόμων με μαζική παγίδευση. Το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου καταπολέμησης είναι ότι στις παγίδες προσελκύνονται μόνο αρσενικά άτομα. Ωστόσο, με τη χρήση καίρομόνης (προσελκυστικό τροφής) επιτυγχάνεται και η παγίδευση των θηλυκών ατόμων. Μια ουσία που χρησιμοποιήθηκε ως προσελκυστικό τροφής είναι οι εστέρες του ethy (E,Z)-2,4-decadienoate (Et-2E,4Z-DD) (Cristofaro *et al.* 2004).

Μια άλλη μέθοδος καταπολέμησης που βασίζεται στη σεξουαλική φερομόνη είναι η παρεμπόδιση σύζευξης και συνίσταται σε κατανομή μεγάλου πόσου φερομόνης φύλου στον οπωρώνα με χρήση εξατμιστήρων. Σκοπός της μεθόδου

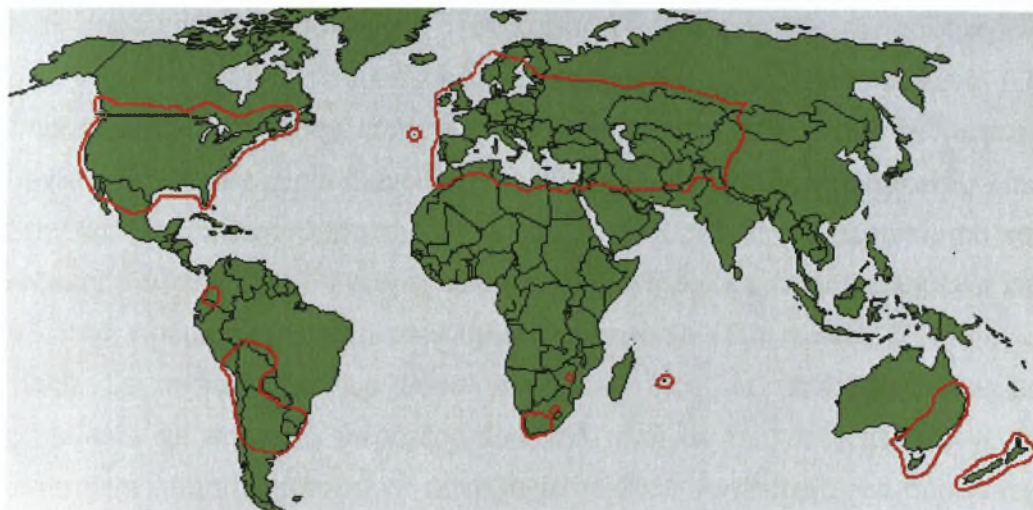
είναι η αποφυγή σύζευξης και η μείωση της ωοτοκίας με αποτέλεσμα τη μειωμένη παρουσία ενηλίκων στην επόμενη γενεά (Charmillot *et al.* 1997).

1.6. Γεωγραφική εξάπλωση

Ως αρχικός ξενιστής της καρπόκαψας θεωρείται το είδος *Malus silvestris* (Miller) με τους μεγάλους καρπούς (Shel'deshova 1967) βάσει της ομοιότητας των κλιματολογικών απαιτήσεων αυτού και του εντόμου. Οι σημερινές εμπορικές ποικιλίες έχουν προέλθει από το *Malus silvestris* που έχει καταγωγή από τη Δυτική Ασία, την Ανατολική Ευρώπη και τη Νοτιοδυτική Σιβηρία (Westwood 1978). Ομοίως, από τις περιοχές που προήλθε το είδος *Malus silvestris* προέρχονται και άλλοι ξενιστές του εντόμου, όπως το αχλάδι *Pyrus communis* (Linnaeus) από τον Καύκασο και τη Νοτιοανατολική Ευρώπη και η καρυδιά *Juglans regia* (Linnaeus) από τον Καύκασο και το Τουρκιστάν. Σε συμφωνία με το θεωρούμενο αρχικό ξενιστή είναι και το γεγονός ότι στην Ανατολική Ασία, σε περιοχές που υπάρχουν είδη *Malus* με μικρά φρούτα, τα οποία είναι γεωγραφικά χωρισμένα από τα *Malus silvestris*, δεν εντοπίζεται η καρπόκαψα. Επίσης, μέχρι τώρα δεν έχει εντοπιστεί στην Ιαπωνία και την Κορέα. Ωστόσο, το έντομο προσβάλλει το ιαπωνικό δαμάσκηνο *Prunus Salicina* (Lindley), ροδάκινο *Prunus persicae* (Linnaeus) και βερίκοκο (*Prunus armeniaca* Linnaeus) ως δευτερεύοντες ξενιστές (Westwood 1978) και δεν εξελίχθηκε μαζί τους.

Η καρπόκαψα διαδόθηκε σε όλο τον κόσμο ταυτόχρονα με την καλλιέργεια του μήλου και των αχλαδιών, κυρίως τον 18^ο και 19^ο αιώνα και εμφάνισε μεγάλη ικανότητα προσαρμογής τόσο στις κλιματικές συνθήκες όσο και σε άλλα είδη δέντρων όπως η αχλαδιά, η ροδακινιά η βερικοκιά και καρυδιά (Εικόνα 1.6.) (Barnes 1991).

Όσον αφορά τους οικολογικούς παράγοντες που επηρεάζουν την κατανομή του εντόμου στα δύο ημισφαίρια, φαίνεται πως το βόρειο όριο καθορίζεται από το επαρκές άθροισμα ημεροβαθμών πάνω από 10°C το καλοκαίρι για 600 περίπου ημεροβαθμούς (Shel' deshova 1967), δηλαδή θερμική συσσώρευση ισοδύναμη με αυτήν που απαιτείται για την ανάπτυξη μιας γενεάς, ενώ τα όρια εξάπλωσης που πλησιάζουν τον ισημερινό είναι περίπου στον 25^ο παραλλήλο στο βόρειο και νότιο ημισφαίριο.



Εικόνα 1.6. Γεωγραφική εξάπλωση του *C. pomonella* (κόκκινο περίγραμμα).

Καθοριστικό ρόλο για την είσοδο του εντόμου στο νότιο ημισφαίριο έπαιξε ο μηχανισμός της μεταβολής του χρόνου διάπαυσης, επιτρέποντας έτσι την εγκατάστασή του σε περιοχές με αντίθετες εποχές. Όμως, ο μηχανισμός της μείωσης της περιόδου διάπαυσης και επαναδραστηριοποίησης του εντόμου ύστερα από μεγάλη διάρκεια φωτοπεριόδου, γεγονός στο οποίο οφείλεται η ικανότητα προσαρμογής, δεν έχει εφαρμογή στον ισημερινό καθώς η διάρκεια της ημέρας δεν μπορεί να υπερβεί τις 12 ώρες (Salazar 1984).

2. Διαχείριση του *Cydia pomonella*

2.1. Ζημίες

Το *C. pomonella* προσβάλλει τους ξενιστές του και προκαλεί απώλεια της παραγωγής, κατά το στάδιο της προνύμφης. Τα σημεία εισόδου των προνυμφών είναι ο κάλυκας και τα σημεία επαφής του καρπού με άλλον καρπό, βλαστό ή φύλλο. Η προνύμφη κατευθύνεται προς το κέντρο του καρπού και τρέφεται αρχικά με τους τρυφερούς σπόρους και στη συνέχεια με τη σάρκα του καρπού. Σε εργαστηριακή μελέτη, προνύμφες που τράφηκαν αποκλειστικά με τη σάρκα του καρπού εμφάνισαν καθυστερημένη προνυμφική ανάπτυξη και αυξημένο ποσοστό διάπαυσης (Ferro & Harwood 1973). Επιπλέον, πειράματα αγρού έδειξαν ότι η ζημιά από τις προνύμφες ήταν μεγαλύτερη σε ποικιλίες που είχαν σπόρους σε σχέση με ποικιλίες χωρίς σπόρους (Barnes 1991).

Η παρουσία της προνύμφης στον καρπό είναι ορατή από την χαρακτηριστική οπή γύρω από την οποία εντοπίζονται κοκκώδη αποχωρήματα (Εικόνα 1.7.). Η απομάκρυνση των αποχωρημάτων πραγματοποιείται είτε μέσω διεύρυνσης της αρχικής στοάς είτε μέσω διάνοιξης καινούριας, συνήθως στα πλάγια του καρπού. Στην καρυδιά, η προνύμφη της 1^{ης} γενεάς αναπτύσσεται στο μεσοκάρπιο και στο ενδοκάρπιο ενώ της 2^{ης} γενεάς κυρίως στο σπόρο. Οι προσβεβλημένοι καρποί πέφτουν πρόωρα ή είναι ακατάλληλοι για εμπορία (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος 1998). Σε περιοχές με μία μόνο γενεά ανά έτος, οι προσβολές των μήλων εκτιμώνται σε ποσοστό μικρότερο του 15% ενώ σε περιοχές με δύο γενεές το αντίστοιχο ποσοστό μπορεί να υπερβαίνει το 75%. Αντίστοιχα, για δύο γενεές, το ποσοστό αυτό για τα αχλάδια υπολογίζεται σε λιγότερο από 50%, για τα καρύδια υπερβαίνει το 50%, ενώ για τα δαμάσκηνα και τα βερίκοκα είναι μικρότερο από 20% (Barnes 1991).

Συνεπώς, για να διατηρηθεί το έντομο κάτω από το όριο ανεκτής πυκνότητας πληθυσμού στον οπωρώνα, είναι απαραίτητο να ληφθούν μέτρα καταπολέμησής του.



Εικόνα 1.7. Αποχωρήματα της προνύμφης γύρω από τη χαρακτηριστική οπή (βέλος).

2.2. Ολοκληρωμένη διαχείριση του εντόμου

Η πυκνότητα του πληθυσμού του *C. pomonella* έχει άμεση σχέση με τις οικονομικές ζημιές καθώς η είσοδος της προνύμφης οδηγεί σε καταστροφή του καρπού. Φαίνεται ότι ο φυσικός περιορισμός, δηλαδή η συνδυασμένη δράση

βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων, δεν είναι αρκετός για να διατηρήσει τον πληθυσμό του εντόμου κάτω από το όριο ανεκτής πυκνότητας. Έτσι, για τον περιορισμό του πληθυσμού κρίνεται απαραίτητη η χρήση φυτοπροστατευτικών ουσιών. Ωστόσο, η συνεχής και πολλές φορές αλόγιστη χρήση τους επιβαρύνει σοβαρά τα γεωργικά προϊόντα με υπολείμματα, έχει αρνητικές επιπτώσεις στη λειτουργία του αγροοικοσυστήματος και οδηγεί στην εμφάνιση ανθεκτικότητας. Επίσης, η δυσμενής επίδραση στους ωφέλιμους οργανισμούς διαταράσσει την οικολογική ισορροπία με αποτέλεσμα να εντείνονται τα προβλήματα που σχετίζονται με την προστασία της παραγωγής. Συνεπώς, είναι επιτακτική η ανάπτυξη και η εφαρμογή σχεδίων ολοκληρωμένης αντιμετώπισης των εχθρών στα πλαίσια της Ολοκληρωμένης Παραγωγής.

Ολοκληρωμένη Διαχείριση ορίζεται «η οθρολογική εφαρμογή συνδυασμένων βιολογικών, βιοτεχνικών, χημικών, καλλιεργητικών ή φυτοβελτιωτικών μεθόδων και μέτρων, ώστε η χρήση χημικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων να περιορίζεται στο απολύτως απαραίτητο προκειμένου να διατηρηθεί ο πληθυσμός των επιβλαβών οργανισμών σε επίπεδα τέτοια ώστε να μην προκαλούνται οικονομικά μη αποδεκτές ζημιές» (οδηγία 91/414/ΕΟΚ). Στα πλαίσια της ολοκληρωμένης διαχείρισης της καρπόκαψας έχουν εφαρμογή: α) η παρεμπόδιση σύζευξης, β) η εξόντωση των αρσενικών, γ) η μαζική παγίδευση, δ) η εξαπόλυση στειρωμένων ατόμων και ε) η βιολογική καταπολέμηση

Εκτός όμως από την καταπολέμηση του εντόμου στον σπυρώνα, για την μείωση των προσβολών, απαραίτητη είναι η απαλλαγή των καρπών από προνύμφες και αυγά και κατά τη διάρκεια της εμπορίας του καρπού καθώς ως κύριο μέσο διάδοσης του εντόμου θεωρείται η διακίνηση μολυσμένων καρπών (Hansen *et al.* 2006).

2.2.1. Μοντέλα πρόγνωσης

Τα μοντέλα πρόγνωσης εμφάνισης των εντομών στηρίζονται στην φαινολογία τους και κυρίως στον υπολογισμό των ημεροβαθμών που χρειάζεται για να ολοκληρωθεί το κάθε στάδιο του εντόμου και σε συνδυασμό με τα κλιματικά στοιχεία της περιοχής προσδιορίζουν τον χρόνο εμφάνισής τους. Έτσι, η συνεισφορά τους είναι σημαντική στη λήψη απόφασης για τον χρόνο επέμβασης με φυτοπροστατευτικά μειώνοντας την άσκοπη χρήση τους. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της αποτελεσματικότητας των φυτοπροστατευτικών

ουσιών και τη μείωση της επιβάρυνσης του περιβάλλοντος από τη χρήση τους (Kogan 1998). Έχουν προταθεί αρκετά μοντέλα πρόγνωσης, σχεδόν για όλα τα γένη των εντομών (Osborne 1982, Jones *et al.* 1989, Hogg & Gutierrez 1980, Pinhassi *et al.* 1996) όπως και για την καρπόκαψα (Pickel *et al.* 1986, Pitcain *et al.* 1992) τα οποία συμβάλουν στον έλεγχό τους.

2.2.2. Απολύμανση καρπών

Η κύρια μέθοδος απολύμανσης των καρπών ήταν ο χημικός υποκαπνισμός με βρωμιούχο μεθύλιο. Πρόκειται για ιδιαίτερα αποτελεσματική μέθοδο αλλά λόγω των περιβαλλοντικών επιπτώσεων της υπόκειται σε σταδιακή κατάργηση σύμφωνα με το Πρωτόκολλο του Μόντρεαλ. Μια εναλλακτική μέθοδος απολύμανσης, για την καταπολέμηση των ατελών σταδίων της καρπόκαψας, είναι η έκθεση των καρπών σε γ-ακτινοβολία 100Gy, δόση που αποτρέπει τη νύμφωση όλων των προνυμφών (Mansour & Mohamad 2004).

2.2.3. Παρεμπόδιση σύζευξης

Η μέθοδος στοχεύει στα τέλεια άτομα και προκαλεί παρεμπόδιση σύζευξης λόγω σύγχυσης των αρσενικών με κατανομή μεγάλης ποσότητας φερομόνης φύλου στον σπωρώνα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον αποπροσανατολισμό των αρσενικών, λόγω ανταγωνισμού των φερομονών που εκλύονται, ή την υπερφόρτωση των αισθητήρων που οδηγεί σε διακοπή της ανίχνευσης λόγω αστάθειας των αισθητήρων. Τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι ότι δεν υπάρχει ένδειξη ανθεκτικότητας καθιστώντας δυνατή την επιτυχή εφαρμογή της σε πληθυσμούς ανθεκτικούς σε χημικά εντομοκτόνα και ότι δεν προκαλεί περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Η μέθοδος δοκιμάστηκε με επιτυχία στην Ελβετία και τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι στις περισσότερες περιπτώσεις δεν χρειάστηκε ψεκασμός με εντομοκτόνα, ενώ το ποσοστό των προσβεβλημένων καρπών κατά τη συγκομιδή ήταν μηδενικό έως 1% το μέγιστο (Charmillot *et al.* 1997).

2.2.4. Εξόντωση των αρσενικών

Η μέθοδος βασίζεται στην προσέλκυση και εξόντωση των αρσενικών ατόμων με συνέπεια την αποτροπή των συζεύξεων και την απόθεση άγονων αυγών από τα θηλυκά. Επιτυγχάνεται με την εφαρμογή στο φύλλωμα 1 ή 2 σταγόνων (50-100μl η κάθε μία) πυκνόρρευστου αιωρήματος που περιέχει 0,16% φερομόνης φύλου και

6% permethrin (συνθετικό πυρεθροειδές), δύο φορές κατά τη βλαστική περίοδο. Η πρώτη εφαρμογή πραγματοποιείται μια εβδομάδα μετά την έναρξη της πτήσης των ατόμων κατά τον Απρίλιο ή Μάιο. Η δεύτερη εφαρμογή πραγματοποιείται 6-7 εβδομάδες αργότερα. Είναι δυνατόν να γίνουν και περισσότερες εφαρμογές αναλόγως του μικροκλίματος της περιοχής και των γενεών του εντόμου (Charmillot *et al.* 2000).

Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε με επιτυχία σε απομονωμένους οπωρώνες της Ελβετίας με αποτέλεσμα το ποσοστό των προσβεβλημένων καρπών κατά τη συγκομιδή να είναι 1% χαμηλότερο του ανεκτού ορίου. Το κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι δεν επηρεάζει την ωφέλιμη πανίδα του οπωρώνα καθώς προσελκύνονται και θανατώνονται μόνο έντομα καρπόκαψας. Επιπλέον, η ποσότητα της χρησιμοποιούμενης φερομόνης είναι πολύ μικρή, της τάξεως του 1 gr ανά εκτάριο και για τις δύο εφαρμογές κατά την καλλιεργητική περίοδο (Charmillot *et al.* 2000). Η ίδια μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί με αντικατάσταση της συνθετικής πυρεθρίνης με εκλεκτικά εντομοκτόνα, όπως ρυθμιστές ουσίες ανάπτυξης π.χ. το fenoxycarb, που αντί για θανάτωση των αρσενικών ενηλίκων προκαλεί τη στέρωσή τους (Charmillot *et al.* 2002).

2.2.5. Μαζική παγίδευση

Η μαζική παγίδευση μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους. Κατά τον πρώτο γίνεται ανάρτηση κολλητικών παγίδων τύπου Δέλτα που περιέχουν ως προσελκυστική ουσία μίγμα σεξουαλικών φερομονών και καϊρομονών (προσελκυστικό τροφής) για την παγίδευση ενηλίκων και των δύο φύλων. Η εφαρμογή της μεθόδου έχει μεγαλύτερη επιτυχία όταν εφαρμόζεται σε απομονωμένους οπωρώνες και όταν ο πληθυσμός του εντόμου είναι μικρός (El-Sayed *et al.* 2006).

Εναλλακτικά, επιτυγχάνεται με την τοποθέτηση κυματοειδών παγίδων χάρτου που στοχεύουν στη σύλληψη των νυμφών και των διαπαύουσων προνυμφών (Εικόνα 1.8.) ενώ στη συνέχεια πραγματοποιείται αφαίρεση και καταστροφή των λωρίδων.



Εικόνα 1.8. Παγίδα κυματοειδούς χάρτου.

2.2.6. Εξαπόλυση στειρωμένων αρσενικών ατόμων

Η μέθοδος έχει ως στόχο τη σύζευξη μεταξύ στειρωμένων αρσενικών και θηλυκών φυσικών πληθυσμών με αποτέλεσμα την παραγωγή μη γόνιμων αυγών και τη μείωση του φυσικού πληθυσμού. Η πρώτη εφαρμογή της εξαπόλυσης στειρωμένων αρσενικών ατόμων ως μέσο καταπολέμησης πραγματοποιήθηκε το 1994 στη Βρετανική Κολομβία του Καναδά. Παρόλο που ο πληθυσμός μειώθηκε, τα αποτελέσματα του προγράμματος δεν ήταν ικανοποιητικά γιατί η μείωση δεν έφτασε κάτω από το οικονομικό όριο καταπολέμησης. Η πιθανότερη αιτία είναι η θνησιμότητα του εξαπολυθέντος εργαστηριακού πληθυσμού και η επίδραση που έχει στη συμπεριφορά του η δόση της ακτινοβολίας με την οποία πραγματοποιείται η στειρώση (Tyson *et al.* 2007).

Οι Bloem *et al* (2004), διαπίστωσαν ότι τα στείρα αρσενικά που εκτρέφονται κάτω από σταθερές εργαστηριακές συνθήκες εμφανίζουν μεγάλη θνησιμότητα όταν εξαπολυθούν την άνοιξη, λόγω των χαμηλότερων θερμοκρασιών σε σχέση με τις συνθήκες εκτροφής τους. Για την αντιμετώπιση του προβλήματος, προτείνουν την εξαπόλυση αρσενικών τα οποία πρώτα έχουν εισέλθει σε συνθήκες τεχνητής διάπαυσης και μετά τη διακοπή της, την στειρώσή τους με γ-ακτινοβολία (150Gy).

2.2.7. Βιολογική καταπολέμηση

Η βιολογική καταπολέμηση της καρπόκαψας πραγματοποιείται με την εφαρμογή ζωντανών οργανισμών όπως εντομοφάγων εντόμων και παρασιτοειδών, εντομοπαθογόνων βακτηριών, μυκήτων, ιών και νηματωδών.

Βακτήρια: Η καταπολέμηση της καρπόκαψας σε εργαστηριακή μελέτη με το στέλεχος *Bacillus thuringiensis* subsp. *Thompsoni* ήταν ικανοποιητική αλλά εξαιτίας του τρόπου βρώσης της προνύμφης (μικρή διάρκεια διατήρησης στην επιφάνεια του καρπού και άνοιγμα μικρής στοάς για να εισέλθει και να τραφεί στο εσωτερικό του καρπού), η καταπολέμηση με το βακτήριο συνήθως δεν έχει ικανοποιητικά αποτελέσματα (Rang *et al.* 2000).

Μύκητες: Ο εντομοπαθογόνος μύκητας *Beauveria bassiana* (Balsamo) είναι αποτελεσματικός εναντίον της καρπόκαψας. Οι Garcia-Gutierrez *et al.* (2004) διαπίστωσαν ότι η προσβολή από την καρπόκαψα, σε οπωρώνα που εφαρμόστηκε ο μύκητας εναντίον των νεαρών προνυμφών, κυμάνθηκε από 2 έως 4%. Παρόλα αυτά δεν χρησιμοποιείται ευρέως στη Βόρεια Αμερική και Δυτική Ευρώπη.

Ιοί: Ο εντομοπαθογόνος ιός της οικογένειας Baculoviridae granulovirus (CpGV) εφαρμόζεται σε προγράμματα ολοκληρωμένης και βιολογικής καταπολέμησης. Ο ιός μπορεί να μολύνει τις νεαρές προνύμφες με την κατάποσή του αλλά και κατόπιν επαφής για διάστημα 3,5 λεπτών. Μετά την είσοδο του ιού στον πεπτικό σωλήνα, η πρωτεΐνη του καψιδίου διαλύεται στο αλκαλικό (pH 9-10,5) πεπτικό υγρό και τα σωματίδια του ιού ελευθερώνονται, μολύνουν τα κύτταρα του πεπτικού σωλήνα, πολλαπλασιάζονται και στη συνέχεια εξαπλώνονται σε άλλα όργανα ως μη έγκλειστοι ιοί. Ο χρόνος που απαιτείται για να θανατωθεί η προνύμφη είναι 5 ημέρες (Ballard *et al.* 2000).

Ο ιός αυτός έχει μεγάλη εκλεκτικότητα και δεν βλάπτει ωφέλημα εντομοφάγα έντομα, τον άνθρωπο και το περιβάλλον. Επιπλέον έχει ικανοποιητική παθογόνο δράση και μεγαλύτερη υπολειμματική διάρκεια από το εντομοπαθογόνο βακτήριο *Bacillus thuringiensis* subsp. *Thompsoni*. Ωστόσο, είναι φωτοευαίσθητος και γι' αυτό συνιστάται η εφαρμογή του στον οπωρώνα ανά 7-10 ημέρες κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου (Lacey & Arthurs 2005).

Νηματώδεις: Τα πιο ενδιαφέροντα είδη για την καταπολέμηση της καρπόκαψας είναι αυτά που προσβάλλουν το έντομο και προκαλούν το θάνατό του μέσω συμβιωτικών βακτηριών που φέρουν. Τα συμβιωτικά βακτήρια των

νηματωδών προκαλούν στο έντομο ασθένεια που εξελίσσεται γρήγορα και οδηγεί στο θάνατό του. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα είδη που ανήκουν στο γένος *Steinernema* και πιο συγκεκριμένα το είδος *Steinernema carrocapsae* (Weiser) και *Steinernema feltiae* (Filipjev). Το πρώτο για να δράσει χρειάζεται υψηλότερες θερμοκρασίες. Έτσι, σε θερμοκρασία χαμηλότερη των 15°C μειώνεται η κινητικότητα του ενώ κάτω από 10°C αδρανοποιείται. Το δεύτερο είδος είναι πιο ανθεκτικό στις χαμηλές θερμοκρασίες και παραμένει δραστήριο και σε θερμοκρασίες κάτω από 10°C (Lacey και Unruh 1998). Γενικά και τα δύο είδη είναι πιο αποτελεσματικά εναντίον των προνυμφών σε σχέση με τις νύμφες ενώ για καλύτερη αποτελεσματικότητα χρειάζονται επιπλέον υγρασία. Έτσι, με ικανοποιητική υγρασία μπορούν να προκαλέσουν θνησιμότητα στις προνύμφες από 92 έως 95%, ενώ σε χαμηλές συνθήκες υγρασίας η θνησιμότητα μειώνεται σε 46% έως 57% (Lacey *et al.* 2005).

Αρπακτικά: Από όλους τους βιολογικούς παράγοντες καταπολέμησης, τα λιγότερο μελετημένα είναι τα εντομοφάγα έντομα της καρπόκαψας. Τα είδη *Orius insidiosus* (Say), *Anthocoris musculus* (Say) καθώς και είδη της οικογένειας Miridae και Carabidae είναι οι κύριοι εχθροί της καρπόκαψας. Είδη της οικογένειας Reduviidae και Nabidae τρέφονται με αναπτυγμένες προνύμφες πέμπτου σταδίου ενώ τα *Haplothrips faurei* (Hood) και *Leptothrips mali* (Fitch) τρέφονται με τα αυγά της (Lacey & Unruh 2005).

Παρασιτοειδή: Έχει αναφερθεί ότι περισσότερα από 100 είδη προσβάλουν την καρπόκαψα, ωστόσο λίγα μόνο από αυτά έχουν μελετηθεί. Τα περισσότερα κατάγονται από τη Δυτική Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική (Lloyd 1958). Το κυριότερο είδος, που κατάγεται από την Αμερική, είναι το *Ascogaster quadridentata* (Wesmael) (Hymenoptera: Braconidae), το οποίο εναποθέτει τα αυγά του μέσα στα αυγά της καρπόκαψας και το ενήλικο εξέρχεται από την αναπτυγμένη προνύμφη (Brown & Kainoh 1992). Στην Καλιφόρνια ως μέσο βιολογικής καταπολέμησης χρησιμοποιούνται διάφορα είδη του γένους *Trichogramma*. Ο Mills (2003) αναφέρει ότι αυτά μπορούν να μειώσουν την προσβολή από την καρποκάψα κατά 60% σε καρύδια, μήλα και αχλάδια.

2.2.8 Χημική καταπολέμηση

Η χημική καταπολέμηση εφαρμόζεται κατά την περίοδο δραστηριότητας του εντόμου, εναντίον των αυγών (πριν εκκολαφθούν) ή των νεαρών προνυμφών,

προτού εισέλθουν στον καρπό. Ο χρόνος επέμβασης προσδιορίζεται κατόπιν παρακολούθησης της πορείας του ενήλικου πληθυσμού, σε συνδυασμό με την εκκόλαψη των πρώτων προνυμφών κάθε γενεάς. Η παρακολούθηση των ενηλίκων και η καταγραφή των γενεών και των δύο φύλων πραγματοποιείται με την ανάρτηση κολλητικών παγίδων τύπου Δέλτα που περιέχουν σεξουαλικές φερομόνες (και καίρομόνες). Ταυτόχρονα, πραγματοποιούνται και δειγματοληψίες φύλλων για τον εντοπισμό αυγών.

Μια άλλη μέθοδος για τον προσδιορισμό του χρόνου εξόδου των ενηλίκων και του χρόνου εκκόλαψης των προνυμφών επιτυγχάνεται με την εφαρμογή των «μοντέλων πρόγνωσης» που βασίζονται στο «άθροισμα των θερμοκρασιών» που απαιτούνται για να συμπληρωθεί κάθε στάδιο του εντόμου και να ολοκληρωθεί κάθε γενεά (Pitcain *et al.* 1992).

Οργανοφωσφορικά: Είναι νευροτοξικές ενώσεις που επιδρούν στις νευρικές συνάψεις, δεσμεύοντας την ακετυλοχολινεστεράση (AChE) με συνέπεια την περίσσεια ακετυλοχολίνης. Το αποτέλεσμα είναι η πρόκληση πληθώρας νευρικών σημάτων στο κεντρικό νευρικό σύστημα, που οδηγεί σε υπερδιέγερση, μεγάλη κινητικότητα, παράλυση και τελικά το θάνατο του εντόμου. Πρόκειται για εντομοκτόνα επαφής ή στομάχου και αρκετά από αυτά είναι διασυστηματικά. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν μερικά από τα πλέον τοξικά για τα θερμόαιμα ζώα αλλά επίσης περιλαμβάνονται και λιγότερο τοξικά για τα θερμόαιμα ζώα και τον άνθρωπο (Fukuta 1990).

Καρβαμιδικά: Έχουν τον ίδιο τρόπο δράσης με τα οργανοφωσφορικά. Είναι εντομοκτόνα επαφής και μερικά είναι διασυστηματικά. Η οξεία τοξικότητά τους για τα θερμόαιμα ζώα ποικίλλει από πολύ μεγάλη έως μέτρια (Fukuta 1990).

Νεονικοτινοειδή: Δρουν στις νευρικές συνάψεις και διαταράσσουν τη μετάδοση των νευρικών σημάτων. Καταλαμβάνουν τη θέση της ακετυλοχολίνης στους νικοτινεριγικούς υποδοχείς της (nAChR) με συνέπεια την περίσσεια ακετυλοχολίνης η οποία έχει ως αποτέλεσμα την υπερδιέγερση του εντόμου και τελικά το θάνατο (Tomizava & Casoda 2004).

Πυρεθροειδή: Επηρεάζουν τη μετάδοση των νευρικών ώσεων στους νευράξονες. Στοχεύουν στα διαμεμβρανικά πρωτεϊνικά κανάλια μεταφοράς ιόντων νατρίου επηρεάζοντας τη ροή ιόντων, με αποτέλεσμα την περίσσεια ιόντων Na^+ στο εσωτερικό του νευράξονα. Αποτέλεσμα είναι η διέγερση του νευρώνα με επανειλημμένες ώσεις (ηλεκτρικές εκκενώσεις) και τελικά η μυϊκή παράλυση του

εντόμου («knock down», kd). Είναι εντομοκτόνα επαφής με μέτρια έως μεγάλη υπολειμματική διάρκεια. Είναι λιγότερο τοξικά για τα θερμόαιμα ζώα αλλά πολύ τοξικά για τα ψάρια (Soderlund & Bloomquill 1989).

Μακροκυκλικές λακτόνες: Ο μηχανισμός δράσης τους συνίσταται στη διέγερση του νευρικού συστήματος, με συνέπεια την τελική αδρανοποίηση του μυϊκού συστήματος και κατ' επέκταση την ολική παράλυση του εντόμου. Στοχεύουν στα διαμεμβρανικά πρωτεϊνικά κανάλια μεταφοράς ιόντων χλωρίου, εμποδίζοντας την είσοδο των ιόντων Cl⁻ και αποτρέποντας την ηρεμιστική δράση του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA). Οι τοξικολογικές επιπτώσεις τους είναι σχετικά μικρές τόσο για τα θερμόαιμα ζώα όσο και τα ψάρια (Wolstenholme & Rogers 2005).

Ρυθμιστικές ουσίες της ανάπτυξης των εντόμων: Πρόκειται για ουσίες που επιδρούν σε φυσιολογικούς μηχανισμούς των εντόμων που απουσιάζουν όμως από τα σπονδυλωτά. Τέτοιοι μηχανισμοί είναι: α) η σύνθεση της χιτίνης, β) ο σχηματισμός του δερματίου, γ) η έκδυση, δ) η μεταμόρφωση, ε) η παραγωγή και έκλυση ορισμένων φερομονών. Τα πλεονεκτήματα των ουσιών αυτών έναντι των παραπάνω είναι η απουσία τοξικότητας στα θερμόαιμα ζώα και η ταχεία βιοαποδόμησή τους. Ως μειονέκτημα θεωρείται η απαίτηση εφαρμογής τους σε κατάλληλο στάδιο του εντόμου (Siddall 1976).

α) Ορμόνη νεότητας (juvenile hormone-JH): Εμποδίζει την ενηλικίωση των εντόμων προκαλώντας ανωμαλίες στη μορφογένεση του ενήλικου με αποτέλεσμα τη δημιουργία μη λειτουργικών ατόμων στα οποία γρήγορα επέρχεται ο θάνατος. Οι εξωγενείς νεανικές ορμόνες μπορεί να προκαλέσουν ανωμαλίες και κατά την εμβρυογένεση με αποτέλεσμα τα αυγά να μην εκκολάπτονται (El-Shazly και Refaie 2002).

β) Μιμητές της εκδυσόνης: Επιταχύνουν τις εκδύσεις και ανατρέπουν την ομαλή εξέλιξη της προνύμφης σε ενήλικο.

γ) Ουσίες που εμποδίζουν την έκδυση: Εμποδίζουν τη σύνθεση της χιτίνης ή την απόθεσή της, με αποτέλεσμα η έκδυση να μην πραγματοποιείται κανονικά ή το δερμάτιο να είναι λεπτό και εύθραστο με τελικό αποτέλεσμα το θάνατο του εντόμου (Smagghe *et al.* 1999).

3. Ανθεκτικότητα

3.1. Ανάπτυξη ανθεκτικότητας

Από το 1950 τα οργανικά εντομοκτόνα είχαν χρησιμοποιηθεί εντατικά στην προστασία της καλλιέργειας εναντίον των εντομών λόγω του χαμηλού κόστους και της γρήγορης αποτελεσματικότητάς τους. Η λανθασμένη χρήση τους όμως (τρόπος, χρόνος και συχνότητα εφαρμογής) οδήγησε στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας (McKenzie 1996). Αυτή οφείλεται στην επιλογή αλληλομόρφων που προσδίδουν ανθεκτικότητα με συνέπεια, με την πάροδο των γενεών, ευπαθείς αρχικά πληθυσμοί να μετατρέπονται σε ανθεκτικούς. Η ταχύτητα εξάπλωσης της ανθεκτικότητας στη φύση εξαρτάται κυρίως από τον αριθμό γενεών και απογόνων, τον τρόπο αναπαραγωγής, την προσαρμοστικότητα αλληλομόρφων που ελέγχουν την ανθεκτικότητα, τη μετανάστευση και τα καταφύγια.

Η ανθεκτικότητα είναι από τους κυριότερους περιοριστικούς παράγοντες για τη διάρκεια μιας συγκεκριμένης στρατηγικής καταπολέμησης. Εκτός από την απώλεια της αποτελεσματικότητας του ελέγχου των εχθρών, η ανθεκτικότητα έχει περιβαλλοντικές και οικονομικές επιπτώσεις, γιατί η άμεση απάντηση των καλλιεργητών είναι η αύξηση της ποσότητας της φυτοπροστατευτικής ουσίας (Wei *et al.* 2001). Επιπλέον, από το 1970 ο αριθμός των εντομοκτόνων με νέο τρόπο δράσης έχει μειωθεί καθιστώντας ιδιαίτερα δαπανηρή τη διαδικασία δημιουργίας νέων και την άδεια κυκλοφορίας τους (Lindquist *et al.* 1996).

Για τους παραπάνω λόγους κρίνεται απαραίτητη αφ' ενός η πρόωρη ανίχνευση της ανθεκτικότητας, αφ' ετέρου η ορθολογική χρήση των υπάρχοντων εντομοκτόνων ώστε να διατηρήσουν την αποτελεσματικότητά τους (Soderlund 1997). Παρόλα αυτά, εμφανίζονται νέοι μηχανισμοί ανθεκτικότητας που σχετίζονται με νέους γονιδιακούς τόπους, περιορίζοντας έτσι την αποτελεσματικότητα δραστικών ουσιών που ανήκουν ακόμα και σε διαφορετικές χημικές ομάδες (διασταυρωτή ανθεκτικότητα) (Scott 1989). Συνεπώς απαιτείται η διερεύνηση αυτών των μηχανισμών ώστε να επιτραπεί η πρόωρη ανίχνευσή τους αλλά και η διαχείριση της ανθεκτικότητας (Wei *et al.* 2001).

3.2. Επίπεδο ανθεκτικότητας

Η εμφάνιση ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα αποτελεί ένα πρόβλημα που μεγεθύνεται με την πάροδο των ετών. Το φαινόμενο είχε επισημανθεί για πρώτη φορά το 1914 και αφορούσε την ανάπτυξη ανθεκτικότητας του εντόμου *Quadrspidiotus perniciosus* (Comstock) στο θείο (Melandar 1914). Η καρπόκαφα των μήλων, *Cydia pomonella* L., ήταν το δεύτερο είδος που αναφέρθηκε ότι εμφάνισε ανθεκτικότητα στο αρσενικό (Hough 1928). Από το 1914 έως το 1950 οι περιπτώσεις εμφάνισης ανθεκτικότητας αυξήθηκαν βαθμιαία και κάθε πενταετία καταγράφονταν και ένα καινούριο είδος. Μεχρι το 1990, περίπου 500 είδη εντόμων είχαν αναπτύξει ανθεκτικότητα σε μία ή περισσότερες κατηγορίες εντομοκτόνων (Cui *et al.* 2006).

3.3. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας

Τα εντομοκτόνα εισέρχονται στο σώμα του εντόμου μέσω του δερματίου, του στόματος ή του αναπνευστικού συστήματος. Μετά την είσοδό τους μεταφέρονται και καταλήγουν στο στόχο δράσης τους όπου επηρεάζουν διάφορες βιοχημικές διεργασίες του εντόμου. Εμφάνιση ανθεκτικότητας σε συγκεκριμένο εντομοκτόνο είναι πιθανή σε περίπτωση μεταλλάξεων των μορίων-στόχων του (Poitrié και Pasteur 1991).

Παρά την ποικιλομορφία των εντόμων και των εντομοκτόνων, οι προσδιορισμένοι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την εμφάνιση ανθεκτικότητας είναι λίγοι (Soderlund 1997). Οι κύριοι μηχανισμοί αφορούν στην ενζυμική αποδόμηση του εντομοκτόνου προς ουσίες μη τοξικές και στη διαφοροποίηση της μοριακής δομής των πρωτεϊνών στόχων (McKenzie 1996). Σπανιότερα, έχουν περιγράψει μηχανισμοί που περιλαμβάνουν αλλαγές στη συμπεριφορά του εντόμου που αποτρέπουν την επαφή του με το εντομοκτόνο, την ταχύτερη απέκκρισή του και τη μικρότερη διείσδυση από τον εξωσκελετό.

3.3.1. Ηθολογική ανθεκτικότητα

Οφείλεται στην ιδιαίτερη συμπεριφορά των ανθεκτικών ατόμων που έχει ως αποτέλεσμα την αποφυγή της επαφής με το εντομοκτόνο ή τον περιορισμό της διάρκειας επαφής τους ώστε να δεκτούν μικρότερη ποσότητα. Στην πρώτη περίπτωση το έντομο έχει την ικανότητα να αναγνωρίσει την τοξικότητα του εντομοκτόνου και να την αποφύγει. Στη δεύτερη περίπτωση η συμπεριφορά του

εντόμου είναι ανεξάρτητη του ερεθίσματος. Τέτοια συμπεριφορά έχει παρατηρηθεί σε ανθεκτικά άτομα του είδους *Haematobia irritans* L., τα οποία αυξάνουν την κινητικότητά τους με αποτέλεσμα να ελαττώνεται ο χρόνος επαφής με το εντομοκτόνο (Lockwood *et al.* 1985).

3.3.2. Φυσιολογική ανθεκτικότητα

Σχετίζεται με την ταχύτητα διείσδυσης σε συνδυασμό με την ταχύτητα απέκκρισης καθώς και με την πιθανή αποθήκευση σε μη ευπαθείς ιστούς. Τα ανθεκτικά άτομα έχουν εξωσκελετό λιγότερο διαπερατό στο εντομοκτόνο, γεγονός που οδηγεί στη βραδύτερη διείσδυσή του. Ένας τέτοιος μηχανισμός αντίστασης, που σχετίζεται με μειωμένη διείσδυσης διαμέσου του δερματίου, έχει περιγραφεί για τα πυρεθροειδή στο είδος *Blattella germanica* L. (Bull & Patterson 1993). Επίσης, μηχανισμός ταχύτερης απέκκρισης των μεταβολιτών έχει παρατηρηθεί στα ανθεκτικά άτομα του *Plutella xylostella* L. (Doichuanngam *et al.* 1992).

3.3.3. Μείωση ευαισθησίας στόχου δράσης

Η εμφάνιση ανθεκτικότητας μπορεί να οφείλεται στη διαφοροποίηση της μοριακής δομής των πρωτεϊνών-στόχων, γεγονός που τις καθιστά λιγότερο ευαίσθητες στα τοξικά μόρια, με αποτέλεσμα τη μείωση ή την απώλεια της αποτελεσματικότητας των εντομοκτόνων. Μέχρι τώρα, έχουν περιγραφεί μεταλλαγές σε τέσσερις πρωτεΐνες, οι οποίες αποτελούν και τον κύριο στόχο δράσης των περισσότερων εντομοκτόνων.

3.3.3.1. Ακετυλοχονιστεράση (AChE)

Οι μεταλλαγές ανθεκτικότητας της πρωτεΐνης AChE προσδίδουν ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα που ανήκουν στις χημικές οικογένειες των οργανοφωσφορικών και των καρβαμιδικών. Η εμφάνιση της ανθεκτικότητας μπορεί να οφείλεται στην τροποποίηση της στερεοδομής της AChE, που έχει ως αποτελέσματα τα μόρια του εντομοκτόνου να μη δημιουργούν σύμπλοκα μαζί της και να μη την δεσμεύουν (Orengo *et al.* 1985). Η δεύτερη περίπτωση είναι το έντομο να παράγει μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης AChE. Επομένως, παρόλο που μία ποσότητα δεσμεύεται από τα εντομοκτόνα, υπάρχει περίσσεια ώστε να δημιουργείται σύμπλοκο με την ακετυλοχολίνη στις νευρικές συνάψεις και έτσι να μην επηρεάζεται η λειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος (Fournier *et al.* 1993).

Από το 1964, που ο Smissaert πρώτος απέδειξε την μη ευαισθησία της AChE ως κύριου μηχανισμού ανθεκτικότητας του *Tetranychus urticae* (Koch) σε οργανοφωσφορικά, ο μηχανισμός αυτός ταυτοποιήθηκε σε πολλά έντομα και ακάρεα (Smissaert *et al.* 1964). Έχει αποδειχθεί ότι η ανθεκτικότητα που οφείλεται στην AChE σχετίζεται με επτά αντικαταστάσεις αμινοξέων σε τέσσερις ανθεκτικούς βιότυπους στο *Drosophila melanogaster* (Meigen) (Mutero *et al.* 1994) και σε τρεις ανθεκτικούς βιότυπους στο *Musca domestica* L. (Devonshire *et al.* 1998). Στο *C. rotonella*, έχει ταυτοποιηθεί ότι τα ευαίσθητα άτομα έχουν φαινυλαλανίνη στη θέση 399 της AChE ενώ στα ανθεκτικά το συγκεκριμένο αμινοξύ έχει αντικατασταθεί από τη βαλίνη (F399V) (Cassanelli *et al.* 2006).

3.3.3.2. Πρωτεϊνικό κανάλι μεταφοράς νατρίου Na⁺

Διαφοροποιήσεις στη μοριακή δομή των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς νατρίου μειώνουν τη συνάφεια των πυρεθροειδών εντομοκτόνων και του DDT, με αποτέλεσμα τη μείωση της ευαισθησίας των ανθεκτικών εντόμων (knock down resistance, kdr) (Miyazaki *et al.* 1996). Οι μεταλλαγές αυτές είναι εξαιρετικά συντηρημένες και προσδίδουν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα που στοχεύουν στο συγκεκριμένο κανάλι ιόντων (Ffrench-Constant *et al.* 1998).

Σε ορισμένα είδη έχει ταυτοποιηθεί και δεύτερη μεταλλαγή στο πρωτεϊνικό κανάλι μεταφοράς ιόντων Na⁺, που προσδίδει ανθεκτικότητα στα παραπάνω εντομοκτόνα (super knock down resistance super-kdr) (Williamson *et al.* 1996). Στα είδη *Musca domestica* L. και *Haematobia irritans* L. διαπιστώθηκε ότι η ανθεκτικότητα kdr οφείλεται στην αντικατάσταση της λευκίνης από φαινυλαλανίνη στη θέση 1014 (L1014F), ενώ η ανθεκτικότητα skdr οφείλεται στην αντικατάσταση της μεθειονίνης 918 από τη θρεονίνη (M918T) (Farnham *et al.* 1987, Guerrero *et al.* 1997). Τα ευαίσθητα άτομα του *C. rotonella* φέρουν λευκίνη στη θέση 1014 ενώ στα ανθεκτικά ταυτοποιήθηκε αντικατάσταση από την φαινυλαλανίνη (L1014F) (Brun-Barale *et al.* 2005).

3.3.3.3. Υποδοχέας του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA).

Η εμφάνιση ανθεκτικότητας στα κυκλοδιένια σχετίζεται με την αντικατάσταση του αμινοξέως αλανίνη στη θέση 302 που εντοπίζεται στη δεύτερη διαμεμβρανική περιοχή (M2) του υποδοχέα του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA). Τα ανθεκτικά άτομα διαφόρων ειδών που μελετήθηκαν, όπως τα *Drosophila melanogaster* M.,

Drosophila simulans (Sturtevant), *Myzus persicae* (Sulzer), στη συγκεκριμένη θέση φέρουν σερίνη ή γλυκίνη (Buckingham *et al.* 2005).

3.3.3.4. Νικοτινεργικοί υποδοχείς της ακετυλοχολίνης (nAChR)

Οι νικοτινεργικοί υποδοχείς της ακετυλοχολίνης (nAChR) είναι οι στόχοι δράσης μιας καινούριας σχετικά χημικής ομάδας εντομοκτόνων, των νεονικοτινοειδών και του spinosad. Τα εντομοκτόνα αυτά είναι αποτελεσματικά εναντίον εντόμων διάφορων ειδών που έχουν ήδη εμφανίσει ανθεκτικότητα σε άλλες ομάδες εντομοκτόνων (Tomizawa *et al.* 1999).

Παρόλο που έχουν ταυτοποιηθεί περιπτώσεις εμφάνισης ανθεκτικότητας, η μοριακή βάση αυτών είναι λιγότερο μελετημένη. Εμφάνιση ανθεκτικότητας έχει διαπιστωθεί στα *Bemisia tabaci* (Gennadius), *Leptinotarsa decemlineata* (Say) και (Mota-Sanchez *et al.* 2006, Zhao *et al.* 2002). Επίσης, υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στο spinosad διαπιστώθηκε στα *Spodoptera exigua*, *Plutella xylostella* L., *Heliothis virescens* (Fabricius) και *Musca domestica* L. (Perry *et al.* 2007). Αυτή φαίνεται ότι σχετίζεται με ένα γονίδιο και εμφανίζει υπολειπόμενο τρόπο κληρονομησης. Πρόσφατα, ταυτοποιήθηκε στο *Drosophila melanogaster* η μοριακή βάση της ανθεκτικότητας αυτής. Συγκεκριμένα, δείχθηκε ότι οφείλεται σε ομόζυγη απώλεια λειτουργίας της υπομονάδας α6 (Da6) του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης. Καθώς υπάρχουν πολυάριθμες υπομονάδες για τους υποδοχείς αυτούς, η συσχέτιση της Da6 με την ανθεκτικότητα στο spinosad πιθανώς δείχνει ότι η υπομονάδα αυτή είναι η μοναδική που συμμετέχει στη σύνδεση με αυτό το εντομοκτόνο ή εναλλακτικά ότι αποτελεί απαραίτητο συστατικό των υποδοχέων που ανταποκρίνονται στο spinosad (Perry *et al.* 2007) Σε ανθεκτικά άτομα του *Nilaparvata lugens* (Stal) στο imidacloprid (νεονικοτινοειδές) ταυτοποιήθηκε η αντικατάσταση της τυροσίνης από σερίνη στη θέση 151 (Y151S) στις υπομονάδες N1a1 και N1a3 των νικοτινεργικών υποδοχέων (Liu *et al.* 2005).

3.3.4. Βιοχημική ανθεκτικότητα

Με τον όρο αυτό περιγράφεται η ανθεκτικότητα που βασίζεται σε ενζυμικά συστήματα που προκαλούν αποδόμηση του εντομοκτόνου σε μη τοξικά παράγωγα πριν αυτό φτάσει στο στόχο του. Ως υπεύθυνοι μηχανισμοί για αυτήν την τροποποιημένη μεταβολική ικανότητα έχουν προταθεί η αυξημένη παραγωγή του ενζύμου, πιθανώς λόγω τροποποιημένης μεταγραφικής ρύθμισης που οδηγεί

σε υπερπαραγωγή mRNA (Taylor & Feyereisen 1996) και η αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου, λόγω τροποποίησης της δομής του (Soderlund 1997). Οι αλλαγές αυτές έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη ενεργότητα των ενζύμων και συνεπώς τον αυξημένο μεταβολισμό των εντομοκτόνων (Daborn *et al.* 2002).

3.3.4.1. Καρβοξυλεστεράσες

Είναι μία μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών, μέλη της οποίας δεσμεύουν εντομοκτόνα στον εξωκυτταρικό χώρο και υδρολύουν τους εστερικούς δεσμούς. Σχετίζονται με ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά, καρβαμιδικά και πυρεθροειδή (Wheeloach *et al.* 2005). Ο πρώτος μηχανισμός δράσης τους που έχει περιγραφεί σχετίζεται με την μεταλλαγή δομικών γονιδίων που προκαλούν την παραγωγή τροποποιημένων μεταβολικών ενζύμων με αυξημένη καταλυτική ικανότητα για τα εντομοκτόνα. Ο μηχανισμός αυτός έχει ταυτοποιηθεί σε ανθεκτικά έντομα του είδους *M. domestica* L. και του είδους *Lucilia cuprina* L. (Orpenoorth & van Asperen 1960, Campbell *et al.* 1997). Επιπλέον, ένας άλλος μηχανισμός οφείλεται στην παραγωγή αυξημένου αριθμού αντιγράφων γονιδίου με αποτέλεσμα την παραγωγή πολύ μεγαλύτερης ποσότητας ενζύμου (Vontas *et al.* 2000, Kim *et al.* 2004). Αυτό έχει ταυτοποιηθεί σε είδη του γένους *Culex* καθώς και στα είδη *M. persicae* S. και *Nilaparvata* (Stal) *Lugens* (Mouchès *et al.* 1986, Fournier *et al.* 1987, Devonshire & Field 1991).

3.3.4.2. Οξειδάσες μικτής λειτουργίας (MFO)

Μία άλλη σημαντική οικογένεια γονιδίων που έχει συσχετιστεί με βιοχημική ανθεκτικότητα είναι οι οξειδάσες μικτής λειτουργίας P450 ή μονοξυγενάσες. Πρόκειται για μικροσωμικές αιμοπρωτεΐνες που καταλύουν την οξειδωτική διάσπαση των εντομοκτόνων και εντοπίζονται κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τα μιτοχόνδρια (Scott 1999).

Η ανθεκτικότητα που οφείλεται στις οξειδάσες μικτής λειτουργίας, περιλαμβάνει όλες σχεδόν τις ομάδες εντομοκτόνων, όπως τα οργανοφωσφορικά, πυρεθροειδή, οργανοχλωριωμένα, νεονικοτινοειδή και αβερμεκτίνες. Συχνά, συσχετίζονται και με διασταυρωτή ανθεκτικότητα αφού ορισμένες οξειδάσες P450 έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν ως υπόστρωμα και να μεταβολίζουν πολύ διαφορετικά τοξικά μόρια (Daborn *et al.* 2002). Η ανθεκτικότητα είναι πιθανόν ότι οφείλεται στην αύξηση της ενεργότητας των MFO (Brattsten 1979). Στο *D. melanogaster* M. και

στο *M. domestica* L. έχει διαπιστωθεί ότι η αυξημένη αυτή ενεργότητα οφείλεται στην αυξημένη μεταγραφή του γονιδίου *CYP6D1* και όχι σε διπλασιασμό γονιδίου (Liu & Scott 1998).

3.3.4.3. S-Τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GST)

Οι S-τρανσφεράσες της γλουταθειόνης είναι μία οικογένεια ενζύμων που παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποτοξικοποίηση τόσο ενδογενών όσο και ξενοβιοτικών συστατικών, συμμετέχουν στην ενδοκυτταρική μεταφορά και βιοσύνθεση των ορμονών και παρέχουν προστασία από το οξειδωτικό στρες. Ο μεταβολισμός των ξενοβιοτικών επιτυγχάνεται είτε μέσω συζευκτικών αντιδράσεων με την ανοιγμένη γλουταθειόνη, γεγονός που καθιστά τους μεταβολίτες διαλυτούς και βοηθάει την έκκρισή τους είτε μέσω αντίδρασης αφυδροχλωρίωσης. Στα έντομα έχουν ταυτοποιηθεί τρεις κλάσεις τέτοιων ενζύμων, η κλάση I (ή δ), η II (ή σ) και η III (ή ε) (Chelvanayagam *et al.* 2001, Hemingway 2000, Sawicki *et al.* 2003). Τα ένζυμα αυτά έχουν συσχετιστεί εκτενώς με την εμφάνιση ανθεκτικότητας σε διάφορα εντομοκτόνα όπως οργανοφωσφορικά, πυρεθροειδή, καρβαμικά και το DDT (Ranson *et al.* 1997) σε διάφορα είδη εντόμων γεωργικής οικονομικής σημασίας (Huang *et al.* 1998, Yu 2002). Σε όλες τις περιπτώσεις, η ανθεκτικότητα αυτή συσχετίζεται με αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας στα ανθεκτικά στελέχη των εντόμων σε σύγκριση με τα ευαίσθητα. Ωστόσο, μέχρι τώρα δεν έχει προσδιοριστεί ο ακριβής μοριακός μηχανισμός που ευθύνεται για την αύξηση αυτή (Hemingway 2000).

4. Πληθυσμιακή γενετική

Τα είδη αποτελούνται από γεωγραφικά δομημένους πληθυσμούς, μερικοί από τους οποίους μπορεί να έχουν μικρή ή καθόλου γενετική επαφή για μεγάλο χρονικό διάστημα. Άλλα είδη πάλι χαρακτηρίζονται από σχετικά πρόσφατη εξάπλωση, με αποτέλεσμα οι πληθυσμοί τους να συνδέονται πολύ στενά μεταξύ τους. Η ιστορική και η σύγχρονη δημογραφία μπορεί να επηρεάσει τη χωρική δομή των πληθυσμών ενός είδους και ως εκ τούτου να επηρεάσει με πολλούς τρόπους την ενδοειδική γενεαλογία (Avisé 2000).

Οι φυσικοί πληθυσμοί χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη πολυμορφισμού, που τους παρέχει τη δυνατότητα να προσαρμόζονται στις περιβαλλοντικές αλλαγές. Η ύπαρξη πολυμορφισμού είναι απαραίτητη για την επιβίωση των πληθυσμών και κατ' επέκταση του είδους, ακόμα και αν αυτός έχει αρνητικό αντίκτυπο σε κάποια άτομα του πληθυσμού. Οι φυσικοί πληθυσμοί διαφέρουν ως προς τον βαθμό πολυμορφισμού και τη γενετική ποικιλότητά τους (Ayala 1982).

Οι πληθυσμιακές γενετικές μελέτες συμβάλλουν στην κατανόηση της εξελικτικής ιστορίας και δυναμικής του είδους, στη μελέτη της πορείας διασποράς του από το αρχικό σημείο εμφάνισης μέχρι την εγκαθίδρυσή του σε άλλες γεωγραφικές περιοχές καθώς και στην εκτίμηση της ικανότητας μετανάστευσής του (Zhou *et al.* 2000, Endersby *et al.* 2006). Επίσης, παρέχουν πληροφορίες, χρήσιμες για εφαρμογή προγραμμάτων ολοκληρωμένης καταπολέμησης τα οποία βασίζονται σε μια καλή γνώση της βιολογίας του εντόμου (Denholm & Rowland 1992, Miller *et al.* 2003, Endersby *et al.* 2006). Επιπλέον, η γνώση σχετικά με τη γενετική διαφοροποίηση μεταξύ γεωγραφικά χωρισμένων πληθυσμών είναι σημαντική σε προγράμματα απελευθέρωσης στερημένων εντόμων, κυρίως όταν τα εξαπολυθέντα άτομα προέρχονται από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές (Timm *et al.* 2006).

4.1. Μοριακοί δείκτες

Οι μελέτες της γενετικής σύστασης των πληθυσμών, η εκτίμηση διαφόρων παραμέτρων γενετικής ποικιλότητας, η κατανόηση της γενετικής δομής και της ομαδοποίησης των πληθυσμών, ο έλεγχος για την ύπαρξη ισορροπίας Hardy-Weinberg στηρίζονται στην ανάλυση διαφόρων μοριακών δεικτών, δηλαδή πολυμορφικών πολυπεπτιδίων ή τμημάτων DNA που αποτελούν δείκτες ποικιλότητας των γονιδιωμάτων και είναι δυνατή η ταυτοποίησή τους με μοριακές μεθόδους.

Η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός μιας σειράς διαφορετικών δεικτών με διαφορετικά επίπεδα πολυμορφισμού που τους καθιστούν κατάλληλους για τη μελέτη συγκεκριμένων ερωτημάτων αποτέλεσε πολύ σημαντική εξέλιξη και έδωσε μεγάλη ώθηση στο πεδίο της μοριακής πληθυσμιακής γενετικής. Σημαντικό πλεονέκτημα των δεικτών αυτών είναι ότι ο πολυμορφισμός τους μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με ακρίβεια, σε σχέση με άλλα χαρακτηριστικά ατόμων και

πληθυσμών που χρησιμοποιούνταν παλαιότερα και συνεπώς αποτελούν κατάλληλο υλικό για στατιστικές αναλύσεις και συγκρίσεις.

Οι δείκτες DNA μπορεί να αντιστοιχούν σε λειτουργικά ή μη τμήματα του γονιδιώματος και η ταυτοποίησή τους στηρίζεται στην εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction ή PCR), τη χρήση των ενδονουκλεασών περιορισμού και στις τεχνικές του ανασυνδυασμένου DNA. Γενικά, η εφαρμογή των δεικτών DNA παρέχει σαφώς μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα εντός και μεταξύ των πληθυσμών ποικίλων ειδών, απ' ό,τι οι ενζυμικοί πολυμορφισμοί (Hadrys *et al.* 1992, Hedrick 1992, Black 1993).

4.1.1. Αλλοένζυμα

Πρόκειται για την παλαιότερη μορφή μοριακών δεικτών. Βασίζεται στη διάκριση των διαφορετικών ισομορφών του ίδιου ενζύμου σε ηλεκτροφόρηση πηκτώματος, λόγω της διαφορετικής αμινοξικής σύστασής τους. Μειονέκτημά τους, εκτός της χαμηλής διακριτικής ικανότητας, είναι η ιστοειδική έκφρασή τους.

4.1.2. Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLPs)

Η μεθοδος RFLP βασίζεται στη χρήση των ενδονουκλεασών περιορισμού, οι οποίες αναγνωρίζουν και κόβουν το DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες. Κάθε ενδονουκλεάση δημιουργεί συγκεκριμένο αριθμό τμημάτων DNA ορισμένου μήκους. Οι αλλαγές στον αριθμό και το μέγεθος των τμημάτων (πολυμορφισμοί) μπορούν να προέλθουν από νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις μέσα στις θέσεις αναγνώρισης καθώς και από προσθήκες ή ελλείμματα. Στη μέθοδο RFLP γίνεται σύγκριση μεταξύ των προτύπων που προκύπτουν από εφαρμογή διαφόρων ενζύμων περιορισμού κατόπιν ηλεκτροφόρησής τους σε πηκτώματα αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδης (Karl & Avise 1993).

4.1.3. Τυχαία ενισχυμένο πολυμορφικό DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPDs)

Στηρίζεται στην ενίσχυση τυχαίων τμημάτων γενωμικού DNA με την εφαρμογή της PCR, χρησιμοποιώντας μικρά συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (Hadrys *et al.* 1992). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται μόνο ένας ολιγονουκλεοτιδικός εκκινητής ενώ δεν απαιτείται προηγούμενη γνώση της γενετικής σύστασης του οργανισμού

στον οποίο εφαρμόζεται η τεχνική. Καθώς ο εκκινητής είναι μικρός, η πιθανότητα υβριδοποίησής του σε πολλαπλές θέσεις του γενωμικού DNA αυξάνει και έτσι επιτυγχάνεται η ενίσχυση τμημάτων ποικίλου μήκους, τα οποία εντοπίζονται μεταξύ των θέσεων υβριδισμού. Τα προϊόντα της PCR διαχωρίζονται σε πηκτώματα αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδης και οι πολυμορφισμοί συμπεριφέρονται ως υπερέχοντες γενετικοί χαρακτήρες που κληρονομούνται μεντελικά (Carlson *et al.* 1991, Martin *et al.* 1991, Welsh *et al.* 1991).

4.1.4. Πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένων τμημάτων (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLPs)

Αποτελεί εξέλιξη της μεθόδου RAPD και βασίζεται στην επιλεκτική ενίσχυση μιας υποομάδας τμημάτων, μέσω PCR σε γενωμικό DNA που έχει προηγουμένως τεμαχιστεί με ένζυμα περιορισμού. Το πλεονέκτημά της είναι η αυξημένη εξειδίκευσή της σε σχέση με τα RAPDs, λόγω προσθήκης συνδετικών τμημάτων (linkers) στα άκρα των προϊόντων τεμαχισμού και χρήσης εκκινητών που εκτός της συμπληρωματικότητάς τους με τα συνδετικά τμήματα φέρουν λίγα επιπλέον τυχαία νουκλεοτίδια στο 3' άκρο τους. Όπως και με τα RAPD, η ανάλυση AFLP μπορεί να εφαρμοστεί χωρίς να υπάρχει προϋπάρχουσα γνώση της αλληλουχίας του γονιδιώματος του υπό εξέταση είδους, ωστόσο τα προβλήματα της επαναληψιμότητας και του επικρατούς τρόπου κληρονόμησης παραμένουν (Vos *et al.* 1995).

4.1.5. SWAPP (Sequencing With Arbitrary Primer Pairs)

Η μέθοδος αυτή συνδυάζει την τυχαία ενίσχυση με την αλληλούχηση (sequencing) χρησιμοποιώντας δύο τυχαίους 10μερείς εκκινητές. Τα τμήματα που ενισχύονται μέσω PCR, απομονώνονται και ακολούθως προσδιορίζεται η αλληλουχία τους (Burt *et al.* 1994).

4.1.6. Ανάλυση πολυμορφισμών διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP)

Η μέθοδος στηρίζεται στη διαφορετική δομή και συνεπώς διαφορετική κινητικότητα σε πήκτωμα ακρυλαμίδης, μονόκλωνων μορίων DNA που διαφέρουν μεταξύ τους έστω και κατά μόνο μία βάση. Τα προς μελέτη τμήματα DNA ενισχύονται με PCR και πριν την ηλεκτροφόρησή τους αποδιατάσσονται ενώ στη

συνέχεια η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται απουσία αποδιατακτικού μέσου ώστε να επιτρέπονται μερικώς οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η δυνατότητας σάρωσης του εξεταζόμενου τμήματος, καθ' όλο το μήκος του για πιθανούς πολυμορφισμούς.

4.1.7. Μικροδορυφόροι (microsatellites)

Οι μικροδορυφόροι (microsatellites) είναι μικρές, διαδοχικές επαναλήψεις νουκλεοτιδικών μοτίβων με επαναλαμβανόμενες μονάδες μήκους ενός έως έξι βάσεων. Το σύνηθες μήκος μιας μικροδορυφορικής αλληλουχίας είναι 10-30 βάσεις (Brown 2002), ενώ σπάνια υπερβαίνουν τις 70 μονάδες επανάληψης (Schlotterer 1998). Οι μικροδορυφόροι με ένα μόνο μοτίβο επανάληψης ονομάζονται απλοί, ενώ όταν στον ίδιο μικροδορυφόρο υπάρχουν περισσότερα του ενός μοτίβα επανάληψης ονομάζονται σύνθετοι. Σε περίπτωση που η μικροδορυφορική αλληλουχία σε κάποιο σημείο της διακόπτεται προσωρινά από κάποια βάση που δεν ανήκει στο συγκεκριμένο μοτίβο επανάληψης, τότε ο μικροδορυφόρος ονομάζεται ατελής ή διακοπτόμενος (Weber 1990).

Οι δείκτες αυτοί είναι άφθονοι στο γονιδίωμα των περισσότερων ανώτερων οργανισμών, ενώ αντίθετα το ποσοστό τους στους κατώτερους είναι κατά πολύ μικρότερο (Schlotterer 1998). Οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες εντοπίζονται κυρίως σε μη κωδικές περιοχές, κοντά ή μέσα σε ρετροτρασποζόνια (Ramsay *et al.* 1999). Όσον αφορά το μέγεθος της επαναλαμβανόμενης μονάδας, έχει δειχτεί ότι οι πολυπληθέστεροι είναι οι δινουκλεοτιδικοί μικροδορυφόροι ενώ σε πολύ μικρότερα ποσοστά απαντώνται οι τρι- και τετρανουκλεοτιδικοί (Schlotterer 1998, Zane *et al.* 2002, Wang *et al.* 1994, Schug *et al.* 1998).

Το χαρακτηριστικό που κάνει τους μικροδορυφόρους να ξεχωρίζουν από κάθε άλλη κατηγορία αλληλουχιών DNA είναι ο ασυνήθιστα υψηλός ρυθμός μετάλλαξης που παρουσιάζουν και στον οποίο οφείλεται η αυξημένη τους πολυμορφικότητα (Schlotterer 2000). Το χαρακτηριστικό αυτό, σε συνδυασμό με την αφθονία τους, την ιδιότητα να κληρονομούνται ως συνυπερέχοντες μεντελικοί δείκτες (γεγονός που καθιστά εφικτή τη διάκριση αλληλομόρφων πατρικής και μητρικής προέλευσης) και την παρουσία εξελικτικής σταθερότητας, τους καθιστά πολύτιμους γενετικούς δείκτες στην πληθυσμιακή γενετική ανάλυση (Goldstein *et al.* 1995), γεγονός που αποδεικνύεται και από την ευρύτατη χρήση τους σε μελέτες φυλογεωγραφικές, προτύπων διασποράς ειδών, γενετικής δομής, κ.λπ.

Συγκεκριμένα, στην καρπόκαψα μέχρι τώρα έχουν πραγματοποιηθεί τρεις μελέτες πληθυσμιακής δομής και σύστασης βασισμένες σε μικροδορυφόρους σε πληθυσμούς προερχόμενους από την Ευρώπη και τη Νότια Αμερική (Franck *et al.* 2007, Fuentes-Contreras *et al.* 2007, Chen & Dorn 2009).

4.1.8. Μιτοχονδριακό DNA

Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) είναι ένα μικρό, δίκλωνο, κυκλικό, υπερελικωμένο μόριο που υπάρχει σε πολλαπλά αντίγραφα και έχει μέγεθος που συνήθως κυμαίνεται από 16 έως 20 χιλιάδες ζεύγη βάσεων (Brown 1983, Moritz *et al.* 1987).

Σε όλα τα πολυκύτταρα ζώα που έχουν μελετηθεί, καθώς και σε μερικά πρωτόζωα, το mtDNA φέρει τις ίδιες ομάδες γονιδίων. Συγκεκριμένα, περιλαμβάνει: 22 γονίδια μεταφορικών RNA (tRNA), 13 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, 2 γονίδια ριβοσωμικών RNA (rRNA) και την περιοχή ελέγχου (D-loop) που είναι μη κωδική και ελέγχει την αντιγραφή και τη μεταγραφή. Κατά κανόνα, από το mtDNA απουσιάζουν τα ιντρόνια, ενώ οι διαγονιδιακές αλληλουχίες είναι γενικά μικρές ή απύσες (Avise *et al.* 1987).

Οι εξελικτικές αλλαγές που συμβαίνουν στο mtDNA είναι συνήθως απλές και αφορούν αντικαταστάσεις βάσεων και αλλαγές στο μήκος, οι οποίες συμβαίνουν συνήθως στις μικρές μη κωδικές περιοχές (Brown 1985, Meyer 1993). Το mtDNA χρησιμοποιείται ευρύτατα σε μελέτες πληθυσμιακής γενετικής και εξέλιξης λόγω των πλεονεκτημάτων που εμφανίζει τόσο από εξελικτική όσο και από τεχνική άποψη. Έτσι, ο αριθμός των αντιγράφων του στα κύτταρα είναι εξαιρετικά υψηλός (εκατοντάδες έως χιλιάδες) σε σχέση με τα αντίγραφα του πυρηνικού DNA (ένα στους απλοειδείς και δύο στους διπλοειδείς οργανισμούς), (Futuyama 1991) και είναι πολύ καλά χαρακτηρισμένο σε σχέση με το πυρηνικό (Hagelberg 1994). Επίσης, εμφανίζει πολύ ταχύτερους ρυθμούς εξέλιξης σε σχέση με το πυρηνικό DNA λόγω απουσίας μηχανισμών επιδιόρθωσης (Clayton 1982) ενώ, λόγω σχεδόν αποκλειστικά μητρικής κληρονομιάς, δεν εμφανίζει γεγονόνα ανασυνδυασμού, συνεπώς οι διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται σε αυτό είναι καθαρά αποτέλεσμα μεταλλαγών και όχι ανασυνδυασμών (Hagelberg 1994).

Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη παραμέτρων, βασικών συνιστωσών προγραμμάτων Ολοκληρωμένης Διαχείρισης του *Cydia pomonella*. Για τον σκοπό αυτό διερευνήθηκε η ανθεκτικότητα πληθυσμών του εντόμου σε διάφορες χημικές ομάδες εντομοκτόνων (οργανοφωσφορικά, πυρεθροειδή, ρυθμιστές ανάπτυξης, νεονικοτενοειδή). Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν βιοδοκιμές με τις διαγνωστικές δόσεις 10 εντομοκτόνων, σε πληθυσμούς που συλλέχθηκαν από διάφορους ξενιστές και περιοχές της Ελλάδας. Επίσης, οι διαγνωστικές δόσεις εφαρμόστηκαν σε διάφορα στάδια του εντόμου. Παράλληλα μελετήθηκαν βιοχημικοί και μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα.

Διερευνήθηκε η γενετική διαφοροποίηση πληθυσμών του εντόμου από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας και της Γαλλίας και από διαφορετικούς ξενιστές (μηλιά, αχλαδιά, καρυδιά) με την χρήση 11 μικροδορυφορικών DNA δεικτών. Μελετήθηκε η διασπορά του εντόμου με την εξαπόλυση και επανασυλλογή σημασμένων αρσενικών και θηλυκών ενηλίκων καθώς και με τον προσδιορισμό του βαθμού συγγένειας (kinship analysis) μεταξύ ατόμων τα οποία συλλέχθηκαν από δύο γειτονικούς οπωρώνες. Η τελευταία μέθοδο βασίστηκε σε μικροδορυφορικούς DNA δείκτες. Επίσης, αξιολογήθηκαν τρία μοντέλα της φαινολογίας του εντόμου από τη διεθνή βιβλιογραφία σε δυο κύριες μηλοπαραγωγικές περιοχές της Ελλάδος, στην Αγιά Λάρισας και στη Ζαγορά Μαγνησίας. Τέλος αξιολογήθηκαν δύο διαφορετικά σιτηρέσια για μαζική εκτροφή των προνυμφών της καρπόκαψας.

Β'. Ειδικό μέρος

5. Αξιολόγηση μοντέλων πρόγνωσης εμφάνισης του *Cydia pomonella* και μελέτη φαινολογίας

5.1. Εισαγωγή

Η ολοκληρωμένη διαχείριση των εντόμων (IPM, Integrated Pest Management) στηρίζεται στην ακριβή παρακολούθηση και έλεγχο των πληθυσμών τους με συνδυασμένη εφαρμογή μεθόδων, όπου η χρήση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων περιορίζεται στο απολύτως απαραίτητο (Kogan 1998). Καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου πρέπει να ελέγχεται ο αριθμός και τα είδη των εντομών προκειμένου να οριστούν τα οικονομικά επίπεδα ζημίας για να κριθεί αναγκαία η απόφαση για τη λήψη των μέτρων ελέγχου (Pedigo & Rice 2005). Επιπλέον η λανθασμένη χρήση των φυτοπροστατευτικών ουσιών (τρόπος, χρόνος και συχνότητα εφαρμογής) αφενός μειώνει την αποτελεσματικότητά τους (αυξημένο κόστος, αποτυχία καταπολέμησης) και επιβαρύνει το περιβάλλον (μόλυνση φυσικών πόρων, εξαφάνιση ωφέλιμων ειδών), αφετέρου οδηγεί στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας (Sauphanor & Bouvier 1995).

Οι νέες ομάδες εντομοκτόνων (ρυθμιστές ανάπτυξης, μιμητές εκδυσώνης, παρεμποδιστές σύνθεσης χιτίνης) που στοχεύουν σε πολύ συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου (αυγά, νεαρές προνύμφες), πρέπει να εφαρμόζονται στην κατάλληλη χρονική στιγμή για αποτελεσματική δράση (Bloomers 1994). Επομένως, τα μοντέλα πρόγνωσης εμφάνισης των διαφόρων εντομών είναι απαραίτητο εργαλείο στην ολοκληρωμένη διαχείρισή τους.

Τα μοντέλα αυτά στηρίζονται στην φαινολογία των εντόμων σε συνδυασμό κυρίως με την ηλιακή ακτινοβολία, τη θερμοκρασία αέρα και την εδαφολογική θερμοκρασία σε ωριαία βάση και με τη χρήση ενός αλγορίθμου προσομοιώνουν την ολοκλήρωση των βιολογικών σταδίων τους. Ο υπολογισμός των ημεροβαθμών που χρειάζεται για να ολοκληρωθεί το κάθε στάδιο του εντόμου (αυγό, προνύμφη, νύμφη), πραγματοποιείται υπό ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες σε σταθερές θερμοκρασίες. Επιπλέον, υπολογίζεται το ανώτερο και κατώτερο θερμοκρασιακό όριο για την ανάπτυξη των εντόμων. Τέλος, ελέγχεται η αξιοπιστία του προγράμματος με επαναλαμβανόμενα πειράματα σε φυσικές συνθήκες (Howell & Neven 2000).

Έχουν προταθεί αρκετά μοντέλα πρόγνωσης σχεδόν για όλα τα γένη των εντομών, που συμβάλουν στον έλεγχο εντόμων (Osborne 1982, Jones *et al.* 1989, Hogg & Gutierrez 1980, Pinhassi *et al.* 1996, Guppy & Mukerji 1974, Coop *et al.* 1993, AliNiazee 1976). Οι Riedl *et al.* (1976) πρώτοι χρησιμοποίησαν για τον έλεγχο της καρποκάψας και την παρακολούθηση των πτήσεων του εντόμου, φερομονικές παγίδες σε συνδυασμό με μοντέλο πρόγνωσης. Αυτό στηρίχθηκε στον υπολογισμό των ημεροβαθμών ώστε να προσδιοριστεί η ακριβής ημερομηνία εφαρμογής των φυτοπροστατευτικών μέσων καταπολέμησης. Έτσι, πρότειναν ότι ο κατάλληλος χρόνος για την εφαρμογή φυτοπροστατευτικών ουσιών που είχαν στόχο τα ωά της πρώτης και της δεύτερης γενιάς ήταν οι 140 ημεροβαθμοί, από την πρώτη πτήση του εντόμου και στη συνέχεια οι 556 ημεροβαθμοί αντίστοιχα.

Βάσει αυτού του μοντέλου πρόγνωσης, ο έλεγχος του εντόμου εφαρμόστηκε επιτυχώς στο Μίσιγκαν (Riedl *et al.* 1979), στη Γιούτα (Jorgensen *et al.* 1979) και στην Ουάσιγκτον (Brunner *et al.* 1982), περιοχές όπου η καρποκάψα είχε δυο γενεές ανά έτος. Ωστόσο, στην Καλιφόρνια όπου το έντομο έχει από 2 έως 4 γενεές, το πρόγραμμα καταπολέμησης δεν είχε επιτυχία. Επομένως, πριν την εφαρμογή κάποιου μοντέλου πρόγνωσης κρίνεται αναγκαία η συσχέτιση με το βιότυπο του πληθυσμού της περιοχής αλλά και με τις κλιματολογικές συνθήκες που επικρατούν (Pitcairn *et al.* 1992).

Οι Boivin *et al.* (2003) παρατήρησαν ότι υπάρχει διαφορά στο χρόνο εμφάνισης των τριών γενεών μεταξύ ευαίσθητων και ανθεκτικών πληθυσμών στις δραστικές ουσίες diflubenzuron και deltamethrin, με τους πρώτους να συμπληρώνουν το βιολογικό τους κύκλο πιο νωρίς στις ίδιες θερμοκρασίες. Στην πρώτη γενεά παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μόνο των ανθεκτικών πληθυσμών στο deltamethrin, ενώ στη δεύτερη και τρίτη γενεά και στους δύο ανθεκτικούς πληθυσμούς.

Η παρούσα εργασία έχει ως στόχο την αξιολόγηση τριών μοντέλων πρόγνωσης, τα οποία υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία, σε δυο κύριες μηλοπαραγωγικές περιοχές της Ελλάδος, στην Αγιά Λάρισας και Ζαγορά Μαγνησίας. Επιπλέον να προσδιοριστεί ο αριθμός των γενεών της καρποκάψας, στις παραπάνω περιοχές που είναι σημαντικό στοιχείο για την εφαρμογή σχεδίων καταπολέμησης.

5.2. Υλικά και Μέθοδοι

Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα μετεωρολογικά δεδομένα των ετών 2002, 2003 και 2005-2008 από τη Αγιά Λάρισα και των ετών 1999, 2000, 2002 και 2006-2008 από τη Ζαγορά Μαγνησίας μαζί με τα αποτελέσματα των συλλήψεων στις φερομονικές παγίδες, για την αξιολόγηση τριών μοντέλων εμφάνισης της καρπόκαψας. Τα παραπάνω στοιχεία χορηγήθηκαν από το «Περιφερικό Κέντρο Προστασίας Φυτών και Ποιοτικού Ελέγχου» Μαγνησίας. Σε κάθε περιοχή ήταν εγκατεστημένος ένας κεντρικός και δύο μικρότεροι πρόσθετοι (added) μετεωρολογικοί σταθμοί. Τα κλιματολογικά στοιχεία καταγράφονταν αυτόματα σε data-logger, και επεξεργάζονταν σε Η/Υ. Η συλλογή των στοιχείων πραγματοποιούνταν σε ωριαία βάση από αισθητήρες οι οποίοι ήταν εγκαταστημένοι 3 μέτρα από το έδαφος.

Τα δεδομένα της θερμοκρασίας χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των απαραίτητων ημεροβαθμών που απαιτήθηκαν για την ολοκλήρωση κάθε γενιάς της καρπόκαψας. Για τον υπολογισμό των ημεροβαθμών χρησιμοποιήθηκε η μέση θερμοκρασία κάθε ημέρας και οι παράμετροι (κατώτερο και ανώτερο όριο ανάπτυξης) τριών μοντέλων πρόγνωσης της καρπόκαψας που εφαρμόζονται στην Καλιφόρνια (Πίνακες 5.1. - 5.3.) http://www.ipm.ucdavis.edu/PHENOLOGY/maccodling_moth.html. Το σύνολο των ημεροβαθμών που απαιτητέ για την ολοκλήρωση κάθε σταδίου, σύμφωνα με το κάθε μοντέλο, ισούται με το άθροισμα των ημεροβαθμών κάθε ημέρας. Ο ημεροβαθμός μιας ημέρας είναι η διαφορά της θερμοκρασίας αναφοράς (κατώτερο και ανώτερο όριο ανάπτυξης) και της θερμοκρασίας περιβάλλοντος της συγκεκριμένης ημέρας. Ο υπολογισμός του αθροίσματος των ημεροβαθμών ξεκίνησε από την ημέρα που καθορίστηκε από το Biofix κάθε μοντέλου.

Η καταγραφή των συλλήψεων πραγματοποιούνταν με έλεγχο των φερομονικών παγίδων ανά τρεις ημέρες ενώ η ανανέωση της φερομόνης γινόταν κάθε 20 ημέρες. Για τη σχεδίαση των διαγραμμάτων τα δεδομένα των συλλήψεων ανάχθηκαν ανά εβδομάδα, ενώ για την παρουσίαση των πινάκων, με την ακριβή ημερομηνία εμφάνισης της κάθε γενιάς, ανά ημέρα. Επομένως, στα αποτελέσματα που αναγράφονται στους πίνακες, υπάρχει απόκλιση από την πραγματική τιμή,

μιάμιση ημέρα. Στους πίνακες σαν πρώτη γενεά αναφέρεται η πρώτη γενεά που εμφανίζεται κατά την διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου.

Πίνακας 5.1. Μοντέλο 1 (από Integrated Pest Management for apple and pears, 1991 Project. Div. Agr. Sci. Publ. #3340).

Στάδιο	Μέσος αριθμός ημεροβαθμών
Έξοδος έως αρχή ωοτοκίας	32,2
Αρχή εκκόλαψης αυγών	87,8
Ανάπτυξη προνύμφης	261,7
Ανάπτυξη νύμφης	239,4
Σύνολο	621,1

Όρια ανάπτυξης: Κατώτερο: 10,0°C

Ανώτερο: 31,0°C

Biofix: Όταν στις παγίδες συλλαμβάνονται για δύο συνεχόμενες νύχτες ενήλικα άτομα και η θερμοκρασία το ηλιοβασίλεμα είναι πάνω από 16,7°C.

Πίνακας 5.2. Μοντέλο 2 (Pickel, C.P. *et al.* 1986).

Στάδιο	Μέσος αριθμός ημεροβαθμών
Ενήλικο πριν την ωοθεσία και ωοθεσία	88,9
Ανάπτυξη προνύμφης	263,9
Ανάπτυξη νύμφης	222,2
Χρόνος γενιάς (από ωό έως ωό)	575,0

Όρια ανάπτυξης: Κατώτερο: 11,1°C

Ανώτερο: 34,4°C

Biofix: Όταν στις παγίδες συλλαμβάνονται για δύο συνεχόμενες νύχτες ενήλικα άτομα και η θερμοκρασία το ηλιοβασίλεμα είναι πάνω από 16,7°C.

Πίνακας 5.3. Μοντέλο 3 (Pitcain M. J. *et al.* 1992).

Στάδιο	Μέσος αριθμός ημεροβαθμών
Ολοκλήρωση Πρώτης γενιάς	588
Ολοκλήρωση Δεύτερη γενιά	657
Ολοκλήρωση Τρίτη γενιά	657
Μέσος όρος	619

Όρια ανάπτυξης: Κατώτερο: 10,0°C

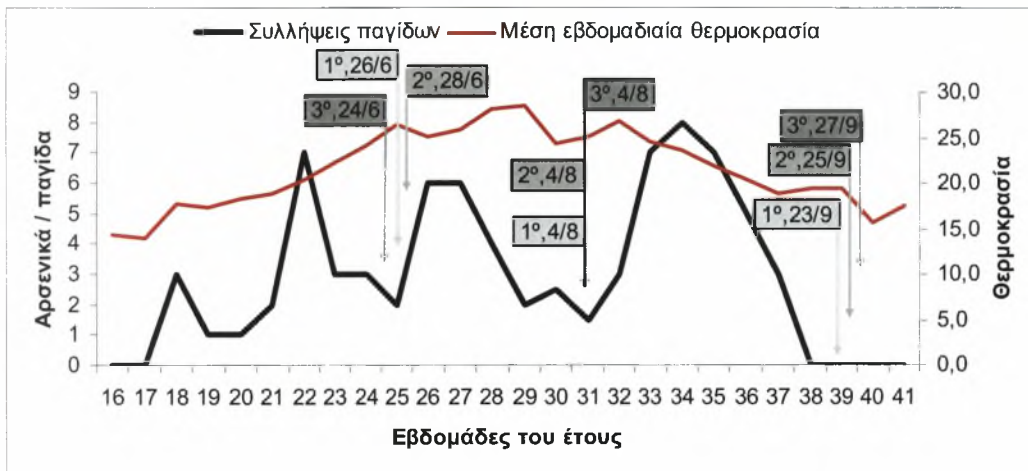
Ανώτερο: 31,1°C

Biofix: Όταν στις παγίδες συλλαμβάνεται το πρώτο ενήλικο άτομο.

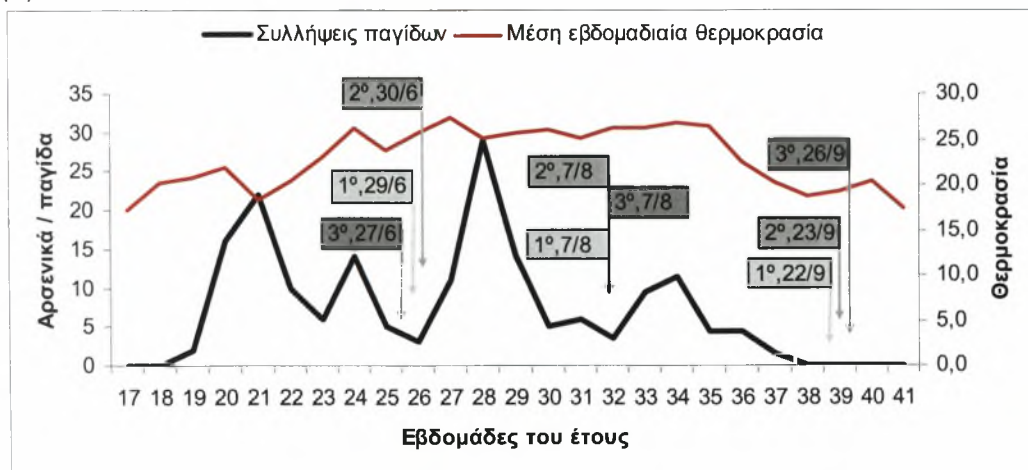
5.3. Αποτελέσματα

Από τα αποτελέσματα των συλλήψεων των φερομονικών παγίδων για τα έτη 2002, 2003, 2005, 2006, 2007 και 2008 παρατηρήθηκε ότι στην περιοχή της Αγίας Λάρισας υπάρχουν τέσσερις γενεές το έτος (Σχήμα 5.1. (a), (b), (c), (d), (e), και (f)). Επιπλέον, στο ίδιο Σχήμα δίνονται οι ακριβείς ημερομηνίες ολοκλήρωσης των τριών γενεών σύμφωνα με τα τρία μοντέλα που εξετάστηκαν (1^ο= 1^ο Μοντέλο, 2^ο= 2^ο Μοντέλο, 3^ο= 3^ο Μοντέλο).

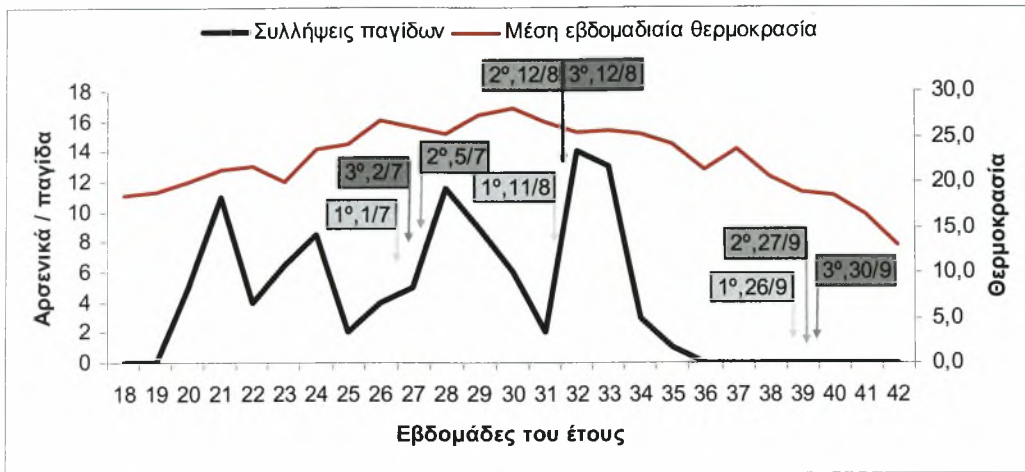
(a)



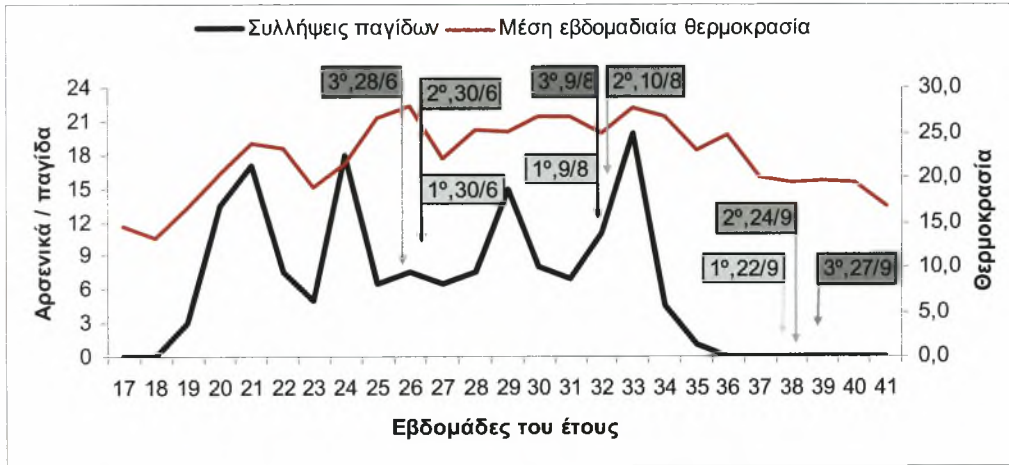
(b)



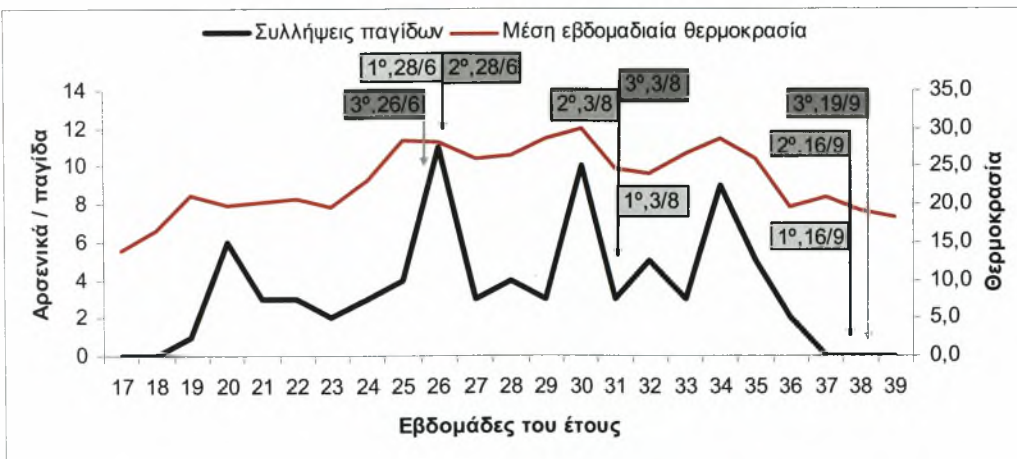
(c)



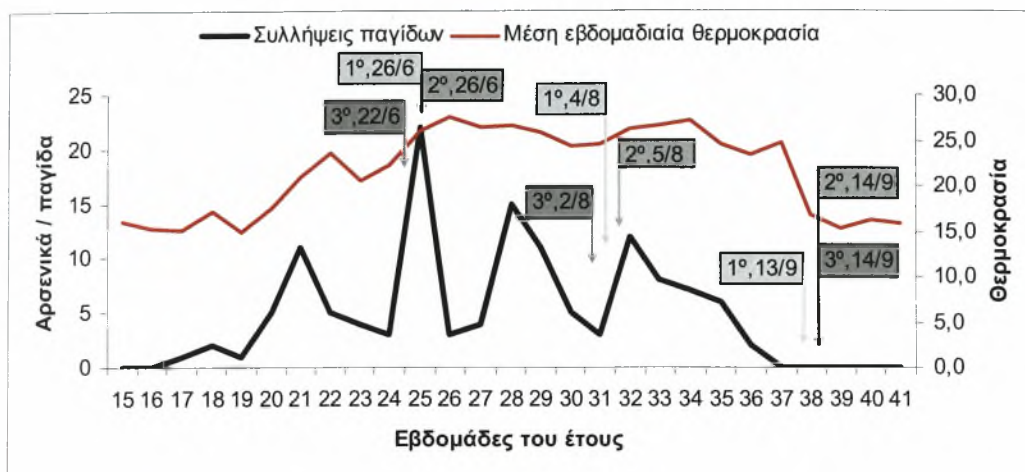
(d)



(e)



(f)



Σχήμα 5.1. Συλλήψεις αρσενικών ατόμων *C. rotonella* σε φερομονικές παγίδες τα έτη, 2002 (a), 2003 (b), 2005 (c), 2006 (d), 2007 (e), 2008 (f) και απεικόνιση των αποτελεσμάτων των τριών μοντέλων στην Αγιά Λάρισα.

Στον Πίνακα 5.4. παρουσιάζονται οι ημέρες, υπολογισμένες από την αρχή του έτους, κατά τις οποίες ολοκληρώθηκαν οι τέσσερις γενεές του *C. rotonella*, σύμφωνα με τις συλλήψεις των φερομονικών παγίδων στην περιοχή της Αγίας Λάρισσας. Επιπλέον, παρατίθενται τα αποτελέσματα των τριών μοντέλων πρόγνωσης υπολογίζοντας τις ημέρες.

Διαπιστώθηκε, ότι η διαφορά μεταξύ των συλλήψεων και των αποτελεσμάτων από τα τρία μοντέλα αυξάνεται από γενιά σε γενιά.

Παρατηρήθηκε ότι, η μέγιστη διαφορά, του χρόνου ολοκλήρωσης της πρώτης γενεάς, μεταξύ των τιμών που προκύπτουν από τα στοιχεία των συλλήψεων στις φερομονικές παγίδες και του πρώτου μοντέλου, ήταν 19 ημέρες. Η μικρότερη διαφορά ήταν τρεις ημέρες και ο μέσος όρος για τα έξι χρόνια ήταν 13 ημέρες. Για τη δεύτερη γενεά, η μέγιστη διαφορά ήταν 28 ημέρες, η μικρότερη έξι ημέρες, ενώ ο μέσος όρος για τα άξι χρόνια ήταν 21 ημέρες. Τέλος, η μέγιστη διαφορά στην τρίτη γενεά, ήταν 44 ημέρες, η μικρότερη 22 ημέρες, ενώ ο μέσος όρος ήταν 31 ημέρες.

Στο δεύτερο μοντέλο πρόγνωσης, η μέγιστη απόκλιση του χρόνου ολοκλήρωσης της πρώτης γενεάς από τις τιμές που προκύπτουν από τα στοιχεία των συλλήψεων στις φερομονικές παγίδες, ήταν 19 ημέρες, η μικρότερη τρεις ημέρες, ενώ ο μέσος όρος ήταν 13 ημέρες. Στη δεύτερη γενεά, η μέγιστη απόκλιση ήταν 28 ημέρες, η μικρότερη έξι, ενώ ο μέσος όρος για τα έξι χρόνια ήταν 22

ημέρες. Τέλος, για την τρίτη γενεά η μέγιστη τιμή της απόκλισης ήταν 45 ημέρες, η μικρότερη 22 ημέρες και ο μέσος όρος 32 ημέρες.

Τα αποτελέσματα από το τρίτο μοντέλο έδειξαν ότι η μέγιστη διαφορά στην ολοκλήρωση της πρώτης γενεάς σε σχέση με τα στοιχεία των συλλήψεων στις φερομονικές παγίδες ήταν 16 ημέρες, η μικρότερη μία ημέρα, ενώ ο μέσος όρος ήταν 10 ημέρες. Στη δεύτερη γενεά, η μέγιστη απόκλιση ήταν 28 ημέρες, η μικρότερη έξι ημέρες, ενώ ο μέσος όρος για τα έξι χρόνια ήταν 21 ημέρες. Τέλος, για την τρίτη γενεά η μέγιστη τιμή της απόκλισης ήταν 48 ημέρες, η μικρότερη 25 και ο μέσος όρος 33 ημέρες.

Πίνακας 5.4. Οι ημέρες ολοκλήρωσης των τριών γενεών του *C. pomonella*, βάσει των συλλήψεων των φερομονικών παγίδων στην περιοχή της Αγίας Λάρισας και των αποτελεσμάτων από τα τρία μοντέλα βάσει των θερμοκρασιών.

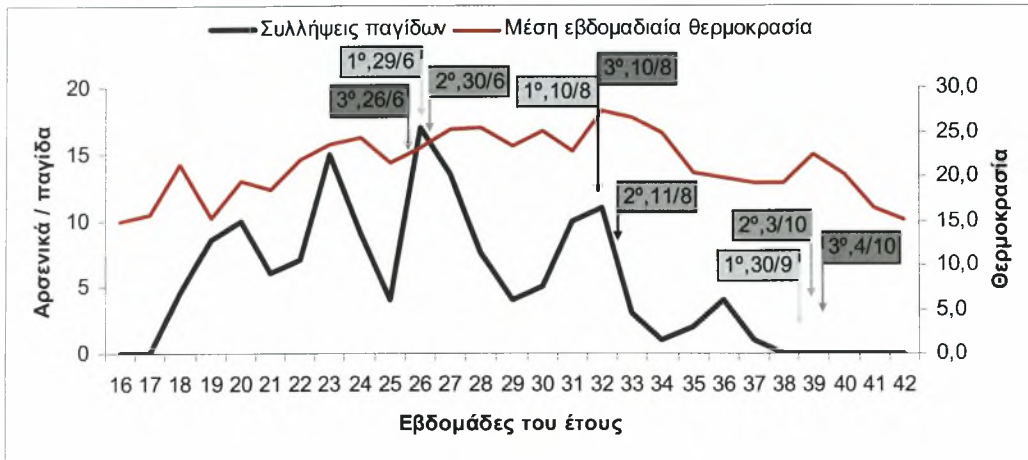
Έτος	1η γενεά				2η γενεά				3η γενεά			
	Σ.Π.	1° Μ	2° Μ	3° Μ	Σ.Π.	1° Μ	2° Μ	3° Μ	Σ.Π.	1° Μ	2° Μ	3° Μ
2002	160	177	179	175	192	216	216	216	242	266	268	270
2003	167	180	181	178	191	219	219	219	230	265	266	269
2005	167	186	186	183	198	223	224	224	225	269	270	273
2006	165	181	181	179	200	221	222	221	232	265	267	270
2007	176	179	179	177	209	215	215	215	237	259	259	262
2008	171	178	178	174	195	217	218	215	230	257	258	258

Σ.Π. = Συλλήψεις αρσενικών στις φερομονικές παγίδες.

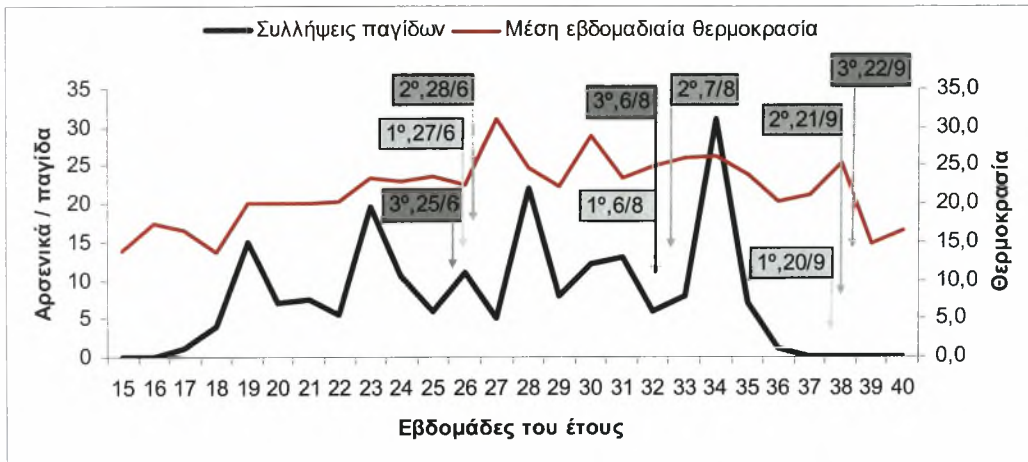
1° Μ = 1° Μοντέλο, 2° Μ = 2° Μοντέλο, 3° Μ = 3° Μοντέλο.

Τα αποτελέσματα των συλλήψεων των φερομονικών παγίδων στην περιοχή της Ζαγοράς Μαγνησίας παρουσιάζονται στα Σχήμα 5.2.. Παρατηρήθηκε ότι για τα έτη 1999, 2000, 2002 και 2006, πιθανόν να υπάρχουν τέσσερις γενεές καρπόκαψας (Σχήμα 5.2. (a), (b), (c) και (d)). Αντίθετα για τα έτη 2007 και 2008 προκύπτουν τρεις γενεές (Σχήμα 5.2. (e),(f)).

(a)



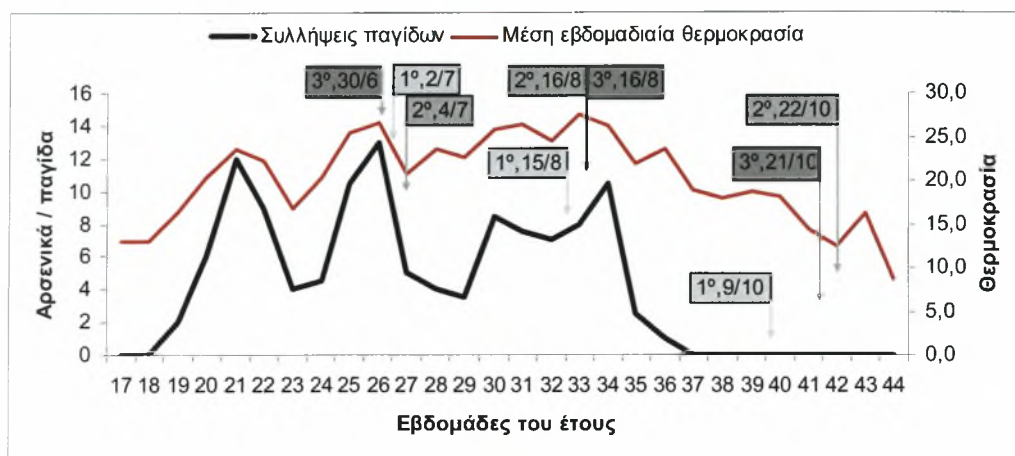
(b)



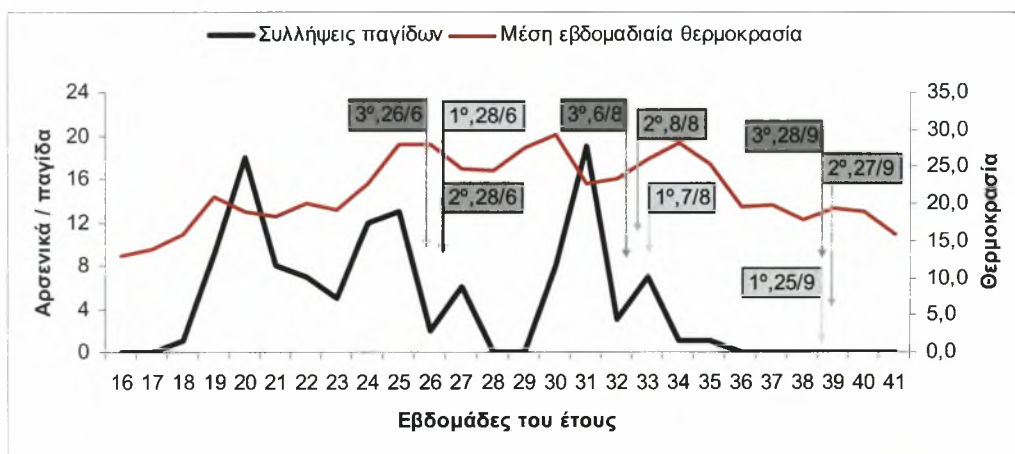
(c)



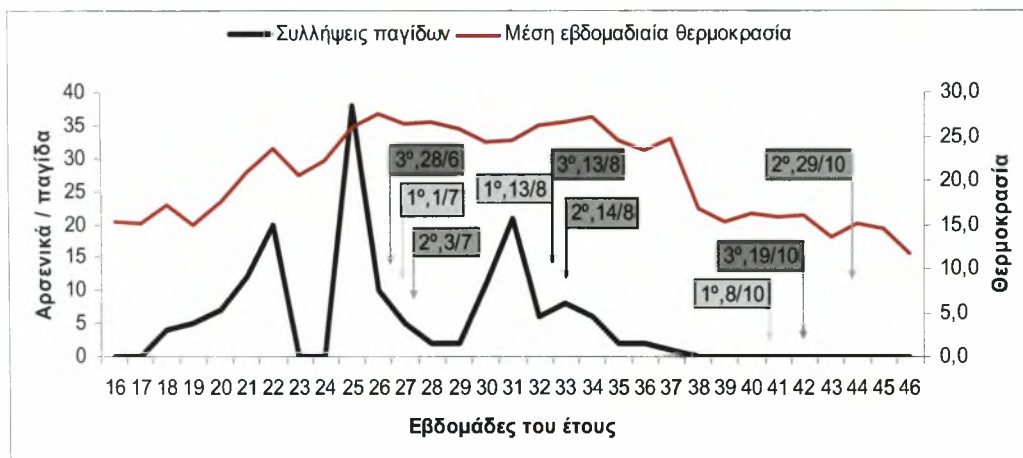
(d)



(e)



(f)



Σχήμα 5.2. Συλλήψεις αρσενικών ατόμων *C. rotonella* σε φερομονικές παγίδες τα έτη 1999 (a), 2000 (d), 2002 (c), 2006 (d), 2007 (e), 2008 (f) και απεικόνιση των αποτελεσμάτων των τριών μοντέλων στην Ζαγορά Μαγνησίας.

Στον Πίνακα 5.5. παρουσιάζονται τα έτη στα οποία παρατηρήθηκαν τρεις ή τέσσερις γενεές του *C. romonella* στην περιοχή της Ζαγοράς Μαγνησίας. Επίσης παρατίθενται τα αποτελέσματα των τριών μοντέλων πρόγνωσης, σε ημέρες, υπολογισμένες όπως και στην περίπτωση της Αγιάς.

Πίνακας 5.5. Οι ημέρες ολοκλήρωσης των τριών γενεών του *C. romonella*, υπολογισμένες από τις συλλήψεις των φερομονικών παγίδων, στην περιοχή της Ζαγοράς Πηλίου και των αποτελεσμάτων από τα τρία μοντέλα βασισμένα στη θερμοκρασία.

Έτος	1 ^η γενεά				2 ^η γενεά				3 ^η γενεά			
	Σ.Π.	1 ^ο Μ	2 ^ο Μ	3 ^ο Μ	Σ.Π.	1 ^ο Μ	2 ^ο Μ	3 ^ο Μ	Σ.Π.	1 ^ο Μ	2 ^ο Μ	3 ^ο Μ
1999	159	180	181	177	184	223	222	223	221	273	276	277
2000	161	179	180	177	196	219	220	219	236	264	265	266
2002	176	181	183	183	208	221	223	221	242	286	290	292
2006	180	183	185	181	205	227	228	228	233	282	295	294
2007	173	179	179	177	215	219	220	218	*	268	270	271
2008	173	183	185	180	215	226	227	226	*	282	303	293

Σ.Π. = Συλλήψεις αρσενικών στις φερομονικές παγίδες.

1^ο Μ = 1^ο Μοντέλο, 2^ο Μ = 2^ο Μοντέλο, 3^ο Μ = 3^ο Μοντέλο.

* = Δεν παρατηρήθηκε γενεά.

Παρατηρήθηκε ότι η μέγιστη διαφορά στο χρόνο ολοκλήρωσης της πρώτης γενεάς, μεταξύ των τιμών που προκύπτουν από τα στοιχεία των συλλήψεων στις φερομονικές παγίδες και του πρώτου μοντέλου ήταν 21 ημέρες ενώ η μικρότερη τρεις ημέρες και ο μέσος όρος για τα έξι χρόνια ήταν 11 ημέρες. Για τη δεύτερη γενεά, η μέγιστη διαφορά ήταν 39 ημέρες, η μικρότερη τέσσερις ημέρες, ενώ ο μέσος όρος ήταν 19 ημέρες. Για την τρίτη γενεά χρησιμοποιήθηκαν μόνο τέσσερα χρόνια γιατί τα έτη 2007 και 2008 παρατηρήθηκαν δύο γενεές και μια που διαχειμάζει. Η μέγιστη διαφορά ήταν 52 ημέρες, η μικρότερη 28 ημέρες, ενώ ο μέσος όρος ήταν 43 ημέρες.

Στο δεύτερο μοντέλο πρόγνωσης, η μέγιστη διαφορά στο χρόνο ολοκλήρωσης της πρώτης γενεάς, μεταξύ των τιμών που προκύπτουν από τα στοιχεία των συλλήψεων στις φερομονικές παγίδες και του πρώτου μοντέλου ήταν 22 ημέρες, η μικρότερη πέντε ημέρες και ο μέσος όρος 12 ημέρες. Στη δεύτερη γενεά, η μέγιστη απόκλιση ήταν 38 ημέρες, η μικρότερη πέντε ημέρες, ενώ ο μέσος όρος ήταν 20 ημέρες. Τέλος, για την τρίτη γενεά η μέγιστη τιμή της απόκλισης ήταν 62 ημέρες, η μικρότερη 29 ημέρες και ο μέσος όρος 38 ημέρες.

Τα αποτελέσματα από το τρίτο μοντέλο έδειξαν ότι η μέγιστη διαφορά στην ολοκλήρωση της πρώτης γενεάς σε σχέση με τα στοιχεία των συλλήψεων στις φερομονικές παγίδες ήταν εννιά ημέρες. Στη δεύτερη γενεά, η μέγιστη απόκλιση που παρατηρήθηκε ήταν 39 ημέρες, η μικρότερη τρεις ημέρες, ενώ ο μέσος όρος για τα επτά χρόνια ήταν 19 ημέρες. Για την τρίτη γενεά η μέγιστη τιμή της απόκλισης ήταν 61 ημέρες, η μικρότερη 30 και ο μέσος όρος 49 ημέρες.

Διαπιστώθηκε, ότι η διαφορά στην ημερομηνία ολοκλήρωσης των γενεών της καρπόκαψας μεταξύ των μοντέλων και των δεδομένων των συλλήψεων αυξάνεται, όπως και στην προηγούμενη περιοχή, από γενιά σε γενιά.

5.4. Συμπεράσματα

Από την παρούσα μελέτη, στην περιοχή της Αγιάς Λάρισας, διαπιστώθηκαν τέσσερις γενεές καρπόκαψας ανά έτος, ενώ στη Ζαγορά Μαγνησίας τρεις με τέσσερις γενεές. Επομένως ο αριθμός των γενεών, στην Ελλάδα, κυμαίνεται από τρεις μέχρι τέσσερις ανάλογα με τις κλιματικές συνθήκες της περιοχής. Το γεγονός αυτό έρχεται μερικώς σε αντίθεση με ότι αναφέρει η Ελληνική βιβλιογραφία. Οι Τζανακάκης & Κατσόγιαννος (1998) υποστηρίζουν ότι στην Ελλάδα η καρπόκαψα έχει δύο με τρεις γενεές το χρόνο αναλόγως με το κλίμα της περιοχής.

Επιπλέον, προκύπτει ότι κανένα από τα τρία μοντέλα δεν μπορεί να προβλέψει με αξιοπιστία την εμφάνιση των γενεών της καρπόκαψας στις δύο περιοχές που μελετήθηκαν. Διαπιστώθηκε, ότι η διαφορά στην ημερομηνία ολοκλήρωσης κάθε γενιάς όπως προκύπτει από τα δεδομένα των συλλήψεων και τα αποτελέσματα των τριών μοντέλων αυξάνεται από γενιά σε γενιά.

Μια πιθανή αιτία για την μη συσχέτιση των μοντέλων πρόγνωσης με τα πραγματικά δεδομένα των συλλήψεων από τις φερομονικές παγίδες είναι ότι τα τρία μοντέλα που εξετάστηκαν είναι βασισμένα σε δεδομένα από πληθυσμούς της καρπόκαψας από την Καλιφόρνια. Όπως αναφέρθηκε, τα μοντέλα στηρίζονται στην φαινολογία των εντόμων και κυρίως στον υπολογισμό των ημεροβαθμών που χρειάζεται για να ολοκληρωθεί το κάθε στάδιο του εντόμου (αυγό, προνύμφη, νύμφη). Είναι γνωστό ότι στους 16°C ο ρυθμός ανάπτυξης των προνυμφών που προέρχονται από την Νότια Καρολίνα, είναι υψηλότερος κατά 89% των προνυμφών που προέρχονται από την πρώην Ε.Σ.Σ.Δ (Pristavko και Degtyarev 1972) και κατά 58% αυτών που προέρχονται από τον Καναδά (Shaffer και Gold

1985). Γίνεται δηλαδή αντιληπτό ότι η γενετική σύσταση του κάθε πληθυσμού επηρεάζει το ρυθμό ανάπτυξης του εντόμου σε σχέση με τη θερμοκρασία. Επομένως, ο ρυθμός ανάπτυξης των ελληνικών πληθυσμών πρέπει να μελετηθεί σε εργαστηριακές συνθήκες και σε διαφορετικές θερμοκρασίες και να υπολογιστούν οι ημεροβαθμοί που χρειάζονται για να ολοκληρωθούν τα διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Με αυτό τον τρόπο θα είναι δυνατό να μεταβληθούν κατάλληλα τα μαθηματικά μοντέλα ή να αναπτυχθεί ένα καινούριο που να προσομοιώνει με ακρίβεια τους ελληνικούς πληθυσμούς.

Επιπλέον ο ρυθμός ανάπτυξης των διαφόρων σταδίων του βιολογικού κύκλου της καρπόκαψας επηρεάζεται από την επιλογή ανθεκτικών γονοτύπων. Οι Boivin *et al.* (2001) παρατήρησαν ότι υπάρχει διαφορά στο χρόνο εμφάνισης των γενεών μεταξύ ομόζυγων ευαίσθητων και ανθεκτικών πληθυσμών στα diflubenzuron και deltamethrin, με τους πρώτους να συμπληρώνουν τον βιολογικό κύκλο τους πιο γρήγορα στις ίδιες θερμοκρασίες.

Συγκεκριμένα, η πρώτη γενεά του ευαίσθητου ομόζυγου πληθυσμού ολοκλήρωσε την ενηλικίωσή της σε ποσοστό 90% μέσα σε χρονικό διάστημα 13 ημερών. Στο ίδιο χρονικό διάστημα μόνο το 26% των ομόζυγων ανθεκτικών στο deltamethrin ολοκλήρωσε μια γενιά ενώ χρειάστηκαν εννιά ημέρες επιπλέον για να φτάσει το ποσοστό στο 90%. Στην πρώτη γενεά παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ως προς τον χρόνο ολοκλήρωσης, μόνο των ανθεκτικών πληθυσμών στο deltamethrin, σε σχέση με τον ευαίσθητο πληθυσμό. Στη δεύτερη και τρίτη γενεά παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ του ευαίσθητου πληθυσμού και με τους δύο ανθεκτικούς πληθυσμούς. Οι ανθεκτικοί πληθυσμοί εμφάνισαν μεγάλη δραστηριότητα στις οξειδάσες μικτής λειτουργίας (MFO) ενώ η δραστηριότητα της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) ήταν μικρότερη από των (MFO), αλλά σημαντική. Οι Boivin *et al.* (2001) διατύπωσαν ότι η αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα στους παραπάνω μηχανισμούς, παρόλο που συμμετέχει στην εμφάνιση ανθεκτικότητας έχει αρνητική επίδραση στο βιολογικό κύκλο του εντόμου.

Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει την αξιοπιστία των μοντέλων πρόγνωσης είναι η διαφορά θερμοκρασίας που υπάρχει μεταξύ της ατμόσφαιρας και της κόμης των δέντρων. Σε μελέτες των Anderson (1967), Landsberg *et al.* (1973) και Thorpe (1974) διαπιστώθηκε ότι οι θερμοκρασίες φύλλων και καρπών είναι δυνατόν να διαφέρουν κατά 13-14°C από την περιβαλλοντική θερμοκρασία

του αέρα. Τα θερμοκρασιακά δεδομένα, που συνυπολογίστηκαν στην παρούσα μελέτη, αφορούσαν την ατμοσφαιρική θερμοκρασία στα τρία μετρά από το έδαφος. Συνεπώς, κρίνεται αναγκαίος ο προσδιορισμός του μικροκλίματος της κόμης των δέντρων έτσι ώστε να υπολογιστεί με ακρίβεια η θερμοκρασία η οποία θα χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια για την αξιολόγηση της αξιοπιστίας των μοντέλων. Επομένως οι γενετικοί παράγοντες, περιβαλλοντικές συνθήκες και μικροπεριβάλλον πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν στην ανάπτυξη και εφαρμογή μοντέλων πρόγνωσης εμφάνισης.

6. Αξιολόγηση δύο τεχνητών σιτηρεσιών στην προνυμφιακή ανάπτυξη του *C. pomonella*

6.1. Εισαγωγή

Η εκτροφή και η συντήρηση ενός εντόμου σε εργαστηριακές συνθήκες έχει μεγάλη σημασία για τη μελέτη της βιοοικολογίας του. Η βελτιστοποίηση των συνθηκών αυτών είναι σημαντική σε προγράμματα ολοκληρωμένης καταπολέμησης, όπως κατά την εφαρμογή προγραμμάτων εξαπόλυσης στείρων εντόμων όπου απαιτείται πολύ μεγάλος αριθμός ατόμων (Bloem *et al.* 2001). Επίσης, μεγάλος αριθμός προνυμφών απαιτείται και κατά την παραγωγή του εντομοπαθογόνου ιού granulovirus (CpGV), ο οποίος χρησιμοποιείται σε προγράμματα βιολογικής καλλιέργειας για την αντιμετώπιση της καρποκάψας (Satinder *et al.* 2008). Τέλος, η μαζική παραγωγή συμβάλει στη μελέτη εμφάνισης της ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα, παρέχοντας υψηλό αριθμό ατόμων για βιοδοκιμές ή μοριακές και βιοχημικές διαγνωστικές δοκιμές (Sauphanor *et al.* 2000).

Η διατήρηση και η μελέτη του *C. pomonella* στο εργαστήριο επιχειρήθηκε για πρώτη φορά με συλλογή της από τους καρπούς και συντήρηση των ώριμων προνυμφών της σε ψυχρές συνθήκες (Farrar & Flint 1930). Το πρόβλημα όμως αυτής της μεθόδου ήταν ότι δεν μπορούσε να υπάρχει συνεχής παροχή εντομών στο εργαστήριο. Στη συνέχεια, ο Theron (1947) προσπάθησε να εκθρέψει τις προνύμφες του εντόμου σε τεχνητή τροφή που περιείχε ως κύριο συστατικό το καλαμπόκι, αλλά αντιμετώπισε προβλήματα με τη διάπασή τους. Ο Dickson (1949) διερεύνησε τη σημασία της φωτοπεριόδου στην εισαγωγή διάπαυσης στο έντομο και προσδιόρισε ότι η εκτροφή των προνυμφών σε φωτισμό, με χρόνο ίσο ή μεγαλύτερο των 15 ωρών, δεν προκαλούσε διάπαυση.

Η πρώτη μέθοδος μαζικής παραγωγής του *C. pomonella* στο εργαστήριο επιτεύχθηκε από τους Dickson *et al.* (1952), χρησιμοποιώντας για την εκτροφή των προνυμφών ανώριμα μήλα. Η μαζική παραγωγή του εντόμου, σε συνθήκες εργαστηρίου, εξαρτάται κυρίως από την ικανοποιητική ανάπτυξη των προνυμφών (Dickson *et al.* 1952) και έτσι αρκετά εργαστήρια έχουν παρασκευάσει τεχνητές τροφές για την ανάπτυξή τους, με κύρια συστατικά σιτάρι, καλαμπόκι, σόγια και

σπόρους μηλών (Hamilton & Hathaway 1966, Rock 1967, Navon 1968, Brinton *et al.* 1969, Howell 1972, Bathon *et al.* 1991).

Ο ανταγωνισμός για την πρόσληψη τροφής είναι ένας καθοριστικός παράγοντας, με σημαντικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη και τα χαρακτηριστικά των ενηλίκων ατόμων (Bradshaw & Holzapfel 1989, Denno & Roderick 1992, Denno *et al.* 1995, Rhainds *et al.* 2002). Έτσι, η μειωμένη διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων, λόγω υψηλής πυκνότητας πληθυσμού κατά τη διάρκεια της προνυμφιακής ανάπτυξης, μπορεί να επιδράσει στη μορφολογία, στη συμπεριφορά, στη φυσιολογία (Fantinou *et al.* 2008), στη διάρκεια ζωής και στη γονιμότητα (Howell 1971). Η αναπαραγωγική ικανότητα στα λεπιδόπτερα, στηρίζεται πρωτίστως στην ικανοποιητική εκτροφή των προνυμφών και κατά συνέπεια το μέγεθος της νύμφης και του ενήλικου εντόμου καθορίζεται συχνά από την πυκνότητα των προνυμφών (Briegel 1990, Berrigan & Charnov 1994, Blanckenhorn 1998, Fischer & Fiedler 2001).

Σκοπός της μελέτης αυτής είναι η αξιολόγηση δύο εναλλακτικών τεχνητών τροφών, σε εργαστηριακές συνθήκες καλλιέργειας του *C. pomonella*. Οι δοκιμές καταλληλότητας των τεχνητών τροφών βασίστηκαν στην εκτίμηση του χρόνου ολοκλήρωσης των προνυμφικών σταδίων, στα ποσοστά θνησιμότητας των προνυμφών και στη μέτρηση του βάρους των νυμφών. Επιπλέον, εξετάστηκε η επίδραση των διαφορετικών πυκνοτήτων του πληθυσμού στις παραπάνω παραμέτρους.

6.2. Υλικά και Μέθοδοι

6.2.1. Σιτηρέσια

Για τη μαζική εκτροφή των προνυμφών του *C. pomonella* στο εργαστήριο, αξιολογήθηκαν δυο σιτηρέσια (τεχνητές τροφές). Στο πρώτο χρησιμοποιήθηκε το παρασκεύασμα «Manduca Premix-Heliothis Premix» (Stonefly Industries, INC Bryan, TX, USA) που διατίθεται σε μορφή σκόνης, με κύρια συστατικά σόγια και σιτάρι. Για την προετοιμασία της τεχνητής τροφής, το παρασκεύασμα αναμίχθηκε με νερό σε αναλογία 1:4 και ακολούθως προστέθηκε φορμαλδεΐδη και οξικό οξύ σε τελικές συγκεντρώσεις 0,037% και 0.2% αντίστοιχα. Το δεύτερο σιτηρέσιο

παρήχθη σύμφωνα με τη συνταγή του Ivaldi-Sender (Bathon *et al.* 1991, Πίνακας 6.1.).

Πίνακας 6.1. Συστατικά σιτηρεσίου του Ivaldi-Sender

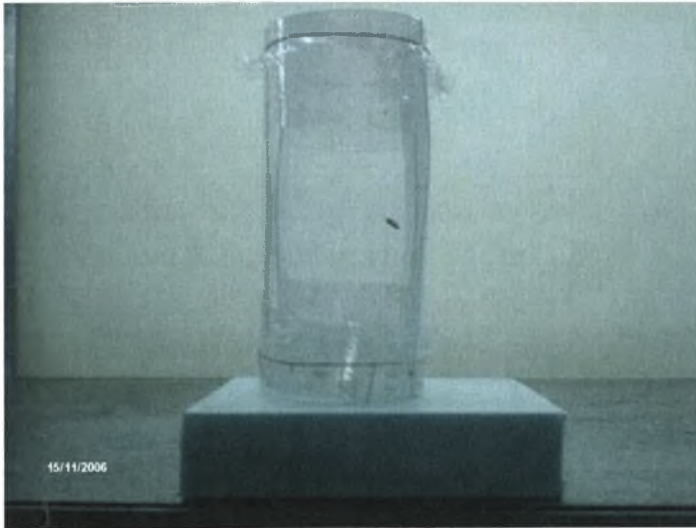
Συστατικά	Ποσότητες
Σκόνη άγαρ	20gr
Σιμιγδάλι καλαμποκιού	50 gr
Φίτρα σίτου	50 gr
Σκόνη ζύμης	50 gr
Ασκορβικό οξύ	4,5 gr
Βενζοϊκό οξύ	1,5 gr
Μέθυλ π-υδροξυβενζοϊκό άλας	1,5 gr
Νερό	780ml
Συνολική ποσότητα	958 gr

Η παραγωγή της δεύτερης τεχνητής τροφής πραγματοποιήθηκε ως εξής: σε βρασμένο νερό προστέθηκε άγαρ και αναμίχθηκε μέχρι να λιώσει. Στη συνέχεια και χωρίς επιπλέον βρασμό, προστέθηκε το σιμιγδάλι καλαμποκιού και αναμίχθηκε εκτενώς. Ακολούθησε βράσιμο λίγων λεπτών και προστέθηκε η σκόνη ζύμη και τα σπερμάτων σίτου, που αναμίχθηκαν χωρίς επιπλέον βρασμό. Όταν η θερμοκρασία του μίγματος έφτασε στους 60°C, προστέθηκε το ασκορβικό οξύ, διαλυμένο σε μικρή ποσότητα απεσταγμένου νερού (5ml). Ακολούθως, συμπληρώθηκε ο παρεμποδιστής μυκητίασης (βενζοϊκό οξύ και μέθυλ π-υδροξυβενζοϊκό άλας) διαλυμένος σε 5ml 96% αλκοόλης. Το μίγμα αναμίχθηκε εκτεταμένα μέχρι να ομογενοποιηθεί πλήρως. Τέλος, εκτέθηκε σε ακτινοβολία UV για 15min για επιπλέον αποστείρωση.

6.2.2. Συνθήκες εκτροφής

Για την αξιολόγηση των παραπάνω τεχνητών τροφών καταγράφηκε το βάρος των νυμφών, ο χρόνος ολοκλήρωσης των προνυμφικών σταδίων καθώς και το ποσοστό προνυμφικής θνησιμότητας σε τρεις μεταχειρίσεις, με δέκα επαναλήψεις για την καθεμία. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 5, 10 και 15 προνύμφες σε 10gr από κάθε τεχνητή τροφή. Ο εργαστηριακός πληθυσμός του *C. pomonella* που εξετάστηκε προερχόταν από το INRA Research Centre στην Avignon Γαλλίας. Η

εκτροφή των ενηλίκων πραγματοποιήθηκε σε μικρά κυλινδρικά κλουβιά (Εικόνα 6.1.) διαμέτρου 10cm, ύψους 20cm και με υλικό κάλυψης από PVC. Η επιφάνεια στο εσωτερικό τους ήταν καλυμμένη με λεπτό τούλι ώστε να αποφευχθεί η ωτοκία ενώ οι δύο βάσεις ήταν καλυμμένες με λεπτή διαφανή μεμβράνη για την εναπόθεση των αυγών (Saurehanor *et al.* 1998). Τα ενήλικα διατηρούνταν σε συνθήκες $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, $65\pm 1\%$ υγρασία (RH), φωτοπερίοδος 16h φως: 8h σκοτάδι (L16:D8) και τρέφονταν με διάλυμα μελιού 10%. Κάθε μέρα πραγματοποιούνταν συλλογή των αυγών και αλλαγή της μεμβράνης.



Εικόνα 6.1. Κλουβιά εκτροφής ενηλίκων ατόμων.

Τα αυγά, μαζί με τη μεμβράνη, τοποθετούνταν σε μικρά κυτία διαμέτρου 4,5cm και ύψους 3cm (Εικόνα 6.2.) ενώ κάτω από τη μεμβράνη ήταν τοποθετημένο διηθητικό χαρτί. Περίπου 3-4 κυτία τοποθετούνταν σε μεγαλύτερο κύπελλο, ο πυθμένας του οποίου είχε καλυφθεί με βρεγμένο βαμβάκι. Οι συνθήκες διατήρησης των αυγών ήταν $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, $70\pm 5\%$ RH και L16:D8 (Saurehanor & Bouvier 1995) στις οποίες η εκκόλαψη ολοκληρώνονταν σε διάστημα 3-4 ημερών.

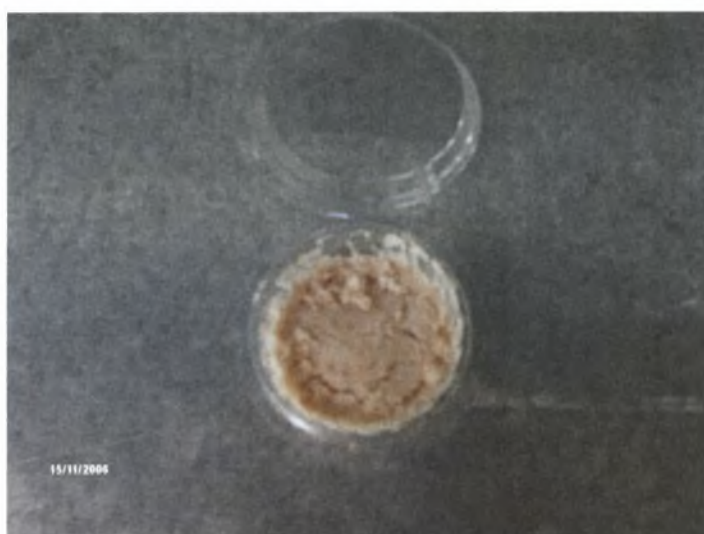
Μετά την έξοδο των νεαρών προνυμφών πραγματοποιούνταν η μεταφορά τους στα κυτία εκτροφής με χρήση πολύ μαλακού πινέλου (Εικόνα 6.3.). Οι συνθήκες εκτροφής ήταν $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, $70\pm 5\%$ RH και L16:D8 (Saurehanor *et al.* 2000).

Ο έλεγχος για την παρακολούθηση της ολοκλήρωσης των προνυμφικών σταδίων πραγματοποιούνταν κάθε 12 ώρες σε καθημερινή βάση. Οι νύμφες μεταφέρονταν σε ατομικά κυτία όπου προσδιορίζονταν το φύλο τους (οι θηλυκές

νύμφες έχουν τρία κοιλιακά διαφράγματα, ενώ οι αρσενικές τέσσερα) και καταγράφονταν το βάρος τους.



Εικόνα 6.2. Κυτία συντήρησης αυγών.



Εικόνα 6.3. Κυτία εκτροφής προνυμφών.

6.2.3 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το στατιστικό πακέτο STATISTICA 7.0. Η σύγκριση των μέσων όρων του βάρους των νυμφών και των χρόνων ολοκλήρωσης των σταδίων έγινε με ANOVA, μετά από μετατροπή των αποτελεσμάτων σε $\sqrt{x+1}$, όπου x η τιμή της μέτρησης λόγω της ύπαρξης μηδενικών τιμών. Η σύγκριση των ποσοστών θνησιμότητας έγινε επίσης με

ANOVA ενώ προηγουμένως πραγματοποιήθηκε μετατροπή των ποσοστών σε τόξο ημιτόνο.

6.3. Αποτελέσματα

6.3.1. Βάρος νυμφών

Στον Πίνακα 6.2. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης της πυκνότητας των προνυμφών, κατά τη διάρκεια της εκτροφής τους, στο βάρος των νυμφών και στα δύο σιτηρέσια. Η ποσότητα της τεχνητής τροφής ήταν 10gr.

Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο σιτηρεσίων στο βάρος των αρσενικών νυμφών ($F = 80,72$, $df = 1$, $p < 0,001$). Οι νύμφες που προέκυψαν από το σιτηρέσιο «Manduca Premix-Heliothis Premix» είχαν μεγαλύτερο βάρος. Η αύξηση του βάρους των νυμφών ήταν αντιστρόφως ανάλογη της αύξησης της πυκνότητας των προνυμφών και στα δύο σιτηρέσια και διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών πυκνοτήτων εκτροφής ($F = 114,98$, $df = 2$, $p < 0,001$).

Πίνακας 6.2. Επίδραση εκτροφής σε διαφορετικές πυκνότητες, στην τεχνητή τροφή «Manduca Premix-Heliothis Premix» και Ivaldi-Sender στο βάρος των αρσενικών νυμφών του *Cydia pomonella*.

Πυκνότητα (προνύμφες / κυτίο)	Τεχνητή τροφή	N	Βάρος νυμφών (mg) (Μ.Ο. ² ± Τ.Σ ³ .)	Συν. μέσο βάρος νυμφών ¹ (mg) (Μ.Ο. ² ± Τ.Σ. ³)
5	Manduca Premix	27	40,7±0,5	38,5±0,7a ⁴
	Ivaldi-Sender	21	36,8±0,8	
10	Manduca Premix	51	36,4±0,6	34,9±0,6b
	Ivaldi-Sender	40	33,2±0,7	
15	Manduca Premix	67	32,6±0,5	30,2±0,6c
	Ivaldi-Sender	51	27,8±0,6	

1: Το συνολικό μέσο βάρος των νυμφών, για κάθε πυκνότητα και στις δύο τροφές.

2: Μέσος όρος.

3: Τυπικό σφάλμα.

4: Οι αριθμοί που ακολουθούνται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά κατά Tukey $F = 114,98$, $df = 2$, $p < 0,001$.

Επίσης, σημαντική ήταν η αλληλεπίδραση μεταξύ σιτηρεσίων και πυκνοτήτων ($F = 4,1$, $df = 2$, $p = 0,023$).

Το ίδιο φαινόμενο διαπιστώθηκε και στις θηλυκές νύμφες (Πίνακας 6.3.). Οι νύμφες που προέκυψαν από την εκτροφή των προνυμφών στο σιτηρέσιο Ivaldi-

Sender είχαν μικρότερο βάρος και διέφεραν στατιστικώς σημαντικά από τις νύμφες του δεύτερου σιτηρεσίου ($F = 57,3$, $df = 1$, $p < 0,001$). Και στην περίπτωση αυτή η αύξηση του βάρους των νυμφών ήταν αντιστρόφως ανάλογη της αύξησης της πυκνότητας των προνυμφών και στα δύο σιτηρέσια και διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών πυκνοτήτων εκτροφής ($F = 83,8$, $df = 2$, $p < 0,001$). Επιπλέον, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των επαναλήψεων ($F = 2,1$, $df = 9$, $p = 0,047$).

Πίνακας 6.3. Επίδραση εκτροφής σε διαφορετικές πυκνότητες, στην τεχνητή τροφή «Manduca Premix-Heliothis Premix» και Ivaldi-Sender στο βάρος των θηλυκών νυμφών του *Cydia pomonella*.

Πυκνότητα (προνύμφες/κυτίο)	Τεχνητή τροφή	N	Βάρος νυμφών (mg) (Μ.Ο. ² ± Τ.Σ. ³)	Συν. μέσο βάρος νυμφών ¹ (mg) (Μ.Ο. ² ± Τ.Σ. ³)
5	Manduca Premix	21	45,2±1,1	44,5±0,6a ⁴
	Ivaldi-Sender	18	43,4±0,7	
10	Manduca Premix	40	41,4±0,6	38,9±0,7b
	Ivaldi-Sender	33	36,3±0,7	
15	Manduca Premix	66	39,1±0,3	36,9±0,6c
	Ivaldi-Sender	57	34,9±0,6	

1: Το συνολικό μέσο βάρος των νυμφών, για κάθε πυκνότητα και στις δύο τροφές.

2: Μέσος όρος.

3: Τυπικό σφάλμα.

4: Οι αριθμοί που ακολουθούνται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά κατά Tukey $F = 83,8$, $df = 2$, $p < 0,001$.

6.3.2. Χρόνος ολοκλήρωσης προνυμφικών σταδίων

Η πυκνότητα εκτροφής των προνυμφών είχε αρνητική επίδραση στο χρόνο ολοκλήρωσης των προνυμφικών σταδίων. Συγκεκριμένα, η αύξηση του χρόνου ήταν ανάλογη της αύξησης της πυκνότητας των αρσενικών προνυμφών και διέφερε στατιστικώς σημαντικά για τις τρεις μεταχειρίσεις ($F = 229$, $df = 1$, $p < 0,001$) (Πίνακας 6.4.).

Ο χρόνος ολοκλήρωσης των προνυμφικών σταδίων στο σιτηρέσιο «Manduca Premix-Heliothis Premix» ήταν λιγότερος και διέφερε στατιστικώς σημαντικά από τον αντίστοιχο χρόνο στο σιτηρέσιο Ivaldi-Sender ($F = 10200$, $df = 1$, $p < 0,001$).

Πίνακας 6.4. Επίδραση εκτροφής σε διαφορετικές πυκνότητες, στην τεχνητή τροφή «Manduca Premix-Heliothis Premix» και Ivaldi-Sender στο χρόνο ολοκλήρωσης των αρσενικών προνυμφών του *Cydia pomonella*.

Πυκνότητα (προνύμφες/κυτίο)	Τεχνητή τροφή	N	Χρόνος ολοκλήρωσης προνυμφικών σταδίων (ημέρες) (Μ.Ο. ² ± Τ.Σ ³ .)	Συν. μέσος χρόνος ολοκλήρωσης προνυμφικών σταδίων (ημέρες) ¹ (Μ.Ο. ² ± Τ.Σ ³ .)
5	Manduca	27	15,6±0,1	18,9±0,8a ⁴
	Premix			
10	Ivaldi-Sender	21	22,2±0,1	19,7±0,8b
	Manduca	51	16,3±0,1	
	Premix			
15	Ivaldi-Sender	40	23,1±0,1	20,7±0,8c
	Manduca	67	17,2±0,1	
	Premix			
	Ivaldi-Sender	51	24,0±0,1	

1: Ο συνολικό μέσος χρόνος ολοκλήρωσης προνυμφικών σταδίων για κάθε πυκνότητα και στις δύο τροφές.

2: Μέσος όρος.

3: Τυπικό σφάλμα

4: Οι αριθμοί που ακολουθούνται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά κατά Tunkey F = 229, df = 2, $p < 0,001$

Το ίδιο φαινόμενο διαπιστώθηκε και στις θηλυκές προνύμφες (Πίνακας 6.5.). Ο χρόνος ολοκλήρωσης των προνυμφικών σταδίων στο σιτηρέσιο Ivaldi-Sender ήταν μεγαλύτερος και διέφερε στατιστικώς σημαντικά από το δεύτερο σιτηρέσιο ($F = 8508$, $df = 1$ $p < 0,001$). Η αύξηση του χρόνου ήταν ανάλογη της αύξησης της πυκνότητας των προνυμφών και στα δύο σιτηρέσια και διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών πυκνοτήτων εκτροφής ($F = 226$, $df = 2$, $p < 0,001$). Επιπλέον, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά και στις επαναλήψεις ($F = 7$, $df = 9$, $p = 0,001$) αλλά και μεταξύ της αλληλεπίδρασης των σιτηρεσίων και των πυκνοτήτων ($F = 6$, $df = 2$, $p = 0,005$).

6.3.3. Θνησιμότητα

Η σύσταση της τεχνητής τροφής είχε επίδραση στη θνησιμότητα των προνυμφών. Το μεγαλύτερο ποσοστό θνησιμότητας, σε όλες τις πυκνότητες, παρατηρήθηκε στις προνύμφες που εκτράφηκαν στο σιτηρέσιο Ivaldi-Sender (Πίνακας 6.6.). Μεταξύ των πυκνοτήτων, το μικρότερο ποσοστό θνησιμότητας και

για τα δύο σιτηρέσια διαπιστώθηκε στη μεταχείριση κατά την οποία εκτράφηκαν πέντε προνύμφες ανά κυτίο.

Πίνακας 6.5. Επίδραση εκτροφής σε διαφορετικές πυκνότητες, στην τεχνητή τροφή «Manduca Premix-Heliothis Premix» και Ivaldi-Sender στο χρόνο ολοκλήρωσης των θηλυκών προνυμφών του *Cydia pomonella*.

Πυκνότητα (προνύμφες/κυτίο)	Τεχνητή τροφή	N	Χρόνος ολοκλήρωσης προνυμφικών σταδίων (ημέρες) (Μ.Ο. ² ± Τ.Σ ³ .)	Συν. μέσος χρόνος ολοκλήρωσης προνυμφικών σταδίων (ημέρες) ¹ (Μ.Ο. ² ± Τ.Σ ³ .)
5	Manduca	21	16,1±0,1	
	Premix			19,9±0,8a ⁴
10	Ivaldi-Sender	18	23,0±0,1	
	Manduca	40	17,3±0,1	
	Premix			20,7±0,8b
15	Ivaldi-Sender	33	24,0±0,1	
	Manduca	66	17,9±0,1	
	Premix			21,6±0,9c
	Ivaldi-Sender	57	25,4±0,1	

1: Ο συνολικό μέσο χρόνος ολοκλήρωσης προνυμφικών σταδίων για κάθε πυκνότητα και στις δύο τροφές.

2: Μέσος όρος.

3: Τυπικό σφάλμα.

4: Οι αριθμοί που ακολουθούνται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά κατά Tukey F = 226, df = 2, p < 0,001

Πίνακας 6.6. Επίδραση εκτροφής σε διαφορετικές πυκνότητες, στην τεχνητή τροφή «Manduca Premix-Heliothis Premix» και Ivaldi-Sender στη θνησιμότητα των προνυμφικών σταδίων του *Cydia pomonella*.

Τεχνητή τροφή	Πυκνότητα (προνύμφες/κυτίο)	Θνησιμότητα (%)
«Manduca Premix-HeliothisPremix»	5	4,0 a ¹
	10	9,0 ab
	15	11,3 ab
Ivaldi-Sender	5	22,0 bc
	10	27,0 c
	15	29,3 c

1: Οι αριθμοί που ακολουθούνται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά κατά Tukey F = 9,62, df = 5, p < 0,001.

6.4. Συμπεράσματα

Από τη μελέτη προκύπτει ότι η πυκνότητα εκτροφής των προνυμφών είχε αρνητική επίδραση στο βάρος των νυμφών. Συγκεκριμένα, η αύξηση του βάρους

των νυμφών ήταν αντιστρόφως ανάλογη της αύξησης της πυκνότητας των προνυμφών (Πίνακες 6.2., 6.3.). Η τάση αυτή παρατηρήθηκε και στα δύο σιτηρέσια που εξετάστηκαν και για τα δύο φύλα. Το βάρος των νυμφών ήταν μεγαλύτερο, ανεξαρτήτως πυκνότητας στο σιτηρέσιο «Manduca Premix-Heliothis Premix» και για τα δύο φύλα.

Η μείωση της αύξησης του βάρους των νυμφών συνδέεται με την αυξημένη πυκνότητα των προνυμφών κατά τη διάρκεια της εκτροφής τους και αποτελεί σύνηθες φαινόμενο στα περισσότερα έντομα (Leonard 1968, Credland *et al.* 1986, Borash & Ho 2001, Agnew *et al.* 2002). Μεταξύ των δύο φύλων, η επίδραση της πυκνότητας και κατ' επέκταση η έλλειψη τροφής έχει διαφορετικά αποτελέσματα. Τα θηλυκά άτομα είναι πιο ευαίσθητα στον παράγοντα πυκνότητα γιατί η έλλειψη τροφής οδηγεί σε μείωση της γονιμότητας. Επομένως, η αναπαραγωγή και η γονιμότητά τους εξαρτώνται κατά ένα μεγάλο μέρος από τα θρεπτικά συστατικά που συσσωρεύονται κατά τη διάρκεια της προνυμφιακής ανάπτυξης (Fantinou *et al.* 2008).

Επιπλέον, βρέθηκε ότι η πυκνότητα εκτροφής των προνυμφών είχε αρνητική επίδραση στο χρόνο ολοκλήρωσης των προνυμφικών σταδίων με την αύξηση του χρόνου να είναι ανάλογη της αύξησης της πυκνότητας των προνυμφών (Πίνακες 6.4., 6.5.). Η τάση αυτή παρατηρήθηκε και στα δύο σιτηρέσια που εξετάστηκαν και στα δύο φύλα. Οι προνύμφες πολλών λεπιδοπτέρων επεκτείνουν την ανάπτυξή τους και συνεπώς την περίοδο σίτισής τους προκειμένου να επιτευχθεί ένα κρίσιμο μέγεθος για τη μεταμόρφωσή τους (Fischer & Fiedler 2001, Bauerfeind & Fischer 2005). Έτσι, στο *Pararge aegeria* L., η υψηλή πυκνότητα προνυμφών οδήγησε σε μεγαλύτερη διάρκεια ανάπτυξης και σε χαμηλότερη επιβίωση (Gibbs *et al.* 2004). Αντίθετα, η υψηλή προνυμφική πυκνότητα ανάγκασε τις προνύμφες *Porthetria dispar* L. να αναπτυχθούν γρηγορότερα. Το γεγονός αυτό είναι πιθανώς μια προσαρμογή στην υψηλή πυκνότητα που έχει ως αποτέλεσμα την ταχύτερη ολοκλήρωση του κύκλου του εντόμου για την αποφυγή της εξάντλησης των πόρων στα προνυμφικά στάδια (Leonard 1968).

Επίσης, προκύπτει ότι το ποσοστό θνησιμότητας αυξήθηκε ανάλογα με την αύξηση της πυκνότητας των προνυμφών στα κυτία εκτροφής, γεγονός που οφείλεται στη χαμηλή διαθεσιμότητα πόρων στην κατάσταση αυξημένης πυκνότητας. Επιπλέον, το μεγαλύτερο ποσοστό θνησιμότητας παρουσιάστηκε στις προνύμφες που εκτράφηκαν στο σιτηρέσιο του Ivaldi-Sender.

Τέλος, διαπιστώθηκε ότι ο χρόνος ολοκλήρωσης των προνυμφικών σταδίων στο σιτηρέσιο Invaldi-Sender είναι μεγαλύτερος, ενώ το βάρος των νυμφών είναι μικρότερο ανεξαρτήτως της πυκνότητας εκτροφής. Έτσι, παρόλο που το κόστος για την εκτροφή μιας προνύμφης στο σιτηρέσιο αυτό εκτιμάται σε 0,012€, ενώ στο σιτηρέσιο «Manduca Premix-Heliothis Premix» σε 0,06€, το δεύτερο σιτηρέσιο είναι πιο αξιόπιστο για την εκτροφή των προνυμφών του *C. pomonella* σε εργαστηριακές συνθήκες γιατί η παραγωγή των προνυμφών πραγματοποιείται σε μικρότερο χρονικό διάστημα και ταυτόχρονα το βάρος των νυμφών, που έχει επίδραση στην μετέπειτα ζωή των ενηλίκων, είναι μεγαλύτερο. Κατά την διάρκεια της παρούσας μελέτης όλα τα δείγματα που συντηρούνταν σε εργαστηριακές συνθήκες εκτράφηκαν στο σιτηρέσιο «Manduca Premix-Heliothis Premix»

7. Μελέτη της ανθεκτικότητας του *Cydia pomonella* σε εντομοκτόνα

7.1. Εισαγωγή

Ο έλεγχος της καρπόκαψας τον 19^ο αιώνα ήταν εφικτός με την εφαρμογή ανόργανων φυσικών προϊόντων όπως κρούλιθος, θείο, ορυκτέλαια, ρετινόλη και νικοτίνη. Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, αυτά αντικαταστάθηκαν από το αρσενικό. Κατά την πρώτη εικοσαετία της χρήσης του πραγματοποιούνταν 1-3 εφαρμογές κατά την καλλιεργητική περίοδο και κατά την επόμενη δεκαετία οι εφαρμογές αυξήθηκαν στις 4-5. Η αύξηση αυτή οδήγησε στην εμφάνιση για πρώτη φορά ανθεκτικότητα του εντόμου στη Βόρεια Αμερική (Hough 1928). Στη συνέχεια, ανάπτυξη ανθεκτικότητας στη συγκεκριμένη δραστική ουσία διαπιστώθηκε στις περισσότερες μηλοπαραγωγικές περιοχές των Η.Π.Α. ενώ κατά την τελευταία χρονιά εφαρμογής του σκευάσματος οι εφαρμογές είχαν αυξηθεί στις 7-8 (Croft & Riedl 1991).

Στα μέσα της δεκαετίας του '40, η εισαγωγή του DDT έλυσε προσωρινά το πρόβλημα της ανθεκτικότητας στο αρσενικό και μέχρι το 1946 το είχε αντικαταστήσει στις περισσότερες μηλοπαραγωγικές περιοχές. Ωστόσο, μετά από επτά χρόνια συνεχούς χρήσης του, διαπιστώθηκε εμφάνιση ανθεκτικότητας και σε αυτή τη δραστική ουσία (Schmith 1955).

Η ανθεκτικότητα στο azinphos-methyl παρατηρήθηκε ύστερα από 30 χρόνια χρήσης του αλλά από το 1955 έχουν αναφερθεί αρκετές περιπτώσεις ανθεκτικότητας όπως και στο parathion (Welter *et al* 1991, Bush *et al.* 1993). Στη Βόρεια Αμερική καταγράφηκε ανθεκτικότητα σε δυο πληθυσμούς του εντόμου στο diflubenzuron το 1988, χωρίς να έχει προηγηθεί προηγούμενη εφαρμογή του σκευάσματος (Moffit *et al.* 1988). Μερικά χρόνια αργότερα, στην Καλιφόρνια, παρατηρήθηκε διασταυρούμενη ανθεκτικότητα μεταξύ του azinphos-methyl και του diflubenzuron (Welter *et al.* 1991).

Στην Ευρώπη καταγράφηκε ανθεκτικότητα στο diflubenzuron για πρώτη φορά το 1990 στην Ιταλία και στην Νότια Γαλλία, (Waldner *et al.* 1993, Sauphanor *et al.* 1994). Βιοδοκιμές σε νεαρές προνύμφες και ωά σε γαλλικούς πληθυσμούς έδειξαν διασταυρούμενη ανθεκτικότητα μεταξύ των δραστικών ουσιών diflubenzuron,

triflumuron, teflubenzuron, tebufenozide και fenoxycarb. Ταυτόχρονα οι παραπάνω πληθυσμοί αποδείχθηκαν ανθεκτικοί και στο azinphos-methyl (Sauphanor & Bouvier 1995). Βιοδοκιμές σε νεαρές και διαπαύουσες προνύμφες, από την ευρύτερη περιοχή της Γαλλίας κατέδειξαν ισχυρή ανθεκτικότητα στο diflubenzuron. Δείγματα από τις ίδιες περιοχές παρουσίασαν ανθεκτικότητα στο deltamethrin σε ενήλικα άτομα. (Sauphanor *et al.* 2000).

Οι Sauphanor *et al.* (1997) διαπίστωσαν αυξημένη δραστικότητα στις οξειδάσες μικτής λειτουργίας (MFO) σε δύο πληθυσμούς ανθεκτικούς στο deltamethrin και στο diflubenzuron. Η δραστικότητα της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) δε διέφερε σημαντικά σε σχέση με τον ευαίσθητο εργαστηριακό πληθυσμό. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στη δραστικότητα των ολικών καρβοξυλεραστών. Έτσι, πρότειναν ότι ο κύριος μηχανισμός εμφάνισης ανθεκτικότητας στο diflubenzuron και στο deltamethrin είναι η αυξημένη δραστικότητα των MFO με μικρή συμμετοχή των GSTs (Sauphanor *et al.* 1997). Επιπλέον, οι Brun-Barele *et al.* (2005) διαπίστωσαν υψηλή συχνότητα εμφάνισης της μεταλλαγής που είναι υπεύθυνη για τη διαφοροποίηση στη μοριακή δομή των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς νατρίου (knock down resistance *kdr*) σε πληθυσμούς του εντόμου ανθεκτικούς στο deltamethrin (Brun-Barale *et al.* 2005).

Παράλληλα, αποτυχημένες προσπάθειες ελέγχου του εντόμου καταγράφηκαν στην Ισπανία και Ελβετία (Charmillot *et al.* 1999, Sauphanor *et al.* 1998a). Δυο χρόνια αργότερα, στην Ελβετία, ανιχνεύτηκε διασταυρούμενη ανθεκτικότητα μεταξύ του azinphos-methyl και tebufenozide (Charmillot *et al.* 2001). Οι Reyes *et al.* (2007) πραγματοποίησαν βιοδοκιμές με οργανοφωσφορικά, πυρεθροειδή, νεονικοτινοειδή, μακροκυκλικές λακτόνες και ρυθμιστές ανάπτυξης σε δείγματα διαπαύουσων προνυμφών καρπόκαψας από τη Γαλλία, Ιταλία, Ελβετία, Ισπανία και Αρμενία. Διαπιστώθηκε δραματική μείωση της αποτελεσματικότητας των δραστικών ουσιών που μελετήθηκαν, σε σύγκριση με τον ευαίσθητο εργαστηριακό πληθυσμό. Επιπλέον, αποδείχθηκε διασταυρούμενη ανθεκτικότητα μεταξύ του azinphos-methyl και του phosalone με νέες δραστικές ουσίες όπως το spinosad και thiacloprid. Η ανθεκτικότητα στο azinphos-methyl, diflubenzuron, spinosad, tebufenozide και thiacloprid συσχετίστηκε θετικά με την αυξημένη δραστικότητα των MFO. Η αυξημένη δραστικότητα του GST συσχετίστηκε με την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο azinphos-methyl. Επίσης, παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ της αυξημένης δραστικότητας των ολικών καρβοξυλεστεραστών (EST) και

της εμφάνισης ανθεκτικότητας στο azinphos-methyl, tebufenozide και thiacloprid. Τέλος, δε διαπιστώθηκε σημαντική συσχέτιση στην ανθεκτικότητα στο deltamethrin με τη συχνότητα εμφάνισης της μετάλλαξης *kdr* (Reyes *et al.* 2007).

Οι Stará & Kocourek (2007) για να ανιχνεύσουν την ανθεκτικότητα του εντόμου σε πληθυσμούς από τη Δημοκρατία της Τσεχίας, πραγματοποίησαν βιοδοκιμές στο στάδιο του αυγού καθώς και σε νεαρές και αναπτυγμένες προνύμφες πέμπτου σταδίου. Παρόλο που διαπιστώθηκε διασταυρούμενη ανθεκτικότητα μεταξύ των δραστικών ουσιών fenoxycarb, teflubenzuron και phosalone, δεν παρατηρήθηκε ανθεκτικότητα στο diflubenzuron (Stará & Kocourek 2007). Στο Ισραήλ, αναφέρθηκε ανθεκτικότητα στο azinphos-methyl και σε ρυθμιστές ανάπτυξης (diflubenzuron, novaluron, teflubenzuron, pyriproxyfen, fenoxycarb και methoxyfenozide). Η εμφάνιση ανθεκτικότητας μεταξύ του azinphos-methyl, novaluron και methoxyfenozide, χωρίς προηγούμενη εφαρμογή των δύο τελευταίων δραστικών ουσιών, στις περιοχές από τις οποίες πραγματοποιήθηκε η συλλογή των δειγμάτων, πιθανώς σχετίζεται με ανάπτυξη διασταυρούμενης ανθεκτικότητας (Reuveny & Cohen 2004).

Βιοδοκιμές σε διαπαύουσες προνύμφες έδειξαν ανθεκτικότητα στο azinphos-methyl, σε πληθυσμούς από την Παταγονία της Αργεντινής. Παράλληλα, σε όλους τους ανθεκτικούς πληθυσμούς παρατηρήθηκε αυξημένη δραστηριότητα των ολικών καρβοξυλεστερασών. Επομένως οι εστεράσες πιθανόν αποτελούν έναν από τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας στους πληθυσμούς αυτής της περιοχής στο azinphos-methyl (Jimena Soleño *et al.* 2008). Οι Fuentes-Contreras *et al.* (2007) πραγματοποίησαν βιοδοκιμές σε νεαρές και διαπαύουσες προνύμφες, για την ανίχνευση της ανθεκτικότητας στο azinphos-methyl σε πληθυσμούς από τη Χιλή. Αποτελέσματα βιοδοκιμών, σε νεαρές προνύμφες, δεν παρουσίασαν καμία σημαντική διαφορά σε σχέση με τον ευαίσθητο εργαστηριακό πληθυσμό. Αντίθετα, η θνησιμότητα των διαπαύουσων προνυμφών, εμφανίστηκε σημαντικά χαμηλότερη από τον ευαίσθητο εργαστηριακό πληθυσμό. Στους πληθυσμούς που χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικοί, παρουσιάστηκε αυξημένη δραστηριότητα της GST, σε σύγκριση με τον εργαστηριακό πληθυσμό (Fuentes-Contreras *et al.* 2007).

Ανθεκτικοί πληθυσμοί στο azinphos-methyl και στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα, καταγραφώθηκαν και στη Νότια Αφρική (Blomefield 1994, Giliomee & Riedl 1998).

Στη χώρα μας υπάρχουν ενδείξεις για την εμφάνιση ανθεκτικότητας της καρπόκαψας σε εντομοκτόνα. Έτσι, κυρίως σε περιοχές της Κεντρικής Μακεδονίας (Ημαθία και Πέλλα) ο έλεγχος του εντόμου με την εφαρμογή οργανοφωσφορικών και πυρεθροειδών εντομοκτόνων είναι αναποτελεσματικός (Ioannidis 1999).

Η παρούσα εργασία έχει ως στόχο την ανίχνευση ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε διαφορετικές ομάδες εντομοκτόνων στις κύριες μηλοπαραγωγικές περιοχές της Ελλάδας. Τη διερεύνηση των πιθανών μηχανισμών που την προκαλούν και τη διαπίστωση διασταυρούμενης ανθεκτικότητας μεταξύ των εντομοκτόνων.

7.2. Υλικά και Μέθοδοι

7.2.1. Συλλογή δειγμάτων - Συνθήκες εκτροφής

Κατά τα έτη 2006-08 πραγματοποιήθηκε συλλογή 33 πληθυσμών προνυμφών που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου και 38 πληθυσμών διαπαύουσων προνυμφών (Σχήμα 7.1.). Η δειγματοληψία των προνυμφών πραγματοποιήθηκε με τη συλλογή προσβεβλημένων καρπών. Μετά την προσεκτική αφαίρεση των προνυμφών, αυτές μεταφέρθηκαν σε κυτία εκτροφής τα οποία περιείχαν τεχνητή τροφή (Manduca Premix-Heliothis Premix; Stonefly Inc., Bryan, TX) και διατηρούνταν σε $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, $65\pm 5\%$ RH και L16:D8.

Η συλλογή των διαπαύουσων προνυμφών πραγματοποιήθηκε με την τοποθέτηση παγίδων κυματοειδούς χάρτου στον κορμό των δέντρων, στα τέλη Αύγουστου κάθε έτους. Η αφαίρεση των παγίδων γινόταν τον Οκτώβριο του ίδιου έτους. Για τη διακοπή της διάπαυσης, οι προνύμφες μεταφέρθηκαν για τουλάχιστον 3 μήνες, σε θαλάμους με χαμηλή θερμοκρασία $2\pm 1^{\circ}\text{C}$ και φωτοπερίοδο L12:D12 (Saurehanor *et al.* 2000). Στον Πίνακα 7.1. φαίνονται τα στοιχεία που αφορούν τον αριθμό των πληθυσμών που εξετάστηκαν, την περιοχή και το στάδιο του βιολογικού κύκλου.

Καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης, πραγματοποιούνταν και αναπαραγωγή ευαίσθητου εργαστηριακού πληθυσμού προερχόμενου από το INRA Research Centre Avignon (Guennelon *et al.* 1981). Ο πληθυσμός αυτός χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των διαγνωστικών δόσεων καθώς και ως μάρτυρας στα πειράματα που ακολούθησαν.



Σχήμα 7.1. Περιοχές της Ελλάδας όπου συλλέχτηκαν οι πληθυσμοί της καρπόκαψας. 1: Αγιά, 2: Αγιόκαμπος, 3: Αγ. Βλάσιος, 4: Αγ. Λαυρέντιος, 5: Αλεξάνδρεια, 6: Καστοριά, 7: Τρίπολη

Πίνακας 7.1. Πληθυσμοί καρπόκαψας προερχόμενοι από διάφορες περιοχές της Ελλάδας που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση

Περιοχή	Αριθμός πληθυσμών	Στάδιο βιολογικού κύκλου
Αγ. Λαυρέντιος	2	Κ ⁽¹⁾
Αγιά	11	Κ
Αγιοκάμπος	2	Κ
Καστοριά	3	Κ
Τρίπολη	2	Κ
Αλεξάνδρεια	12	Κ
Αγ. Βλάσιος	1	Κ
Αγ. Λαυρέντιος	3	Δ
Αγιά	16	Δ
Αγιοκάμπος	2	Δ
Καστοριά	2	Δ
Αλεξάνδρεια	14	Δ
Αγ. Βλάσιος	1	Δ

1: Κ= Προνύμφες που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου, Δ= Διαπαύουσες προνύμφες

7.2.2. Εύρεση διαγνωστικών δόσεων

Για τον υπολογισμό των διαγνωστικών δόσεων διαφόρων δραστικών ουσιών, πραγματοποιήθηκαν τοπικές βιοδοκιμές σε νεαρές (0-4 ωρών) και αναπτυγμένες προνύμφες πέμπτου σταδίου του ευαίσθητου εργαστηριακού πληθυσμού. Αυτές που προέκυψαν, σε συνδυασμό με διαγνωστικές δόσεις που έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία, χρησιμοποιήθηκαν στις βιοδοκιμές που πραγματοποιήθηκαν στη μελέτη.

7.2.2.1. Νεαρές προνύμφες

Τα εντομοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το Χέλγκαρ 25WG (fenoxycarb 25%, Χελλαφάρμ ΑΕ, Ελλάς), Runner 240SC (methoxyfenozide 24%, Bayer CropScience ABEE, Ελλάς), Decis 2,5EC (deltamethrin 2,5%, Bayer CropScience ABEE, Ελλάς), Calypso 48SC (thiacloprid, Bayer CropScience ABEE, Ελλάς 48%) και Dimilin 25WP (diflubenzuron 25% Ντυ Ποντ ΑΕ, Ελλάς). Σε κάθε κελί της μικροπλάκας (96-πηγαδιών) προστίθονταν 150 μl από τεχνητή τροφή (Manduca Premix-Heliothis Premix; Stonefly Inc., Bryan, TX). Στη συνέχεια, στην επιφάνεια

της τροφής εφαρμόζονταν 6 μl από κάθε εντομοκτόνο, διαλυμένο σε νερό ενώ για κάθε εντομοκτόνο εφαρμόστηκαν 7-9 διαφορετικές δόσεις. Πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις και κάθε επανάληψη περιελάμβανε 40 προνύμφες για κάθε εντομοκτόνο. Ο μάρτυρας περιελάμβανε μόνο νερό. Οι προνύμφες μεταφέρονταν ατομικά με πολύ μαλακό πινέλο σε ξεχωριστά πηγάδια. Στη συνέχεια η μικροπλάκα διατηρούνταν σε συνθήκες $25\pm 1^\circ\text{C}$, $40\pm 5\%$ RH και φωτοπερίοδο L16:D8. Η θνησιμότητα καταγραφόταν μετά από 4 ημέρες (Reyes & Sauphanor 2008).

7.2.2.2. Προνύμφες πέμπτου σταδίου

Τα εντομοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν σε τεχνικώς καθαρή μορφή. Οι δραστικές ουσίες που εξετάστηκαν ήταν το fenoxycarb (Χελλαφάρμ ΑΕ, Ελλάς), deltamethrin (Bayer CropScience ABEE, Ελλάς), tebufenozide (Άλφα Γεωργικά Εφόδια ΑΕΒΕ, Ελλάς), thiacloprid (Bayer CropScience ABEE, Ελλάς), fluvalinate (Άλφα Γεωργικά Εφόδια ΑΕΒΕ, Ελλάς), phosalone (Ανοργκαχήμ ΑΕ, Ελλάς), diflubenzuron (Ντυ Ποντ ΑΕ, Ελλάς), azinphos-methyl (Άλφα Γεωργικά Εφόδια ΑΕΒΕ, Ελλάς), teflubenzuron (BASF ABEE, Ελλάς), methoxyfenozide (Bayer CropScience ABEE, Ελλάς) και triflumuron (Bayer CropScience ABEE, Ελλάς). Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ακετόνη εκτός από το diflubenzuron που ήταν το tetrahydrofuran.

Οι τοπικές βιοδοκιμές πραγματοποιήθηκαν λίγο πριν αρχίσουν οι προνύμφες να σχηματίζουν το νυμφικό βομβύκιο. Στο μέσο του θώρακα κάθε προνύμφης, εφαρμόστηκε 1μl από το διάλυμα της δραστικής ουσίας. Στον μάρτυρα εφαρμόστηκε μόνο ακετόνη. Για κάθε δραστική ουσία εφαρμόστηκαν από 6 έως 8 διαφορετικές δόσεις. Πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις και κάθε επανάληψη περιλάμβανε 20 προνύμφες για κάθε δραστική ουσία. Μετά την ολοκλήρωση των βιοδοκιμών, οι προνύμφες μεταφέρθηκαν σε κυτία που περιείχαν τεμάχιο κυματοειδούς χάρτου, για τη συμπλήρωση του βιολογικού τους κύκλου σε σταθερές συνθήκες $23\pm 1^\circ\text{C}$, $65\pm 5\%$ υγρασία και φωτοπερίοδο L16:D8. Η θνησιμότητα καταγραφόταν με βάση τη μη ενηλικίωση των προνυμφών.

7.2.3. Βιοδοκιμές

Οι βιοδοκιμές διενεργήθηκαν στο στάδιο του ωού, σε νεαρές και αναπτυσσόμενες προνύμφες πέμπτου σταδίου καθώς και σε διαπαύουσες προνύμφες. Πραγματοποιήθηκαν με την εφαρμογή των διαγνωστικών δόσεων για κάθε δραστική ουσία. Στα αποτελέσματα παρουσιάζεται η διορθωμένη θνησιμότητα (Δ.Θ.) που υπολογίστηκε από τον τύπο του Abbot (Abbot 1925).

7.2.3.1. Στάδιο του ωού

Εξετάστηκαν 3 πληθυσμοί από την Αγιά και 3 από την Αλεξάνδρεια για την εμφάνιση ανθεκτικότητας στο Χέλγκαρ 25WG (fenoxycarb 25%, Χελλαφάρμ ΑΕ, Ελλάς), στο στάδιο των ωών με την εφαρμογή διαγνωστικής δόσης 5mg/l (90% θνησιμότητας του ευαίσθητου εργαστηριακού πληθυσμού) (Saurehanor *et al* 1998).

Από κάθε πληθυσμό εξετάστηκαν 15 ζευγάρια ενηλίκων ατόμων, 24-48 ωρών. Τα ενήλικα άτομα προήλθαν από τη συλλογή αναπτυσσόμενων προνυμφών πέμπτου σταδίου κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου. Μετά τον διαχωρισμό του φύλου βάσει της μορφολογίας των νυμφών (τα αρσενικά έχουν τέσσερα κοιλιακά διαφράγματα ενώ τα θηλυκά τρία), μεταφέρθηκαν σε ξεχωριστά κυτία για την ολοκλήρωση του βιολογικού τους κύκλου σε συνθήκες $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, $65\pm 5\%$ L16:D8.

Για τη διεξαγωγή των βιοδοκιμών χρησιμοποιήθηκαν κυλινδρικά κλουβιά, με διάμετρο 8cm και ύψος 5cm από PVC. Η εσωτερική παράπλευρη επιφάνεια καθώς και η πάνω βάση ήταν καλυμμένη με λεπτό τούλι για την αποφυγή της ωτοκίας. Στην κάτω βάση του κυλίνδρου ήταν τοποθετημένο Petri dish διαμέτρου 10cm για την εναπόθεση των αυγών (Εικόνα 7.2.).

Η εφαρμογή του εντομοκτόνου γινόταν με ψεκαστήρα κάλυψης $1.7\pm 0.1\text{mg}/\text{cm}^2$ με τη διαγνωστική δόση στην επιφάνεια του Petri dish. Μετά το πέρας 2 ωρών, 3 ζευγάρια ενηλίκων ατόμων 24-48 ωρών, τοποθετούνταν μέσα σε κάθε κλουβί όπου και παρέμειναν για 48 ώρες ώστε να συζευχθούν. Μετά το πέρας των 48 ωρών, το Petri dish μεταφέρονταν σε θάλαμο με συνθήκες $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, $70\pm 5\%$ RH και L16:D8 για να πραγματοποιηθεί η εκκόλαψη των ωών. Η θνησιμότητα υπολογίζονταν από τον τύπο:

$\% \text{ θνησιμότητα} = (1 - \text{αριθμός ωών που εκκολάφθηκαν} / \text{αριθμός ωών που γονιμοποιήθηκαν}) \times 100.$



Εικόνα 7.2. Κυλινδρικό κλουβί για την πραγματοποίηση των βιοδοκιμών στο στάδιο του ωού

7.2.3.2. Νεαρές προνύμφες

Οι διαγνωστικές δόσεις των εντομοκτόνων που προέκυψαν από την εφαρμογή των βιοδοκιμών στις νεαρές προνύμφες του ευαίσθητου εργαστηριακού πληθυσμού μαζί με τη διαγνωστική δόση του Gusathion M 25WP (azinphos-methyl 25%, Άλφα Γεωργικά Εφόδια ΑΕΒΕ, Ελλάς) χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της ανθεκτικότητας νεαρών προνυμφών (0-4 ωρών) F1 γενεάς, από 12 πληθυσμούς. Η διαγνωστική δόση του azinphos-methyl που χρησιμοποιήθηκε ήταν 45 mg/l και προκαλεί 90% θνησιμότητα του ευαίσθητου εργαστηριακού πληθυσμού (Reyes & Sauphanor 2008).

Συλλέχθηκαν και αναπαράχθηκαν σε εργαστηριακές συνθήκες, πέντε πληθυσμοί από την περιοχή της Αγιάς, πέντε από την Αλεξάνδρεια, ένας από την Καστοριά και ένας από την Τρίπολη. Η διενέργεια των βιοδοκιμών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο που περιγράφηκε προηγουμένως για την εύρεση των διαγνωστικών δόσεων στις νεαρές προνύμφες.

7.2.3.3. Προνύμφες πέμπτου σταδίου.

Οι πληθυσμοί των προνυμφών που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου, εξετάστηκαν ως προς την ανθεκτικότητά τους στις δραστικές ουσίες azinphos-methyl, phosalone, deltamethrin, diflubenzuron,

triflumuron, fenoxycarb, thiacloprid, tebufenozide. Οι βιοδοκιμές έγιναν με εφαρμογή διαγνωστικής δόσης (θανατώνει ποσοστό μεγαλύτερο από 94% του ευαίσθητου εργαστηριακού πληθυσμού) με μικροσύριγγα Hamilton στο μέσο του θώρακα της κάθε προνύμφης και διατηρούνταν στις συνθήκες που περιγράφηκαν προηγουμένως. Για κάθε δραστική ουσία οι βιοδοκιμές περιελάμβαναν 30 προνύμφες.

7.2.3.4. Διαπαύουσες προνύμφες.

Η ανίχνευση της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στους πληθυσμούς των διαπαύουσων προνυμφών έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο των Sauphanor *et al.* (2000). Μετά τη διακοπή της διαπαύσης, πραγματοποιήθηκαν βιοδοκιμές με τοπική εφαρμογή των διαγνωστικών δόσεων που παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.2. (Sauphanor *et al.* 2000, Pasquier & Charmillot 2003, Reyes *et al.* 2007). Σε κάθε δραστική ουσία πραγματοποιήθηκαν βιοδοκιμές 40 προνυμφών για κάθε πληθυσμό. Οι τοπικές βιοδοκιμές διεξάγονταν σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στις προνύμφες πέμπτου σταδίου

Πίνακας 7.2. Εντομοκτόνα και διαγνωστικές δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της ανθεκτικότητας σε διαπαύουσες προνύμφες

Εντομοκτόνα	Ποσοστό θνησιμότητας %	Διαγνωστικές συγκεντρώσεις (mg L ⁻¹)	Χημική ομάδα
Fenoxycarb	97,7	1	Καρβαμιδικά
Methoxyfenozide	99,1	100	Διακυλυδραζίνες
Deltamethrin	99,5	100	Πυρεθροειδή
Tebufenozide	94,6	300	Διακυλυδραζίνες
Thiacloprid	99,4	500	Νεονικοτινοειδή
Chlorpyrifos-methyl	95,6	1.200	Οργανοφωσφορικά
Phosalone	99,9	3.000	Οργανοφωσφορικά
Diflubenzuron	98,0	25.000	Φαινυλουρίες
Azinphos-methyl	97,0	400	Οργανοφωσφορικά

7.2.4. Βιοχημικές δοκιμές

Για τον προσδιορισμό των βιοχημικών μηχανισμών που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα, εξετάστηκαν συνολικά 1241 δείγματα. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η δραστηριότητα των καρβοξυλεστερασών (EST), των τρανσφερασών της γλουταθειόνης (GST) και των οξειδασών μικτής λειτουργίας (MFO).

7.2.4.1. Απομόνωση ενζύμων

Πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Reyes *et al.* (2007). Σε πλαστικό φιαλίδιο χωρητικότητας 1,5 ml, όπου τοποθετήθηκαν 150μl Tampon HEPES (50mM, pH 7.0) ομογενοποιήθηκε το μισό τμήμα της κοιλιάς του ενήλικου. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 15min στους 4°C. Το υπερκείμενο, μεταφέρθηκε σε νέο πλαστικό φιαλίδιο και αποθηκεύτηκε στους -20°C. Για την εκτίμηση της ποσότητας των ολικών πρωτεϊνών του εντόμου εφαρμόστηκε η μέθοδος Bradford χρησιμοποιώντας 5 μl ενζύμου σε 2 επαναλήψεις, με προσθήκη 300 μl αντιδραστηρίου BioRad (Bio-Rad Laboratories, Inc 1000 Alfred Nobel Drive Hercules California 94547 U.S.A.). Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε σκοτάδι στους 25°C για 5min και η εκτίμηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 595 nm. Παράλληλα, κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης με πρότυπα διαλύματα BSA (Bovine Serum Albumin) (Bradford 1976).

7.2.4.2. Καρβοξυλεστεράσες (EST)

Η εκτίμηση της δραστηριότητας των γενικών καρβοξυλεστερασών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το β-naphthyl acetate (β-NA). Σε κάθε κελί της μικροπλάκας προστέθηκε 90 μl phosphate buffer (50 mM pH 6.5) με 0.1 mM υποστρώματος (β-NA), μαζί με 0,5 μl ενζύμου και 89,5 μl HEPES buffer (50 mM pH 7.0). Πραγματοποιήθηκε επώαση στους 30°C για 15min και ακολούθως προστέθηκε 20 μl από το διάλυμα χρωματισμού το οποίο περιείχε 3gr/λίτρο Fast Garnet και 35gr/λίτρο sodium dodecyl sulfate. Ακολούθησε επώαση για 15 min σε συνθήκες δωματίου και στη συνέχεια καταγράφηκε η απορρόφηση στα 492 nm (Spectramax® M2, Molecular Devices, 1311 Orleans Avenue Sunnyvale CA 94089-1136 U.S.A). Ως μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκαν 12 κελιά από κάθε πλάκα που περιείχαν 90 μl phosphate buffer (50 mM pH 7.2). Οι μονάδες μέτρησης εκφράστηκαν σε nmole β-naphthol/mg protein/min (Reyes *et al.* 2007, Walker 1998).

7.2.4.3. Τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST)

Η διερεύνηση των επιπέδων δραστηριότητας της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) διεξήχθη σύμφωνα με τη μέθοδο των Nauen & Stumpf (2002). Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το monochlorobimane (MCB). Για την

εκτίμηση της ενεργότητας χρησιμοποιήθηκαν εις διπλούν 30 μl ενζύμου από κάθε ενήλικο άτομο. Σε κάθε κελί της μικροπλάκας ELIZA προστέθηκε μαζί με 30 μl ενζύμου, 168 μl διαλύματος γλουταθιόνης (GSH) 100mM σε διαλύτη Herpes buffer (50 mM pH 7.0) και 2 μl από 30 mM MCB. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν 12 κελιά από κάθε μικροπλάκα που περιείχαν 30 μl Herpes buffer χωρίς ένζυμο. Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 22°C για 20 min και στη συνέχεια η πλάκα μεταφέρθηκε στο φθορισμόμετρο. Ο φθορισμός μετρήθηκε χρησιμοποιώντας φίλτρο με 380 nm για τη διέγερση και 465 nm για την εκπομπή. Οι μονάδες μέτρησης εκφράστηκαν σε uf/mg protein.

7.2.4.4. Οξειδάσες μικτής λειτουργίας (MFO)

Ο υπολογισμός της δραστηριότητας των οξειδασών μικτής λειτουργίας (MFO) ανιχνεύτηκε χρησιμοποιώντας 7-ethoxycoumarin O-deethylation (ECOD) με *in vivo* ανάλυση (Reyes *et al.* 2007). Το μισό τμήμα της κοιλιάς του ενήλικου ατόμου, τοποθετήθηκε σε πλαστικό φιαλίδιο χωρητικότητας 1,5 ml μαζί με 100μl phosphate buffer (50 mM pH 7.2) και ethoxycoumarin (0.4 mM). Ακολουθούσε επώαση στους 30°C για 4 ώρες και η αντίδραση σταματούσε με προσθήκη 50μl glycine buffer (0.1 mM pH 10.4) και 50 μl αιθανόλης. Δώδεκα βοθρία από κάθε μικροπλάκα, χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρας και περιείχαν 100μl phosphate buffer (50 mM pH 7.2) και ethoxycoumarin (0.4 mM) μαζί με 50μl glycine buffer (0.1 mM pH 10.4) και 50 μl αιθανόλης πριν την επώαση. Ο φθορισμός μετρήθηκε χρησιμοποιώντας φίλτρο με 380 nm για την διέγερση και 465 nm για την εκπομπή. Οι μονάδες μέτρησης εκφράστηκαν σε $pg7OH/mg$ protein/min.

7.2.5. Μοριακές δοκιμές

Εξετάστηκαν 1650 δείγματα που προήλθαν από τους πληθυσμούς των αναπτυσσόμενων προνυμφών που συλλέχθηκαν κατά την καλλιεργητική περίοδο και 1900 δείγματα από τους πληθυσμούς των διαπαύουσων προνυμφών με μοριακά διαγνωστικά για την ύπαρξη τροποποιημένης ακετυλχολινεστεράσης (AChE) και η *kdr* ανθεκτικότητα.

7.2.5.1. Απομόνωση DNA

Η απομόνωση DNA έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο των Malloch *et al.* (2006). Σε πλαστικό φιαλίδιο χωρητικότητας 1,5 ml, όπου τοποθετήθηκαν 40μl 5% Chelex

100 (Bio-Rad, Laboratories, Inc 1000 Alfred Nobel Drive Hercules California 94547 U.S.A) ομογενοποιήθηκε ένα πόδι εντόμου. Ακολούθησε ανάδευση για 15". Πραγματοποιήθηκε επώαση στους 56°C για 35 λεπτά και στην συνέχεια στους 95°C για 15 λεπτά. Κατόπιν έγινε νέα ανάδευση για 15" και φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για δύο λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο πλαστικό φιαλίδιο οπού και αποθηκεύτηκε στους -20°C.

7.2.5.2. *Kdr* ανθεκτικότητα και τροποποιημένη AChE

Ο καθορισμός της *kdr* ανθεκτικότητας και η ανίχνευση της τροποποιημένης ακετυλχολινεστεράσης (AChE) πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο PCR-RFLP (Reyes *et al.* 2007, Cassanelli *et al.* 2006). Για τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν 50 ng DNA στόχου, 1 μονάδα Taq Πολυμεράσης, 2,5 mM dNTPs, 50 mM από τον κάθε primer, 25 mM MgCl₂, 1X reaction buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris pH 9,0) και αποστειρωμένου νερού μέχρι τελικό όγκο 25 μl. Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν για τον καθορισμό της *kdr* ανθεκτικότητας ήταν οι CpNaF (TAGAGAGCATGTGGGATTGC) και CpNaR (AATTCGTAGCCCTTGATCG), ενώ για την ανίχνευση της τροποποιημένης ακετυλχολινεστεράσης (AChE) οι ACE1-CP-F2 (CGCTCGGTTTCCTTTTCTTTGACA) και ACE1-CP-R8 (GTAAAATGGTAGTCACCCACCAT). Οι συνθήκες πολλαπλασιασμού του DNA στόχου για την *kdr*, ήταν 3 min στους 94°C, 35 κύκλοι με 30 sec στους 94°C, 1 min στους 55°C και 45 sec στους 72°C, ενώ για την AChE ήταν 4 min στους 95°C, 35 κύκλοι με 40 sec στους 95°C, 40 sec στους 53°C, 1 min στους 72°C, και 10 min στους 72°C. Το πολλαπλασιαζόμενο DNA παρέμεινε στους 4°C μέχρι να γίνει ηλεκτροφόρηση σε 1,5% πηκτή αгарόζης (που περιείχε 0,5 μl ml⁻¹ βρωμιούχο αιθίδιο) σε διάλυμα TAE (40 mM Tris/ acetate, 1 mM EDTA). Ο οπτικός έλεγχος των ζωνών έγινε σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV).

Στην συνέχεια για την *kdr* ακολουθούσε πέψη με το ένζυμο περιορισμού Tsp509I (NEB, NEW ENGLAND BioLabs® Inc). Χρησιμοποιήθηκαν 5 μl από το προϊόν της PCR, 2 μονάδες από το ένζυμο περιορισμού, 1X reaction buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris pH 9,0), που αποκτήθηκε από τον κατασκευαστή του ενζύμου και αποστειρωμένου νερού μέχρι τελικό όγκο 10 μl. Ακολουθούσε επώαση στο σκοτάδι, στους 65° C για 8 ώρες. Για την AChE ακολουθούσε πέψη με το ένζυμο περιορισμού Apo I (NEB, NEW ENGLAND BioLabs® Inc). Η συγκέντρωση της αντίδρασης ήταν όμοια με την προηγούμενη. Ακολουθούσε

επίωση στο σκοτάδι, στους 50° C για 8 ώρες. Τα προϊόντα κάθε πέψης διαχωρίστηκαν σε ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδης 8%.

7.2.5.3. Στατιστική ανάλυση

Το στατιστικό πακέτο που χρησιμοποιήθηκε για την στατιστική ανάλυση της εύρεσης των διαγνωστικών δόσεων στις νεαρές και στις αναπτυγμένες προνύμφες πέμπτου σταδίου ήταν το Simply probit vir, 1.3 (©Pisces Conservation Ltd 2007). Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το στατιστικό πακέτο STATISTICA 7.0 (StatSoft® Ins. USA). Η σύγκριση των ποσοστών θνησιμότητας πραγματοποιήθηκε με το χ^2 κριτήριο, ενώ προηγουμένως πραγματοποιήθηκε μετατροπή των τιμών σε τόξο ημιτόνου. Η συσχέτιση των Συντελεστών Ανθεκτικότητας και των Ποσοστών Θνησιμότητας, μεταξύ των διαφορετικών περιοχών, πραγματοποιήθηκε με τον έλεγχο U των Mann-Whitney. Η συσχέτιση μεταξύ της ενζυμικής δραστηριότητας και της εμφάνισης ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα, όπως και η διαπίστωση της διασταυρούμενης ανθεκτικότητας πραγματοποιήθηκε με τον Συντελεστή Συσχέτισης Pearson.

7.3. Αποτελέσματα

7.3.1. Διαγνωστικές δόσεις

Τα αποτελέσματα από την διεξαγωγή των βιοδοκιμών στις νεαρές προνύμφες και στις αναπτυγμένες προνύμφες πέμπτου σταδίου (L5) που πραγματοποιήθηκαν στον ευαίσθητο εργαστηριακό πληθυσμό, παρουσιάζονται στους Πίνακες 7.3 και 7.4.

Πίνακας 7.3. Αποτελέσματα από την διεξαγωγή των βιοδοκιμών σε νεαρές προνύμφες στον ευαίσθητο εργαστηριακό πληθυσμό.

Δραστικές ουσίες	Αριθμός προν. ¹	Κλίση	χ^2	df	LC ₅₀ (mg/l) ²	LC ₉₀ (mg/l)
Methoxyfenozide	960	4,52	14,82* ¹	6	0,64(0,57-0,72)	2,35(1,99-2,76)
Fenoxycarb	960	2,81	32,48*	6	1138(1062-1219)	2256(2094-24321)
Deltamethrin	960	4,20	15,14*	6	0,095(0,084-0,11)	0,38(0,32-0,459)
Thiacloprid	1200	4,66	14,19*	8	22,61(19,66-25,99)	140,4(113,4-173,8)
Diflubenzuron	960	4,17	22,56*	6	25,1(22,33-28,22)	104,8(87,34-125,8)

1: Αριθμός προνυμφών

2: * $p = 0,05$, ** $p = 0,01$, *** $p = 0,001$.

3: Όρια εμπιστοσύνης για 95%.

Η εργασία πραγματοποιήθηκε για να υπολογιστούν οι διαγνωστικές δόσεις που εφαρμόστηκαν στα προαναφερθέντα στάδια του εντόμου, για την μελέτη εμφάνισης ανθεκτικότητας.

Πίνακας 7.4. Αποτελέσματα από την διεξαγωγή των βιοδοκιμών σε προνύμφες πέμπτου σταδίου στον ευαίσθητο εργαστηριακό πληθυσμό.

Δραστικές ουσίες	Αριθμός προν.	Κλίση	χ^2	df	LC ₅₀ (mg/l) ³	LC ₉₀ (mg/l)
Azinphos-methyl	480	4,61	6,73* ²	7	65.38(53,79-79.46)	352,9(269,60-462)
Deltamethrin	460	4,26	2,28*	4	28,97(25,00-33,57)	80,85(65,6-99,65)
Fenoxycarb	440	3,61	14,59*	3	0,29(0,26-0,33)	0,68(0,57-0,80)
Phosalone	420	3,53	18,90*	6	766(672,10-873,30)	2.197(1.864-2.590)
Teflubenzuron	520	4,27	20,48*	6	30,2(23,62-38,62)	181,1(138,6-236,7)
Triflumuron	640	4,19	10,41*	6	23,95(20,56-27,9)	112,3(89,61-140,6)
Diflubenzuron	480	3,48	9,65*	4	5.705(5.014-6.491)	14.080(11.680-16.960)
Fluvalinate	480	3,55	26,45*	5	167,4(142,6-196,6)	512,1(405,2-647,3)
Tebufenozide	520	4,24	3,91*	4	61,18 (51,51-72,66)	208,6(160,6-271,1)
Thiacloprid	480	4,34	5,23*	7	32,67(27,46-38,86)	158,3(121,5-206,1)
Methoxyfenozide	560	3,46	3,58*	4	27,02(23,7-30,8)	76,55(64,04-91,5)

1: Αριθμός προνυμφών

2: * $p = 0,05$, ** $p = 0,01$, *** $p = 0,001$

3: Όρια εμπιστοσύνης για 95%

Οι διαγνωστικές δόσεις που εφαρμόστηκαν στις τοπικές βιοδοκιμές των προνυμφών πέμπτου σταδίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.5 Στις νεαρές προνύμφες εφαρμόστηκε η δόση που σκότωσε το 90% του ευαίσθητου πληθυσμού.

Πίνακας 7.5. Εντομοκτόνα και διαγνωστικές δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της ανθεκτικότητας σε προνύμφες L5 οι οποίες συλλέχθηκαν κατά την διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου.

Δραστικές ουσίες	Ποσοστό θνησιμότητας%	Διαγνωστικές συγκεντρώσεις (mg/l)	Χημική ομάδα
Azinphos-methyl	94	500	Οργανοφωσφορικά
Deltamethrin	94	100	Πυρεθροειδή
Fenoxycarb	97	1	Καρβαμιδικά
Phosalone	97	3 600	Οργανοφωσφορικά
Teflubenzuron	95	300	Φαινιλουρίες
Triflumuron	96.1	200	Φαινιλουρίες
Diflubenzuron	99	29 500	Φαινιλουρίες
Fluvalinate	95	700	Πυρεθροειδή
Tebufenozide	95.2	300	Διακυλυδραζίνες
Thiacloprid	98.2	500	Νεονικοτινοειδή

7.3.2. Βιοδοκιμές

7.3.2.1. Στάδιο ωού

Τα ποσοστά θνησιμότητας κυμανθήκαν από 77,6% έως 94,6% (Πίνακα 7.6.) Μόνο ένας πληθυσμός, από την Αλεξάνδρεια διέφερε στατιστικώς σημαντικά από τον ευαίσθητο εργαστηριακό πληθυσμό ($\chi^2 = 5,974$, $df = 1$, $p = 0,015$).

Πίνακας 7.6. Θνησιμότητα (%) ωών 6 πληθυσμών, με την χρήση διαγνωστικής δόσης του fenoxycarb.

Κωδικός	Περιοχή	Διαχείριση	Έτος συλλογής	Θνησιμότητα (%) ²
E. ¹				90,3
AL15	Αλεξάνδρεια	Χημική Καταπολέμηση	2008	77,6*
AL19	Αλεξάνδρεια	Χημική Καταπολέμηση	2008	91,2 ^{ns}
AL21	Αλεξάνδρεια	Χημική Καταπολέμηση	2008	86,8 ^{ns}
AG16	Αγιά	Χημική Καταπολέμηση	2008	94,0 ^{ns}
AG17	Αγιά	Χημική Καταπολέμηση	2008	85,2 ^{ns}
AG22	Αγιά	Χημική Καταπολέμηση	2008	86,0 ^{ns}

1: E.= Ευαίσθητος πληθυσμός.

2: Τα αποτελέσματα της σύγκρισης των ποσοστών θνησιμότητας μεταξύ του ευαίσθητου πληθυσμού και των 6 πληθυσμών χρησιμοποιώντας το χ^2 test, όπου ns = δεν είναι σημαντική, * $p = 0.05$, ** $p = 0.01$, *** $p = 0.001$.

7.3.2.2. Νεαρές προνύμφες

Η δραστική ουσία στην οποία παρατηρήθηκε το μικρότερο ποσοστό θνησιμότητας (60%), επί του συνόλου των εξεταζόμενων πληθυσμών, ήταν το azinphos-methyl σε τρεις πληθυσμούς από την Αλεξάνδρεια Ημαθίας (Πίνακα 7.7.). Οι πληθυσμοί που συλλέχθηκαν από την Καστόρια και την Τρίπολη δεν διέφεραν στατιστικώς σημαντικά από τον ευαίσθητο εργαστηριακό πληθυσμό.

Στο deltamethrin διαπιστώθηκαν οι περισσότεροι ανθεκτικοί πληθυσμοί. Μόνο ο πληθυσμός από την Τρίπολη δεν διέφερε στατιστικώς σημαντικά από τον ευαίσθητο εργαστηριακό πληθυσμό. Στο diflubenzuron παρατηρήθηκαν οκτώ ανθεκτικοί πληθυσμοί και τα ποσοστά θνησιμότητάς τους ήταν από 64,2% έως 73,3%. Πέντε ευαίσθητοι πληθυσμοί διαπιστώθηκαν στο thiacloprid και οι περισσότεροι στη περιοχή της Αγιάς. Στην Αλεξάνδρεια παρατηρήθηκαν οι περισσότεροι ανθεκτικοί πληθυσμοί στο fenoxycarb. Τέλος στο methoxyfenozide δεν διαπιστώθηκε κανένας ανθεκτικός πληθυσμός. Τα ποσοστά θνησιμότητας ήταν υψηλά και κυμάνθηκαν από 83,3% μέχρι 93,3%.

Πίνακας 7.7. Θνησιμότητα (%) 12 πληθυσμών νεαρών προνυμφών, με την χρήση διαγνωστικής δόσης σε έξι εντομοκτόνα.

Κωδ.	Περιοχή	Διαχείρ.	Ε. Σ. ³	Θνησιμότητα (%) ⁴					
				Azin ⁵	Meth	Delt	Diflu	Feno	Thia
E. ¹				90,1	90,2	90,2	91,1	91,3	90,4
K4	Καστοριά	Χ. Κατ. ²	2008	86,7 ^{ns}	90,0 ^{ns}	80,0*	86,6 ^{ns}	86,6 ^{ns}	
AL6	Αλεξάνδρεια	Χ. Κατ.	2007	70,0***	86,7 ^{ns}	64,3***	73,3***	83,3 ^{ns}	74,0**
AL9	Αλεξάνδρεια	Χ. Κατ.	2007	60,0***	86,7 ^{ns}	70,4***	67,8***	80,0*	81,4 ^{ns}
AL15	Αλεξάνδρεια	Χ. Κατ.	2008	63,3***	86,7 ^{ns}	63,0***	82,1 ^{ns}	83,3 ^{ns}	82,7 ^{ns}
AL19	Αλεξάνδρεια	Χ. Κατ.	2008	60,0***	90,0 ^{ns}	72,4***	64,2***	80,0*	74,0**
AL22	Αλεξάνδρεια	Χ. Κατ.	2008	60,0***	83,3 ^{ns}	71,4***	68,9***	76,6**	79,3*
AG7	Αγιά	Χ. Κατ.	2007	76,9*	92,3 ^{ns}	71,4***	84,6 ^{ns}	88,8 ^{ns}	88,8 ^{ns}
AG10	Αγιά	Χ. Κατ.	2007	63,0***	90,0 ^{ns}	66,7***	71,4***	82,1 ^{ns}	82,1 ^{ns}
AG16	Αγιά	Χ. Κατ.	2008	66,7***	93,3 ^{ns}	71,4***	73,0***	80,0*	81,4 ^{ns}
AG17	Αγιά	Χ. Κατ.	2008	73,3**	90,0 ^{ns}	66,7***	71,4***	83,3 ^{ns}	75,0**
AG23	Αγιά	Χ. Κατ.	2008	66,7***	86,7 ^{ns}	63,0***	67,8***	80,0*	78,5*
TR3	Τρίπολη	Χ. Κατ.	2007	83,3 ^{ns}		83,3 ^{ns}	86,6 ^{ns}		
Σύνολο				69,1***	88,7^{ns}	70,3***	74,8**	82,2^{ns}	79,7*

1: Ε. = Ευαίσθητος πληθυσμός

2: Χ. Κατ. = Χημική Καταπολέμηση

3: Ε. Σ. = Έτος Συλλογής

4: Τα αποτελέσματα της σύγκρισης των ποσοστών θνησιμότητας μεταξύ του ευαίσθητου πληθυσμού και των 6 πληθυσμών χρησιμοποιώντας το χ^2 test, όπου ns = δεν είναι σημαντική, * $p = 0.05$, ** $p = 0.01$, *** $p = 0.001$

5: Azin = azinphos-methyl, Meth = methoxyfenozide, Delt = deltamethrin, Diflu = diflubenzylron, Feno = fenoxycarb, Thia = thiacloprid

7.3.2.3. Αναπτυγμένες προνύμφες πέμπτου σταδίου.

Τα αποτελέσματα από την διενέργεια των τοπικών βιοδοκιμών των αναπτυγμένων προνυμφών πέμπτου σταδίου παραθέτονται στον Πίνακα 7.8. με την μορφή ποσοστών θνησιμότητας. Στον ίδιο πίνακα καταγράφονται τα αποτελέσματα της σύγκρισης των ποσοστών θνησιμότητας μεταξύ του ευαίσθητου πληθυσμού και των 33 πληθυσμών των προνυμφών πέμπτου σταδίου χρησιμοποιώντας το χ^2 κριτήριο.

Στο azinphos-methyl τα ποσοστά θνησιμότητας κυμάνθηκαν από 56,5% μέχρι 100%. Ο μεγαλύτερος αριθμός ανθεκτικών πληθυσμών διαπιστώθηκε στην Αγιά. Ο μέσος όρος των ποσοστών θνησιμότητας για το σύνολο των δειγμάτων που εξεταστήκαν, στο phosalone ήταν 81,0%.

Πίνακας 7.8. Θνησιμότητα (%) 33 πληθυσμών προνυμφών πέμπτου σταδίου με εφαρμογή της διαγνωστικής δόσης οκτώ εντομοκτόνων.

Κωδικός	Περιοχή	Διαχείριση	Ε. Σ. ³	Θνησιμότητα (%) ⁴							
				Azin ⁵	Phos	Delit	Diflu	Triflu	Feno	Thia	Tebu
E.1				95,8	97,9	95,8	100	96,1	97,8	98,2	95,9
K1	Καστοριά	X. Κατ. ²	2007	95,5 ^{ns}		77,3 ^{***}	100 ^{ns}				85,7*
K2	Καστοριά	X. Κατ.	2008	87,0*		73,9 ^{***}	100 ^{ns}				82,6 ^{**}
K3	Καστοριά	X. Κατ.	2008	78,3 ^{***}		82,6 ^{**}	100 ^{ns}				82,6 ^{**}
AL1	Αλεξανδρεια	X. Κατ.	2006	61,9 ^{***}			91,7 ^{**}	66,7 ^{***}	87,5 ^{**}	76,2 ^{***}	63,6 ^{***}
AL2	Αλεξανδρεια	B. Κατ	2006	100 ^{ns}				85,7*	90,5*	81,8 ^{***}	
AL5	Αλεξανδρεια	B. Κατ	2007	95,2 ^{ns}	100 ^{ns}	86,4*	95,5*	81,0 ^{**}	90,5 ^{**}	77,3 ^{***}	90,5 ^{ns}
AL6	Αλεξανδρεια	X. Κατ.	2007	63,6 ^{***}	68,2 ^{***}	50,0 ^{***}	61,9 ^{***}	57,1 ^{***}	71,4 ^{***}	66,7 ^{***}	54,5 ^{***}
AL7	Αλεξανδρεια	B. Κατ	2007	81,0 ^{**}	100 ^{ns}	85,7*	90,9 ^{**}	81,8*	85,7 ^{**}	81,0 ^{***}	86,4*
AL8	Αλεξανδρεια	X. Κατ.	2007	68,2 ^{***}	76,2 ^{***}	59,1 ^{***}	95,7*	63,6 ^{***}	77,3 ^{***}	77,3 ^{***}	54,5 ^{***}
AL15	Αλεξανδρεια	X. Κατ.	2008	56,5 ^{***}	78,3 ^{***}	68,2 ^{***}	72,7 ^{***}	81,0 ^{**}	83,3 ^{***}	63,6 ^{***}	71,4 ^{***}
AL16	Αλεξανδρεια	X. Κατ.	2008	63,6 ^{***}	68,2 ^{***}	50,0 ^{***}	61,9 ^{***}	57,1 ^{***}	71,4 ^{***}	66,7 ^{***}	54,5 ^{***}
AL17	Αλεξανδρεια	X. Κατ.	2008	71,4 ^{***}	71,4 ^{***}	66,7 ^{***}	63,6 ^{***}	63,6 ^{***}	81,0 ^{***}	61,9 ^{***}	63,6 ^{***}
AL18	Αλεξανδρεια	X. Κατ.	2008	68,2 ^{***}	78,3 ^{***}	54,5 ^{***}	52,2 ^{***}	63,6 ^{***}	78,3 ^{***}	77,3 ^{***}	45,5 ^{***}
AL19	Αλεξανδρεια	X. Κατ.	2008	65,2 ^{***}	73,9 ^{***}	56,5 ^{***}	50,0 ^{***}	65,2 ^{***}	83,3 ^{***}	68,2 ^{***}	50,0 ^{***}
AL20	Αλεξανδρεια	X. Κατ.	2008	65,2 ^{***}	73,9 ^{***}	56,5 ^{***}	50,0 ^{***}	65,2 ^{***}	83,3 ^{***}	68,2 ^{***}	50,0 ^{***}
AGK1	Αγιοκαμπος	B. Κατ	2006	100 ^{ns}		85,7*	86,4 ^{***}	87,0*	90,9*	95,5 ^{ns}	85,7*
AGK3	Αγιοκαμπος	X. Κατ.	2007	90,9 ^{ns}				77,3 ^{***}	90,9*	77,3 ^{***}	
AG1	Αγιά	X. Κατ.	2006	85,0*				76,2 ^{***}	95,5 ^{ns}	100 ^{ns}	86,4*
AG6	Αγιά	B. Κατ	2007	76,2 ^{***}	85,7 ^{**}	100 ^{ns}	95,2*	90,9 ^{ns}	85,7 ^{**}	100 ^{ns}	90,5 ^{ns}
AG7	Αγιά	X. Κατ.	2007	71,4 ^{***}	90,9 ^{ns}	77,3 ^{***}	81,8 ^{***}	90,9 ^{ns}	85,7 ^{**}	100 ^{ns}	77,3 ^{***}
AG8	Αγιά	X. Κατ.	2007	72,7 ^{***}	86,4 ^{**}	71,4 ^{***}	90,5 ^{**}	87,0*	90,5*	75,0 ^{***}	77,3 ^{***}
AG9	Αγιά	B. Κατ	2007	95,7 ^{ns}	86,4 ^{**}	86,4*	81,0 ^{***}	77,3 ^{***}	86,4 ^{**}	100 ^{ns}	76,2 ^{***}
AG16	Αγιά	X. Κατ.	2008	63,6 ^{***}	66,7 ^{***}	59,1 ^{***}	66,7 ^{***}	78,3 ^{***}	73,9 ^{***}	68,2 ^{***}	77,3 ^{***}
AG17	Αγιά	X. Κατ.	2008	56,5 ^{***}	90,9 ^{ns}	63,6 ^{***}	77,3 ^{***}	82,6 ^{**}	71,4 ^{***}	86,4 ^{**}	81,0 ^{***}
AG18	Αγιά	X. Κατ.	2008	72,7 ^{***}	68,2 ^{***}	65,2 ^{***}	68,2 ^{***}	69,6 ^{***}	86,4 ^{**}	76,2 ^{***}	77,3 ^{***}
AG19	Αγιά	X. Κατ.	2008	87,0*	86,4 ^{**}	72,7 ^{***}	61,9 ^{***}	76,6 ^{***}	81,8 ^{***}	85,7 ^{**}	76,2 ^{***}
AG20	Αγιά	X. Κατ.	2008	66,7 ^{***}	82,6 ^{***}	63,6 ^{***}	57,1 ^{***}	78,3 ^{***}	77,3 ^{***}	81,0 ^{***}	66,7 ^{***}
AG21	Αγιά	X. Κατ.	2008	70,8 ^{***}	82,6 ^{***}	72,7 ^{***}	61,9 ^{***}	77,3 ^{***}	72,7 ^{***}	85,7 ^{**}	66,7 ^{***}
AGB1	Αγ.Ελάσιος	X. Κατ.	2008	82,6*		81,8 ^{**}	75,0 ^{***}		87,5 ^{**}		77,3 ^{**}
AGL2	Αγ.Λαυρέντιος	X. Κατ.	2007	90,9 ^{ns}		86,4*	86,4 ^{***}		83,3 ^{***}		90,9 ^{ns}
AGL4	Αγ.Λαυρέντιος	X. Κατ.	2008	87,0*		72,7 ^{***}	79,2 ^{***}		95,0 ^{ns}		81,8 ^{**}
TR1	Τρίτολη	X. Κατ.	2007	76,2 ^{***}	86,4 ^{**}	76,2 ^{***}	85,7 ^{***}	72,7 ^{***}	95,0 ^{ns}	100 ^{ns}	90,5 ^{ns}

Κωδικός	Περιοχή	Διαχείριση	Ε. Σ. ³	Θνησιμότητα (%) ⁴								
				Azin ⁵	Phos	Delt	Diflu	Triflu	Feno	Thia	Tebu	
TR2	Τρίπολη	X. Κατ. ²	2007	90,5 ^{ns}					77,3 ^{***}	100 ^{ns}	100 ^{ns}	
Σύνολο				77,5^{***}	81,0^{***}	71,5^{***}	76,4^{***}	74,6^{***}	84,0^{***}	80,5^{***}	73,7^{***}	

1: Ε. = Ευαίσθητος πληθυσμός

2: X. Κατ. = Χημική Καταπολέμηση, Β. Κατ. = Βιολογική Καταπολέμηση

3: Ε. Σ. = Έτος Συλλογής

4: Τα αποτελέσματα της συσχέτισης των ποσοστών θνησιμότητας μεταξύ του ευαίσθητου πληθυσμού και των 33 πληθυσμών χρησιμοποίησαν το χ^2 test όπου (^{ns}) η συσχέτιση δεν είναι σημαντική, * $p = 0.05$, ** $p = 0.01$, *** $p = 0.001$

5: Azin = azinphos-methyl, Phos = phosalone, Delt = deltamethrin, Diflu = diflubenzuron, Triflu = triflumuron, Feno = fenoxycarb, Thia = Thiocloprid, Tebu = tebufenozide

Το χαμηλότερο ποσοστό θνησιμότητας ήταν 68,2% και παρατηρήθηκε σε δύο πληθυσμούς στην Αλεξάνδρεια και σε έναν στην Αγιά.

Ο μεγαλύτερος αριθμός ανθεκτικών πληθυσμών διαπιστώθηκε στο deltamethrin και στο triflumuron. Μόνο ένας πληθυσμός από την Αγιά δεν διέφερε στατιστικώς σημαντικά από τον ευαίσθητο εργαστηριακό πληθυσμό, διαφορετικός για κάθε εντομοκτόνο. Στο deltamethrin παρατηρήθηκε ο χαμηλότερος μέσος όρος των ποσοστών θνησιμότητας όλων των πληθυσμών που εξετάστηκαν. Στους πληθυσμούς από την Αλεξάνδρεια διαπιστώθηκε υψηλότερη ανθεκτικότητα στο triflumuron και διέφεραν στατιστικώς σημαντικά από τους πληθυσμούς της Αγιάς ($U = 33, N_1 = 12, N_2 = 11, p = 0,0439$).

Στο diflubenzuron οι πληθυσμοί με την υψηλότερη ανθεκτικότητα παρατηρήθηκαν στην Αλεξάνδρεια και το χαμηλότερο ποσοστό θνησιμότητας ήταν 50%. Από την ίδια περιοχή προήλθαν και οι πιο ανθεκτικοί πληθυσμοί στο tebufenozide και στο thiacloprid και διέφεραν στατιστικώς σημαντικά από τους πληθυσμούς της Αγιάς με ($U = 20, N_1 = 11, N_2 = 10, p = 0,013$) για το πρώτο και ($U = 23,5, N_1 = 12, N_2 = 11, p = 0,009$) για το δεύτερο εντομοκτόνο. Τα υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας παρατηρήθηκαν στο fenoxycarb και κυμάνθηκαν από 71,4% έως 100%. Οι πληθυσμοί με τα χαμηλότερα ποσοστά θνησιμότητας στο παραπάνω εντομοκτόνο προήλθαν από την Τρίπολη.

Στον Πίνακα 7.9. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των συσχετίσεων της αποτελεσματικότητας των οκτώ εντομοκτόνων, που χρησιμοποιήθηκαν στις βιοδοκιμές με τις προνύμφες πέμπτου σταδίου. Η συσχέτιση περιλάμβανε δέκα πληθυσμούς από την Αλεξάνδρεια Ημαθίας, δέκα από την Αγιά Λάρισας και έναν από την Τρίπολη Αρκαδίας. Παρατηρήθηκε διασταυρούμενη ανθεκτικότητα μεταξύ των περισσοτέρων εντομοκτόνων που εξετάστηκαν. Διασταυρούμενη ανθεκτικότητα δεν καταγράφηκε στο fenoxycarb με το phosalone, και το triflumuron. Στο triflumuron δεν παρατηρήθηκε διασταυρούμενη ανθεκτικότητα με το azinphos-methyl και στο thiacloprid με το phosalone.

Πίνακας 7.9. Συσχέτιση της αποτελεσματικότητας δέκα εντομοκτόνων σε 21 πληθυσμούς προνυμφών πέμπτου σταδίου του *Cydia pomonella* με τον Συντελεστή Συσχέτισης Pearson.

	Azin ¹	Phos	Delt	Diflu	Triflu	Feno	Thia	Tebu
Azin	1							
Phos	0,585**	1						
Delt	0,587**	0,588**	1					
Diflu	0,432*	0,613**	0,661**	1				
Triflu	0,261	0,625**	0,523*	0,475*	1			
Feno	0,507*	0,418	0,725**	0,575*	0,379	1		
Thia	0,437*	0,357	0,681**	0,458*	0,464*	0,552**	1	
Tebu	0,469*	0,670**	0,704**	0,674**	0,782**	0,597**	0,618**	1

1: Azin = azinphos-methyl, Phos = phosalone, Delt = deltamethrin, Diflu = diflubenzuron, Ttifu = triflumuron, Feno = fenoxycarb, Thia = thiacloprid, Tebu = tebufenozide

7.3.2.4. Διαπαύουσες προνύμφες

Στον Πίνακα 7.10. παρουσιάζονται τα ποσοστά θνησιμότητας των διαπαύουσων προνυμφών και οι συσχετίσεις με τον ευαίσθητο εργαστηριακό πληθυσμό με το χ^2 κριτήριο. Όλοι οι πληθυσμοί που εξεταστήκαν εμφανιστήκαν ανθεκτικοί στο azinphos – methyl και στο phosalone. Στο πρώτο εντομοκτόνο παρατηρήθηκε ο χαμηλότερος μέσος όρος των ποσοστών θνησιμότητας των πληθυσμών που εξετάστηκαν. Υψηλότερη ανθεκτικότητα στο phosalone, παρατηρήθηκε στους πληθυσμούς από την Αλεξάνδρεια και διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά με τους πληθυσμούς από την Αγιά ($U = 49$, $N_1 = 14$, $N_2 = 16$, $p = 0,0087$).

Το χαμηλότερο ποσοστό θνησιμότητας στο chlorpyrifos – methyl ήταν 50% και καταγράφηκε σε έναν πληθυσμό από την Αλεξάνδρεια. Από την ίδια περιοχή προήλθε και ο πληθυσμός που εμφάνισε την υψηλότερη ανθεκτικότητα στο deltamethrin με ποσοστό θνησιμότητας 40%. Οι πληθυσμοί της προαναφερθείσας περιοχής διέφεραν στατιστικώς σημαντικά από τους πληθυσμούς της Αγιάς ($U=60,5$, $N_1=14$, $N_2=16$, $p=0,032$).

Ο μέσος όρος των ποσοστών θνησιμότητας για το σύνολο των δειγμάτων που εξετάστηκαν, στο diflubenzuron ήταν 74,9%. Το χαμηλότερο ποσοστό θνησιμότητας ήταν 52,9% και παρατηρήθηκε σε δύο πληθυσμούς στην Αγιά και σε έναν στην Αλεξάνδρεια.

Πίνακας 7.10. Θνησιμότητα (%) 38 πληθυσμών διαπαύουσων προνυμφών με εφαρμογή της διαγνωστικής δόσης ενιά εντομοκτόνων.

Κωδικός	Περιοχή	Διαχείριση	Ε. Σ. ³	Θνησιμότητα (%) ⁴								
				Azin ⁵	Chl-me	Phos	Delt	Diflu	Mez	Tebu	Thia	Feno
E ¹				97,2	96,3	100	100	97,6	100	97	100	97,7
K5	Καστοριά	X. Κατ. ²	2008	81,3**	88,2*	81,3***	85,7***	81,8***	94,1*	80,0***	92,9**	86,4*
K6	Καστοριά	X. Κατ.	2008	75,0***	82,4**	78,9***	76,2***	77,3***	88,2***	75,0***	78,6***	81,8**
AL3	Αλεξανδρεία	B. Κατ.	2006		100 ^{ns}	86,7***	94,4*	93,8 ^{ns}	100 ^{ns}	100 ^{ns}	100 ^{ns}	94,1 ^{ns}
AL4	Αλεξανδρεία	X. Κατ.	2006		100 ^{ns}	66,7***	72,2***	86,7**	87,5*	82,4***	93,8*	82,4**
AL6	Αλεξανδρεία	X. Κατ.	2007	50,0***	58,8***	52,9***	47,4***	66,7***	76,5***	62,5***	56,3***	77,8**
AL10	Αλεξανδρεία	B. Κατ.	2007	73,7***	78,9***	84,2***	84,2***	78,9***	78,9***	78,9***	84,2***	84,2*
AL11	Αλεξανδρεία	X. Κατ.	2007	66,7***	64,7***	62,5***	55,6***	70,6***	76,5***	77,8***	72,2***	84,2*
AL12	Αλεξανδρεία	X. Κατ.	2007	43,8***	58,8***	58,8***	40,0***	60,0***	75,0***	70,6***	66,7***	70,6***
AL13	Αλεξανδρεία	X. Κατ.	2007	61,1***	62,5***	64,7***	46,7***	70,6***	80,0***	68,4***	73,7***	73,3***
AL14	Αλεξανδρεία	X. Κατ.	2007	73,7***	70,6***	62,5***	77,8***	70,6***	81,3**	68,8***	76,5***	78,9**
AL15	Αλεξανδρεία	X. Κατ.	2008	44,4***	50,0***	57,9***	47,4***	56,3***	70,0***	56,3***	66,7***	68,4***
AL19	Αλεξανδρεία	X. Κατ.	2008	41,2***	56,3***	50,0***	44,4***	58,8***	72,2***	58,8***	64,7***	66,7***
AL23	Αλεξανδρεία	X. Κατ.	2008	52,9***	70,6***	68,8***	66,7***	61,1***	77,8***	70,6***	71,4***	75,0***
AL24	Αλεξανδρεία	X. Κατ.	2008	72,2***	78,9***	76,5***	72,7***	68,2***	80,0***	78,9***	77,8***	77,3**
AL25	Αλεξανδρεία	X. Κατ.	2008	60,0***	64,7***	70,6***	50,0***	52,9***	78,9***	62,5***	72,2***	66,7***
AL26	Αλεξανδρεία	X. Κατ.	2008	61,9***	68,8***	75,0***	55,6***	63,2***	73,7***	66,7***	73,7***	72,2***
AGK2	Αιόκαμπος	B. Κατ.	2006		100 ^{ns}	81,3***	88,2***	93,8 ^{ns}	100 ^{ns}	93,8 ^{ns}	100 ^{ns}	100 ^{ns}
AGK4	Αιόκαμπος	X. Κατ.	2007	88,9*	94,1 ^{ns}	84,2***	88,9***	94,1 ^{ns}	100 ^{ns}	89,5*	94,7*	94,1 ^{ns}
AG2	Αιιά	X. Κατ.	2006		88,2*	93,8 ^{ns}	100 ^{ns}	93,8 ^{ns}	100 ^{ns}	94,7 ^{ns}	100 ^{ns}	100 ^{ns}
AG3	Αιιά	X. Κατ.	2006		93,8 ^{ns}	93,8*	76,5***	100 ^{ns}	86,7***	88,2*	81,3***	88,9*
AG4	Αιιά	B. Κατ.	2006		87,5*	82,4***	100 ^{ns}	100 ^{ns}	100 ^{ns}	100 ^{ns}	81,3***	88,9*
AG5	Αιιά	X. Κατ.	2006		93,3 ^{ns}	94,1*	100 ^{ns}	94,1 ^{ns}	93,8*	100 ^{ns}	100 ^{ns}	100 ^{ns}
AG7	Αιιά	X. Κατ.	2007	52,9***	73,7***	72,7***	66,7***	60,0***	81,0**	61,1***	64,7***	75,0***
AG11	Αιιά	X. Κατ.	2007	70,6***	64,7***	76,5***	81,3***	75,0***	88,2***	83,3***	73,7***	87,5*
AG12	Αιιά	X. Κατ.	2007	77,8***	75,0***	83,3***	76,5***	82,4***	89,5***	88,2*	76,5**	77,8**
AG13	Αιιά	X. Κατ.	2007	55,6***	66,7***	68,4***	55,6***	52,9***	75,0***	63,2***	66,7***	68,8***
AG14	Αιιά	X. Κατ.	2007	84,2**	77,8***	76,5***	82,4***	89,5*	93,8*	66,7***	94,4*	75,0***
AG15	Αιιά	X. Κατ.	2007	68,4***	70,6***	66,7***	66,7***	75,0***	85,7***	70,6***	64,7***	85,0*
AG16	Αιιά	X. Κατ.	2008	50,0***	71,4***	66,7***	57,1***	52,9***	76,5***	64,3***	61,1***	58,8***
AG17	Αιιά	X. Κατ.	2008	57,1***	73,3***	70,6***	60,0***	73,7***	80,0***	77,8***	70,6***	75,0***
AG24	Αιιά	X. Κατ.	2008	64,7***	77,8***	73,3***	61,1***	64,7***	83,3***	75,0***	76,5***	73,7***
AG25	Αιιά	X. Κατ.	2008	66,7***	73,7***	72,2***	63,2***	66,7***	81,3***	78,9***	78,6***	76,5***

Κωδικός	Περιοχή	Διαχείριση	Ε. Σ. ³	Θνησιμότητα (%) ⁴								
				Azin ⁵	Chl-me	Phos	Delt	Diflu	Mez	Tebu	Thia	Feno
AG26	Ανιά	X. Κατ. ²	2008	76,5**	81,3***	78,6**	73,7***	72,2***	84,2***	78,9***	81,0***	80,0**
AG27	Ανιά	X. Κατ.	2008	60,0***	75,0***	76,5***	70,6***	68,8***	78,9***	73,3***	75,0***	64,7***
AGB2	Αν. Βλάσιος	X. Κατ.	2008	77,8***	82,4**	81,3***	81,0***	77,3***	81,0***	73,7***	85,7***	81,8**
AGL1	Αν. Λαυρέντιος	X. Κατ.	2006		86,7*	75,0***	88,2***	100 ^{ns}	100 ^{ns}	93,8 ^{ns}	94,1*	100 ^{ns}
AGL3	Αν. Λαυρέντιος	X. Κατ.	2007	73,7***	76,5**	66,7***	66,7***	70,6***	88,9***	78,9***	86,7***	81,3**
AGL5	Αν. Λαυρέντιος	X. Κατ.	2008	72,2***	80,0***	82,4***	71,4***	72,7***	85,0***	73,7***	78,9***	77,3**
Σύνολο				65,2***	76,8***	74,1***	70,9***	74,9***	84,8***	76,9***	79,1***	80,1***

1: Ε. = Ευαίσθητος πληθυσμός

2: Χ. Κατ. = Χημική Καταπολέμηση, Β. Κατ. = Βιολογική Καταπολέμηση

3: Ε. Σ. = Έτος Συλλογής

4: Τα αποτελέσματα της συσχέτισης των ποσοτών θνησιμότητας μεταξύ του ευαίσθητου πληθυσμού και των 38 πληθυσμών χρησιμοποιώντας το χ^2 test όπου (^{ns}) η συσχέτιση δεν είναι σημαντική, * $p = 0.05$, ** $p = 0.01$, *** $p = 0.001$

5: Chl-me = chlorpyrifos-methyl, Azin = azinphos-methyl, Phos = phosalone, Delt = deltamethrin, Diflu = diflubenzuron, Meth = methoxyfenozide, Feno = fenoxycarb, Tebu = tebufenozide, Thia = thiacloprid.

Στο tebufenoze και thiacloprid το χαμηλότερο ποσοστό θνησιμότητας ήταν 56,3% και παρατηρήθηκε σε πληθυσμούς από την Αλεξάνδρεια. Στο fenoxycarb ο μέσος όρος των ποσοστών θνησιμότητας ήταν 80,1%, ενώ τα υψηλότερα ποσοστά παρατηρήθηκαν στο methoxyfenozide και κυμάνθηκαν από 70% έως 100%.

Στον Πίνακα 7.11. παρουσιάζεται η συσχέτιση της αποτελεσματικότητας των εννιά εντομοκτόνων που χρησιμοποιήθηκαν στις βιοδοκιμές με διαπαύουσες προνύμφες από 30 πληθυσμούς. Διαπιστώθηκε διασταυρούμενη ανθεκτικότητα στις περισσότερες δραστικές ουσίες. Δεν παρατηρήθηκε μόνο μεταξύ των chlorpyrifos-methyl και azinphos-methyl, chlorpyrifos-methyl και fenoxycarb και μεταξύ των chlorpyrifos-methyl και deltamethrin.

Πίνακας 7.11. Συσχέτιση της αποτελεσματικότητας εννιά δραστικών ουσιών σε 30 πληθυσμούς διαπαύουσων προνυμφών του *Cydia pomonella* με τον Συντελεστή Συσχέτισης Pearson.

	Azin ¹	Chl-me	Phos	Delt	Diflu	Mez	Tebu	Thia	Feno
Azin	1								
Chl-me	0,358	1							
Phos	0,759**	0,409*	1						
Delt	0,868**	0,300	0,810**	1					
Diflu	0,859**	0,392*	0,614**	0,783**	1				
Mez	0,809**	0,457*	0,590**	0,729**	0,845**	1			
Tebu	0,719**	0,466**	0,657**	0,658**	0,699**	0,664**	1		
Thia	0,865**	0,458*	0,674**	0,765**	0,786**	0,771**	0,584**	1	
Feno	0,731**	0,310	0,458*	0,679**	0,755**	0,708**	0,706**	0,572**	1

1: Azin = azinphos-methyl, Chl-me = chlorpyrifos-methyl, Phos = phosalone, Delt = deltamethrin, Diflu = diflubenzylron, Meth = methoxyfenozide, Tebu = tebufenoze, Thia = thiacloprid, Feno = fenoxycarb

7.3.2.5. Σύγκριση βιοδοκιμών σε διαφορετικά στάδια του εντόμου

Στον Πίνακα 7.12. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις βιοδοκιμές για τρεις πληθυσμούς από την Αλεξάνδρεια σε έξι εντομοκτόνα σε διαφορετικά στάδια του εντόμου. Διαπιστώθηκε ότι το υψηλότερο ποσοστό θνησιμότητας παρατηρήθηκε στις νεαρές προνύμφες, ενώ το χαμηλότερο ποσοστό διαπιστώθηκε στις διαπαύουσες προνύμφες για τα περισσότερα εντομοκτόνα. Η ίδια εικόνα διαπιστώθηκε και για τους πληθυσμούς από την Αγιάς (Πίνακας 7.13.).

Πίνακας 7.12. Θνησιμότητα (%) τριών πληθυσμών από την Αλεξάνδρεια σε διαφορετικά στάδια του εντόμου.

Κωδ.	Περιοχή	Διαχείρ.	Ε. Σ. ¹	Στ. Εντ. ³	Θνησιμότητα (%)					
					Azin ⁴	Mez	Thia	Delt	Diflu	Feno
AL6	Αλεξάνδρεια	Χ. Κατ. ²	2007	N. Πρ. ⁴	70,0	86,7	74,0	64,3	73,3	83,3
				Πρ. Πεμ.	63,6		66,7	50,0	61,9	71,4
				Διαπ. Πρ.	50,0	76,5	56,3	47,4	66,7	77,8
				Ωό						77,6
AL15	Αλεξάνδρεια	Χ. Κατ.	2008	N. Πρ	63,3	86,7	82,7	63,0	82,1	83,3
				Πρ. Πεμ.	56,5		63,6	68,2	72,7	83,3
				Διαπ. Πρ.	44,4	70,0	66,7	47,4	56,3	68,4
				Ωό						91,2
AL19	Αλεξάνδρεια	Χ. Κατ.	2008	N. Πρ	60,0	90,0	74,0	72,4	64,2	80,0
				Πρ. Πεμ.	65,2		68,2	56,5	50,0	83,3
				Διαπ. Πρ.	41,2	72,2	64,7	44,4	58,8	66,7

1: Ε. Σ. = Έτος Συλλογής.

2: Χ. Κατ. = Χημική Καταπολέμηση.

3: Στ. Εντ. = Στάδιο Εντόμου.

4: N. Πρ. = Νεαρές Προνύμφες, Πρ. Πεμ. = Προνύμφες Πέμπτου Σταδίου, Διαπ. Πρ. = Διαπαύουσες Προνύμφες.

5: Azin = azinphos-methyl, Meth = methoxyfenozide, Thia = thiacloprid, Delt = deltamethrin, Diflu = diflubenzcyron, Feno = fenoxycarb.

Πίνακας 7.13. Θνησιμότητα (%) τριών πληθυσμών από την Αγιά σε διαφορετικά στάδια του εντόμου.

Κωδ.	Περιοχή	Διαχείρ.	Ε.Σ. ¹	Στ. Εντ. ³	Θνησιμότητα (%)					
					Azin ⁵	Mez	Thia	Delt	Diflu	Feno
AG7	Αγιά	Χ. Κατ. ²	2007	N. Πρ. ⁴	76,9	92,3	88,8	71,4	84,6	88,8
				Πρ. Πεμ.	71,4		100	77,3	81,8	85,7
				Διαπ. Πρ.	52,9	81,0	64,7	66,7	60,0	75,0
				Ωό						94,0
AG16	Αγιά	Χ. Κατ.	2008	N. Πρ	66,7	93,3	81,4	71,4	73,0	80,0
				Πρ. Πεμ.	63,6		68,2	59,1	66,7	73,9
				Διαπ. Πρ.	50,0	76,5	61,1	57,1	52,9	58,8
				Ωό						85,2
AG17	Αγιά	Χ. Κατ.	2008	N. Πρ	73,3	90,0	75,0	66,7	71,4	83,3
				Πρ. Πεμ.	56,5		86,4	63,6	77,3	71,4
				Διαπ. Πρ.	57,1	80,0	70,6	60,0	73,7	75,0

1: Ε. Σ. = Έτος Συλλογής.

2: Χ. Κατ. = Χημική Καταπολέμηση.

3: Στ. Εντ. = Στάδιο Εντόμου.

4: N. Πρ. = Νεαρές Προνύμφες, Πρ. Πεμ. = Προνύμφες Πέμπτου Σταδίου, Διαπ. Πρ. = Διαπαύουσες Προνύμφες.

5: Azin = azinphos-methyl, Meth = methoxyfenozide, Thia = thiacloprid, Delt = deltamethrin, Diflu = diflubenzcyron, Feno = fenoxycarb.

Από το σύνολο των εξεταζόμενων πληθυσμών το μεγαλύτερο ποσοστό ανθεκτικών πληθυσμών, στις νεαρές προνύμφες, παρατηρήθηκε στο deltamethrin (Πίνακας 7.14). Στο ίδιο εντομοκτόνο διαπιστώθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό ανθεκτικών πληθυσμών στις προνύμφες πέμπτου σταδίου. Στις διαπαύουσες προνύμφες στα εντομοκτόνα azinphos-methyl και phosalone δεν παρατηρήθηκε

κανένας ευαίσθητος πληθυσμός. Ενώ στο methoxyfenozide όλοι οι πληθυσμοί των νεαρών προνυμφών που εξετάστηκαν εμφανίστηκαν ευαίσθητοι.

Πίνακας 7.14. Ποσοστό εμφάνισης μη ευαίσθητων πληθυσμών επί του συνόλου των εξεταζόμενων δειγμάτων σε κάθε στάδιο για όλα τα εντομοκτόνα που εξετάστηκαν.

Δραστική Ουσία	Θνησιμότητα (%)			
	Ωά	Νεαρές Προνύμφες	Προνύμφες Πέμπτου Σταδίου	Διαπαύουσες Προνύμφες
Fenoxycarb	16,7	45,5	86,7	84,2
Azinphos-methyl	-	83,8	90,9	100
Chlorpyrifos-methyl	-	-	-	84,2
Phosalone	-	-	80,9	100
Deltamethrin	-	91,7	96,3	92,1
Diflubenzuron	-	66,6	92,6	78,9
Triflumuron	-	-	96,2	-
Methoxyfenozide	-	0,0	-	84,2
Tebufenozide	-	-	86,2	84,2
Thiacloprid	-	50,0	77,8	89,5

7.3.3. Βιοχημικές και μοριακές δοκιμές

7.3.3.1. Αναπτυγμένες προνύμφες πέμπτου σταδίου.

Ο Συντελεστής Ανθεκτικότητας της GST, κυμάνθηκε από 0,2 μέχρι 2,0 (Πίνακα 7.15.). Το 24,2% των πληθυσμών που μελετηθήκαν, ήταν μεταξύ των ορίων 0,2–1,0 και το 75,8% μεταξύ 1,1–2,0. Ο Συντελεστής Ανθεκτικότητας των MFO, κυμάνθηκε από 0,9 μέχρι 6,0. Το 33,4% των πληθυσμών που μελετηθήκαν, ήταν μεταξύ 0,9–3,0, και το 66,6% μεταξύ 3,1–6,0. Για τις EST ο συντελεστής ανθεκτικότητας κυμάνθηκε από 0,3 έως 0,8.

Πίνακας 7.15. Αποτελέσματα της ενζυμικής δραστηριότητας των GST, MFO και EST των 33 πληθυσμών προνυμφών πέμπτου σταδίου.

Κωδικός	Περιοχή	Διαχείριση	Ε. Σ. ³	Αποτελέσματα Βιοχημικών δοκιμών						
				GST ⁴	MFO	EST				
				N	M.O. ⁵	Σ.Α. ⁶	M.O.	Σ.Α.	M.O.	Σ.Α.
E. ¹				60	88584±16275	1,0	159,8±31,1	1,0	906,1±153,8	1,0
K1	Καστοριά	X. Κατ. ²	2007	17	144701±21333	1,6	458,5±211,0	2,9	431,0±96,4	0,5
K2	Καστοριά	X. Κατ.	2008	25	114181±16239	1,3	273,6±59,9	1,7	707,1±150,1	0,8
K3	Καστοριά	X. Κατ.	2008	25	75203±13491	0,8	217,8±89,7	1,4	622,4±115,7	0,7
AL1	Αλεξάνδρεια	X. Κατ.	2006	53	33074±10177	0,4	231,1±77,8	1,4	510,9±68,4	0,6
AL2	Αλεξάνδρεια	B. Κατ	2006	23	16535±2616	0,2	137,9±85,0	0,9	316,6±136,2	0,3
AL5	Αλεξάνδρεια	B. Κατ	2007	26	125403±18843	1,4	697,4±486,4	4,4	465,2±153,4	0,5
AL6	Αλεξάνδρεια	X. Κατ.	2007	51	118714±23585	1,3	900,3±202,7	5,6	442,0±93,4	0,5
AL7	Αλεξάνδρεια	B. Κατ	2007	48	110455±15658	1,2	879,9±271,1	5,5	493,5±110,6	0,5
AL8	Αλεξάνδρεια	X. Κατ.	2007	27	103078±12904	1,2	528,4±300,9	3,3	308,4±91,0	0,3
AL15	Αλεξάνδρεια	X. Κατ.	2008	25	127071±26388	1,4	817,0±195,0	5,1	476,5±142,8	0,5
AL16	Αλεξάνδρεια	X. Κατ.	2008	25	155148±12542	1,8	710,8±145,2	4,4	377,6±96,7	0,4
AL17	Αλεξάνδρεια	X. Κατ.	2008	25	148953±52434	1,7	927,1±462,2	5,8	430,6±106,3	0,5
AL18	Αλεξάνδρεια	X. Κατ.	2008	25	179402±28172	2,0	667,0±308,4	4,2	372,1±80,9	0,4
AL19	Αλεξάνδρεια	X. Κατ.	2008	25	114027±33851	1,3	708,3±340,0	4,4	265,0±70,0	0,3
AL20	Αλεξάνδρεια	X. Κατ.	2008	22	120184±33225	1,4	389,6±127,9	2,4	528,0±135,6	0,6
AGK1	Αγιόκαμπος	B. Κατ	2006	25	23061±6994	0,3	195,6±114,0	1,2	475,3±135,7	0,5
AGK3	Αγιόκαμπος	X. Κατ.	2007	22	74161±11445	0,8	662,5±357,4	4,1	388,7±145,2	0,4
AG1	Αγιά	X. Κατ.	2006	40	18632±4715	0,2	185,7±117,0	1,2	477,6±75,9	0,5
AG6	Αγιά	B. Κατ	2007	28	134980±32080	1,5	913,2±387,4	5,7	702,5±137,5	0,8
AG7	Αγιά	X. Κατ.	2007	48	125603±25319	1,4	832,2±191,6	5,2	506,4±116,1	0,6
AG8	Αγιά	X. Κατ.	2007	50	170728±17567	1,9	518,5±131,7	3,2	362,9±61,7	0,4
AG9	Αγιά	B. Κατ	2007	28	110302±24150	1,2	538,8±175,6	3,4	595,4±132,9	0,7
AG16	Αγιά	X. Κατ.	2008	25	136499±23846	1,5	741,7±278,7	4,6	350,5±107,2	0,4
AG17	Αγιά	X. Κατ.	2008	25	116754±16126	1,3	844,8±477,9	5,3	693,3±167,9	0,8
AG18	Αγιά	X. Κατ.	2008	25	117577±17495	1,3	870,3±521,1	5,4	609,3±211,2	0,7
AG19	Αγιά	X. Κατ.	2008	25	107587±16411	1,2	323,6±147,1	2,0	604,6±106,3	0,7
AG20	Αγιά	X. Κατ.	2008	25	135946±27798	1,5	442,5±131,9	2,8	698,4±131,9	0,8
AG21	Αγιά	X. Κατ.	2008	25	103159±20267	1,2	955,9±280,4	6,0	635,6±156,3	0,7

Κωδικός	Περιοχή	Διαχείριση	Ε. Σ. ³	Αποτελέσματα Βιοχημικών δοκιμών						
				GST ⁴			MFO			EST
				N	M.O. ⁵	Σ.Α. ⁶	M.O.	Σ.Α.	M.O.	Σ.Α.
AGB1	Αν.Βλάσιος	Χ. Κατ.	2008	25	88561±25944	1,0	597,9±346,2	3,7	614,9±124,0	0,7
AGL2	Αν.Λαυρέντιος	Χ. Κατ.	2007	18	147755±20021	1,7	895,2±452,9	5,6	497,4±115,0	0,5
AGL4	Αν.Λαυρέντιος	Χ. Κατ.	2008	25	128679±30798	1,5	708,0±269,2	4,4	701,5±255,6	0,8
TR1	Τρίπολη	Χ. Κατ. ²	2007	29	113805±18856	1,3	493,5±308,3	3,1	243,2±71,6	0,3
TR2	Τρίπολη	Χ. Κατ.	2007	24	23159±6293	0,3	187,1±122,2	1,2	540,4±195,6	0,6

1: Ε. = Ευαίσθητος πληθυσμός.

2: Χ. Κατ. = Χημική Καταπολέμηση, Β. Κατ. = Βιολογική Καταπολέμηση.

3: Ε. Σ. = Έτος Συλλογής.

4: Οι μονάδες των GST είναι **uf/mg prot**, οι μονάδες των MFO είναι **pg 7OH/ mg prot /min** και οι μονάδες των EST είναι **nmole/mg prot/min b naphthol**.

5: M.O. = Μέσος όρος ± Τυπικό σφάλμα.

6: Σ.Α. = Ο Συντελεστής ανθεκτικότητας, δηλαδή η ενζυμική δραστηριότητα των πληθυσμών που συλλέχθηκαν από τους μηλαινώνες προς την ενζυμική δραστηριότητα του ευαίσθητου εργαστηριακού πληθυσμού.

Στον Πίνακα 7.16. παραθέτονται τα αποτελέσματα της συχνότητας εμφάνισης ανθεκτικών προνυμφών πέμπτου σταδίου στους 33 πληθυσμούς οι οποίοι είχαν τιμή μεγαλύτερη από το υψηλότερο 95% του ορίου εμπιστοσύνης του μέσου όρου του ευαίσθητου εργαστηριακού πληθυσμού των GST, MFO και καρβοξυλεστερασών. Επιπλέον καταγράφονται και οι τιμές της συχνότητας εμφάνισης των ατόμων, που παρουσίασαν ενζυμική δραστικότητα, στις καρβοξυλεστεράσες, χαμηλότερες από το χαμηλότερο 95% του ορίου εμπιστοσύνης του μέσου όρου του ευαίσθητου εργαστηριακού πληθυσμού.

Για την GST, η συχνότητα εμφάνισης των ανθεκτικών προνυμφών πέμπτου σταδίου κυμάνθηκε από 0,0% μέχρι 64%, ενώ για τα MFO, κυμάνθηκε από 7,5% μέχρι 80%. Τα ποσοστά των προνυμφών που εμφάνισαν τιμές μεγαλύτερες από το υψηλότερο 95% του ορίου εμπιστοσύνης του μέσου όρου του ευαίσθητου εργαστηριακού πληθυσμού, βάσει της ενζυμικής δραστικότητας των καρβοξυλεστερασών κυμανθήκαν από 0% μέχρι 21,4%. Ενώ η συχνότητα εμφάνισης των προνυμφών που εμφάνισαν τιμές χαμηλότερες από το χαμηλότερο 95% του ορίου εμπιστοσύνης του μέσου όρου του ευαίσθητου εργαστηριακού πληθυσμού, βάση της ενζυμικής δραστικότητας των καρβοξυλεστερασών (EST<) κυμανθήκαν από 50% μέχρι 100,0%.

Παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της δραστικότητας των οξειδάσεων μικτής λειτουργίας MFO και της εμφάνισης ανθεκτικότητας στο azinphos-methyl ($r = 0,529$, $df = 31$, $p = 0,0015$), στο fenoxycarb ($r = 0,456$, $df = 28$, $p = 0,0114$), στο thiacloprid ($r = 0,414$, $df = 25$, $p = 0,0317$), στο deltamethrin ($r = 0,374$, $df = 26$, $p = 0,0498$) και στο diflubenzuron ($r = 0,428$, $df = 26$, $p = 0,0229$)

Η συχνότητα εμφάνισης προνυμφών που εμφάνισαν τιμές χαμηλότερες από το χαμηλότερο 95% του ορίου εμπιστοσύνης του μέσου όρου του ευαίσθητου εργαστηριακού πληθυσμού, βάσει της ενζυμικής δραστικότητας των καρβοξυλεστερασών (EST<) συσχετίστηκε με την εμφάνιση ανθεκτικότητας στο thiacloprid ($r = 0,387$, $df = 25$, $p = 0,0459$), στο deltamethrin ($r = 0,589$, $df = 26$, $p = 0,0001$), στο diflubenzuron ($r = 0,451$, $df = 26$, $p = 0,0158$), στο phosalone ($r = 0,483$, $df = 19$, $p = 0,0262$) και στο tebufenozide ($r = 0,565$, $df = 27$, $p = 0,0013$).

Τέλος δεν παρατηρήθηκε σε κανένα από τα δείγματα που εξεταστήκαν η μεταλλαγή της τροποποιημένης ακετυλχολινεστεράσης (AChE) και η kdr ανθεκτικότητα.

Πίνακας 7.16. Συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικών προνυμφών πέμπτου σταδίου.

Κωδικός	Περιοχή	Διαχείριση	Ε. Σ. ³	Συχνότητα%			
				GST ⁴	MFO ⁵	EST ⁶	EST ⁷
E. ¹				6,7	10	8,3	20,0
K1	Καστοριά	Χ. Κατ. ²	2007	76,5***	29,4***	0,0**	76,5***
K2	Καστοριά	Χ. Κατ.	2008	44,0***	40,0***	12,0 ^{ns}	68,0***
K3	Καστοριά	Χ. Κατ.	2008	20,0**	8,0 ^{ns}	16,0 ^{ns}	52,0***
AL1	Αλεξάνδρεια	Χ. Κατ.	2006	5,7 ^{ns}	28,3***	13,2 ^{ns}	64,2***
AL2	Αλεξάνδρεια	Β. Κατ	2006	0,0**	8,7 ^{ns}	8,7 ^{ns}	91,3***
AL5	Αλεξάνδρεια	Β. Κατ	2007	30,8***	38,5***	11,5 ^{ns}	69,2***
AL6	Αλεξάνδρεια	Χ. Κατ.	2007	31,4***	62,7***	7,8 ^{ns}	84,3***
AL7	Αλεξάνδρεια	Β. Κατ	2007	41,7***	47,9***	16,7 ^{ns}	70,8***
AL8	Αλεξάνδρεια	Χ. Κατ.	2007	33,3***	33,3***	7,4 ^{ns}	88,9***
AL15	Αλεξάνδρεια	Χ. Κατ.	2008	36,0***	72,0***	12,0 ^{ns}	80,0***
AL16	Αλεξάνδρεια	Χ. Κατ.	2008	64,0***	80,0***	12,0 ^{ns}	68,0***
AL17	Αλεξάνδρεια	Χ. Κατ.	2008	32,0***	60,0***	8,0 ^{ns}	80,0***
AL18	Αλεξάνδρεια	Χ. Κατ.	2008	52,0***	52,0***	8,0 ^{ns}	80,0***
AL19	Αλεξάνδρεια	Χ. Κατ.	2008	24,0***	52,0***	0,0 ^{ns}	100***
AL20	Αλεξάνδρεια	Χ. Κατ.	2008	32,0***	40,9***	12,0 ^{ns}	84,0***
AGK1	Αγιόκαμπος	Β. Κατ	2006	8,0 ^{ns}	16 ^{ns}	8,0 ^{ns}	72,0***
AGK3	Αγιόκαμπος	Χ. Κατ.	2007	22,7**	50,0***	9,0 ^{ns}	81,8***
AG1	Αγιά	Χ. Κατ.	2006	2,5 ^{ns}	7,5 ^{ns}	7,5 ^{ns}	75,0***
AG6	Αγιά	Β. Κατ	2007	35,7***	50,0***	21,4**	60,7***
AG7	Αγιά	Χ. Κατ.	2007	35,4***	45,8***	10,4 ^{ns}	72,9***
AG8	Αγιά	Χ. Κατ.	2007	50,0***	52,0***	6,0 ^{ns}	86,0***
AG9	Αγιά	Β. Κατ	2007	32,1***	42,9***	14,3 ^{ns}	50,0***
AG16	Αγιά	Χ. Κατ.	2008	36,0***	64,0***	8,0 ^{ns}	84,0***
AG17	Αγιά	Χ. Κατ.	2008	40,0***	52,0***	20,0*	64,0***
AG18	Αγιά	Χ. Κατ.	2008	44,0***	44,0***	16,0 ^{ns}	80,0***
AG19	Αγιά	Χ. Κατ.	2008	36,0***	8,0 ^{ns}	16,0 ^{ns}	68,0***
AG20	Αγιά	Χ. Κατ.	2008	44,0***	40,0***	20,0*	68,0***
AG21	Αγιά	Χ. Κατ.	2008	28,0***	76,0***	16,0 ^{ns}	76,0***
AGB1	Αγ.Βλάσιος	Χ. Κατ.	2008	24,0***	28,0***	16,0 ^{ns}	64,0***
AGL2	Αγ.Λαυρέντιος	Χ. Κατ.	2007	61,1***	33,3***	16,7 ^{ns}	61,1***
AGL4	Αγ.Λαυρέντιος	Χ. Κατ.	2008	36,0***	60,0***	16,0 ^{ns}	76,0***
TR1	Τρίπολη	Χ. Κατ.	2007	31,0***	37,9***	3,4 ^{ns}	96,6***
TR2	Τρίπολη	Χ. Κατ.	2007	4,2 ^{ns}	12,5*	12,5 ^{ns}	66,7***

1: E. = Ευαίσθητος πληθυσμός

2: Χ. Κατ. = Χημική Καταπολέμηση, Β. Κατ. = Βιολογική Καταπολέμηση

3: Ε. Σ.= Έτος Συλλογής

4, 5: Ποσοστά εμφάνισης ατόμων στους πληθυσμούς στα GST και MFO τα οποία εμφάνισαν ενζυμική δραστικότητα μεγαλύτερη από το 95% του ανώτερου ορίου εμπιστοσύνης του μέσου όρου του ευαίσθητου πληθυσμού (122501 **uf/mg prot** και 222,02 **pg 7OH/ mg prot /min**)

6: Ποσοστά εμφάνισης ατόμων στους πληθυσμούς στις καρβοξυλεστεράσες οποία εμφάνισαν ενζυμική δραστικότητα μεγαλύτερη από το 95% του ανώτερου ορίου εμπιστοσύνης του μέσου όρου του ευαίσθητου πληθυσμού (1213,96 **nmole/mg/min b naphthol**)

7: Ποσοστά εμφάνισης ατόμων στους πληθυσμούς στις καρβοξυλεστεράσες οποία εμφάνισαν ενζυμική δραστικότητα μικρότερη από το 95% του χαμηλοτέρου ορίου εμπιστοσύνης του μέσου όρου του ευαίσθητου πληθυσμού (598,13 **nmole/mg/min b naphthol**)

7.3.3.2. Διαπαύουσες προνύμφες

Ο Συντελεστής Ανθεκτικότητας της GST, κυμάνθηκε από 0,3 μέχρι 1,7 (Πίνακας 7.17.). Το 50% των πληθυσμών που μελετήθηκαν, κυμάνθηκαν μεταξύ 0,3–1,0 και το υπόλοιπο 50% από 1,1 έως 1,7. Ο Συντελεστής Ανθεκτικότητας των MFO, κυμάνθηκε από 0,4 μέχρι 12,4. Το 81,4% των πληθυσμών που μελετηθήκαν, ήταν μεταξύ 0,4–4,0 και το 10,5% από 4,1 έως 8,0 και το 8,1% < 8. Για τις (EST) ο συντελεστής ανθεκτικότητας κυμάνθηκε από 0,2 έως 0,8.

Τα αποτελέσματα της συχνότητας εμφάνισης ανθεκτικών διαπαύουσων προνυμφών στους 38 πληθυσμούς, οι οποίοι είχαν τιμή μεγαλύτερη από το υψηλότερο 95% του ορίου εμπιστοσύνης του μέσου όρου του ευαίσθητου εργαστηριακού πληθυσμού στα GST, MFO και EST παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.18. Επιπλέον καταγράφονται και οι τιμές της συχνότητας εμφάνισης των ατόμων, που παρουσίασαν ενζυμική δραστικότητα στις καρβοξυλεστερασές, χαμηλότερες από το χαμηλότερο 95% του ορίου εμπιστοσύνης του μέσου όρου του ευαίσθητου εργαστηριακού πληθυσμού.

Η συχνότητα εμφάνισης των ανθεκτικών διαπαύουσων προνυμφών για την GST, κυμάνθηκε από 2,8% μέχρι 60%, ενώ για τα MFO, κυμάνθηκε από 0% μέχρι 75%. Τα ποσοστά των προνυμφών που εμφάνισαν τιμές μεγαλύτερες από το υψηλότερο 95% του ορίου εμπιστοσύνης του μέσου όρου του ευαίσθητου εργαστηριακού πληθυσμού, βάσει της ενζυμικής δραστικότητας των καρβοξυλεστερασών κυμανθήκαν από 0% μέχρι 25%.

Ενώ η συχνότητα εμφάνισης των προνυμφών που εμφάνισαν τιμές χαμηλότερες από το χαμηλότερο 95% του ορίου εμπιστοσύνης του μέσου όρου του ευαίσθητου εργαστηριακού πληθυσμού, βάση της ενζυμικής δραστικότητας των καρβοξυλεστερασών (EST<) κυμανθήκαν από 54,5% μέχρι 91,2%.

Παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της ενζυμικής δραστικότητας των MFO και της εμφάνισης ανθεκτικότητας στο azinphos-methyl ($r = 0,449$, $df = 28$, $p = 0,0127$), thiacloprid ($r = 0,468$, $df = 36$, $p = 0,003$), στο tebufenozide ($r = 0,527$, $df = 36$, $p < 0,001$), στο phosalone ($r = 0,568$, $df = 38$, $p < 0,001$) και στο methoxyfenozide ($r = 0,475$, $df = 38$, $p = 0,002$). Επίσης θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε στο fenoxycarb ($r=0,538$, $df = 38$, $p < 0,001$), στο diflubenzuron ($r = 0,527$, $df = 38$, $p < 0,001$), στο deltamethrin ($r = 0,461$, $df = 38$, $p = 0,003$) και στο chlorpyrifos-methyl ($r = 0,3960$, $df = 38$, $p = 0,013$).

Πίνακας 7.17. Αποτελέσματα της ενζυμικής δραστηρότητας των GST, MFO και EST 38 πληθυσμών διαπαύουσων προνυμφών.

Κωδικός	Περιοχή	Διαχείριση	Ε. Σ. ³	Αποτελέσματα Βιοχημικών δοκιμών			EST			
				GST ⁴	MFO	EST				
				M.O. ⁵	Σ.Α. ⁶	N	M.O.	Σ.Α.	M.O.	Σ.Α.
E. ¹				86702±17860	1,0	60	168,1±35,7	1,0	879,2±132,1	1,0
K5	Καστοριά	X. Κατ. ²	2008	115352±36906	1,3	20	368,3±152,1	2,2	734,8±129,2	0,8
K6	Καστοριά	X. Κατ.	2008	69256±15298	0,8	21	281,3±64,9	1,7	372,1±143,4	0,4
AL3	Αλεξάνδρεια	B. Κατ	2006	47622±7254	0,5	32	404,0±186,3	2,4	514,0±151,3	0,6
AL4	Αλεξάνδρεια	X. Κατ.	2006	103500±25631	1,2	33	286,8±50,4	1,7	405,5±108,8	0,5
AL6	Αλεξάνδρεια	X. Κατ.	2007	110837±16953	1,3	30	1584,0±701,2	9,4	426,1±99,5	0,5
AL10	Αλεξάνδρεια	B. Κατ	2007	52457±7788	0,6	32	456,9±258,1	2,7	542,5±106,9	0,6
AL11	Αλεξάνδρεια	X. Κατ.	2007	141422±18044	1,6	30	529,9±155,2	3,2	468,9±87,4	0,5
AL12	Αλεξάνδρεια	X. Κατ.	2007	97903±16855	1,1	31	660,2±231,0	3,9	304,5±73,9	0,3
AL13	Αλεξάνδρεια	X. Κατ.	2007	147942±33765	1,7	31	826,3±232,7	4,9	223,6±58,1	0,3
AL14	Αλεξάνδρεια	X. Κατ.	2007	76057±32791	0,9	29	479,5±115,9	2,9	476,7±95,5	0,5
AL15	Αλεξάνδρεια	X. Κατ.	2008	91909±23305	1,1	20	562,9±222,5	3,3	414,0±82,6	0,5
AL19	Αλεξάνδρεια	X. Κατ.	2008	105319±22242	1,2	22	650,9±176,9	3,9	324,5±69,2	0,4
AL23	Αλεξάνδρεια	X. Κατ.	2008	68617±14997	0,8	20	1586,6±747,1	9,4	346,8±197,7	0,4
AL24	Αλεξάνδρεια	X. Κατ.	2008	108376±22131	1,2	20	346,5±89,5	2,1	375,5±60,3	0,4
AL25	Αλεξάνδρεια	X. Κατ.	2008	77978±23606	0,9	21	593,2±254,6	3,5	388,1±132,6	0,4
AL26	Αλεξάνδρεια	X. Κατ.	2008	97710±21067	1,1	20	473,3±381,9	2,8	209,5±75,9	0,2
AGK2	Αγιοκαμπος	B. Κατ	2006	74587±13120	0,9	34	240,3±74,1	1,4	327,9±93,3	0,4
AGK4	Αγιοκαμπος	X. Κατ.	2007	117140±13356	1,4	31	651,2±194,7	3,9	468,1±99,5	0,5
AG2	Αγιά	X. Κατ.	2006	65327±14527	0,8	35	314,3±92,8	1,9	232,6±42,3	0,3
AG3	Αγιά	X. Κατ.	2006	85677±12185	1,0	40	257,2±87,1	1,5	355,2±60,2	0,4
AG4	Αγιά	B. Κατ	2006	49353±11201	0,6	39	237,2±55,0	1,4	373,7±77,7	0,4
AG5	Αγιά	X. Κατ.	2006	51180±14527	0,6	29	165,9±98,6	1,0	423,1±105,1	0,5
AG7	Αγιά	X. Κατ.	2007	87509±15568	1,0	30	382,5±182,4	2,3	422,6±151,3	0,5
AG11	Αγιά	X. Κατ.	2007	92775±15499	1,1	32	472,4±95,0	2,8	560,9±62,9	0,6
AG12	Αγιά	X. Κατ.	2007	57574±17012	0,7	32	791,2±391,7	4,7	694,2±108,3	0,8
AG13	Αγιά	X. Κατ.	2007	92606±16113	1,1	31	2081,3±1611	12,4	505,9±177,4	0,6
AG14	Αγιά	X. Κατ.	2007	125911±22608	1,5	29	454,7±110,3	2,7	476,4±116,4	0,5
AG15	Αγιά	X. Κατ.	2007	78342±15163	0,9	33	981,7±757,7	5,8	455,6±133,9	0,5

Κωδικός	Περιοχή	Διαχείριση	Ε. Σ. ³	Αποτελέσματα Βιοχημικών δοκιμών						
				GST ⁴			MFO			EST
				N	M.O. ⁵	Σ.Α. ⁶	M.O.	Σ.Α.	M.O.	
AG16	Ανιά	X. Κατ.	2008	20	78724±18713	0,9	843,9±224,0	5,0	414,3±82,5	0,5
AG17	Ανιά	X. Κατ.	2008	21	78341±25476	0,9	508,1±234,5	3,0	416,6±71,3	0,5
AG24	Ανιά	X. Κατ.	2008	23	71644±21683	0,8	669,2±386,3	4,0	375,8±85,0	0,4
AG26	Ανιά	X. Κατ.	2008	20	120651±26084	1,4	675,2±214,8	4,0	513,9±126,1	0,6
AG25	Ανιά	X. Κατ.	2008	20	97380±21286	1,1	549,9±198,0	3,3	457,1±113,0	0,5
AG27	Ανιά	X. Κατ.	2008	20	29211±9746	0,3	613,8±433,2	3,7	387,3±80,8	0,4
AGB2	Αγ.Βλάσιος	X. Κατ.	2008	20	126534±22221	1,5	390,7±167,0	2,3	634,4±161,5	0,7
AGL1	Αγ.Λαυρέντιος	X. Κατ.	2006	36	44412±7373	0,5	61,3±10,4	0,4	452,7±151,5	0,5
AGL3	Αγ.Λαυρέντιος	X. Κατ.	2007	30	57638±12899	0,7	344,4±66,3	2,0	494,1±192,5	0,6
AGL5	Αγ.Λαυρέντιος	X. Κατ.	2008	20	110003±14417	1,3	314,3±178,7	1,9	506,3±129,3	0,6

1: Ε. = Ευαίσθητος πληθυσμός.

2: X. Κατ. = Χημική Καταπολέμηση, Β. Κατ. = Βιολογική Καταπολέμηση.

3: Ε. Σ. = Έτος Συλλογής.

4: Οι μονάδες των GST είναι **uf/mg prot**, οι μονάδες των MFO είναι **pg 7OH/ mg prot /min** και οι μονάδες των EST είναι **nmole/mg prot/min b naphthol**.

5: M.O. = Μέσος όρος ± Τυπικό σφάλμα.

6: Σ.Α. = Ο Συντελεστής ανθεκτικότητας, δηλαδή η ενζυμική δραστηριότητα των πληθυσμών που συλλέχθηκαν από τους μηλαινές προς την ενζυμική δραστηριότητα του ευαίσθητου εργαστηριακού.

Πίνακας 7.18. Συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικών διαπαύουσων προνυμφών

Κωδικός	Περιοχή	Διαχείριση	Ε. Σ. ³	Συχνότητα%			
				GST ⁴	MFO ⁵	EST> ⁶	EST< ⁷
Ε. ¹				10,0	10,0	10,0	31,6
K5	Καστοριά	Χ. Κατ. ²	2008	20,0***	35,0***	25,0**	55,0***
K6	Καστοριά	Χ. Κατ.	2008	14,3***	42,9***	9,5 ^{ns}	90,5***
AL3	Αλεξάνδρεια	Β. Κατ.	2006	9,4 ^{ns}	31,3***	18,7 ^{ns}	81,3***
AL4	Αλεξάνδρεια	Χ. Κατ.	2006	27,3**	42,4***	15,2 ^{ns}	81,8***
AL10	Αλεξάνδρεια	Β. Κατ.	2007	6,3 ^{ns}	34,4***	15,6 ^{ns}	71,9***
AL6	Αλεξάνδρεια	Χ. Κατ.	2007	36,7***	60,0***	3,3*	90,0***
AL11	Αλεξάνδρεια	Χ. Κατ.	2007	60,0***	50,0***	3,3*	76,7***
AL12	Αλεξάνδρεια	Χ. Κατ.	2007	35,5***	45,2***	3,2*	87,1***
AL13	Αλεξάνδρεια	Χ. Κατ.	2007	48,4***	48,4***	6,5 ^{ns}	87,1***
AL14	Αλεξάνδρεια	Χ. Κατ.	2007	17,2***	55,2***	13,8 ^{ns}	79,3***
AL23	Αλεξάνδρεια	Χ. Κατ.	2008	25,0**	70,0***	5,0 ^{ns}	70,0***
AL24	Αλεξάνδρεια	Χ. Κατ.	2008	25,0**	40,0***	5,0 ^{ns}	85,0***
AL25	Αλεξάνδρεια	Χ. Κατ.	2008	28,6***	33,3***	19,8***	70,5***
AL19	Αλεξάνδρεια	Χ. Κατ.	2008	40,9***	59,1***	9,3 ^{ns}	54,5***
AL15	Αλεξάνδρεια	Χ. Κατ.	2008	20,0*	45,0***	5,0 ^{ns}	90,0***
AL26	Αλεξάνδρεια	Χ. Κατ.	2008	25,0**	25,0**	0,0***	75,0***
AGK2	Αγιοκάμπος	Β. Κατ.	2006	17,6 ^{ns}	14,7 ^{ns}	8,8 ^{ns}	91,2***
AGK4	Αγιοκάμπος	Χ. Κατ.	2007	51,6***	45,2***	9,7 ^{ns}	77,4***
AG2	Αγιά	Χ. Κατ.	2006	14,3 ^{ns}	28,6***	0,0***	85,7***
AG3	Αγιά	Χ. Κατ.	2006	15,0 ^{ns}	22,5*	5,0 ^{ns}	77,5***
AG4	Αγιά	Β. Κατ.	2006	5,1 ^{ns}	25,6**	12,8 ^{ns}	79,5***
AG5	Αγιά	Χ. Κατ.	2006	10,3 ^{ns}	6,9 ^{ns}	10,3 ^{ns}	65,5***
AG11	Αγιά	Χ. Κατ.	2007	28,1***	43,8***	9,4 ^{ns}	78,1***
AG7	Αγιά	Χ. Κατ.	2007	30,0***	36,7***	3,3 ^{ns}	93,3***
AG12	Αγιά	Χ. Κατ.	2007	15,6 ^{ns}	31,3***	15,6 ^{ns}	56,3***
AG13	Αγιά	Χ. Κατ.	2007	29,0***	32,3***	9,7 ^{ns}	80,6***
AG14	Αγιά	Χ. Κατ.	2007	44,8***	48,3***	3,5*	89,7***
AG15	Αγιά	Χ. Κατ.	2007	21,2*	24,2**	11,6 ^{ns}	66,7***
AG24	Αγιά	Χ. Κατ.	2008	13,0 ^{ns}	43,5***	13,0 ^{ns}	86,9***
AG25	Αγιά	Χ. Κατ.	2008	35,0***	45,0***	10,0 ^{ns}	65,0***
AG17	Αγιά	Χ. Κατ.	2008	38,1***	28,6***	4,8 ^{ns}	71,4***
AG26	Αγιά	Χ. Κατ.	2008	35,0***	45,0***	10,0 ^{ns}	65,0***
AG27	Αγιά	Χ. Κατ.	2008	5,0 ^{ns}	30,0***	5,0 ^{ns}	70,0***
AG16	Αγιά	Χ. Κατ.	2008	35,0***	75,0***	5,0 ^{ns}	65,0***
AGB2	Αγ. Βλάσιος	Χ. Κατ.	2008	35,0***	45,0***	15,0 ^{ns}	60,0***
AGL1	Αγ. Λαυρέντιος	Χ. Κατ.	2006	2,8*	0,0 ^{ns}	11,1 ^{ns}	88,9***
AGL3	Αγ. Λαυρέντιος	Χ. Κατ.	2007	16,7 ^{ns}	40,0***	10,0 ^{ns}	80,0***
AGL5	Αγ. Λαυρέντιος	Χ. Κατ.	2008	45,0***	5,0 ^{ns}	20,0*	65,0***

1: Ε. = Ευαίσθητος πληθυσμός.

2: Χ. Κατ. = Χημική Καταπολέμηση, Β. Κατ. = Βιολογική Καταπολέμηση.

3: Ε. Σ. = Έτος Συλλογής.

4, 5: Ποσοστά εμφάνισης ατόμων στους πληθυσμούς στα GST και MFO τα οποία εμφάνισαν ενζυμική δραστικότητα μεγαλύτερη από το 95% του ανώτερου ορίου εμπιστοσύνης του μέσου όρου του ευαίσθητου πληθυσμού (122439 **uf/mg prot** και 239,59 **pg 7OH/ mg prot /min**).

6: Ποσοστά εμφάνισης ατόμων στους πληθυσμούς στις καρβοξυλεστεράσες τα οποία εμφάνισαν ενζυμική δραστικότητα μεγαλύτερη από το 95% του ανώτερου ορίου εμπιστοσύνης του μέσου όρου του ευαίσθητου πληθυσμού (1143,73 **nmole/mg/min b naphthol**).

7: Ποσοστά εμφάνισης ατόμων στους πληθυσμούς στις καρβοξυλεστεράσες τα οποία εμφάνισαν ενζυμική δραστικότητα μικρότερη από το 95% του χαμηλότερου ορίου εμπιστοσύνης του μέσου όρου του ευαίσθητου πληθυσμού (614,80 **nmole/mg/min b naphthol**).

Διαπιστώθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ της ενζυμικής δραστηριότητας των EST και της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στο azinphos-methyl ($r = -0,600$, $df = 28$ $p < 0,001$).

Τέλος σε κανένα από τα δείγματα που εξεταστήκαν δεν παρατηρήθηκε η μεταλλαγή της τροποποιημένης ακετυλχολινεστεράσης (AChE) και η kdr ανθεκτικότητα.

7.3.3.3. Βιοχημικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας σε πληθυσμούς από οπωρώνες με διαφορετική καταπολέμηση

Διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά, των μέσων όρων της συχνότητας εμφάνισης ανθεκτικών προνουμφών πέμπτου σταδίου στα MFO, μεταξύ των βιολογικών και συμβατικών οπωρώνων ($\chi^2 = 9,457$, $df = 1$, $p = 0,002$) στην περιοχή της Αλεξάνδρειας Ημαθίας. Παρατηρήθηκε υψηλότερη συχνότητα στους πληθυσμούς που προήλθαν από συμβατικούς οπωρώνες. Χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης προνουμφών που χαρακτηρίστηκαν ως (EST<) διαπιστώθηκε στους πληθυσμούς που προήλθαν από βιολογικούς οπωρώνες στην περιοχή της Αγίας Λάρισας και παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ οπωρώνων ($\chi^2 = 5,213$, $df = 1$, $p = 0,022$).

Παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά, των μέσων όρων της συχνότητας εμφάνισης ανθεκτικών διαπαύουσων προνουμφών στα MFO, μεταξύ των βιολογικών και συμβατικών οπωρώνων ($\chi^2 = 4,668$, $df = 1$, $p = 0,030$) στην περιοχή της Αλεξάνδρειας και στην περιοχή της Αγίας ($\chi^2 = 7,091$, $df = 1$, $p = 0,008$). Επίσης στατιστικώς σημαντική διαφορά διαπιστώθηκε και στην GST και στις δύο περιοχές (Αλεξάνδρεια $\chi^2 = 18,839$, $df = 1$, $p < 0,001$, Αγία $\chi^2 = 7,461$, $df = 1$, $p = 0,006$). Η υψηλότερη συχνότητα παρατηρήθηκε στους πληθυσμούς που προήλθαν από συμβατικούς οπωρώνες. Όμως χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης προνουμφών που χαρακτηρίστηκαν ως (EST>) διαπιστώθηκε στους πληθυσμούς που προήλθαν από συμβατικούς οπωρώνες στην περιοχή της Αγίας Λάρισας και παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των οπωρώνων ($\chi^2 = 4,734$, $df = 1$, $p = 0,029$).

7.4. Συζήτηση

7.4.1. Επίπεδο Ανθεκτικότητας

Στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε η ανάπτυξη ανθεκτικότητας, κυρίως στα οργανοφωσφορικά (azinphos – methyl, chlorpyrifos – methyl, phosalone) και πυρεθροειδή εντομοκτόνα (deltamethrin), στο *C. pomonella* στις κύριες μηλοπαραγωγικές περιοχές της Ελλάδας. Στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα το ποσοστό των μη ευαίσθητων πληθυσμών κυμάνθηκε από 83,8% μέχρι 100%, για τα διάφορα στάδια του εντόμου που μελετήθηκαν (Πίνακας 7.14). Ο μεγαλύτερος αριθμός ανθεκτικών πληθυσμών παρατηρήθηκε στο azinphos – methyl. Ποσοστό μεγαλύτερο από 91,7% των πληθυσμών που εξετάστηκαν στο deltamethrin αποδείχθηκαν ανθεκτικοί.

Ανθεκτικότητα διαπιστώθηκε στους ρυθμιστές ανάπτυξης όπως στο diflubenzuron, triflumuron και tebufenozide. Στο πρώτο εντομοκτόνο το ποσοστό των ανθεκτικών πληθυσμών, ήταν από 66,6% μέχρι 92,6%. Το 96,2% των πληθυσμών που εξετάστηκαν στο triflumuron διαπιστώθηκαν μη ευαίσθητοι, ενώ στο tebufenozide ανθεκτικοί πληθυσμοί εμφανίστηκαν σε ποσοστό μεγαλύτερο από 84,2%. Στο νεονικοτινοειδές εντομοκτόνο thiacloprid τα ποσοστά των ανθεκτικών πληθυσμών κυμάνθηκαν από 50% μέχρι 89,5%. Τα εντομοκτόνα με την υψηλότερη αποτελεσματικότητα ήταν το methoxyfenozide και το fenoxycarb. Ο μεγαλύτερος αριθμός ανθεκτικών πληθυσμών παρατηρήθηκε κυρίως στην Αλεξάνδρεια Ημαθίας.

Η μειωμένη αποτελεσματικότητα του azinphos – methyl στον έλεγχο της καρπόκαψας έχει διαπιστωθεί στις κύριες μηλοπαραγωγικές περιοχές ανά τον κόσμο όπως στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (Dunley & Welter 2000), στην Αυστραλία, (Thwaite *et al.* 1993), στην Νοτιοανατολική Γαλλία (Sauphanor *et al.* 1998), στην Ισπανία (Bosch *et al.* 1999), στο Ισραήλ (Reuveny & Cohen 2004), στην Νότια Αφρική (Giliomee & Riedl 1998), και στην Χιλή (Reyes *et al.* 2004). Επίσης, η ανθεκτικότητα στο deltamethrin καθώς και στους ρυθμιστές ανάπτυξης έχει παρατηρηθεί σε πολλές χώρες (Sauphanor *et al.* 2000, Reuveny & Cohen, 2004, Timm *et al.* 2006, Reyes *et al.* 2007, Stará & Kocourek, 2007, Ioriatti *et al.* 2007).

Διαφορές παρατηρήθηκαν ως προς την ανθεκτικότητα μεταξύ των διαφορετικών σταδίων της καρπόκαψας. Στις νεαρές προνύμφες παρατηρήθηκε ο μεγαλύτερος αριθμός των ευαίσθητων πληθυσμών σε σύγκριση με τους πληθυσμούς που προήλθαν από διαπαύουσες και προνύμφες πέμπτου σταδίου. Οι Reuveny & Cohen (2006), διαπίστωσαν ότι η θνησιμότητα στο azinphos-methyl μειώθηκε στα μεγαλύτερα προνυμφιακά στάδια σε σχέση με τις νεαρές προνύμφες. Επίσης οι Reyes & Sauphanor (2008), κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι διαπαύουσες προνύμφες εμφανίζουν υψηλότερη ανθεκτικότητα από τις νεαρές προνύμφες. Επίσης, μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στις προνύμφες πέμπτου σταδίου σε σχέση με τις νεαρές διαπιστώθηκε στο teflubenzuron και deltamethrin (Bouvier *et al.* 2002).

7.4.2. Διασταυρούμενη Ανθεκτικότητα

Στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε διασταυρούμενη ανθεκτικότητα μεταξύ των azinphos-methyl – phosalone – deltamethrin – diflubenzuron – thiacloprid – tebufenozide – fenoxycarb – methoxyfenozide. Δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των azinphos-methyl και chlorpyrifos-methyl. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με προγενέστερες μελέτες με πληθυσμούς του εντόμου από την Γαλλία και Αρμενία οι οποίοι διαπίστωσαν διασταυρούμενη ανθεκτικότητα μεταξύ των επτά προαναφερθέντων εντομοκτόνων (Sauphanor *et al.* 1998b, Sauphanor *et al.* 1998c, Reyes *et al.* 2007). Οι Reuveny & Cohen (2004), παρατήρησαν σε ανθεκτικούς πληθυσμούς στο azinphos-methyl, από το Ισραήλ ανθεκτικότητα στο methoxyfenozide χωρίς προγενέστερη εφαρμογή που πιθανώς οφείλεται σε διασταυρούμενη ανθεκτικότητα. Επιπλέον δεν διαπίστωσαν διασταυρούμενη ανθεκτικότητα μεταξύ των azinphos-methyl – chlorpyrifos-methyl.

Διασταυρούμενη ανθεκτικότητα διαπιστώθηκε μεταξύ των fenoxycarb – tebufenozide – deltamethrin – diflubenzuron – thiacloprid. Τα αποτελέσματα διαφέρουν από προηγούμενες μελέτες γιατί οι Sauphanor & Bouvier (1995) διαπίστωσαν διασταυρούμενη ανθεκτικότητα μεταξύ των diflubenzuron – triflumuron – tebufenozide και fenoxycarb. Οι Stara & Kocourek (2007) παρατήρησαν διασταυρούμενη ανθεκτικότητα σε πληθυσμούς από την Τσέχικη Δημοκρατία στο fenoxycarb και phosalone. Στην παρούσα μελέτη δεν διαπιστώθηκε διασταυρούμενη ανθεκτικότητα μεταξύ των δύο αυτών εντομοκτόνων.

Επίσης, παρατηρήθηκε διασταυρούμενη ανθεκτικότητα μεταξύ των triflumuron – thiacloprid – tebufenozide – phosalone – deltamethrin – diflubenzuron, αλλά δεν διαπιστώθηκε μεταξύ των triflumuron και fenoxycarb την οποία διαπιστώσαν οι Sauphanor & Bouvier (1995). Τέλος παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ των ανθεκτικών πληθυσμών στα chlorpyrifos-methyl, diflubenzuron, thiacloprid, methoxyfenozide, tebufenozide αλλά ο συντελεστής συσχέτισης σε όλες τις περιπτώσεις ήταν μικρός ($p = 0,392-0,466$) (Πίνακας 7.11.).

7.4.3. Βιοχημική Βάση Ανθεκτικότητας

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της δραστηριότητας των MFO και της ανθεκτικότητας στις προνύμφες πέμπτου σταδίου που συλλέχθηκαν κατά την διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου, σε όλες τις δραστικές ουσίες που μελετήθηκαν εκτός από το triflumuron, tebufenozide και phosalone. Θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ της ανθεκτικότητας στα thiacloprid, deltamethrin, diflubenzuron, phosalone, tebufenozide και της συχνότητας των προνυμφών που εμφάνισαν τιμές χαμηλότερες από το χαμηλότερο 95% του ορίου εμπιστοσύνης του μέσου όρου του ευαίσθητου εργαστηριακού πληθυσμού, βάσει της ενζυμικής δραστηριότητας των καρβοξυλεστερασών (EST<). Στις διαπαύουσες προνύμφες διαπιστώθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της δραστηριότητας των MFO και της ανθεκτικότητας σε όλες τις δραστικές ουσίες. Διαπιστώθηκε αρνητική συσχέτιση με τη δραστηριότητα των EST και της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στο azinphos-methyl. Τέλος δεν παρατηρήθηκε καμιά επίδραση της δραστηριότητας της GST στην εμφάνιση ανθεκτικότητας σε κανένα εντομοκτόνο. Διαπιστώθηκε ότι ο κύριος ενζυμικός μηχανισμός που μετέχει στην εμφάνιση ανθεκτικότητας και στα δύο στάδια του εντόμου, είναι η αυξημένη δραστηριότητα των MFO.

Οι Reyes *et al* (2007) διαπίστωσαν θετική συσχέτιση σε πληθυσμούς που προέρχονταν από την Γαλλία, Ιταλία Ελβετία και Ισπανία, μεταξύ της εμφάνισης ανθεκτικότητας στο azinphos-methyl και της αυξημένης δραστηριότητας των MFO, της GST και αρνητική συσχέτιση μεταξύ της ανθεκτικότητας και της δραστηριότητας των EST. Πληθυσμοί ανθεκτικοί στο azinphos-methyl από την Χιλή παρουσίασαν θετική συσχέτιση με την GST αλλά τα MFO και οι EST δεν σχετίστηκαν με την ανθεκτικότητα (Fuentes-Contreras *et al.* 2007). Η ανθεκτικότητα στην ίδια δραστική ουσία σε πληθυσμούς από την Αργεντινή σχετίστηκε μονό με τις

αυξημένες EST (Soleño *et al.* 2008). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης καταδεικνύουν θετική συσχέτιση μεταξύ της εμφάνισης ανθεκτικότητας στο azinphos-methyl και της δραστικότητας της MFO και αρνητική συσχέτιση με τη δραστικότητα των EST. Επιπλέον σε διαφορά εντομοκτόνα παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της εμφάνισης ανθεκτικότητας και αυξημένης συχνότητας των (EST<).

Οι Bouvier *et al.* (2002) διαπίστωσαν ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ των GST και MFO και της ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν με αυτή την διαπίστωση. Επιπλέον, προέκυψε ότι η ανθεκτικότητα στο diflubenzuron σχετίζεται θετικά με την δραστικότητα των MFO. Στην ίδια διαπίστωση κατέληξαν και οι Reyes *et al.* (2007).

Διαπιστώθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της ανθεκτικότητας στο chlorpyrifos-methyl και της δραστικότητας των MFO. Σε πληθυσμούς από την Γαλλία, Ιταλία, Ελβετία και Ισπανία η ανθεκτικότητα στην ίδια δραστική ουσία δεν σχετίστηκε με κανέναν από τους παραπάνω βιοχημικούς μηχανισμούς (Reyes *et al.* 2007).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν θετική συσχέτιση της αυξημένης δραστικότητας των MFO με την ανθεκτικότητα στο tebufenozide σε διαπαύουσες προνύμφες, ενώ οι Reyes *et al.* (2007) διαπιστώσαν ότι η ανθεκτικότητα στο tebufenozide σχετίζονταν θετικά με τη δραστικότητα των MFO και αρνητικά με την δραστικότητα των EST.

Η ανθεκτικότητα στο thiacloprid σχετίζεται θετικά με την δραστικότητα των MFO. Οι Reyes *et al.* (2007) διαπίστωσαν ότι οι EST και MFO εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα του thiacloprid. Για τα έντομα *Plutella xylostella* (Linnaeus). (Lepidoptera: Plutellidae) και *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyroidae) παρατηρήθηκε ότι οι EST προσδίδουν ισχυρή ανθεκτικότητα στα νεονικοτινοειδή (Ninsin & Tanaka 2005, Nauen *et al.* 2003). Στο *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Insecta: Coleoptera: Chrysomelidae) προτείνεται ότι εκτός από τα MFO στην ανθεκτικότητα στα νεονικοτινοειδή εμπλέκονται και άλλοι μηχανισμοί (Mota-Sanchez *et al.* 2006).

Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ως προς την επίδραση των ενζυμικών μηχανισμών στην εμφάνιση ανθεκτικότητας σε σχέση με άλλες μελέτες πιθανώς να οφείλεται στο ότι οι πληθυσμοί συλλέχθηκαν από διαφορετικές χώρες. Οι πληθυσμοί από διαφορετικές χώρες πιθανώς περιέχουν γενότυπους με διαφορετικά χαρακτηριστικά ανθεκτικότητας και λόγω

της πιθανής μειωμένης γονιδιακής ροής δείχνουν διαφορετικό πρότυπο ανθεκτικότητας.

Η συσχέτιση της μειωμένης ενεργότητας των καρβοξυλ-εστερασών με την εμφάνιση ανθεκτικότητας στα οργανοφωσφωρικά εντομοκτόνα, παρόλο που εκ πρώτης όψεως φαίνεται αντιφατική, έχει περιγραφεί βιοχημικά σε διάφορα έντομα όπως στο *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Townsend & Busvine, 1969) στο *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Beeman & Schmidt, 1982), στο *Plodia interpunctella* (Hübner) (Tabashnik, 1991) και σε πληθυσμούς καρπόκαψας από την Αρμενία (Reyes *et al.* 2007). Αρχικά, η υπόθεση που είχε διατυπωθεί για την αιτιολόγηση αυτού του φαινομένου ήταν ότι, λόγω μεταλλαγής, η κύρια εστεράση είχε τροποποιηθεί έτσι ώστε να εμφανίζει μειωμένη ενεργότητα για το μη ειδικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται κατά τη μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας και αυξημένη για το εντομοκτόνο («mutant ali-esterase» hypothesis, 12-18 από το Newcomb *et al.* 1997). Αργότερα, μέσω στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης της βουτυρυλ-χολινεστεράσης του ανθρώπου δείχθηκε και πειραματικά ότι μία τέτοια αλλαγή ως προς την ειδικότητα για το υπόστρωμα είναι εφικτή (19 από το Newcomb 1997). Η επιβεβαίωση της παραπάνω υπόθεσης πραγματοποιήθηκε με την ταυτοποίηση μίας αμινοξικής αλλαγής (Gly137Asp) στο ενεργό κέντρο της εστεράσης E3 του *Lucilia cuprina* που οδηγεί σε ενεργότητα, μειωμένη για τα τεχνητά υποστρώματα α-NA, ρ-NPA και MtB αλλά αυξημένη για το οργανοφωσφωρικό CVP.

Πιθανώς, μία τέτοια λειτουργικά ανάλογη μεταλλαγή στο ορθόλογο γονίδιο της καρπόκαψας να αποτελεί την μοριακή εξήγηση της αρνητικής συσχέτισης που βρέθηκε. Αυτό θα μπορούσε να ελεγχθεί με PCR με τους εκκινητές του *Lucilia cuprina* ή με τροποποιημένους εκκινητές σε cDNA ή σε γενωμικό DNA (εφόσον υβριδοποιούνται στο ίδιο εξόνιο) καρπόκαψας και αλληλούχηση του προϊόντος τόσο σε ευαίσθητα άτομα όσο και σε ανθεκτικά που εμφανίζουν τη συγκεκριμένη μειωμένη ενζυμική ενεργότητα (Newcomb *et al.* 1997).

7.4.4. Βιοχημικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του εντόμου

Διαφορές παρατηρηθήκαν μεταξύ των δύο σταδίων, στην επίδραση των MFO στην ανθεκτικότητα στο phosalone και στο tebufenozide. Στις διαπαύουσες διαπιστώθηκε θετική συσχέτιση ενώ στις προνύμφες πέμπτου σταδίου καμιά

συσχέτιση. Επίσης, στους πληθυσμούς των διαπαύουσων προνυμφών παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση της ενζυμικής δραστηριότητας των EST και ανάπτυξης της ανθεκτικότητας στο azinphos-methyl. Στις προνύμφες πέμπτου σταδίου δεν διαπιστώθηκε καμιά επίδραση των EST. Τέλος, σε κανένα από τα εντομοκτόνα στα οποία διαπιστώθηκε θετική συσχέτιση με την αυξημένη συχνότητα των (EST<), στις προνύμφες πέμπτου σταδίου δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση στις διαπαύουσες προνύμφες.

Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στους πιθανούς ενζυμικούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας, πιθανόν να οφείλονται στα διαφορετικά στάδια του εντόμου που μελετήθηκαν (ενήλικα τα οποία προέκυψαν από προνύμφες πέμπτου σταδίου κατά την διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου και ενήλικα τα οποία προήλθαν από διαπαύουσες προνύμφες). Οι Reyes και Saurehanor 2008 διαπίστωσαν ότι οι τιμές των MFO, GST και EST ήταν υψηλότερες στα ενήλικα σε σχέση με τις νεαρές και διαπαύσες προνύμφες. Οι Bouvier *et al.* 2002, παρατήρησαν ότι στις νεαρές προνύμφες τα MFO ήταν αυξημένα σε σχέση με τις προνύμφες πέμπτου σταδίου. Οι Usmani και Knowles 2001 όμως διαπίστωσαν ότι οι τιμές των EST με υπόστρωμα α- και β-naphyl acetate ήταν υψηλότερες στις προνύμφες των *Agrotis ipsilon* (Hufn) και *Spodoptera frugiperda* (Smith) σε σχέση με τα ενήλικα.

7.4.5. Μοριακή Βάση ανθεκτικότητας

Σε κανέναν πληθυσμό δεν παρατηρήθηκε εμφάνιση γενοτύπων με τροποποιημένη ακετυλχολινεστεράση (AChE) και kdr ανθεκτικότητα. Οι γενότυποι με τροποποιημένη AChE προσδίδουν ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά και στα καρβαμιδικά εντομοκτόνα (Mutero *et al.* 1994, Villate *et al.* 2000). Επομένως, η ανθεκτικότητα σε αυτά τα εντομοκτόνα που καταγράφηκε, στους Ελληνικούς πληθυσμούς οφείλεται σε άλλον μηχανισμό και ο πιο πιθανός είναι η αυξημένη δραστηριότητα των MFO (Bouvier *et al.* 2002, Reyes *et al.* 2007, Fuentes *et al.* 2007).

Επίσης η εμφάνιση ανθεκτικών γενοτύπων της kdr προσδίδουν ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή (Brun-Barale *et al.* 2005). Όμως παρόλο που ανιχνεύθηκαν ανθεκτικοί πληθυσμοί στο deltamethrin δεν παρατηρήθηκε κανένα δείγμα με την μετάλλαξη. Ο πιο πιθανός μηχανισμός ανθεκτικότητας είναι και σε αυτή την περίπτωση η αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα. Το ίδιο συμπέρασμα προέκυψε και

από προγενέστερες εργασίες σε πληθυσμούς από άλλες χώρες (Sauphanor *et al.* 1997, Bouvier *et al.* 2002, Reyes *et al.* 2007).

7.4.6. Ανθεκτικότητα σε πληθυσμούς από οπωρώνες με διαφορετική καταπολέμηση

Στους πληθυσμούς που συλλέχθηκαν από βιολογικούς οπωρώνες παρατηρήθηκε υψηλότερο ποσοστό θνησιμότητας στα περισσότερα εντομοκτόνα σε σχέση με τους πληθυσμούς που προήλθαν από συμβατικούς οπωρώνες (Πίνακες 7.8, 7.10). Επίσης στους περισσότερους πληθυσμούς που προήλθαν από βιολογικούς οπωρώνες διαπιστώθηκε μικρότερη δραστικότητα των MFO σε σχέση με τους συμβατικούς και στα δύο στάδια του εντόμου που εξετάστηκαν.

Τα αποτελέσματα συμφωνούν με προγενέστερη μελέτη των Reuveny & Cohen (2004), στην οποία παρατήρησαν ότι η ανθεκτικότητα ήταν υψηλότερη στους πληθυσμούς που συλλέχθηκαν από συμβατικούς, μέτρια στους πληθυσμούς από οπωρώνες στους οποίους εφαρμόζονταν πρόγραμμα ολοκληρωμένης διαχείρισης και χαμηλότερη στους βιολογικούς. Επιπλέον οι Reyes *et al.* (2008) διαπίστωσαν ότι σε πληθυσμούς που συλλέχθηκαν από συμβατικούς οπωρώνες παρατηρήθηκε υψηλότερη δραστικότητα των MFO. Η διαπίστωση αυτή συμφωνεί με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης και ενισχύει την υπόθεση ότι η αυξημένη δραστικότητα των MFO συμβάλλει στην εμφάνιση ανθεκτικότητας.

7.4.7. Πρακτικές προεκτάσεις

Από την παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε η εμφάνιση ανθεκτικότητας στις κυρίες μηλοπαραγωγικές περιοχές της Ελλάδας κυρίως στα οργανοφωσφορικά και πυρεθροειδή εντομοκτόνα του εντόμου *C. pomonella*. Παρατηρήθηκε επίσης ανθεκτικότητα σε ρυθμιστές ανάπτυξης εντόμων και νεονικοτινοειδή. Ανιχνεύτηκε η ύπαρξη διασταυρούμενης ανθεκτικότητας στα περισσότερα εντομοκτόνα. Παρατηρήθηκε ότι ο κύριος μηχανισμός εμφάνισης ανθεκτικότητας είναι η αυξημένη δραστικότητα των MFO και συμπληρωματικά η αυξημένη συχνότητα των (EST<). Επίσης, διαπιστώθηκε ότι στο methoxyfenozide δεν έχει εμφανιστεί ακόμα υψηλή ανθεκτικότητα.

Τα στοιχεία που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη μπορεί να συμβάλουν σε προγράμματα ολοκληρωμένης διαχείρισης του *C. pomonella* και να βοηθήσουν στην κατανόηση του μεγέθους της ανθεκτικότητας στην Ελλάδα.

8. Ικανότητα διασπορά της καρπόκαψας και γενετική δομή πληθυσμών της

8.1. Εισαγωγή

Η καρπόκαψα παρουσιάζει ευρύτατη γεωγραφική εξάπλωση και συναντάται στις κυρίες μηλοπαραγωγικές περιοχές του κόσμου, γεγονός που οφείλεται στη δυνατότητα του εντόμου να προσαρμόζεται σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες (Barnes 1991). Καθοριστικό ρόλο στην προσαρμογή αυτή έχει η αναπαραγωγική ικανότητα σε ποικιλία κλιματικών συνθηκών και ξενιστών (Thaler *et al.* 2008). Εντυπωσιακή είναι η προσαρμογή του βιολογικού της κύκλου και του χρόνου διάπασής της κατά την εγκατάστασή της σε περιοχές των δύο ημισφαιρίων με αντίθετες εποχές (Salazar 1984).

Η γενετική σύσταση των πληθυσμών του εντόμου εξαρτάται από τη σύσταση των οπωρώνων που αποικεί, τη γεωγραφική απομόνωση των βιοτόπων της και την επιλογή των ξενιστών (Thaler *et al.* 2008, Chen & Dorn 2009). Επιπλέον, ένας σημαντικός παράγοντας που κατά περίπτωση μπορεί να μεταβάλει τη γενετική σύσταση και να τροποποιήσει τις συχνότητες αλληλομόρφων είναι οι επαναλαμβανόμενες εφαρμογές φυτοπροστατευτικών ουσιών (Franck *et al.* 2007). Επίσης, το ποσοστό της γονιδιακής ροής μεταξύ των πληθυσμών, εξαρτάται τόσο από την ικανότητα πτήσης των ενηλίκων όσο και από την ανθρώπινη δραστηριότητα, που συμβάλει στην παθητική μεταφορά του εντόμου (Fuentes-Contreras *et al.* 2007).

Για τη βελτίωση προγραμμάτων ολοκληρωμένης καταπολέμησης αποφασιστικό ρόλο παίζουν οι πληροφορίες των εντόμων-εχθρών από μελέτες γενετικής διαφοροποίησης των πληθυσμών (Denholm & Rowland 1992, Miller *et al.* 2003; Endersby *et al.* 2006). Στο ίδιο πλαίσιο, σημαντική είναι η εκτίμηση του ποσοστού της γονιδιακής ροής καθώς μπορεί να εκτιμήσει την απόσταση διασποράς. Η ικανότητα διασποράς επηρεάζει τη διάδοση γονιδίων ανθεκτικότητας και την αποτελεσματικότητα προγραμμάτων καταπολέμησης με απελευθερώσεις στειρών εντόμων (Timm *et al.* 2006).

Τα αποτελέσματα από προγενέστερες μελέτες για τη γενετική σύσταση των πληθυσμών της καρπόκαψας, σε διαφορετικές περιοχές του κόσμου, είναι αντιφατικά. Η ανάλυση γαλλικών πληθυσμών με χρήση αλλοενζύμων, που συλλέχθηκαν από οπωρώνες με μήλα, αχλάδια και καρύδια διαπίστωσαν υψηλό

βαθμό ομοιότητας μεταξύ τους (Buès *et al.* 1995). Βέβαια, αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στα αλλοένζυμα που εμφανίζουν αργό ρυθμό εξέλιξης και μικρότερη ευαισθησία σε σχέση με μοριακούς δείκτες που βασίζονται στο DNA. Ωστόσο, στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Franck *et al.* (2007) για πληθυσμούς της Γαλλίας παρόλο που χρησιμοποίησαν στην ανάλυσή τους επτά μικροδορυφορικούς γενετικούς δείκτες. Παρομοίως, χαμηλή γενετική διαφοροποίηση βρέθηκε σε πληθυσμούς από κύριες μηλοπαραγωγικές περιοχές της Χιλής. Η ανάλυση βασίστηκε σε πέντε μικροδορυφορικούς γενετικούς δείκτες, και αποκάλυψε υψηλή γονιδιακή ροή ακόμα και σε περιπτώσεις που η απόσταση μεταξύ των οπωρώνων ήταν μεγαλύτερη από 185 Km (Fuentes-Contreras *et al.* 2007).

Από την άλλη, οι Thaler *et al.* (2008) που μελέτησαν πληθυσμούς της Ιταλίας, Αυστρίας και Γερμανίας με δείκτες AFLP, διαπίστωσαν υψηλό βαθμό γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ τους, ακόμα και σε μικρή γεωγραφική κλίμακα. Επίσης, σε μελέτη πληθυσμών από την Νοτιο Αφρική με AFLPs, παρόλο που δεν παρατηρήθηκε γενετική διαφοροποίησή τους μεταξύ διαφορετικών ξενιστών, βρέθηκε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ πληθυσμών από μηλιά ακόμη και στην περίπτωση που η απόσταση των οπωρώνων ήταν μικρότερη του 1 Km (Tim *et al.* 2006). Τέλος, σημαντική γενετική διαφοροποίηση παρατηρήθηκε σε πληθυσμούς του εντόμου από διαφορετικούς ξενιστές και μεταξύ οπωρώνων μηλιάς στην Ελβετία με ανάλυση βασισμένη σε μικροδορυφόρους (Chen & Dorn 2009).

Η γονιδιακή ροή συνδέεται άμεσα με τη μετανάστευση, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές των συχνοτήτων των αλληλομόρφων αλλά και στην εμφάνιση νέων αλληλομόρφων στη γενετική δεξαμενή ενός πληθυσμού. Έτσι, η γονιδιακή ροή εμφανίζεται μειωμένη σε πληθυσμούς σχετικά μη μεταναστευτικών ειδών (Peterson & Denno 1998, Loxdale & Lushai 2001).

Η αξιολόγηση την μετανάστευσης και της ικανότητας πτήσης του *C. pomonella* μπορεί να προσδιοριστεί με διάφορες προσεγγίσεις. Ένας τρόπος είναι οι εξαπολύσεις σημασμένων ατόμων και η παρακολούθηση των συλλήψεών τους σε φερομονικές παγίδες (Keil *et al.* 2001). Οι Mani & Wildbolz (1977) διαπίστωσαν ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των εξαπολυθέντων αρσενικών ατόμων συλλήφθηκε εκ νέου στις φερομονικές παγίδες που ήταν τοποθετημένες σε ακτίνα 60 μέτρων από το σημείο εξαπόλυσης. Ένα πολύ μικρό ποσοστό εντοπίστηκε 11 χιλιόμετρα από το σημείο εξαπόλυσης.

Η αξιολόγηση της ικανότητας πτήσης και των δύο φύλων πραγματοποιήθηκε πρώτη φορά από τους Keil *et al.* (2001) οι οποίοι εξαπέλυσαν σημασμένα αρσενικά και θηλυκά άτομα. Οι συλλήψεις των αρσενικών πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση φερομονικών παγίδων, ενώ για τα θηλυκά χρησιμοποιήθηκαν «φωτεινές παγίδες». Αξιολογήθηκαν δύο πληθυσμοί για κάθε φύλο, μετά από επιλογή στο εργαστήριο βασισμένη στην κινητική δραστηριότητα. Ο πληθυσμός με την υψηλότερη κινητική δραστηριότητα χαρακτηρίστηκε ως «κινητικός» και ο πληθυσμός με την μικρότερη ως «στατικός». Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι το 50,6% των αρσενικών «κινητικών» ατόμων και το 60,2% του «στατικού» πληθυσμού, συλλήφθησαν εκ νέου στις φερομονικές παγίδες που ήταν τοποθετημένες στα 75 μέτρα. Αντίθετα, μόνο το 3,6% των «κινητικών» ατόμων και το 1,1% των ατόμων του «στατικού» πληθυσμού συλλήφθησαν στα 550 μέτρα. Επίσης, κανένα θηλυκό άτομο δεν συλλήφθηκε εκ νέου στις «φωτεινές παγίδες». Ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι δεν μπορούν να εκτιμήσουν τη συμβολή των μεταναστών στους τοπικούς πληθυσμούς, δεδομένου ότι η μετανάστευση δεν οδηγεί πάντα σε επιτυχή αποίκιση (Charuis *et al.* 2009).

Ένας εναλλακτικός τρόπος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ικανότητας πτήσης του εντόμου ήταν ο «μύλος πτήσης», μία διάταξη προσομοίωσης που καταγράφει στο εργαστήριο την πτήση του εντόμου (Shumacher *et al.* 1997b). Έτσι, διαπιστώθηκε ότι η καρπόκαφα μπορεί να πετάξει σε απόσταση μεγαλύτερη των 8 χιλιομέτρων και ότι η ικανότητα πτήσης ήταν παρόμοια στα θηλυκά και τα αρσενικά άτομα. Συγκεκριμένα, καταγράφηκε ότι το 16,7% των παρθένων και το 10% των συζευγμένων αρσενικών, κάλυψαν απόσταση 5Km, ενώ την ίδια απόσταση κάλυψαν το 20% των παρθένων και το 7,4% των συζευγμένων θηλυκών ατόμων.

Μια εναλλακτική προσέγγιση για τη μελέτη της μετανάστευσης είναι η χρήση μοριακών δεικτών DNA, όπως οι μικροδορυφόροι. Αυτοί παρέχουν μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα εντός και μεταξύ των πληθυσμών, λόγω της ιδιότητάς τους να κληρονομούνται ως συνυπερέχοντες μεντελικοί δείκτες, γεγονός που καθιστά εφικτή τη διάκριση αλληλομόρφων πατρικής και μητρικής προέλευσης (Goldstein *et al.* 1995).

Στην Ελλάδα δεν έχει πραγματοποιηθεί ως τώρα κάποια γενετική πληθυσμιακή μελέτη της καρπόκαφας. Η καλλιέργεια του μήλου κατανέμεται σε όλη την ηπειρωτική Ελλάδα σε περιοχές με διαφορετικές κλιματικές και περιβαλλοντικές

συνθήκες. Επίσης, σε πολλές περιπτώσεις υπάρχει συγκαλλιέργεια και με άλλους ξενιστές του εντόμου. Αυτοί οι διαφοροποιημένοι βιότοποι της καρπόκαψας μπορούν να παρέχουν ευκαιρίες για υποδιαιρέσεις των πληθυσμών σε τοπικά προσαρμοσμένους πληθυσμούς.

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η μελέτη της γονιδιακής ροής και της μετανάστευσης του εντόμου που επηρεάζουν τη διασπορά δυνητικώς ανθεκτικών ατόμων, ώστε να επιλεγούν συγκεκριμένοι μέθοδοι φυτοπροστασίας, πιθανώς διαφορετικές για κάθε ξενιστή του εντόμου ή γεωγραφική περιοχή. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με ανάλυση μικροδορυφόρων σε πληθυσμούς της καρπόκαψας από διαφορετικές γεωγραφικές μηλοπαραγωγικές περιοχές της Ελλάδος καθώς και από διαφορετικούς ξενιστές όπως η καρυδιά και η αχλαδιά. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη Ελληνικών πληθυσμών και πληθυσμών προερχόμενων από διαφορετικούς ξενιστές από τη Νότια Γαλλία. Τέλος, η μελέτη της διασποράς του εντόμου πραγματοποιήθηκε με την εξαπόλυση και επανασυλλογή σημασμένων αρσενικών και θηλυκών ατόμων καθώς και με τον προσδιορισμό του βαθμού συγγένειας μεταξύ συλληφθέντων ατόμων σε δύο γειτονικούς οπωρώνες με χρήση μικροδορυφορικών δεικτών DNA.

8.2. Υλικά και Μέθοδοι

8.2.1. Αξιολόγηση ικανότητας διασποράς με εξαπόλυση σημασμένων ατόμων

Τα έτη 2007-2008 πραγματοποιήθηκε στην περιοχή της Αγίας Λάρισας πείραμα εξαπολύσεων σημασμένων αρσενικών και θηλυκών ατόμων *C. pomonella* που είχε ως στόχο τη μελέτη της διασποράς του εντόμου. Η παρακολούθηση πραγματοποιήθηκε με παγίδες τύπου Δέλτα που περιείχαν σεξουαλικές φερομόνες και καΐρομόνες.

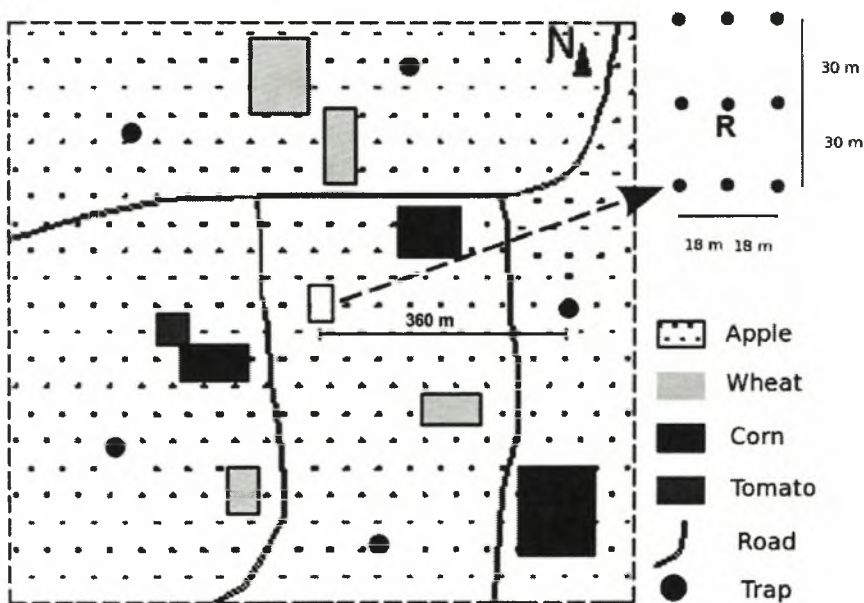
8.2.1.1. Πειραματικό σχέδιο έτους 2007

Το έτος 2007, το πείραμα διήρκησε από τις 11 Ιουνίου έως τις 26 Αυγούστου. Ο πληθυσμός του εντόμου που χρησιμοποιήθηκε προερχόταν από το INRA Research Centre στην Avignon Γαλλίας. Οι συνθήκες εκτροφής του πληθυσμού περιγράφονται στο δεύτερο κεφάλαιο. Ο διαχωρισμός μεταξύ θηλυκών και

αρσενικών ατόμων λάμβανε χώρα στο στάδιο της νύμφης βάσει του αριθμού των τεσσάρων ή τριών κοιλιακών διαφραγμάτων αντίστοιχα (Bathon *et al.* 1991).

Η παρακολούθηση της διασποράς των εντόμων έγινε με την καταγραφή των συλλήψεων σημασμένων αρσενικών και θηλυκών, σε κολλητικές παγίδες τύπου Δέλτα (Pherocon[®] IIB, Trece Inc., Salinas). Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν 54 παγίδες με εξατμιστήρα που περιείχε 0,1mg σεξουαλικής φερομόνης και 0,1mg καΐρομόνης (Pherocon[®] CM-DA COMBO Caps, Trece Inc.). Ο εξατμιστήρας άλλαζε κάθε 20 ημέρες.

Το πειραματικό σχέδιο περιελάμβανε ένα τεμάχιο διαστάσεων 36 X 60m με περίπου 270 δέντρα. Μέσα ήταν τοποθετημένες σε εννιά δέντρα, παγίδες τύπου Δέλτα. Η απόσταση των παγίδων ήταν 18m μεταξύ των γραμμών και 30m επί της γραμμής φύτευσης. Στον οπωρώνα δεν εφαρμόζονταν καμιά μέθοδος καταπολέμησης (Εικόνα 8.1).



Εικόνα 8.1. Διάταξη παγίδων το έτος 2007.

R = Σημείο εξαπόλυσης.

Γύρω από το κεντρικό πειραματικό τεμάχιο ήταν τοποθετημένες σε πέντε δέντρα, στην περίμετρο ενός νοητού κύκλου με ακτίνα 360m από το σημείο εξαπόλυσης, από μία παγίδα τύπου Δέλτα. Η απόσταση μεταξύ των πέντε παγίδων ήταν περίπου 450m.

Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν έξι εξαπολύσεις για τα αρσενικά και έξι για τα θηλυκά άτομα. Κάθε εξαπόλυση περιελάμβανε 200 ενήλικα 0-2 ημερών, για κάθε φύλο. Συνολικά εξαπολύθηκαν 2.400 άτομα. Τα αρσενικά άτομα, ήταν σημασμένα με πράσινη (Radglo JST11, Radiant color N.V. Houthalen) και τα θηλυκά με πορτοκαλί χρωστική (Radglo JST43, Radiant color N.V. Houthalen). Η χρώση των ενηλικών πραγματοποιούνταν την ημέρα της εξαπόλυσης, με τη βάδισή τους σε επιφάνεια που περιείχε την κάθε χρωστική. Τα έντομα ακινητοποιήθηκαν με έκθεση σε θερμοκρασία 4°C για 5min και τοποθετήθηκαν σε χάρτινο κυτίο διαστάσεων 20 X 30 X 30cm, οι εσωτερικές επιφάνειες του οποίου ήταν καλυμμένες με τη χρωστική σε μορφή σκόνης. Η εξαπόλυση πραγματοποιούνταν κατά τις πρωινές ώρες (7-9π.μ.) με τη μεταφορά των εντόμων από το εργαστήριο.

Η χρονική διάρκεια κάθε επανάληψης ήταν έξι ημέρες και περιελάμβανε τρεις καταγραφές των συλληφθέντων εντόμων, ανά δύο ημέρες η κάθε μία. Η επιλογή των έξι ημερών βασίστηκε στο γεγονός ότι η χρονική διάρκεια κατά την οποία το έντομο παρουσιάζει τη μέγιστη ικανότητα πτήσης είναι κατά το διάστημα 2-7 ημερών από την ενηλικίωσή του (Shumacher *et al.* 1997a). Η εξαπόλυση των θηλυκών πραγματοποιούνταν δύο με τέσσερις ημέρες μετά τα αρσενικά, για αποφυγή αλληλεπίδρασης.

Οι εννιά παγίδες γύρω από το σημείο εξαπόλυσης τοποθετούνταν δύο ημέρες μετά την κάθε εξαπόλυση. Αυτό γινόταν για να δοθεί στα έντομα η δυνατότητα μετακίνησης χωρίς την επίδραση της προσελκυστικής ουσίας των παγίδων. Οι υπόλοιπες παγίδες ήταν τοποθετημένες στα σημεία συλλήψεων, όλη τη χρονική διάρκεια του πειράματος. Παράλληλα με την καταγραφή των εξαπολυθέντων ατόμων, καταγράφονταν και ο φυσικός πληθυσμός της καρπόκαψας που συλλαμβάνονταν στις παγίδες.

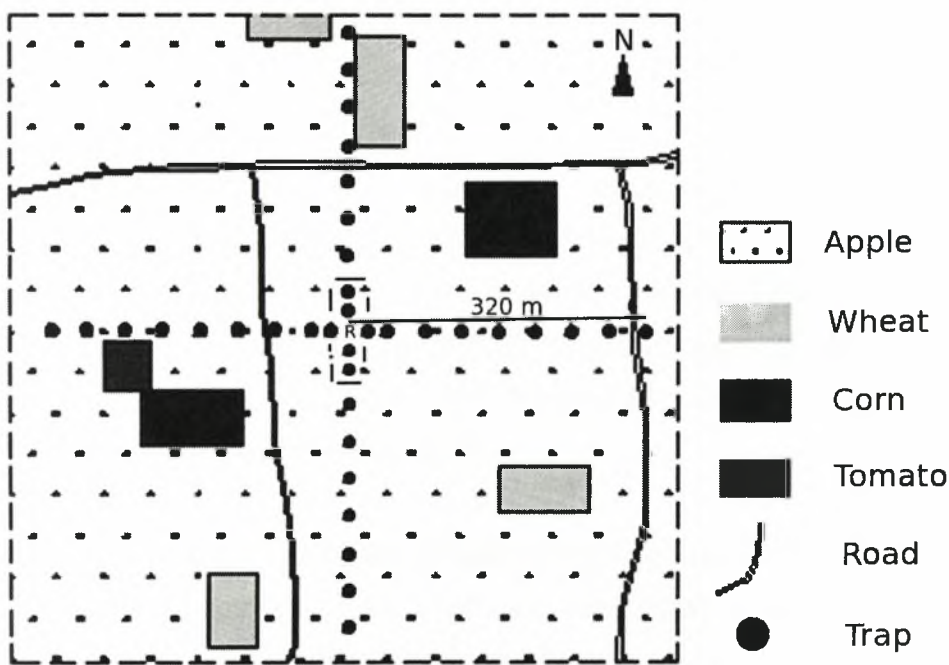
8.2.1.2. Πειραματικό σχέδιο έτους 2008

Το έτος 2008, χρησιμοποιήθηκαν τρεις πληθυσμοί: ο πρώτος ήταν ο ίδιος με το προηγούμενο έτος (ο πληθυσμός από τον INRA), ο δεύτερος ήταν πληθυσμός που συλλέχθηκε από την Αγιά Λάρισας το έτος 2007 και εκτράφηκε για ένα χρόνο σε εργαστηριακές συνθήκες και ο τρίτος πληθυσμός προήλθε από τη συλλογή προνυμφών κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου του έτους 2008. Η συλλογή των προνυμφών του τρίτου πληθυσμού πραγματοποιήθηκε από τη συλλογή προσβεβλημένων καρπών ή με χρήση παγίδων κυματοειδούς χάρτου.

Μετά την αφαίρεση από τους καρπούς, τα έντομα ολοκλήρωναν το βιολογικό τους κύκλο σε τεχνητή τροφή «Manduca Premix-Heliothis Premix» (Stonefly Industries, INC Bryan, TX, USA) σε σταθερές συνθήκες $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, $65\pm 5\%$ RH και L16:D8. Η χρονική διάρκεια του πειράματος ήταν από τις 24 Μαΐου μέχρι τις 24 Σεπτεμβρίου.

Η παρακολούθηση της διασποράς των εντόμων έγινε όπως και την προηγούμενη χρονιά με την καταγραφή των εξαπολυθέντων ατόμων στις παγίδες τύπου Δέλτα. Το έτος 2008 χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 36 παγίδες.

Η διάταξη των παγίδων παρουσιάζεται στην Εικόνα 8.2. Συγκεκριμένα, τοποθετήθηκαν εννιά παγίδες σε κάθε προσανατολισμό (Βορράς, Νότος, Ανατολή, Δύση) που σχημάτιζαν εννιά ομόκεντρους κύκλους. Ο πρώτος κύκλος είχε ακτίνα 20m από το σημείο εξαπόλυσης (R) και ο δεύτερος 40m. Οι υπόλοιποι επτά ομόκεντροι κύκλοι, είχαν ακτίνα αυξημένη κατά 40m από τον προηγούμενο.



Εικόνα 8.2. Διάταξη παγίδων το έτος 2008.

R = Σημείο εξαπόλυσης.

Συνολικά, εξαπολύθηκαν 3.600 άτομα που αντιστοιχούν σε δεκαοκτώ εξαπολύσεις, (έξι για κάθε πληθυσμό και τρεις για κάθε φύλο από κάθε πληθυσμό). Η χρώση και ο χρόνος εξαπόλυσης πραγματοποιήθηκαν όπως και

την προηγούμενη χρονιά ενώ το σημείο εξαπόλυσης καθώς και ο πρώτος ομόκεντρος κύκλος, ήταν μέσα σε οπωρώνα στον οποίο δεν εφαρμόζονταν καμιά μορφή καταπολέμησης. Ο οπωρώνας ήταν ο ίδιος μέσα στον οποίο βρίσκονταν το κεντρικό πειραματικό τεμάχιο της προηγούμενης χρονιάς.

Η χρονική διάρκεια κάθε επανάληψης ήταν έξι ημέρες, και περιλάμβανε τρεις καταγραφές των συλληφθέντων εντόμων, ανά δύο ημέρες η κάθε μία. Η εξαπόλυση των δύο φύλων πραγματοποιούνταν ξεχωριστά και η διαφορά μεταξύ τους ήταν δύο με τέσσερις ημέρες. Στον πρώτο ομόκεντρο κύκλο, οι παγίδες τοποθετούνταν δυο ημέρες μετά την κάθε εξαπόλυση για το λόγο που προαναφέρθηκε. Οι υπόλοιπες παγίδες ήταν τοποθετημένες στα σημεία συλλήψεων όλη τη χρονική διάρκεια του πειράματος. Όπως και την προηγούμενη χρονιά, παράλληλα με την καταγραφή των εξαπολυθέντων ατόμων καταγράφονταν και ο φυσικός πληθυσμός της καρπόκαψας που συλλαμβάνονταν στις παγίδες.

8.2.1.3. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το στατιστικό πακέτο STATISTICA 7.0 (StatSoft® Ins. USA). Οι συγκρίσεις των μέσων όρων των συλλήψεων στις παγίδες έγινε με ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) και συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το πλήρες τυχαιοποιημένο σχέδιο με ομάδες (RCBD). Τα δεδομένα μετατράπηκαν πριν την ανάλυση σύμφωνα με τον τύπο $\sqrt{x+1}$ λόγω της ύπαρξης μηδενικών τιμών.

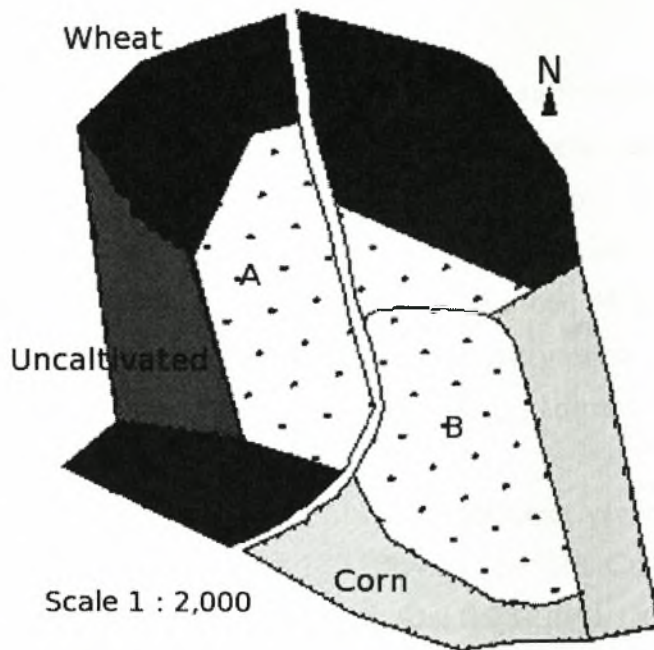
8.2.2. Αξιολόγηση ικανότητας διασποράς με χρήση μικροδορυφόρων

Το έτος 2007, προσδιορίστηκε ο βαθμός συγγένειας μεταξύ συλληφθέντων ατόμων σε δύο γειτονικούς οπωρώνες και αξιολογήθηκε η ικανότητα διασποράς του εντόμου χρησιμοποιώντας μικροδορυφορικούς δείκτες DNA.

8.2.2.1. Συλλογή δειγμάτων

Η επιλογή του οπωρώνα βασίστηκε στο γεγονός ότι η έκταση έπρεπε να ήταν σχετικά μεγάλη για την καλύτερη μελέτη της διασποράς του εντόμου. Επιπλέον, έπρεπε να μην εφαρμόζεται καμιά μορφή καταπολέμησης ώστε η δειγματοληψία να ήταν αντιπροσωπευτική της έκτασης. Η επιλογή δύο γειτονικών οπωρώνων έγινε με σκοπό να μελετηθεί η διασπορά μεταξύ τους. Για τους παραπάνω λόγους

δεν επιλέχθηκε ο ίδιος οπωρώνας, στον οποίο πραγματοποιήθηκε την ίδια χρονιά το πείραμα των εξαπολύσεων, άλλα δύο γειτονικοί εγκαταλελημένοι με έκταση 12 στρέμματα ο πρώτος (A) και 14 στρέμματα ο δεύτερος (B) (Εικόνα 8.3.).



Εικόνα 8.3. Οπωρώνες (A και B) όπου μελετήθηκε η διασπορά της καρπόκαψας με τη χρήση δεικτών μικροδορυφορικού DNA.

Η συλλογή των δειγμάτων στους οπωρώνες A και B πραγματοποιήθηκε με την επιλογή 100 δένδρων στον καθένα και την ανάρτηση παγίδων κυματοειδούς χάρτου για τη συλλογή νυμφών. Η σήμανση των δέντρων γινόταν ανά τέσσερα δέντρα στην ίδια γραμμή και ανά δύο γραμμές. Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν τέσσερις δειγματοληψίες, όσες και οι γενεές του εντόμου (μία διαπαύουσα γενεά και τρεις κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου). Οι νύμφες μεταφέρονταν στον εργαστηριακό θάλαμο και τοποθετούνταν σε ξεχωριστά κυττία μέχρι την έξοδο των τέλειων ατόμων. Οι συνθήκες διατήρησης των νυμφών, μέχρι την έξοδο των ενηλίκων, ήταν $23 \pm 1^\circ\text{C}$, $65 \pm 5\% \text{ RH}$ και L16:D8.

Τα ενήλικα τοποθετούνταν σε πλαστικό φιαλίδιο που περιείχε 1 ml 98% αιθανόλης και αποθηκεύονταν στους -20°C . Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν 186 δείγματα από 63 παγίδες στον οπωρώνα A και 166 από 62 παγίδες στον οπωρώνα B. Ο αριθμός των παγίδων από τις οποίες συλλέχθηκαν έντομα ήταν

μικρότερος από τον αρχικό που τοποθετήθηκαν, γιατί δεν βρέθηκαν σε όλες τις παγίδες νύμφες. Το γεωγραφικό στίγμα των δέντρων και η μεταξύ τους απόσταση καταγράφηκε με GPS (GARMIN Corporation, GARMIN International Inc. USA).

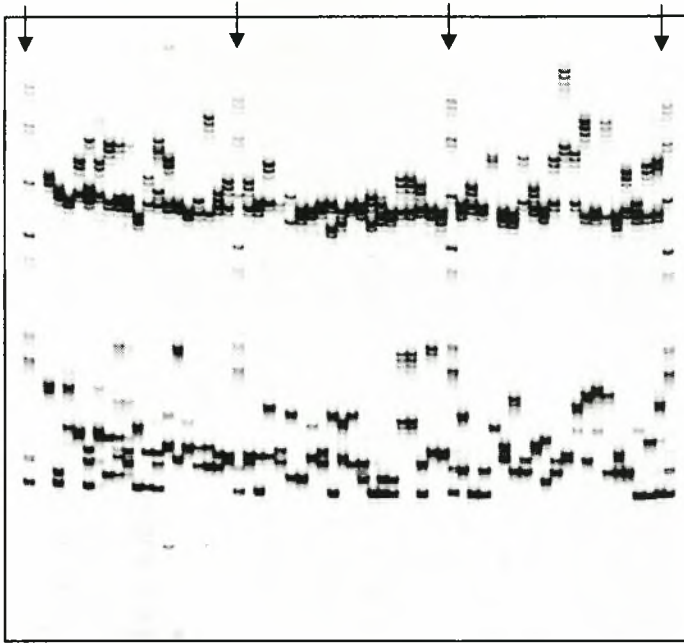
8.2.2.2. Δείκτες μικροδορυφορικού DNA

Η απομόνωση του DNA από τα ενήλικα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Malloch *et al.* (2006). Αναλυτικότερα, σε πλαστικό φιαλίδιο χωρητικότητας 1,5 ml, όπου τοποθετήθηκαν 40 μl 5% Chelex-100 (Bio-Rad), ομογενοποιήθηκε ένα πόδι εντόμου. Ακολούθησε ανάδευση για 15 sec σε vortex, επώαση στους 56°C για 35 min και ακολούθως στους 95°C για 15min. Κατόπιν, έγινε νέα ανάδευση για 15 sec σε vortex και φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 2 min. Το υπερκείμενο, μεταφέρθηκε σε νέο πλαστικό φιαλίδιο όπου και αποθηκεύτηκε στους -20 °C.

Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν 11 μικροδορυφορικοί γενετικοί δείκτες (Cp1.62, Cp2.129, Cp2.131, Cp3.169, Cp3.180, Cp4.S, Cp4.129, Cp5.M, Cp5.24, Cp6.32, Cp6.46) (Franck *et al.* 2005 και Genbank IDs: DQ393948, DQ393907, DQ394027, DQ393997, DQ394014). Οι δείκτες αυτοί επιλέχθηκαν γιατί σε προηγούμενη μελέτη σε πληθυσμό της νοτιοανατολικής Γαλλίας δεν εμφάνισαν σημαντική απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg ούτε ένδειξη ανισορροπίας σύνδεσης (Franck *et al.* 2005). Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 50 ng DNA στόχου, 0,4 μM από τον κάθε εκκινητή, 0,5 unit Taq πολυμεράσης (Promega, Madison, WI, U.S.A), 200 μM dNTPs (Invitrogen Ltd 3 Fountain Drive Inchinnan Business Park Paisley UK), 1,5 mM MgCl₂, 1X buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 9,0) της ίδιας εταιρείας με το ένζυμο και ο τελικός όγκος ρυθμίστηκε στα 10 μl με αποστειρωμένο νερό.

Οι συνθήκες πολλαπλασιασμού ήταν ένας αρχικός κύκλος αποδιάταξης με 2 min στους 94°C και 30 κύκλοι με 30 sec στους 94°C (αποδιάταξη), 40 sec σε θερμοκρασία συγκεκριμένη για κάθε ζεύγος εκκινητών (Πίνακας 8.1) που χρησιμοποιήθηκε (υβριδοποίηση των εκκινητών) και 40 sec στους 72 °C (πολυμερισμός), χρησιμοποιώντας τη γρηγορότερη μετάβαση μεταξύ των θερμοκρασιών. Από κάθε ζεύγος εκκινητών, ο reverse ήταν σημασμένος με τη χρωστική IRDye™ με μήκος κύματος εκπομπής 700 ή 800 nm. Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα αποδιατακτικής πολυακρυλαμίδης (6,5%) στο αυτοματοποιημένο μηχάνημα αλληλούχησης Licor

4200 ενώ η ανίχνευση και οπτικοποίησή τους έγινε με εφαρμογή του λογισμικού SAGA™ (American Laboratory Trading, Inc 12 Colton Rd. East Lyme) (Franck *et al.* 2005) (Εικόνα 8.4).



Εικόνα 8.4. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR με τους εκκινητές Cr6.46 και Cr5.M σε αυτοματοποιημένο σύστημα αλληλούχησης Licor. Τα βέλη συμβολίζουν τις θέσεις του δείκτη DNA.

Για ζεύγη εκκινητών με παρόμοιες θερμοκρασίες (Cr3.180 και Cr4.S, Cr4.129 και Cr5.24, Cr6.46 και Cr5.M, Cr1.62 και Cr6.32) πραγματοποιήθηκε πολλαπλή PCR (multiplex). Επίσης, στην ίδια ηλεκτροφόρηση περιλαμβάνονταν διαφορετικά προϊόντα, σημασμένα με την ίδια χρωστική, λαμβάνοντας υπ' όψιν το μέγεθός τους, έτσι ώστε αυτά να διαχωρίζονται ικανοποιητικά καθώς και προϊόντα παρόμοιου μεγέθους με διαφορετική όμως σήμανση ώστε να εκπέμπουν σε διαφορετικό μήκος κύματος. Έτσι, πραγματοποιήθηκε παράλληλη ηλεκτροφόρηση των προϊόντων Cr3.180, Cr4.S και Cr2.129, Cr3.169, Cr1.62 και Cr6.32, Cr4.129 και Cr5.24, Cr6.46, Cr5.M και Cr2.131 παρουσία δείκτη γνωστών μοριακών μεγεθών (marker). Το λογισμικό SAGA™ αυτοματοποιεί την ηλεκτροφόρηση, την ταυτοποίηση των δειγμάτων, τη θέση των ζωνών του marker, την ταυτοποίηση των αλληλομόρφων και βαθμονομεί το μέγεθος των ζωνών.

Πίνακας 8.1. Οι εκκινητές των μικροδορυφορικών τόπων, η θερμοκρασία υβριδοποίησης (T_a) και το μέγεθος των προϊόντων PCR.

Μικροδορυφόρος	Αλληλουχία εκκινητών (5'-3')	T_a (°C)	Μέγεθος PCR
Cp1.62	F: GTGTTCCAAATTAAGCTGACG R: GACATCCGCGAGAAACC	58	244
Cp2.129	F: TGCCGAGACTCTTCACTGC R: TCCAGGTCGCACAGAACC	60	168
Cp2.131	F: GATACTTCCGCGAACGGTAA R: CTTGCACTACGACGGGTGA	57	168
Cp3.169	F: GTATGGTTTGGCTTATGAGG R: TGCTCTTTTCAACAATTCAG	52	194
Cp3.180	F: GGCGAGAACGATTATTTCC R: ACATATTCT TCGGGCTTGC	58	209
Cp4.S	F: TATGTTCTGTCCCTCACG R: AGCTGGTAA AAGGACACC	55	195
Cp4.129	F: CGTCCCATCCTGAATTATCG R: GCAAGGAACGACTGAAACATC	57	233
Cp5.M	F: AAAACAAGGTTACAACAAACG R: CTTGGTTGATGTTTGAACC	52	166
Cp5.24	F: AGTAGCAGAGCATCAGCAAGC R: CATTCCACGTCT TTGTGTGG	58	212
Cp6.32	F: CTGAATCCCGCCTCTTGG R: TGCACTTGGCTCGTTTAGC	58	189
Cp6.46	F: ATAGACATTGCCTCGTAGC R: GTTACGAAAGTTGGATTGC	53	232

* F= forward, R= reverse.

8.2.2.3. Ισορροπία Hardy-Weinberg

Για κάθε μικροδορυφόρο υπολογίστηκε ο αριθμός των αλληλομόρφων στον πληθυσμό και επιπλέον για κάθε γενιά υπολογίστηκε η αναμενόμενη (H_{exp}) και παρατηρούμενη (H_o) ετεροζυγωτία, η τιμή F_{is} (F-statistics), η πιθανή ανισορροπία σύνδεσης ανά ζεύγος μικροδορυφόρων και τυχόν απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα GENEPOP (Raymond & Rousset 1995, <http://genepop.curtin.edu.au/>). Ο έλεγχος του μοντέλου της απομόνωσης λόγω απόστασης, σύμφωνα με το οποίο η γονιδιακή ροή είναι συνάρτηση της απόστασης των πληθυσμών που συναποτελούν μία συνέχεια, πραγματοποιήθηκε με ανάλυση παλινδρόμησης (regression analysis) της γενετικής απόστασης μεταξύ ζευγών ατόμων και της γεωγραφικής απόστασης (Rousset 2000). Το επίπεδο σημαντικότητας ελέγχθηκε με το τεστ του Mantel (1967).

8.2.2.4. Ανάλυση συγγένειας (kinship analysis)

Η ανάλυση της συγγένειας (kinship analysis) πραγματοποιήθηκε μεταξύ ζευγαριών ατόμων από κάθε γενιά βάσει ελέγχου του λόγου πιθανοτήτων lodscore (Queller & Goodnight 1989). Η υπόθεση που ελέγχθηκε, βάσει των κοινών αλληλομόρφων σε κάθε γενετικό τόπο, ήταν ότι τα άτομα των ζευγών ήταν συγγενή πρώτου βαθμού σε σχέση με την εναλλακτική υπόθεση ότι είναι μη συγγενή. Για περισσότερους του ενός γενετικούς τόπους, ο λόγος των πιθανοτήτων είναι το άθροισμα του λόγου για κάθε έναν ξεχωριστά, θεωρώντας ότι δεν υφίσταται ανισορροπία σύνδεσης μεταξύ των διαφορετικών τόπων.

Οι τιμές του lodscore που προέκυψαν συγκρίθηκαν με 1.000.000 προσομοιώσεις μη-συγγενών ζευγών ατόμων και ζευγών συγγενών πρώτου βαθμού λαμβάνοντας υπ' όψιν τις συχνότητες των αλληλομόρφων μέσα σε κάθε γενιά. Γενικά, οι προσομοιώσεις των κατανομών των lodscores των μη συγγενών και συγγενών ζευγών ατόμων αλληλοεπικαλύπτονται και γι' αυτό χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά όρια τιμών (threshold) σε κάθε ομάδα δεδομένων από τα εξ ορισμού του προγράμματος, ώστε να αποφασισθεί εάν τα άτομα είναι συγγενή ή όχι.

Έτσι, για την εκτίμηση της διασποράς των συζευγμένων θηλυκών σε κάθε γενιά, χρησιμοποιήθηκε αρκετά χαμηλό threshold, ώστε ο αριθμός των μη συγγενών ζευγών ατόμων που ταξινομούνται κατά λάθος ως συγγενή ουσιαστικά να μηδενισθεί. Επίσης, για την εκτίμηση του αριθμού των θηλυκών που είχαν βιώσιμους απογόνους για κάθε γενιά, χρησιμοποιήθηκαν όρια τιμών που εξισορροπούν τον αριθμό των δύο τύπων λαθών (Type I και Type II error), δηλαδή την ταξινόμηση συγγενών ως μη-συγγενή και το αντίστροφο (Baudry *et al.* 1998). Αυτές οι τιμές ορίων παρέχουν εκτιμήσεις μη μεροληπτικές όταν υπάρχει σημαντική διαφορά στην αναλογία μη συγγενών / συγγενών ζευγών ατόμων.

8.2.2.5. Αριθμός συζευγμένων θηλυκών

Η εκτίμηση του αριθμού των θηλυκών (N_f) ή αλλιώς των ζευγών γονέων που συνεισφέρουν απογόνους σε κάθε δείγμα που συλλέχθηκε, έγινε με την μέθοδο που περιγράφουν οι Baudry *et al.* (1998). Ο υπολογισμός του N_f βασίστηκε στην παραδοχή ότι όλα τα θηλυκά άτομα έχουν, κατά μέσο όρο, τον ίδιο αριθμό απογόνων και συνεπώς ο αριθμός των συγγενών ανά οικογένεια σε ένα δείγμα ακολουθεί κατά προσέγγιση την κατανομή Poisson. Η μέση τιμή λ αντιστοιχεί στο

μέσο αριθμό συγγενών που συνεισφέρουν στο δείγμα τα άτομα N_f . Σε ένα δείγμα στο οποίο παρατηρούνται N_s συγγενείς, ο αριθμός των θηλυκών είναι: $N_f = N_s / \lambda$. Η αναμενόμενη κατανομή των συγγενών ανά οικογένεια υπολογίσθηκε βάσει της κατανομής Poisson για κάθε οικογένεια με περισσότερους από έναν συγγενείς. Η μέση τιμή λ της κατανομής εκτιμήθηκε βάσει της μεθόδου μεγίστης πιθανότητας και η τιμή N_f προέκυψε από αυτήν την εκτίμηση.

Οι κατανομές των συγγενών ανά οικογένεια καθορίστηκαν για τα ζεύγη των ατόμων που κατατάχθηκαν ως συγγενείς. Τα ζεύγη καθορίστηκαν βήμα προς βήμα ακολουθώντας τις τιμές των lodscores. Ένα συγκεκριμένο ζεύγος ατόμων ταξινομήθηκε σε μία προκαθορισμένη οικογένεια εφόσον οι γονότυποι και των δύο ατόμων ήταν συμβατοί με αυτούς των μελών της οικογένειας. Εναλλακτικά, δημιουργούνταν μία καινούρια οικογένεια για το καινούριο ζεύγος.

8.2.2.6. Διασπορά συζευγμένων θηλυκών

Καθώς οι προνύμφες δεν διασπείρονται μεταξύ των δέντρων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους, η χωρική κατανομή των συγγενών παρέχει ουσιαστικά εκτίμηση της διασποράς των μητέρων τους. Το όριο της διασποράς αυτών των συζευγμένων θηλυκών εκτιμήθηκε βάσει της χωρικής κατανομής μεταξύ των ζευγών συγγενών.

Η μετανάστευση μεταξύ των δύο οπωρώνων A και B (Εικόνα 8.3.) εκτιμήθηκε με την ανάλυση «Migrant detection» χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα GeneClass 2 (Piry *et al.* 2004). Συγκεκριμένα, με το GeneClass2 υπολογίζονται οι μετανάστες πρώτης γενιάς. Το κριτήριο που χρησιμοποιήθηκε στους υπολογισμούς με βάση τη μέγιστη πιθανοφάνεια είναι η Μπαγεσουανή προσέγγιση που περιγράφεται από τους Rannala & Mountain (1997). Η τιμή της συχνότητας των χαμένων αλληλομόρφων ορίστηκε στο 0.01. Στην ανάλυση υπολογίζεται και η πιθανότητα που ένα άτομο δεν είναι μετανάστης, σύμφωνα με τη Μπαγεσουανή μέθοδο. Χρησιμοποιήθηκαν 10.000 προσομοιώσεις των ατόμων από κάθε δείγμα και η τιμή του σφάλματος Τύπου I (όριο πιθανότητας για τον υπολογισμό της προέλευσης ενός ατόμου) ορίστηκε στο 0.01.

8.2.3. Συγκριτική μελέτη πληθυσμών από Ελλάδα και Γαλλία.

Η συγκριτική μελέτη της γενετικής πληθυσμών από διαφορετικούς ξενιστές από την Ελλάδα και τη Γαλλία έγινε με ανάλυση δεικτών μικροδορυφορικού DNA

8.2.3.1. Συλλογή δειγμάτων

Το έτος 2007 πραγματοποιήθηκε συλλογή εννέα πληθυσμών καρπόκαπας από πέντε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές και από τρεις διαφορετικούς ξενιστές του εντόμου (Εικόνα 8.5). Συνολικά, συλλέχθηκαν πέντε πληθυσμοί από μηλιά, δύο από καρυδιά και δύο από αχλαδιά. Στον Πίνακα 8.2. παρουσιάζονται τα στοιχεία που αφορούν τις περιοχές και τους ξενιστές από τους οποίους συλλέχθηκαν οι πληθυσμοί και ο αριθμός των δειγμάτων.

Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου με την ανάρτηση κυματοειδών παγίδων χάρτου για τη σύλληψη των αναπτυσσόμενων προνυμφών πέμπτου σταδίου, οι οποίες αναζητούν προφυλαγμένα καταφύγια για να νυμφωθούν. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μεταφορά των δειγμάτων στον εργαστηριακό θάλαμο, σε ξεχωριστά κυτία, μέχρι την έξοδο των τέλειων ατόμων. Οι συνθήκες διατήρησης ήταν $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, $65\pm 1\%$ RH και L16:D8. Τα ενήλικα, μετά την έξοδό τους, τοποθετήθηκαν σε πλαστικό φιαλίδιο με 1 ml 98% αιθανόλης και φυλάσσονταν στους -20°C .

Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον έξι πληθυσμοί από τρεις διαφορετικούς ξενιστές του εντόμου, από τρεις περιοχές της Γαλλίας (Εικόνα 8.6.). Πληροφορίες σχετικά με τους ξενιστές καθώς και τον αριθμό των δειγμάτων παρατίθενται στον Πίνακα 8.2.

8.2.3.2. Ανάλυση δεικτών μικροδορυφορικού DNA

Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι δείκτες μικροδορυφορικού DNA που περιγράφηκαν προηγουμένως (Πίνακας 8.1.) και με την ίδια τεχνική που περιγράφηκε στην παράγραφο 8.2.2.2.

8.2.3.3. Συχνότητες αλληλομόρφων, ισοροπία Hardy-Weinberg και ανισοροπία σύνδεσης

Η πιθανή ανισοροπία σύνδεσης ανά ζεύγος μικροδορυφόρων και τυχόν αποκλίσεις από την ισοροπία Hardy-Weinberg υπολογίσθηκαν με το πρόγραμμα GENEPOP (Raymond & Rousset 1995, <http://genepop.curtin.edu.au/>).



Εικόνα 8.5. Περιοχές της Ελλάδας από όπου συλλέχθηκαν οι πληθυσμοί της καρπόκαψας. 1: Αλεξάνδρεια, 2: Αγιά, 3: Πήλιο, 4: Αργος, 5: Τρίπολη.



Εικόνα 8.6. Περιοχές της Γαλλίας από όπου συλλέχθηκαν οι πληθυσμοί της καρπόκαψας 1: Avignon, 2: Valence, 3: St-Marcelin.

Πίνακας 8.2. Πληθυσμοί καρπόκαψας από διάφορες περιοχές της Ελλάδας και της Γαλλίας.

Κωδικός	Ημ/νία συλλογής	Ξενιστής	Περιοχή	Γεωγραφικό μήκος	Γεωγραφικό πλάτος	N ¹
AlexA	22/7/07	Μηλιά	Αλεξάνδρεια Ημαθίας	22° 28' 642"	40° 34' 648"	24
AgAa	20/7/07	Μηλιά	Αγιά Λάρισας	22° 39' 544"	39° 40' 719"	54
AgAb	20/7/07	Μηλιά	Αγιά Λάρισας	22° 39' 382"	39° 40' 770"	44
AgW	25/7/07	Καρυδιά	Αγιά Λάρισας	22° 40' 102"	39° 42' 118"	25
PiA	7/8/07	Μηλιά	Αγ. Λαυρέντιος Μαγνησίας	23° 03' 574"	39° 27' 107"	19
PiP	24/7/07	Αχλαδιά	Κορωπί Μαγνησίας	23° 03' 328"	39° 19' 047"	21
PiW	17/7/07	Καρυδιά	Αγριά Μαγνησίας	23° 02' 514"	39° 22' 874"	29
ArgP	28/7/07	Αχλαδιά	Άργος Αργολίδας	22° 37' 311"	37° 36' 121"	23
TrA	25/7/07	Μηλιά	Τρίπολη Αρκαδίας	22° 22' 745"	37° 31' 814"	19
MarW	5/07-6/07 ²	Καρυδιά	St-Marcelin	05° 28'	45° 14'	29
ValA	5/06 ²	Μηλιά	Valence, Γαλλία	04° 95'	44° 97'	36
ValP	5/04-6/04 ²	Αχλαδιά	Valence, Γαλλία	04° 96'	44° 96'	25
ValW	5/06-5/06 ²	Καρυδιά	Valence, Γαλλία	04° 97'	44° 96'	20
EcoA	5/07-6/07 ²	Μηλιά	Avignon, Γαλλία	04° 93'	43° 81'	20
EcoP	5/07 ²	Αχλαδιά	Avignon, Γαλλία	04° 90'	43° 87'	25

1= Ο αριθμός των δειγμάτων από κάθε πληθυσμό.

2= Ημερομηνία ενηλικίωσης των εντομών.

Για κάθε πληθυσμό και για όλους τους γενετικούς τόπους προσδιορίστηκε ο μέσος αριθμός των αλληλομόρφων, οι συχνότητές τους, η τιμή R_s (allelic richness), που αποτελεί μία εκτίμηση του αριθμού των αλληλομόρφων ανεξάρτητα από το μέγεθος του δείγματος, η αναμενόμενη (H_{EXP}) και η παρατηρούμενη (H_O) ετεροζυγωτία.

8.2.3.4. Μπαγεσουανή ανάλυση ομαδοποίησης και ταξινόμησης

Το πρόγραμμα Structure (Pritchard *et al.* 2000) χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση της γενετικής δομής πληθυσμών βάσει δεδομένων αλληλομόρφων από πολλούς γενετικούς τόπους. Συγκεκριμένα, είναι εφικτή η εκτίμηση της παρουσίας διακριτών πληθυσμών, η ταξινόμηση ατόμων σε πληθυσμούς, η μελέτη ζωνών υβριδισμού και μεταναστεύσεων. Το πρόγραμμα μπορεί να εφαρμοστεί σε δεδομένα από διάφορους γενετικούς δείκτες, όπως μικροδορυφόρους, SNPs, RFLPs και AFLPs.

Το πρόγραμμα Structure ver. 2 χρησιμοποιήθηκε για την ομαδοποίηση των δειγμάτων σε γενετικές ομάδες (K). Για τον προσδιορισμό της δομής των πληθυσμών, χρησιμοποιείται Μπαγεσιανή ανάλυση (Bayesian analysis). Συγκεκριμένα, χωρίς προηγούμενη πληροφορία σχετικά με τα δείγματα (π.χ. περιοχή δειγματοληψίας, ξενιστής κ.λπ.), εφαρμόστηκαν και τα δύο γενεαλογικά μοντέλα που καθορίζουν το βαθμό των γενετικών σχέσεων συγγένειας: 1) το μοντέλο της ανάμιξης (admixture) σύμφωνα με το οποίο κάποιο ποσοστό του γονιδιώματος κάθε ατόμου προέρχεται από όλους τους πληθυσμούς. Το μοντέλο θεωρεί ύπαρξη γονιδιακής ροής μεταξύ των πληθυσμών, σε βαθμό ικανό ώστε τα άτομα να έχουν κοντινούς προγόνους σε περισσότερους από έναν πληθυσμό και 2) το μοντέλο της μη-ανάμιξης (no-admixture) κατά το οποίο τα άτομα διαχωρίζονται από τον ένα ή τον άλλο πληθυσμό, δηλαδή η γονιδιακή ροή είναι τόσο μικρή που τα άτομα είναι ουσιαστικά σαν να έχουν προκύψει είτε από τον ένα είτε από τον άλλο πληθυσμό.

Επιπλέον, για κάθε ένα από τα δυο ανωτέρω μοντέλα, εφαρμόστηκαν δύο εναλλακτικά μοντέλα για τις αλληλομορφικές συχνότητες, αυτό που τις θεωρεί ανεξάρτητες και αυτό που τις θεωρεί συσχετιζόμενες. Το μοντέλο των ανεξάρτητων αλληλομορφικών συχνοτήτων θεωρεί ότι οι αλληλομορφικές συχνότητες σε έναν πληθυσμό δεν σχετίζονται καθόλου με αυτές άλλων πληθυσμών και υποδηλώνει ότι η γονιδιακή ροή είναι και ήταν για μεγάλο χρονικό διάστημα πολύ μικρή ή μηδενική. Το μοντέλο των συσχετιζόμενων αλληλομορφικών συχνοτήτων θεωρεί ότι οι αλληλομορφικές συχνότητες σε διαφορετικούς πληθυσμούς είναι πιθανόν να είναι παρόμοιες, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στη μετανάστευση ή στην ύπαρξη κοινού πρόγονου.

Οι εξ ορισμού παράμετροι του προγράμματος είναι το μοντέλο της ανάμιξης και των ανεξάρτητων αλληλομορφικών συχνοτήτων. Πολλοί ερευνητές προτείνουν ως αρχή για τις περισσότερες αναλύσεις το μοντέλο της ανάμιξης καθώς, όπως υποστηρίζουν, βελτιώνει την ομαδοποίηση για στενά συγγενικούς πληθυσμούς. Ωστόσο, σ' αυτήν την περίπτωση υπάρχει ο κίνδυνος να υπερεκτιμηθεί το K . Το εναλλακτικό μοντέλο είναι καταλληλότερο για πληθυσμούς πλήρως διακριτούς και συχνά είναι πιο ευαίσθητο στην ανίχνευση δυσδιάκριτης δομής. Σε κάθε περίπτωση πραγματοποιήθηκαν 10 προσομοιώσεις (100.000 MCMC επαναλήψεις και 20.000 περίοδος burn-in) για κάθε τιμή K ($K = 1-10$).

8.2.3.5. Ανάλυση Μοριακής Διακύμανσης, γενετικές αποστάσεις

Η μελέτη της γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών εξετάστηκε με AMOVA (Analysis of Molecular Variance) χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Arlequin, ver. 2.0 (Schneider *et al.* 2000). Υπολογίστηκε ο συντελεστής F_{st} , που απεικονίζει τη διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών και η αλληλομορφική διαφοροποίηση (allelic differentiation), που εκτιμά το ποσοστό των διαφορετικών αλληλομόρφων μεταξύ των πληθυσμών.

Για τη μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των πληθυσμών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα POPULATIONS, ver. 1.1.28 (Langella 1999–2003, <http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>). Από τα αποτελέσματα του προγράμματος κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) που βασίζεται στον αριθμό των διαφορετικών αλληλομόρφων για δεδομένα από πολλαπλούς γενετικούς τόπους (allele shared distance=DAS) εφαρμόζοντας 1000 επαναλήψεις (bootstrap).

8.3. Αποτελέσματα

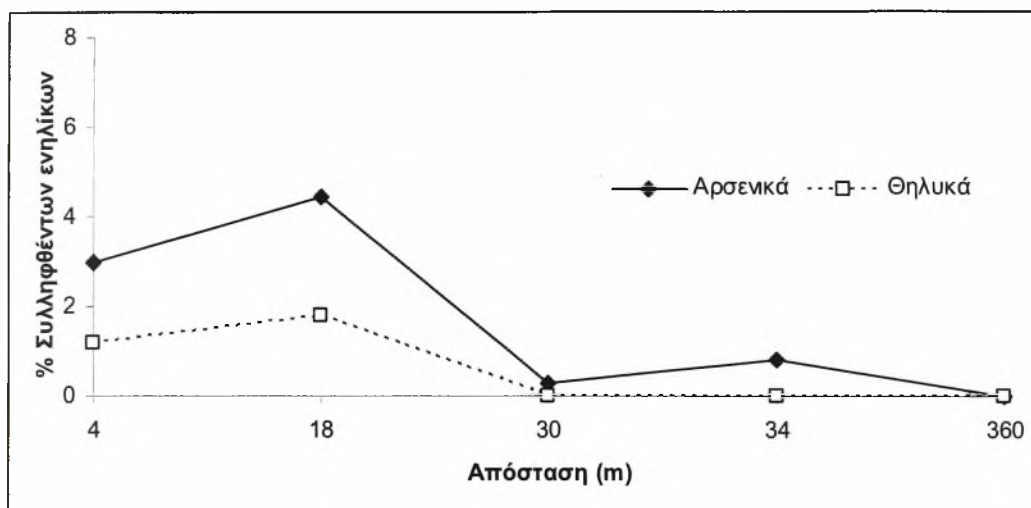
8.3.1. Μελέτη διασποράς με εξαπόλυση σημασμένων ατόμων

8.3.1.1. Έτος 2007

Στο Σχήμα 8.1. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των συλλήψεων των εξαπολυθέντων ατόμων του *C. rotonella* σε σχέση με την απόσταση από το σημείο εξαπόλυσης, για το έτος 2007. Παρατηρήθηκε ότι η μέγιστη απόσταση μετακίνησης μέσα στον οπωρώνα των αρσενικών ατόμων ήταν 34m ενώ η αντίστοιχη απόσταση για τα θηλυκά ήταν 18m. Η πλειονότητα των αρσενικών και θηλυκών ατόμων συλλήφθηκε στα 18m.

Στον Πίνακα 8.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των συλλήψεων των εξαπολυθέντων ατόμων στις παγίδες τύπου Δέλτα το έτος 2007, εξετάζοντας ξεχωριστά τις συλλήψεις των αρσενικών και θηλυκών ατόμων τόσο του ευαίσθητου εργαστηριακού πληθυσμού όσο και του φυσικού πληθυσμού. Τα αποτελέσματα αυτά περιλαμβάνουν τις συλλήψεις έως τη μέγιστη απόσταση εντοπισμού εξαπολυθέντων ατόμων. Όταν συνυπολογίστηκαν και οι πέντε

περιφερειακές παγίδες, στις οποίες δεν καταγράφηκε κανένα εξαπολυθέν άτομο, τότε ο μέσος όρος των ατόμων ανά παγίδα ελαχιστοποιήθηκε ($0,202 \pm 0,401$).



Σχήμα 8.1. Ποσοστό συλληφθέντων ενηλίκων καρπόκαψας σε σχέση με την απόσταση το έτος 2007.

Πίνακας 8.3. Αποτελέσματα συλλήψεων στις παγίδες τύπου Δέλτα.

Εξαπόλυση	Αριθμός παγίδων	Ημερομηνία	Αρσενικά (Μ.Ο ¹ ±Τ.Σ ²)	Θηλυκά (Μ.Ο ¹ ±Τ.Σ ²)	Φυσικός πληθυσμός
1 ^η	9	16/6/2007	0,583±0,295	0	0,375±0,095
2 ^η	9	23/6/2007	0	0	0,528±0,073
3 ^η	9	30/6/2007	0,667±0,273	0,306±0,155	0,306±0,062
4 ^η	9	16/7/2007	0,611±0,229	0,250±0,167	0,417±0,064
5 ^η	9	30/7/2007	0,861±0,398	0,250±0,131	0,611±0,109
6 ^η	9	12/8/2007	0,083±0,059	0,167±0,083	0,542±0,079

1: Μέσος όρος συλληφθέντων ατόμων/παγίδα/ημέρα.

2: Τυπικό σφάλμα.

Μεταξύ των δύο φύλων παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ($F = 6,763$, $df = 1$, $p = 0,011$). Συγκεκριμένα, από το σύνολο των εξαπολυθέντων αρσενικών ατόμων, το 8,42% συλλήφθηκε στις φερομονικές παγίδες ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τα θηλυκά ήταν 2,90%. Επίσης, στατιστικώς σημαντική διαφορά διαπιστώθηκε και μεταξύ των εξαπολύσεων ($F = 2,584$, $df = 5$, $p = 0,031$). Τέλος, στατιστικώς σημαντική διαφορά ($F = 7,355$, $df = 1$, $p = 0,008$) ταυτοποιήθηκε και μεταξύ των συλλήψεων των εξαπολυθέντων ατόμων και του φυσικού πληθυσμού, με το φυσικό πληθυσμό να έχει μεγαλύτερη τιμή.

8.3.1.2. Έτος 2008

Τα αποτελέσματα των συλλήψεων για το έτος 2008 παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.4. Αναλυτικότερα, παρουσιάζονται οι συλλήψεις των εξαπολυθέντων αρσενικών και θηλυκών ατόμων του εργαστηριακού πληθυσμού (Πίνακας 8.4Α), του πληθυσμού από την Αγιά που εκτράφηκε στο εργαστήριο (Πίνακας 8.4Β), του πληθυσμού ο οποίος συλλέχθηκε κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου το έτος που πραγματοποιήθηκε το πείραμα (Πίνακας 8.4Γ), καθώς και οι συλλήψεις του φυσικού πληθυσμού (Πίνακας 8.4Α, 8.4Β, 8.4Γ). Όπως και κατά το προηγούμενο έτος, ο αριθμός των ατόμων αντιστοιχεί στις συλλήψεις έως τη μέγιστη απόσταση εντοπισμού εξαπολυθέντων ατόμων.

Πίνακας 8.4. Αποτελέσματα συλλήψεων εξαπολυθέντων ατόμων στις παγίδες τύπου Δέλτα κατά τη διάρκεια των εξαπολύσεων του εργαστηριακού πληθυσμού (Α), του εργαστηριακού πληθυσμού της Αγιάς (Β) και του πληθυσμού που συλλέχθηκε κατά την καλλιεργητική περίοδο.

Α

Εξαπόλυση	Αριθμός παγίδων	Ημερομηνία	Αρσενικά (Μ.Ο ¹ ±Τ.Σ ²)	Θηλυκά (Μ.Ο ¹ ±Τ.Σ ²)	Φυσικός πληθυσμός
1 ^η	12	24/05/2008	0,666±0,139	0,515±0,092	0,632±0,103
2 ^η	12	01/07/2008	0,667±0,154	0,479±0,116	0,643±0,106
3 ^η	12	09/08/2008	0,624±0,136	0,508±0,107	0,716±0,099

Β

Εξαπόλυση	Αριθμός παγίδων	Ημερομηνία	Αρσενικά (Μ.Ο ¹ ±Τ.Σ ²)	Θηλυκά (Μ.Ο ¹ ±Τ.Σ ²)	Φυσικός πληθυσμός
1 ^η	12	07/06/2008	1,021±0,175	0,736±0,129	0,270±0,519
2 ^η	12	13/07/2008	0,791±0,128	0,548±0,110	0,608±0,080
3 ^η	12	29/07/2008	0,772±0,141	0,645±0,124	0,465±0,731

Γ

Εξαπόλυση	Αριθμός παγίδων	Ημερομηνία	Αρσενικά (Μ.Ο ¹ ±Τ.Σ ²)	Θηλυκά (Μ.Ο ¹ ±Τ.Σ ²)	Φυσικός πληθυσμός
1 ^η	12	19/06/2008	1,201±0,214	0,715±0,132	0,378±0,076
2 ^η	12	26/07/2008	0,903±0,161	0,806±0,150	1,167±0,182
3 ^η	12	12/09/2008	0,813±0,145	0,139±0,043	0,700±0,212

1: Μέσος όρος των συλληφθέντων ατόμων/παγίδα/ημέρα.

2: Τυπικό σφάλμα.

Από το σύνολο των εξαπολυθέντων αρσενικών ατόμων, το 20,17%, 26,67% και 29,83% του ευαίσθητου εργαστηριακού πληθυσμού, του πληθυσμού της Αγιάς που εκτράφηκε στο εργαστήριο και του μη εργαστηριακού πληθυσμού, δηλαδή των ατόμων που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου, αντίστοιχα επανασυλλήφθηκαν στις παγίδες. Το μεγαλύτερο ποσοστό παρατηρήθηκε στα άτομα που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου. Τα αντίστοιχα ποσοστά συλλήψεων των θηλυκών ατόμων ήταν χαμηλότερα. Συγκεκριμένα, για τον ευαίσθητο εργαστηριακό πληθυσμό, το ποσοστό ήταν 15,17%, για τον εργαστηριακό πληθυσμό της Αγιάς 19,5% και για τον μη εργαστηριακό πληθυσμό 16,17%. Η διαφορά μεταξύ αρσενικών-θηλυκών ατόμων είναι στατιστικώς σημαντική ($F = 8,961$, $df = 1$, $p = 0,003$) για τον μη εργαστηριακό πληθυσμό, για όλες τις επαναλαμβανόμενες εξαπολύσεις που πραγματοποιήθηκαν σ' αυτόν τον πληθυσμό ($F = 4,834$, $df = 2$, $p = 0,011$). Αντίθετα, στους υπόλοιπους πληθυσμούς δεν διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά.

Επίσης, στατιστικώς σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μεταξύ των συλλήψεων των εξαπολυθέντων ενηλίκων του εργαστηριακού πληθυσμού της Αγιάς και του φυσικού πληθυσμού του εντόμου ($F = 9,898$, $df = 1$, $p = 0,02$), με τον πρώτο πληθυσμό να εμφανίζει υψηλότερες τιμές.

Τέλος, περισσότερα ήταν τα ενήλικα του μη εργαστηριακού πληθυσμού που συλλήφθηκαν στις παγίδες, σε σχέση με το φυσικό πληθυσμό, με τη διαφορά αυτή να είναι στατιστικώς σημαντική μεταξύ των πληθυσμών ($F = 5,135$, $df = 1$, $p = 0,027$) και των επαναλήψεων ($F = 14,102$, $df = 2$, $p < 0,001$).

Από τα αποτελέσματα των συλλήψεων των εξαπολυθέντων αρσενικών ατόμων του εντόμου για το έτος 2008 (Σχήμα 8.2.) παρατηρήθηκε ότι η μέγιστη απόσταση μετακίνησης των ατόμων και των τριών πληθυσμών ήταν 80m εντός του οπωρώνα. Για τον ευαίσθητο εργαστηριακό πληθυσμό, τον εργαστηριακό πληθυσμό της Αγιάς και τον μη εργαστηριακό πληθυσμό, τα ποσοστά των αρσενικών ατόμων που συλλήφθηκαν σε απόσταση 20m ήταν 6,66%, 8,6% και 10,33%, 40m 12,5%, 15,16% και 16,16% και 80m 1%, 2,83% και 3,33% αντίστοιχα.

Ομοίως και για τα θηλυκά άτομα των τριών πληθυσμών, η μέγιστη απόσταση μετακίνησής τους εντός του οπωρώνα ήταν 80m (Σχήμα 8.3) Τα αντίστοιχα ποσοστά των θηλυκών ατόμων για τον ευαίσθητο εργαστηριακό πληθυσμό, τον

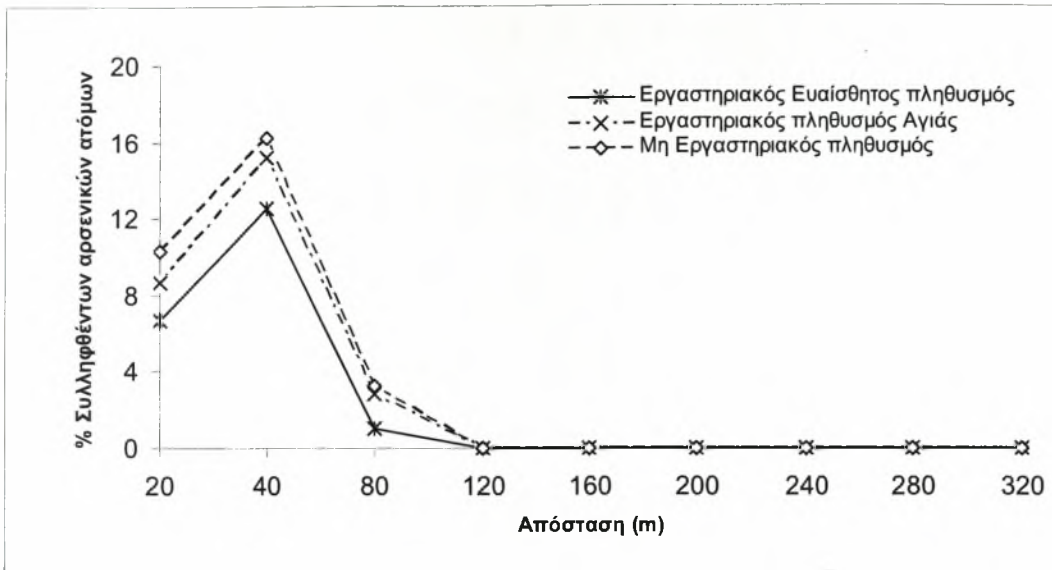
εργαστηριακό πληθυσμό της Αγιάς και τον μη εργαστηριακό πληθυσμό ήταν 5,66%, 7,3% και 5,33% για απόσταση 20m, 8,16%, 10,13% και 8,83% για 40m και 1,33%, 1,83% και 2% για τη μέγιστη απόσταση των 80m.

8.3.2. Μελέτη συγγένειας και διασποράς με χρήση δεικτών μικροδορυφορικού DNA

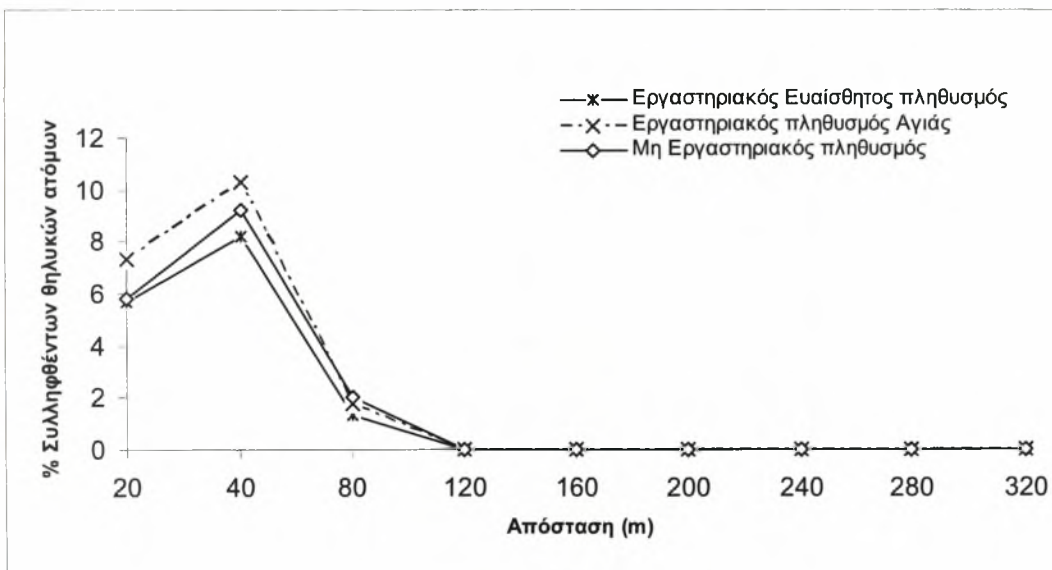
Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στα 303 άτομα (78 δείγματα από την πρώτη γενιά, 93 από τη δεύτερη, 108 από την τρίτη και 24 από την διαπαύουσα γενεά, Πίνακας 8.5.) που συλλέχθηκαν κατά το έτος 2007 από τους δύο εγκαταλελλημένους γειτονικούς οπоровνες στην περιοχή της Αγιάς Λάρισας (Εικόνα 8.3.). Η ανάλυση βασίστηκε σε 11 μικροδορυφορικούς τόπους οι οποίοι ενισχύθηκαν με PCR (Πίνακας 8.1.).

8.3.2.1. Γενετική ποικιλότητα και ισορροπία Hardy-Weinberg

Ο αριθμός των αλληλομόρφων στην πρώτη και τη δεύτερη γενεά κυμάνθηκε από 3 έως 23, στην τρίτη από 3 έως 22 και στην τέταρτη από 3 έως 17 ενώ οι πέντε από τους 11 μικροδορυφόρους εμφάνισαν 10 ή περισσότερα αλληλόμορφα σε όλες τις γενιές (Πίνακας 8.5.). Στον Πίνακα 8.5. παρατίθενται οι τιμές της αναμενόμενης (H_{exp}) και της παρατηρούμενης (H_o) ετεροζυγωτίας. Επίσης (Πίνακας 8.5.), φαίνεται ο υπολογισμός του συντελεστή F_{IS} , που μετρά τον βαθμό ομομιξίας, που κυμάνθηκε από -0,08 έως 0,23. Γενικά το εύρος των τιμών του είναι από -1 (καθολου ομομιξία) έως +1 (πλήρης ταύτηση). Τέλος, για όλους τους γενετικούς τόπους, υπολογίστηκαν τυχόν αποκλίσεις από την ισορροπία Hardy-Weinberg και ανά ζεύγη, η ύπαρξη ανισορροπίας σύνδεσης, δηλαδή η κατάσταση κατά την οποία κάποιοι συνδυασμοί αλληλομόρφων απαντώνται περισσότερο ή λιγότερο συχνά σε σχέση με το αναμενόμενο, που θα προέκυπτε από τον ανεξάρτητο συνδυασμό τους. Παρόλο που απόκλιση από το νόμο των Hardy-Weinberg παρατηρήθηκε σε όλες τις γενεές, αυτή περιορίστηκε σε λίγους μόνο μικροδορυφορικούς δείκτες (1-5) και η πιθανότητα ήταν υψηλή σε λίγες περιπτώσεις (Πίνακας 8.5.). Από τα 276 ζευγάρια των γενετικών τόπων, τα 56 έδειξαν σημαντική ανισορροπία σύνδεσης, αριθμός μεγαλύτερος από τον αναμενόμενο ($0,05 \times 276 = 13,8$).



Σχήμα 8.2. Το ποσοστό των συλληφθέντων αρσενικών ατόμων σε σχέση με την απόσταση το έτος 2008.



Σχήμα 8.3. Το ποσοστό των συλληφθέντων θηλυκών ατόμων σε σχέση με την απόσταση το έτος 2008.

Πίνακας 8.5. Αριθμός αλληλομόρφων (n), αναμενόμενη (H_{exp}) και παρατηρούμενη (H_o) ετεροζυγωτία, συντελεστής F_{is} και απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg για κάθε μικροδορυφόρο και γενιά.

Γ.Τ. ¹	1 ^η Γενιά (N=78)					2 ^η Γενιά (N=93)					3 ^η Γενιά (N=108)					Διαπαύουσα Γενιά (N=24)				
	n	H_{exp}	H_o	F_{is}	P*	n	H_{exp}	H_o	F_{is}	P*	n	H_{exp}	H_o	F_{is}	P*	n	H_{exp}	H_o	F_{is}	P*
Cp3.180	4	0.44	0.40	0.10	NS	3	0.40	0.34	0.14	*	3	0.42	0.32	0.23	NS	3	0.37	0.29	0.21	NS
Cp3.169	17	0.63	0.63	0.00	NS	13	0.57	0.58	-0.02	NS	13	0.64	0.61	0.05	NS	11	0.73	0.71	0.02	NS
Cp2.129	16	0.84	0.71	0.16	***	14	0.86	0.80	0.07	***	15	0.84	0.80	0.05	NS	10	0.82	0.71	0.14	***
Cp1.62	12	0.81	0.74	0.09	NS	11	0.83	0.76	0.08	*	11	0.76	0.76	0.01	NS	8	0.83	0.83	0.00	NS
Cp5.24	4	0.32	0.32	-0.01	NS	4	0.41	0.32	0.22	***	4	0.39	0.33	0.14	NS	3	0.23	0.25	-0.08	NS
Cp5M	18	0.90	0.79	0.11	***	20	0.91	0.84	0.07	*	19	0.91	0.89	0.02	NS	11	0.89	0.79	0.12	**
Cp4S	3	0.32	0.31	0.03	NS	3	0.42	0.37	0.14	NS	4	0.38	0.34	0.09	NS	3	0.38	0.38	0.02	NS
Cp6.46	23	0.88	0.86	0.03	NS	23	0.82	0.80	0.03	NS	22	0.85	0.84	0.01	NS	17	0.86	0.92	-0.07	NS
Cp2.131	18	0.76	0.73	0.04	NS	18	0.73	0.69	0.06	NS	18	0.73	0.66	0.10	**	10	0.60	0.63	-0.05	NS
Cp4.129	5	0.76	0.79	-0.05	NS	5	0.72	0.67	0.08	NS	5	0.70	0.76	-0.08	NS	5	0.79	0.71	0.11	NS
Cp6.32	10	0.58	0.54	0.07	NS	10	0.68	0.73	-0.08	NS	12	0.69	0.67	0.04	NS	7	0.64	0.54	0.16	NS

1: Γενετικοί τόποι.

P: Πιθανότητα για την απόκλιση από τον νομό των Hardy-Weinberg * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001, NS = μη σημαντικό.

8.3.2.2. Εκτίμηση συγγένειας

Στην Εικόνα 8.7. παρουσιάζεται η παρατηρούμενη και βάσει προσομοίωσης κατανομή των lod scores για κάθε ζεύγος ατόμων, για κάθε μία από τις τέσσερις γενεές του εντόμου που εξετάστηκαν, από τους οπωρώνες της περιοχής της Αγίας Λάρισας. Οι εξ ορισμού τιμές του ορίου (threshold) lod score που χρησιμοποιήθηκαν από το πρόγραμμα κυμάνθηκαν από 1,741 έως 3,062, ανάλογα με τις γενεές. Ωστόσο, στη μελέτη αυτή επιλέχθηκε threshold = 5,52 για όλες τις γενεές ώστε ο αριθμός των μη συγγενών ζευγών ατόμων, που ταξινομήθηκαν κατά λάθος ως συγγενή (Type I error) ουσιαστικά να μηδενιστεί. Με αυτήν την τιμή threshold ταυτοποιήθηκαν 2, 5, 25 και 0 ζεύγη αδελφών στην πρώτη, δεύτερη, τρίτη και διαπαύουσα γενεά αντίστοιχα (Πίνακας 8.6.).

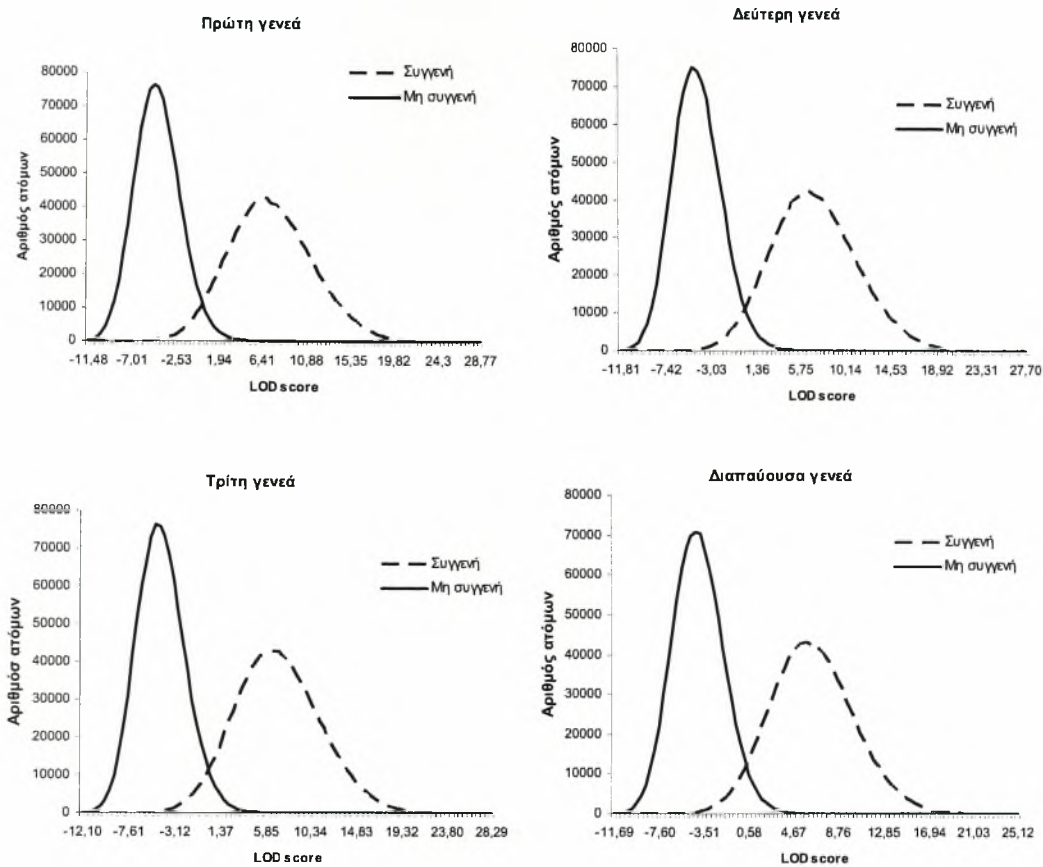
Πίνακας 8.6. Αριθμός συγγενών (αδέλφια) ανά γενεά. Εκτίμηση των σφαλμάτων τύπου I και II (Type I και Type II error).

Γενιές	N ¹	Ns ²	Type I error	Type II error
Πρώτη	78	2 (0,065%)	0,000240	0,369030
Δεύτερη	93	5 (0,114%)	0,000195	0,363640
Τρίτη	108	25 (0,425%)	0,000141	0,372530
Διαπαύουσα	24	0 (0,00%)	0,000133	0,441280

1: Αριθμός δειγμάτων που εξετάστηκαν.

2: Αριθμός ζευγαριών αδελφών υπολογισμένα με όριο = 5,25.

Με βάση την παραδοχή ότι ο αριθμός των συγγενών ανά οικογένεια σε ένα δείγμα ακολουθεί κατά προσέγγιση την κατανομή Poisson υπολογίστηκαν οι παρατηρούμενοι και οι αναμενόμενοι αριθμοί οικογενειών (Πίνακας 8.7.). Η παράμετρος λ της κατανομής για την πρώτη γενεά ήταν $\lambda = 0,4435$, για την δεύτερη $\lambda = 0,4183$, για την τρίτη $\lambda = 1,4053$ και για την διαπαύουσα γενεά $\lambda = 0,1766$. Η μέση τιμή λ αντιστοιχεί στο μέσο αριθμό συγγενών που συνεισφέρουν στο δείγμα τα άτομα N_i (αριθμός θηλυκών ή ζευγών γονέων που συνεισφέρουν απογόνους). Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των παρατηρούμενων και αναμενόμενων τιμών παρατηρήθηκε μόνο στην τρίτη γενεά ($\chi^2 = 23,501$, $df = 5$, $p < 0,001$).



Εικόνα 8.7. Κατανομές συχνοτήτων του lod score για κάθε μία από τις τέσσερις γενεές της καρπόκαψας για τα ζεύγη συγγενών και μη-συγγενών ατόμων.

Πίνακας 8.7. Παρατηρούμενοι (H_0) και αναμενόμενοι ($H_{exp.}$) αριθμοί αδελφών βάσει παραδοχής κατανομής Poisson.

Αριθμός ενηλίκων που αντιπροσωπεύουν μια οικογένεια	1 ^η Γενεά ¹		2 ^η Γενεά ²		3 ^η Γενεά ³		Διαπαύουσα Γενεά ⁴	
	Αν. ⁵	Παρ. ⁶	Αν.	Παρ.	Αν.	Παρ.	Αν.	Παρ.
1	22,2	48	25,6	48	26,5	48	3,6	48
2	4,9	15	5,4	15	18,7	15	0,3	15
3	-	-	0,7	15	8,7	15	-	-
4	-	-	-	-	3,1	15	-	-
5	-	-	-	-	0,9	15	-	-
6	-	-	-	-	0,2	15	-	-

1: $\chi^2 = 0,306$, $df = 1$, $p = 0,58$.

2: $\chi^2 = 5,519$, $df = 2$, $p = 0,063$.

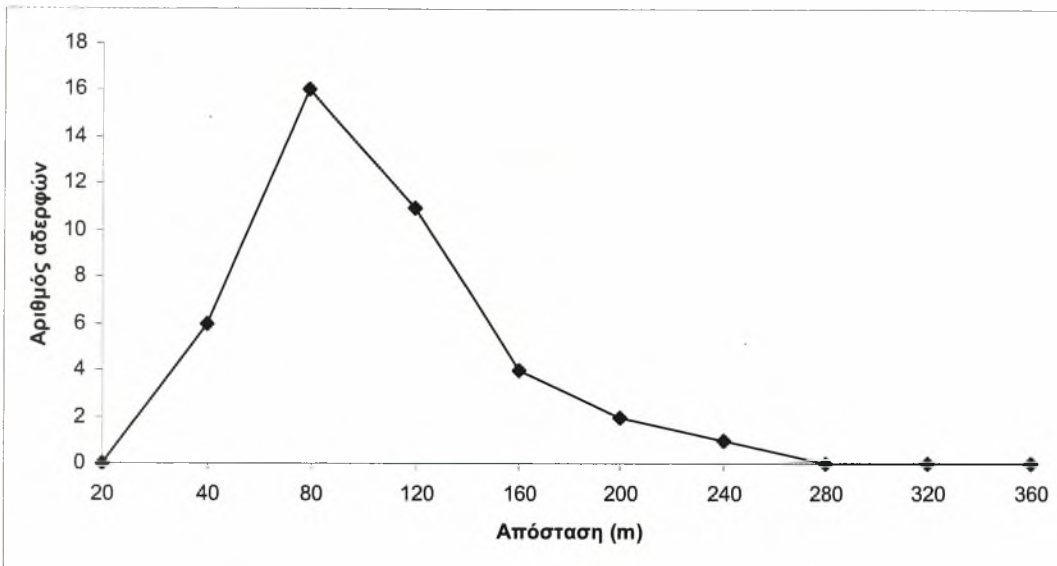
3: $\chi^2 = 23,501$, $df = 5$, $p < 0,001$.

4: $\chi^2 = 1,227$, $df = 1$, $p = 0,268$.

5: Αναμενόμενοι αριθμοί οικογενειών.

6: Παρατηρούμενοι αριθμοί οικογενειών.

Ο αριθμός των αδερφών σε σχέση με την απόσταση παρουσιάζεται στην Σχήμα 8.4. Η απόσταση προέκυψε από την ανάλυση όλων των αδερφών και από τις τέσσερις γενεές και για τους δύο οπωρώνες μαζί. Διαπιστώθηκε ότι η μεγαλύτερη απόσταση μετακίνησης ήταν 240m ενώ τα περισσότερα συγγενή άτομα ανιχνεύτηκαν σε απόσταση 80m.



Σχήμα 8.4. Ο αριθμός αδερφών σε σχέση με την απόσταση.

Στον Πίνακα 8.8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του αριθμού των ατόμων που μετανάστευσαν μεταξύ των δύο οπωρώνων (Εικόνα 8.3). Το ποσοστό των ατόμων που μετανάστευσε από τον οπωρώνα Β στον Α, ήταν λίγο μεγαλύτερο, αλλά δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ του αριθμού των ατόμων που μετακινήθηκαν από τον έναν οπωρώνα στον άλλο σε καμία γενεά (πρώτη γενεά $\chi^2 = 0,318$, $df = 1$, $p = 0,573$, δεύτερη γενεά $\chi^2 = 0,374$, $df = 1$, $p = 0,541$, τρίτη γενεά $\chi^2 = 0,033$, $df = 1$, $p = 0,856$).

8.3.3. Συγκριτική μελέτη πληθυσμών από Ελλάδα και Γαλλία

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε 413 δείγματα από εννιά ελληνικούς και έξι γαλλικούς πληθυσμούς και από διαφορετικούς ξενιστές (Εικόνες 8.5. και 8.6., Πίνακας 8.2.). Η ανάλυση βασίστηκε σε 11 μικροδορυφορικούς τόπους (Πίνακας 8.1.).

Πίνακας 8.8. Αριθμός μεταναστευτικών ατόμων μεταξύ των οπωρώνων Α και Β, στις τρεις γενεές που μελετήθηκαν.

Γενεές	N_B^1	Αρ. Μετ. ² από το Α στο Β	N_A^3	Αρ. Μετ. από το Β στο Α
Πρώτη	38	11 (28,9) ⁴	40	13(32,5)
Δεύτερη	41	12 (29,3)	52	17(32,7)
Τρίτη	51	9 (17,6)	57	11(19,3)

- 1: Αριθμός δειγμάτων που εξετάστηκαν από το χωράφι Α.
 2: Αριθμός μεταναστευτικών ατόμων.
 3: Αριθμός δειγμάτων που εξετάστηκαν από το χωράφι Β.
 4: (Ποσοστό μεταναστευτικών ατόμων).

8.3.3.1. Γενετική ποικιλομορφία πληθυσμών

Ο μέσος αριθμός των αλληλομόρφων κυμάνθηκε από 6,7 (πληθυσμός EcoA από την Ανίγνηση Γαλλίας, ξενιστής: μηλιά) έως 10,4 (πληθυσμός AgAa από την Αγιά Λάρισας, ξενιστής: μηλιά). Η τιμή R_s ήταν υψηλότερη για τους ελληνικούς πληθυσμούς και κυμάνθηκε από 6,8 έως 7,8, σε σχέση με τους γαλλικούς στους οποίους ήταν από 6,1 έως 6,6 και μάλιστα η διαφορά που παρατηρήθηκε μεταξύ των δύο πληθυσμών ήταν στατιστικώς σημαντική ($U = 0,000$, $p = 0,001$).

Η μέση παρατηρούμενη ετεροζυγωτία στους ελληνικούς πληθυσμούς, για όλους τους γενετικούς τόπους, ήταν μεταξύ 0,561 και 0,694, ενώ για τους γαλλικούς ήταν λίγο υψηλότερη και κυμάνθηκε από 0,582 έως 0,705 (Πίνακας 8.9.). Από τα αποτελέσματα του προγράμματος Bottleneck, που ανιχνεύει φαινόμενα στενωπού, λαμβάνοντας υπ' όψιν την αναμενόμενη και παρατηρούμενη ετεροζυγωτία, βρέθηκε ότι μόνο δύο πληθυσμοί, ένας από την Ελλάδα και ένας από τη Γαλλία παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δυο ετεροζυγωτιών (PiA και ValA, πληθυσμοί από τον Αγ. Λαυρέντιο Μαγνησίας και Valence Γαλλίας αντίστοιχα, ξενιστές: μηλιά και αχλαδιά αντίστοιχα). Συνεπώς, υπάρχουν ενδείξεις ότι υπάρχουν φαινόμενα στενωπού σε αυτούς τους πληθυσμούς.

Απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg παρατηρήθηκε σε λίγες μόνο περιπτώσεις και αφορούσε μικρό αριθμό μικροδορυφορικών τόπων (Πίνακας 8.10.). Επιπλέον, το επίπεδο σημαντικότητας ήταν σχετικά υψηλό ($p = 0,01$) μόνο σε πληθυσμό της Αγιάς από μήλα (AgAB) για δύο μικροδορυφορικούς τόπους (Cr2.129, Cr5.24) και στον πληθυσμό από την Ανίγνηση (EcoP) από αχλάδια για τον μικροδορυφορικό τόπο Cr5M. Όταν η δοκιμή της απόκλισης από την ισορροπία Hardy-Weinberg εφαρμόστηκε για όλους τους γενετικούς τόπους κάθε πληθυσμού, υψηλό επίπεδο σημαντικότητας ($p = 0,001$) διαπιστώθηκε σε δύο

πληθυσμούς (AlexA, AgAb) (Πίνακας 8.10.). Ωστόσο, σημαντικές αποκλίσεις παρατηρήθηκαν και στους πληθυσμούς PiP, PiW, ValW και EcoP (Μαγνησία, Valence, Avignon, Πίνακας 8.10.). Από τα 825 ζευγάρια των γενετικών τόπων, τα 63 έδειξαν σημαντική ανισορροπία σύνδεσης, αριθμός λίγο μεγαλύτερος από τον αναμενόμενο ($0,05 \times 825 = 41,25$). Η μέση τιμή του συντελεστή F_{IS} για όλους τους γενετικούς τόπους δεν διέφερε μεταξύ των πληθυσμών των δύο χωρών ($U = 14,0$, $p = 0,124$).

Πίνακας 8.9. Δείκτες γενετικής ποικιλομορφίας σε πληθυσμούς από Ελλάδα και Γαλλία. Αριθμός δειγμάτων που εξετάστηκαν (N), μέσος αριθμός αλληλομόρφων (n), τιμή R_S (allelic richness), αναμενόμενη (H_{exp}) και παρατηρούμενη ετεροζυγωτία (H_o) για όλους τους γενετικούς τόπους.

Κωδικός*	Ξενιστής	Περιοχή	N	n	R_S	H_{exp}	H_o
AlexA	Μηλιά	Αλεξάνδρεια Ημαθίας	24	7,5	6,8	0,666	0,650
AgAa	Μηλιά	Αγιά Λάρισας	54	10,4	7,3	0,659	0,643
AgAb	Μηλιά	Αγιά Λάρισας	44	9,5	7,2	0,671	0,610
AgW	Καρυδιά	Αγιά Λάρισας	25	8,5	7,5	0,641	0,646
PiA	Μηλιά	Αγ. Λαυρέντιος Μαγνησίας	19	7,3	7,1	0,699	0,694
PiP	Αχλαδιά	Κορωπί Μαγνησίας	21	7,4	7,0	0,598	0,561
PiW	Καρυδιά	Αγριά Μαγνησίας	29	8,0	6,9	0,644	0,584
ArgP	Αχλαδιά	Άργος Αργολίδας	23	8,8	7,8	0,668	0,613
TrA	Μηλιά	Τρίπολη Αρκαδίας	19	7,6	7,3	0,626	0,636
MarW	Καρυδιά	St-Marcelin	29	7,8	6,6	0,639	0,611
ValA	Μηλιά	Valence, Γαλλία	36	7,3	6,1	0,647	0,656
ValP	Αχλαδιά	Valence, Γαλλία	25	7,1	6,3	0,635	0,629
ValW	Καρυδιά	Valence, Γαλλία	20	6,8	6,4	0,654	0,705
EcoA	Μηλιά	Avignon, Γαλλία	20	6,7	6,4	0,639	0,662
EcoP	Αχλαδιά	Avignon, Γαλλία	25	7,0	6,2	0,605	0,582

*Οι κωδικοί των πληθυσμών παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.2.

Πίνακας 8.10. Συντελεστής F_{IS} και επίπεδο σημαντικότητας για αποκλίσεις από την ισορροπία Hardy-Weinberg.

Κωδικοί Γενετικοί Τόποι

	Cp3.180	Cp3.169	Cp2.129	Cp1.62	Cp5.24	Cp5M	Cp4S	Cp6.46	Cp2.131	Cp4.129	Cp6.32	Σύνολο
AlexA	-0,35 ^{ns}	-0,05 ^{ns}	0,05 ^{ns}	0,17 ^{**}	0,24 ^{ns}	0,11 [*]	-0,08 ^{ns}	0,09 [*]	0,13 ^{ns}	-0,16 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	0,03 ^{***}
AgAa	0,1 ^{ns}	0,04 ^{ns}	0,03 ^{ns}	-0,02 ^{ns}	0,11 [*]	0,07 ^{ns}	0,04 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,07 [*]	0,03 ^{ns}	-0,15 [*]	0,02 ^{ns}
AgAb	0,17 [*]	-0,05 ^{ns}	0,08 ^{**}	0,1 ^{ns}	0,37 ^{**}	0,09 [*]	0,17 ^{ns}	0,05 [*]	0,05 ^{ns}	0,14 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,09 ^{***}
AgW	-0,12 ^{ns}	-0,05 ^{ns}	0,25 ^{ns}	0,04 ^{ns}	0,16 ^{ns}	0,02	-0,06 ^{ns}	-0,02 ^{ns}	0,02 ^{ns}	-0,22 [*]	-0,17 ^{ns}	-0,01 ^{ns}
PIA	0,33 ^{ns}	-0,22 [*]	-0,15 ^{ns}	0,2 ^{ns}	0,2 ^{ns}	0,12 ^{ns}	-0,10 ^{ns}	0,04 ^{ns}	-0,03 ^{ns}	0,2 ^{ns}	-0,17 ^{ns}	0,01 ^{ns}
PIP	-0,15 ^{ns}	0,18 ^{ns}	0,13 ^{ns}	-0,02 ^{ns}	0,6 ^{ns}	-0,03 ^{ns}	0,03 ^{ns}	-0,01 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,11 ^{ns}	0,06 [*]
PIW	-0,17 ^{ns}	0,04 ^{ns}	0,19 ^{ns}	0,19 [*]	0,35 [*]	0,01 ^{ns}	0,12 ^{ns}	-0,07 ^{ns}	0,19 ^{ns}	0,24 ^{ns}	-0,05 ^{ns}	0,09 [*]
ArgP	0,12 ^{ns}	0,08 [*]	0,07 ^{ns}	0,1 ^{ns}	0,62 ^{**}	-0,04 ^{ns}	-0,1 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,03 ^{ns}	-0,13 ^{ns}	0,21 [*]	0,08 ^{ns}
TrA	-0,06 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,33 ^{**}	-0,22 [*]	-0,17 ^{ns}	-0,11 ^{ns}	-0,22 ^{ns}	0,09 ^{ns}	0,02 ^{ns}	-0,14 ^{ns}	0,12 ^{ns}	-0,02 ^{ns}
MarW	0,29 ^{ns}	0,09 ^{ns}	-0,05 ^{ns}	-0,02 ^{ns}	0,14 ^{ns}	0,16 [*]	0,02 ^{ns}	0,17 [*]	0,00 ^{ns}	-0,15 ^{ns}	-0,07 ^{ns}	0,04 ^{ns}
ValA	0,09 ^{ns}	-0,05 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	-0,12 ^{ns}	0,03 ^{ns}	-0,05 ^{ns}	0,22 ^{ns}	0,05 ^{ns}	0,04 ^{ns}	-0,02 ^{ns}	-0,13 ^{ns}	-0,01 ^{ns}
ValP	0,53 [*]	0,03 ^{ns}	-0,16 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,19 ^{ns}	-0,02 ^{ns}	-0,02 ^{ns}	0,18 ^{ns}	-0,01 [*]	-0,08 ^{ns}	-0,20 [*]	0,01 ^{ns}
ValW	-0,23 ^{ns}	-0,26 [*]	0 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	0,12 ^{ns}	-0,05 ^{ns}	-0,19 ^{ns}	-0,07 ^{ns}	-0,03 ^{ns}	-0,09 ^{ns}	-0,09 ^{ns}	-0,08 ^{**}
EcoA	-0,12 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	0,03 ^{ns}	-0,23 ^{ns}	-0,23 ^{ns}	0,14 [*]	-0,04 ^{ns}	0,05 ^{ns}	0,07 ^{ns}	-0,16 ^{ns}	-0,12 ^{ns}	-0,04 ^{ns}
EcoP	-0,15 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	-0,02 ^{ns}	0,05 ^{ns}	-0,25 ^{ns}	0,10 ^{**}	0,38 [*]	0,01 ^{ns}	0,17 ^{ns}	0,17 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,04 [*]

1: Οι κωδικοί των πληθυσμών παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.2.

Πιθανότητα P για την απόκλιση από τον νομό των Hardy-Weinberg * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001, NS = μη σημαντικό.

8.3.3.2. Γενετική διαφοροποίηση πληθυσμών

Η γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών εξετάστηκε με ανάλυση AMOVA. Συγκεκριμένα, υπολογίστηκε το ποσοστό της γενετικής παραλακτικότητας εντός των πληθυσμών, μεταξύ των πληθυσμών και μεταξύ των ομάδων (πληθυσμοί της Ελλάδας και της Γαλλίας), (Πίνακας 8.11.). Το 95% της παρατηρούμενης παραλακτικότητας οφείλεται σε διαφορές ενδοπληθυσμιακές, το 1,1% σε διαπληθυσμιακές και το 3,9% σε διαφορές μεταξύ ελληνικών-γαλλικών πληθυσμών. Η γενετική διαφοροποίηση, μεταξύ των πληθυσμών εντός κάθε ομάδας δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ($p = 0,074$). Αντίθετα, οι δύο ομάδες των πληθυσμών (Ελλάδα-Γαλλία) διαφοροποιήθηκαν σημαντικά ($p = 0,006$). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση στους έξι από τους 11 μικροδορυφόρους (Cr5.24, Cr5M, Cr6.46, Cr2.131, Cr4.129, Cr6.32), (Πίνακας 8.11.).

Επιπλέον, η γενετική διαφοροποίηση των 15 πληθυσμών εκτιμήθηκε και μέσω υπολογισμού του συντελεστή F_{ST} ανά ζεύγη πληθυσμών (Πίνακας 8.12.). Στις περισσότερες περιπτώσεις η τιμή του F_{ST} ήταν χαμηλή και κυμάνθηκε από -0,002 μέχρι 0,081, γεγονός που υποδηλώνει υψηλή γονιδιακή ροή μεταξύ τους. Σχετικά υψηλό F_{ST} ($> 0,062$) παρατηρήθηκε σε τέσσερα ζευγάρια ελληνικών πληθυσμών (AlexA-AgW, AlexA-PiA, PiA-PiP, AgW-TrA). Στις τρεις από τις τέσσερις περιπτώσεις οι πληθυσμοί προήλθαν από διαφορετικό ξενιστή ενώ η μεγαλύτερη τιμή του F_{ST} ($= 0,081$), παρατηρήθηκε μεταξύ του πληθυσμού από την Αλεξάνδρεια Ημαθείας που συλλέχθηκε από μήλα και του πληθυσμού από την Αγιά Λάρισας που συλλέχθηκε από καρύδια.

Στους γαλλικούς πληθυσμούς, σχετικά υψηλό F_{ST} διαπιστώθηκε μόνο σε δύο περιπτώσεις: μεταξύ του πληθυσμού από την Avignon που συλλέχθηκε από μήλα και του πληθυσμού από την St-Marcelin που συλλέχθηκε από καρύδια ($F_{ST} = 0,068$) καθώς και μεταξύ του πρώτου πληθυσμού και αυτού από την Valence που συλλέχθηκε επίσης από καρύδια ($F_{ST} = 0,064$). Οι υψηλότερες τιμές F_{ST} ταυτοποιήθηκαν μεταξύ πληθυσμών των δύο χωρών, και συγκεκριμένα σε επτά περιπτώσεις υπερέβαινε το 0,06. Η υψηλότερη τιμή διαπιστώθηκε μεταξύ του πληθυσμού από τον Αγ. Λαυρέντιο Μαγνησίας που συλλέχθηκε από μήλα και του πληθυσμού από την Valence που συλλέχθηκε από καρύδια ($F_{ST} = 0,083$).

Πίνακας 8.11. Αποτελέσματα AMOVA για τους 11 δείκτες μικροδορυφορικού DNA.

Γ. Τ.*	Εντός των δειγμάτων			Μεταξύ των δειγμάτων εντός των ομάδων			Μεταξύ των ομάδων (Ελλάδα-Γαλλία)			
	df	Variance component	% ποικιλότητα	df	Variance component	% ποικιλότητα	df	Variance component	% ποικιλότητα	P
Cp3.180	801	0,162	98,9	13	0,001	0,3	1	0,001	0,8	0,081
Cp3.169	809	0,303	99,1	13	0,002	0,7	1	0,000	0,1	0,253
Cp2.129	807	0,398	98,1	13	0,005	1,2	1	0,003	0,7	0,126
Cp1.62	807	0,381	97,1	13	0,008	2,1	1	0,003	0,8	0,132
Cp5.24	805	0,219	84,9	13	0,003	1,3	1	0,035	13,7	0,000
Cp5M	811	0,452	97,4	13	0,005	1,1	1	0,007	1,6	0,044
Cp4S	799	0,220	97,3	13	0,003	1,4	1	0,003	1,3	0,072
Cp6.46	809	0,402	97,9	13	0,003	0,6	1	0,006	1,5	0,036
Cp2.131	811	0,385	94,1	13	0,006	1,4	1	0,018	4,5	0,005
Cp4.129	809	0,295	93,7	13	0,005	1,5	1	0,015	4,9	0,004
Cp6.32	809	0,347	86,4	13	0,001	0,3	1	0,053	13,3	0,000
Σύνολο	811	3,537	95,0	13	0,041	1,1	1	0,145	3,9	0,006

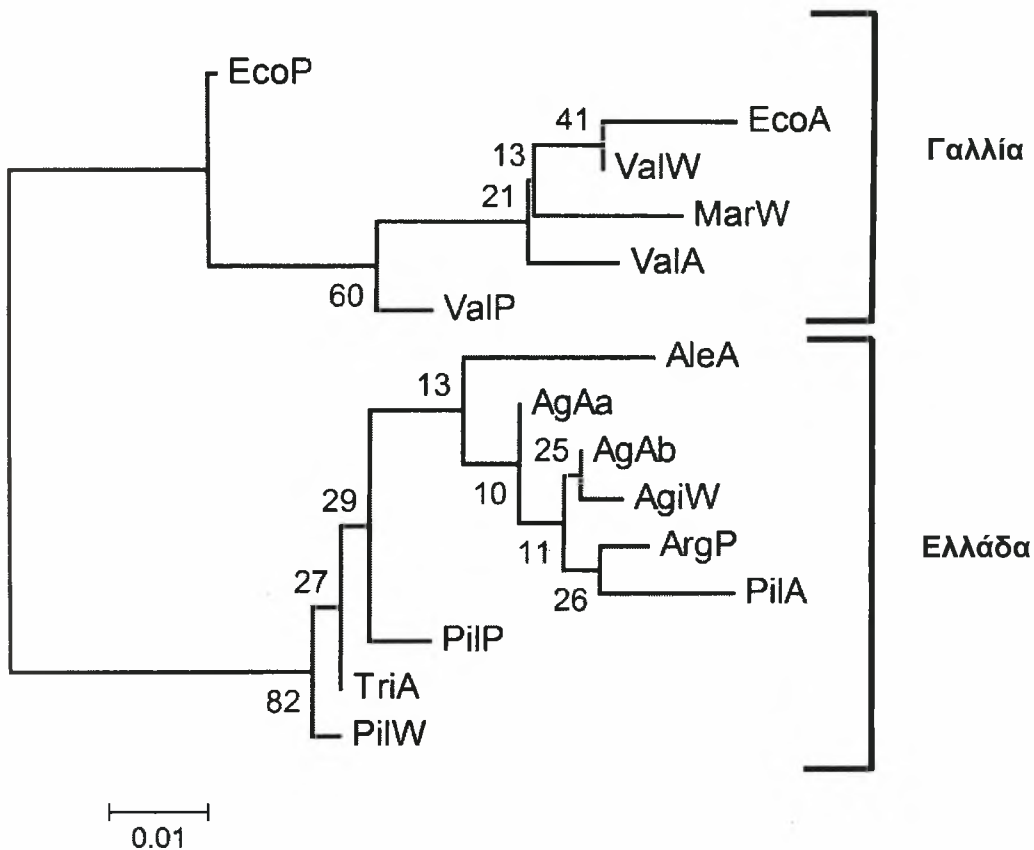
*Γενετικός τόπος.

Πίνακας 8.12. Γενετική διαφοροποίηση μεταξύ 15 πληθυσμών της καρτόκαψας από Ελλάδα και Γαλλία. Κάτω από τη διαγώνιο δίνονται οι τιμές του F_{ST} και η πιθανότητα απουσίας διαφορών μεταξύ των πληθυσμών. Πάνω από τη διαγώνιο δίνονται οι πιθανότητες για την απουσία αλληλομορφικής διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, NS = μη σημαντικό).

	AlexA	AgAa	AgAb	AgW	PIA	PIP	PIW	ArgP	TrA	MarW	ValA	ValP	ValW	EcoA	EcoP
AlexA	-														
AgAa	0,011	-	NS	NS	*	NS	***	**	**	***	***	***	***	***	***
AgAb	0,012	-0,002	-	NS	**	*	***	NS	**	***	***	***	***	***	***
AgW	0,081	0,057	0,057	-	*	*	**	**	NS	***	***	***	***	***	***
PIA	0,079	0,056	0,053	0,023	-	***	***	NS	*	***	***	***	***	***	***
PIP	0,021	0,011	0,012	0,050	0,066	-	NS	***	**	***	***	***	***	***	***
PIW	0,057	0,043	0,044	0,002	0,003	0,045	-	***	NS	***	***	***	***	***	***
ArgP	0,011	0,009	0,005	0,046	0,051	0,018	0,043	-	**	***	***	***	***	***	***
TrA	0,013	0,006	0,005	0,063	0,054	0,020	0,045	0,005	-	***	***	***	***	***	***
MarW	0,021	0,002	-0,001	0,078	0,079	0,014	0,069	0,013	0,010	-	***	***	NS	***	***
ValA	0,058	0,042	0,039	0,027	0,018	0,030	0,008	0,045	0,051	0,058	-	***	**	***	***
ValP	0,045	0,026	0,033	0,020	0,025	0,026	0,012	0,038	0,033	0,051	0,015	-	NS	***	*
ValW	0,015	0,007	0,011	0,077	0,083	0,007	0,062	0,033	0,025	0,014	0,045	0,038	-	NS	NS
EcoA	0,062	0,047	0,046	0,015	0,015	0,038	0,003	0,049	0,055	0,068	0,012	0,021	0,064	-	***
EcoP	0,012	0,008	0,005	0,055	0,056	0,002	0,038	0,019	0,015	0,009	0,026	0,025	0,002	0,040	-
			NS	***	NS	NS	***	***	*	NS	**	***	NS	***	***

*Οι κωδικοί των πληθυσμών παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.2.

Η σχηματική απεικόνιση των φυλογενετικών σχέσεων των πληθυσμών πραγματοποιήθηκε με την κατασκευή δενδρογράμματος UPGMA, που στηρίχτηκε στη γενετική απόσταση DAS. Παρόλο που οι τιμές bootstrap δεν ήταν ιδιαίτερα υψηλές, το δέντρο απεικονίζει ξεκάθαρα το διαχωρισμό των ελληνικών και των γαλλικών πληθυσμών (Εικόνα 8.8.). Επίσης, από το δενδρογράμμα είναι προφανές ότι, μεταξύ των ελληνικών πληθυσμών, δεν παρατηρήθηκε διαχωρισμός είτε βάσει περιοχής (Βόρεια, Κεντρική και Νότια Ελλάδα) είτε βάσει προέλευσης ξενιστή.



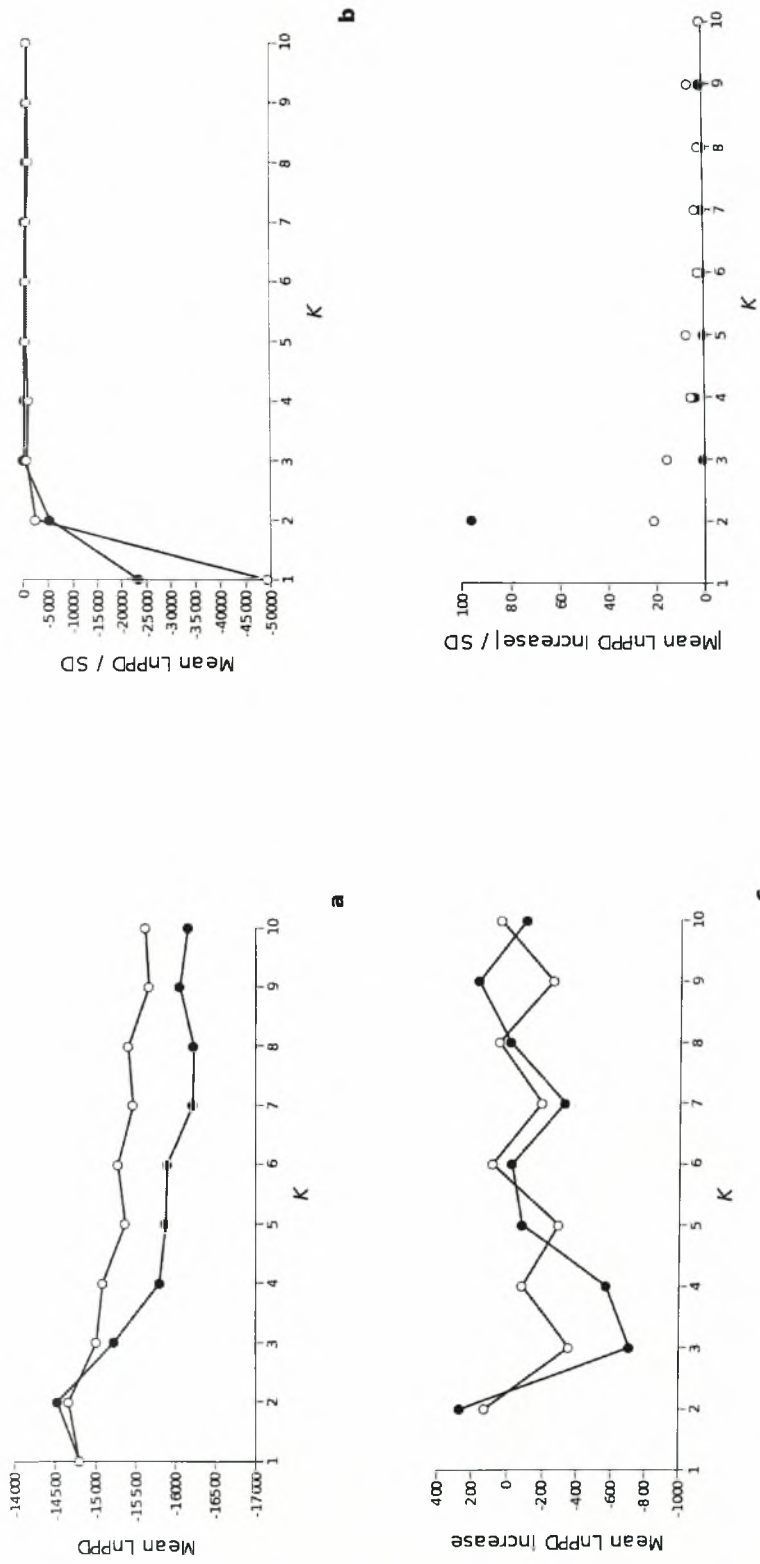
Εικόνα 8.8. Δενδρογράμμα UPGMA που απεικονίζει τη γενετική απόσταση βάσει των κοινών αλληλομόρφων, μεταξύ των 15 πληθυσμών του *Cydia pomonella*. Οι αριθμοί αντιπροσωπεύουν το ποσοστό αξιοπιστίας των κλάδων, εφαρμόζοντας 1000 εικονικές δειγματοληψίες (bootstraps). Οι κωδικοί των πληθυσμών παρουσιάζονται στον Πίν 8.2.

Η Μπαγεσιανή ανάλυση με το πρόγραμμα STRUCTURE έδειξε ότι τα δείγματα που εξετάστηκαν, ομαδοποιούνται σε δύο γενετικές ομάδες ($K = 2$, Ελλάδα και Γαλλία). Η επιλογή του $K = 2$ έγινε σύμφωνα με τα κριτήρια των Garnier *et al.*, Lecis *et al.* και Evnano *et al.* (2005) και βασίστηκε στο γεγονός ότι η υψηλότερη

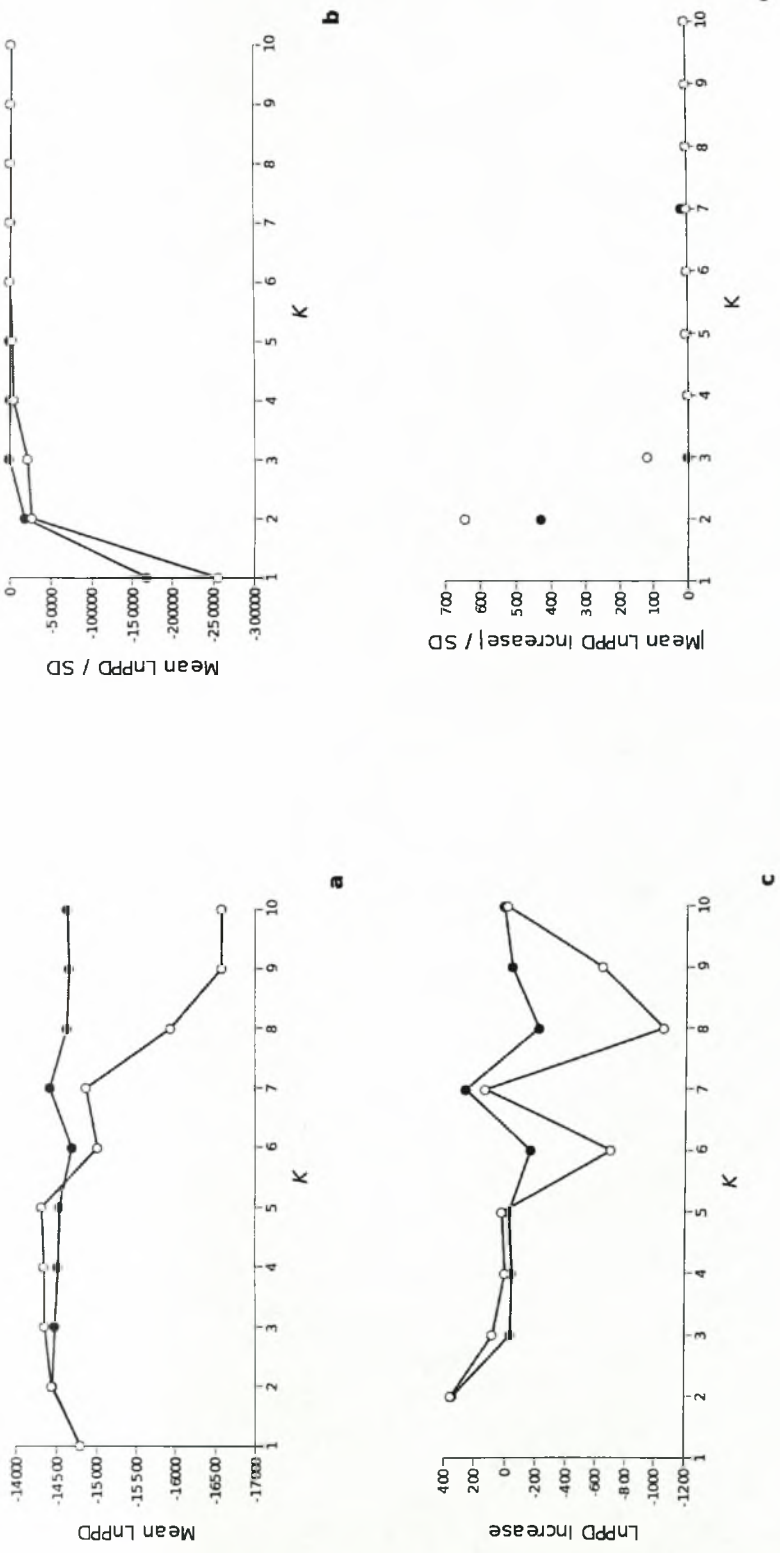
αύξηση του LnPPD (λογάριθμος της μετα-πιθανότητας) παρατηρήθηκε για $K = 2$. Εκτός από την αύξηση του LnPPD , η επιλογή της τιμής του K πρέπει να είναι συντηρητική, ώστε να επιλεγθεί ο μικρότερος δυνατός αριθμός γενετικών ομάδων που εξηγεί ικανοποιητικά τα δεδομένα και να αποφευχθεί ένας μη υποστηριζόμενος πολυδιαχωρισμός. Η επιλογή του $K = 2$ ήταν πιο εμφανής όταν συνυπολογίσθηκε και η τυπική απόκλιση από τις 10 επαναλήψεις για κάθε τιμή K (Εικόνες 8.9 - 8.10 a, b, c, d). Αξίζει να σημειωθεί ότι και τα δύο μοντέλα (ανάμιξης και μη-ανάμιξης) ομαδοποίησαν τα δείγματα σε δύο γενετικές ομάδες $K = 2$.

Την καλύτερη ικανότητα διάκρισης δείχνει το γενεαλογικό μοντέλο χωρίς ανάμιξη (Πίνακας 8.13.). Ταξινομεί τα άτομα με μεγαλύτερη ακρίβεια βάσει της προέλευσής τους και με τα δύο μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν (CAF, IAF). Επιπλέον το ποσοστό των ατόμων που δεν διαχωρίστηκαν είναι μικρότερα σε σχέση με το γενεαλογικό μοντέλο ανάμιξης. Όπως παρατηρήθηκε για τον πληθυσμό από την Αλεξάνδρεια Ημαθίας που συλλέχθηκε από μήλα, το γενεαλογικό μοντέλο χωρίς ανάμιξη, σύμφωνα με το μοντέλο CAF, διέκρινε 21 άτομα από την Ελλάδα, μηδέν από την Γαλλία και δεν μπόρεσε να διαχωρίσει τρία. Στην Εικόνα 8.11. δίνεται οπτικοποιημένα τα αποτελέσματα του μοντέλου της χωρίς ανάμιξης (IAF).

Ενώ το γενεαλογικό μοντέλο ανάμιξης, σύμφωνα με το ίδιο μοντέλο (CAF) και τον ίδιο πληθυσμό διέκρινε δύο Γαλλικά άτομα, 11 Ελληνικά και δεν μπόρεσε να διαχωρίσει 11 άτομα.



Εικόνα 8.9. Μετα-πιθανότητα (Posterior probability, LnPPD) για διάφορες τιμές του K (αριθμός γενετικών ομάδων) με το μοντέλο ανάμιξης. (a) = Μέση LnPPD, (b) = Μέση LnPPD προς τυπική απόκλιση, (c) = Αύξηση της μέσης LnPPD, (d) = Απόλυτη τιμή της αύξησης της μέσης LnPPD. Με μαύρους κύκλους το μοντέλο που θεωρεί τις αλληλομορφικές συχνότητες συσχετιζόμενες, με άσπρους κύκλους το μοντέλο που θεωρεί τις αλληλομορφικές συχνότητες ανεξάρτητες.



Εικόνα 8.10. Μετα-πιθανότητα (Posterior probability, LnPPD) για διάφορες τιμές του K (αριθμός γενετικών ομάδων) με το μοντέλο μη-ανάμιξης. (a) = Μέση λογαριθμημένη (LnPPD), (b) = Μέση λογαριθμημένη (LnPPD) προς τυπική απόκλιση, (c) = Αύξηση της μέσης λογαριθμημένης (LnPPD), (d) = Απόλυτη τιμή της αύξησης της μέσης λογαριθμημένης (LnPPD). Με μαύρους κύκλους το μοντέλο που θεωρεί τις αλληλομορφικές συχνότητες αλληλοεξαρτώμενες, με άσπρους κύκλους το μοντέλο που θεωρεί τις αλληλομορφικές συχνότητες ανεξάρτητες.

Πίνακας 8.13. Διαχωρισμός του *C. pomonella* σε δύο γενετικές ομάδες. Τα άτομα κατηγοριοποιούνται σε μια ενιαία ομάδα όταν το ποσοστό καταγωγής τους σ' αυτήν ήταν μεγαλύτερο από 80%.

Κωδικός	Ξενιστής	Περιοχή	N	Γενεαλογικό μοντέλο ανάμιξης		Γενεαλογικό μοντέλο χωρίς ανάμιξη	
				CAF ¹	IAF ²	CAF	IAF
AgAa	Μηλιά	Κ. Ελλάδα	54	0-28-26	0-11-43	1-42-11	1-46-7 ³
AgAb	Μηλιά	Κ. Ελλάδα	44	2-20-22	0-10-34	3-36-5	3-37-4
AlexA	Μηλιά	Β. Ελλάδα	24	2-11-11	0-4-20	0-21-3	0-22-2
AgW	Καρυδιά	Κ. Ελλάδα	25	0-21-4	0-9-16	1-23-1	1-23-1
ArgP	Αχλαδιά	Ν. Ελλάδα	23	0-13-10	0-6-17	1-18-4	1-17-8
EcoP	Αχλαδιά	Avignon, Γαλλία	25	15-1-9	9-0-16	20-1-4	21-1-1
EcoA	Μηλιά	Avignon Γαλλία	20	15-0-5	9-0-11	19-0-1	19-1-5
MarW	Καρυδιά	St-Marcelin Γαλλία	29	0-21-8	12-0-17	25-1-3	25-1-3
PiA	Μηλιά	Κ. Ελλάδα	19	1-15-3	1-3-15	1-16-2	1-16-2
PiP	Αχλαδιά	Κ. Ελλάδα	21	0-15-6	0-3-18	1-17-3	1-18-2
PiW	Καρυδιά	Κ. Ελλάδα	29	1-13-15	1-7-21	5-19-5	4-20-5
TrA	Μηλιά	Ν. Ελλάδα	19	5-8-6	0-2-17	5-9-5	5-10-4
ValP	Αχλαδιά	Valence Γαλλία	25	17-0-8	11-0-14	22-0-3	21-0-4
ValW	Καρυδιά	Valence Γαλλία	20	14-0-6	6-0-14	17-0-3	20-0-0
ValA	Μηλιά	Valence Γαλλία	36	31-5-0	19-0-17	35-0-1	35-0-1

1: Μοντέλο που θεωρεί τις αλληλομορφικές συχνότητες αλληλοεξαρτώμενες.

2: Μοντέλο που θεωρεί τις αλληλομορφικές συχνότητες ανεξάρτητες.

3: 1-46-7: 1 άτομο προσδιορίστηκε ότι ανήκει στη γαλλική ομάδα, 46 άτομα στην ελληνική ομάδα και 7 δε διαχωρίστηκα.



Εικόνα 8.11. Ομαδοποίηση βάσει του μοντέλου χωρίς ανάμιξη (IAF) των 15 πληθυσμών σε δύο γενετικές ομάδες ($K = 2$, Ελλάδα = κόκκινο χρώμα και Γαλλία = πράσινο χρώμα). Κάθε μπάρα δείχνει το ποσοστό του γενώματος του ατόμου που ανήκει στον καθένα από τους δυο πληθυσμούς. 1 = AgAa, 2 = AgAb, 3 = AlexA, 4 = AgW, 5 = ArgP, 6 = EcoP, 7 = EcoA, 8 = MarW, 9 = PiA, 10 = PiP, 11 = PiW, 12 = TrA, 13 = ValP, 14 = ValW, 15 = ValA. Οι κωδικοί των πληθυσμών παρουσιάζονται στον Πίν 5.2. Οι πληθυσμοί χωρίζονται μεταξύ τους με μαύρη γραμμή.

8.4. Συζήτηση

8.4.1. Διασπορά του *Cydia pomonella*

Η μελέτη της διασποράς του εντόμου *Cydia pomonella*, πραγματοποιήθηκε με την εξαπόλυση σημασμένων αρσενικών και θηλυκών ατόμων και καταγραφή των

συλλήψεων τους σε παγίδες τύπου Δέλτα που περιείχαν καίρομόνη και σεξουαλική φερόμενη (MMR). Η μέθοδος έχει εφαρμοστεί στο παρελθόν αλλά μόνο για αρσενικά άτομα με χρήση σεξουαλικών φερομονών (Mani & Wildbolz 1977, Bloem *et al.* 1998, Keil *et al.* 2001) ενώ η διασπορά των θηλυκών ατόμων είχε εκτιμηθεί μόνο με παγίδευση σε κολλητικές ταινίες αναρτημένες στα δέντρα γύρω από το σημείο εξαπόλυσης (Bloem *et al.* 1998) και με έμμεσες μεθόδους σε εργαστηριακά πειράματα (Schumacher *et al.* 1997b).

Στη μελέτη αυτή, για πρώτη φορά, πραγματοποιείται παρακολούθηση της διασποράς των θηλυκών ατόμων με παγίδες τύπου Δέλτα που περιείχαν καίρομόνη. Η καίρομόνη έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στο παρελθόν, για την παρακολούθηση των πληθυσμών του εντόμου σε οπωρώνες και τον προσδιορισμό του χρόνου εφαρμογής επέμβασης (Landolt & Guédot 2006).

Από τα αποτελέσματα των συλλήψεων παρατηρήθηκε μικρότερο ποσοστό συλληφθέντων ατόμων το έτος 2007 σε σχέση με το 2008. Επίσης, διαπιστώθηκε διαφορά στην απόσταση μετακίνησης του εντόμου μεταξύ των δύο ετών. Το έτος 2007 η μέγιστη απόσταση επανασύλληψης ήταν 34 μέτρα και το 2008 ήταν 80 μέτρα. Μια πιθανή αιτία είναι η διαφορετική διάταξη των παγίδων κατά τα δύο έτη. Το έτος 2007 οι παγίδες ήταν τοποθετημένες σε απόσταση 4, 18, 30 και 34 μέτρων και αμέσως μετά σε απόσταση 360 μέτρα από το σημείο εξαπόλυσης, ενώ το επόμενο έτος η διάταξη ήταν σε ομόκεντρους κύκλους με ακτίνα 20 μέτρα από το σημείο εξαπόλυσης ο πρώτος, 40 μέτρα ο δεύτερος και οι υπόλοιποι επτά ομόκεντροι κύκλοι είχαν ακτίνα αυξημένη κατά 40 μέτρα από τον προηγούμενο. Επομένως, είναι πιθανόν το έτος 2007 μερικά εξαπολυθέντα άτομα να μετακινήθηκαν σε απόσταση μεγαλύτερη των 34 μέτρων αλλά λόγω απουσίας παγίδων να μην καταγράφηκαν οι πτήσεις τους.

Επιπλέον και τα δύο έτη διαπιστώθηκε μεγαλύτερος αριθμός συλληφθέντων αρσενικών ατόμων στις παγίδες και μάλιστα η διαφορά μεταξύ αρσενικών-θηλυκών ήταν στατιστικώς σημαντική για τις συλλήψεις των εξαπολυθέντων ατόμων το 2007 καθώς και για τον πληθυσμό που προέκυψε από τη συλλογή προνυμφών την καλλιεργητική περίοδο το 2008. Ως πιθανή αιτία γι' αυτό είναι η σύσταση της προσελκυστικής ουσίας που εκτός από καίρομόνη, που αποτελεί προσελκυστικό τροφής και για τα δύο φύλα, περιελάμβανε και σεξουαλική φερόμονη η οποία προσελκύει μόνο τα αρσενικά άτομα.

Το 2007 τα αρσενικά άτομα μετακινήθηκαν σε μεγαλύτερη απόσταση (34 μέτρα) σε σχέση με τα θηλυκά (18 μέτρα) ενώ το 2008 δεν παρατηρήθηκε διαφορά στη μέγιστη απόσταση πτήσης μεταξύ των δύο φύλων (80 μέτρα). Το μεγαλύτερο ποσοστό παρατηρήθηκε στα 40 μέτρα ενώ δεν καταγράφηκε διαφορά στην απόσταση πτήσης μεταξύ των τριών διαφορετικών πληθυσμών που εξετάστηκαν, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι συνθήκες εκτροφής δεν επηρεάζουν την ικανότητα πτήσης του εντόμου. Ωστόσο, παρατηρήθηκε διαφορά στο ποσοστό των συλλήψεων μεταξύ των πληθυσμών, με το υψηλότερο ποσοστό να καταγράφεται στα άτομα που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου. Πιθανώς, το υψηλότερο ποσοστό οφείλεται στην καλύτερη προσαρμογή αυτού του πληθυσμού στις φυσικές συνθήκες, επειδή ο χρόνος διατήρησής του σε εργαστηριακές συνθήκες ήταν μικρός (10-15 ημέρες).

Επιπρόσθετα, η διασπορά του εντόμου εκτιμήθηκε και με ανάλυση συγγένειας (Kinship analysis) μεταξύ ενήλικων ατόμων. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται ευρέως σε διάφορους τομείς της μοριακής οικολογίας και της εξέλιξης και παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τη μελέτη της αναπαραγωγικής και της κοινωνικής συμπεριφοράς. Επιπλέον, η χρήση των μικροδορυφορικών δεικτών DNA για τον προσδιορισμό του βαθμού συγγένειας μεταξύ ατόμων, έχει συμβάλει σημαντικά στην αποτελεσματικότητα των δοκιμών πατρότητας (Cameron *et al.* 2004) και πλέον θεωρούνται οι ιδανικοί δείκτες για τον καθορισμό των σχέσεων συγγένειας μεταξύ ατόμων (Queller *et al.* 1993). Αυτό οφείλεται στη μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα που παρέχουν εντός των πληθυσμών, λόγω της ιδιότητάς τους να κληρονομούνται ως συνυπερέχοντες μεντελικοί δείκτες (Goldstein *et al.* 1995), των πολλαπλών αλληλομόρφων τους και της γρήγορης ανάλυσης πολλών ατόμων ή της ταυτόχρονης ανάλυσης πολλών διαφορετικών δεικτών για ένα άτομο (Grapputo *et al.* 2006). Γενικά, ένας μικρός αριθμός μικροδορυφορικών δεικτών είναι επαρκής για να διακρίνει τα συγγενή από τα μη συγγενή άτομα (Brookfield & Parkin 1992), ωστόσο για την ανίχνευση μικρότερων σχέσεων συγγένειας είναι προτιμότερη η χρήση περισσότερων (Queller *et al.* 1993).

Λόγω όλων των παραπάνω πλεονεκτημάτων που παρέχουν οι μικροδορυφόροι, επιλέχθηκαν κατά τη μελέτη αυτή ως οι πλέον κατάλληλοι δείκτες για τη διερεύνηση της συγγένειας και κατ' επέκταση της διασποράς του εντόμου. Συγκεκριμένα, η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε 303 άτομα και από τις τέσσερις γενεές, με τη χρήση 11 μικροδορυφορικών δεικτών. Επίσης, κατά τη μελέτη επιλέχθηκε χαμηλό

threshold (5,52) για την καλύτερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Αυτό αποδεικνύεται και από το γεγονός ότι το άθροισμα των σφαλμάτων τύπου I και II (Type I και Type II error) ήταν μικρότερο από 0,5 σε όλες τις γενεές (Brookfeld & Parkin 1992). Επιπλέον το δραστικό μέγεθος του πληθυσμού ήταν ίδιο σε κάθε γενεά. Βάσει των αποτελεσμάτων των δοκιμών πατρότητας η μέγιστη απόσταση μετακίνησης ήταν 240 μέτρα ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό ατόμων παρατηρήθηκε στα 80 μέτρα. Επίσης, μεταξύ των δύο γειτονικών οπωρώνων όπου πραγματοποιήθηκε η μελέτη, διαπιστώθηκε ποσοστό μετακίνησης ατόμων της τάξεως του 25%.

Από τις δύο εναλλακτικές προσεγγίσεις που εφαρμόστηκαν για την εκτίμηση της διασποράς του εντόμου παρατηρήθηκε διαφορά, με τις δοκιμές πατρότητας να υποδεικνύουν μεγαλύτερη μετακίνηση του εντόμου σε σχέση με τα αποτελέσματα της παρακολούθησης των σημασμένων ατόμων. Η διαφορά αυτή πιθανότατα οφείλεται στο ότι οι δοκιμές πατρότητας καθιστούν δυνατή την παρατήρηση της διασποράς του εντόμου κατά τη διάρκεια της ζωής του με φυσικό τρόπο χωρίς την ανθρώπινη παρέμβαση σε αντίθεση με την εναλλακτική μέθοδο κατά την οποία τα άτομα καταπονούνται, όσο λεπτοί και να είναι οι χειρισμοί που εφαρμόζονται. Συνεπώς, τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τον έλεγχο συγγένειας θεωρούνται πιο αξιόπιστα.

Ωστόσο και με τις δύο μεθόδους διαπιστώθηκε ότι ο μεγαλύτερος αριθμός ατόμων του *C. pomonella* μετακινήθηκε σε σχετικά μικρή απόσταση (40m, 80m), ενώ λίγα μόνο άτομα εντοπίστηκαν σε μεγαλύτερη απόσταση (80m, 240m), γεγονός που αποδεικνύει ότι το έντομο αυτό είναι κυρίως στατικό, ενώ μπορεί μέσα στον πληθυσμό να υπάρχουν άτομα με σχετικά μεγαλύτερη ικανότητα πτήσης.

Οι παλαιότερες μελέτες της ικανότητας πτήσης και της απόστασης μετακίνησης της καρπόκαψας βασίστηκαν αποκλειστικά σε πειράματα (MMR) ή προσωμίωσης πτήσης. Οι Mani & Wildbolz (1977), διαπίστωσαν ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των εξαπολυθέντων αρσενικών συλλήφθηκε στις φερομονικές παγίδες που ήταν τοποθετημένες σε ακτίνα 60 μέτρων από το σημείο εξαπόλυσης, ενώ μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό διασκορπίστηκε μερικά χιλιόμετρα. Σε συμφωνία είναι και τα αποτελέσματα των Keil *et al.* (2001), οι οποίοι παρατήρησαν ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των εξαπολυθέντων αρσενικών ατόμων συλλήφθηκε σε απόσταση 75 μέτρων, ενώ η μέγιστη απόσταση ήταν 250 μέτρα. Επιπλέον, διαπίστωσαν ότι η ικανότητα διασποράς του εντόμου βασίζεται σε κληρονομήσιμα γενετικά

χαρακτηριστικά. Έτσι, μέσα στον πληθυσμό υπάρχουν άτομα τα οποία μετακινούνται σε μικρές αποστάσεις αλλά και άτομα με μεγαλύτερη δυνατότητα διασποράς, που πιθανώς έχουν την ικανότητα να αποικίσουν νέους βιοτόπους σε περίπτωση που διαταραχθεί ο παλιός.

Οι μόνες μελέτες που αφορούν την μετακίνηση ατόμων και των δύο φύλων στηρίχτηκαν σε προσεγγίσεις που θα μπορούσαν να θεωρηθούν αμφιλεγόμενες. Συγκεκριμένα, οι Schumacher *et al.* (1997b) χρησιμοποίησαν το «μύλο πτήσης» ως σύστημα προσομοίωσης της ικανότητας πτήσης του εντόμου σε εργαστηριακές συνθήκες και βάσει αυτού κατέληξαν σε εκτιμήσεις απόστασης πτήσης του, που ωστόσο στηρίζονται σε ένα σύστημα όπου το έντομο είναι παγιδευμένο και δεν έχει άλλη εναλλακτική επιλογή από το να μετακινείται. Επίσης, η μελέτη αυτή κατέληξε στο ότι δεν υπήρχε διαφορά μεταξύ της απόστασης και της διάρκειας πτήσης μεταξύ των δύο φύλων. Διαφορές βρέθηκαν μεταξύ παρθένων και συζευγμένων ατόμων, με τα πρώτα να μπορούν να μετακινούνται σε μεγαλύτερες αποστάσεις, πιθανώς για λόγους εύρεσης ταιριού. Σε αντίθεση με αυτήν τη μελέτη είναι η εκτίμηση των Bloem *et al.* (1998), οι οποίοι βρήκαν ότι τα αρσενικά μετακινούνται σε μεγαλύτερες αποστάσεις από τα θηλυκά, χρησιμοποιώντας όμως απλές κολλητικές ταινίες για σύλληψη όλων των ατόμων, χωρίς να έχουν επιλέξει κάποιο τρόπο σήμανσης.

8.4.2. Γενετική παραλλακτικότητα και γονιδιακή ροή μεταξύ πληθυσμών

Η μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας, δομής και γονιδιακής ροής πραγματοποιήθηκε σε εννιά ελληνικούς και έξι γαλλικούς πληθυσμούς καρπόκαψας από διαφορετικούς ξενιστές (μηλιά, καρυδιά, αχλαδιά) και περιοχές (Βόρεια, Κεντρική, Νότια Ελλάδα και Νότια Γαλλία). Συνολικά, αναλύθηκαν 413 δείγματα με 11 δείκτες μικροδορυφορικού DNA, αριθμός αρκετά μεγάλος που αυξάνει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Οι αποκλίσεις που παρατηρήθηκαν από τον H-W πιθανόν να οφείλονται σε αυξημένη ομομιξία. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να παρατηρηθεί ύστερα από συνεχείς εφαρμογές εντομοκτόνων που έχει ως αποτέλεσμα την επιβίωση μονό ανθεκτικών γενοτύπων που αναπαράγονται μεταξύ τους. Για την Ελλάδα, παρόλο που η καρπόκαψα αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για τις καλλιέργειες, δεν είχε πραγματοποιηθεί ως τώρα καμία μελέτη της γενετικής των πληθυσμών της.

Η μελέτη της γενετικής δομής είναι σημαντική γιατί παρόλο που κατά τις πληθυσμιακές μελέτες χρησιμοποιείται ο όρος «πληθυσμός», αποκλειστικά βάσει της γεωγραφικής περιοχής από όπου έγινε η δειγματοληψία, δεν είναι γνωστή εκ των προτέρων η διάρθρωσή τους και το επίπεδο γονιδιακής ροής μεταξύ τους. Η Μπαγεσσανή ανάλυση έδειξε ότι οι πληθυσμοί διαχωρίζονται σε δύο ομάδες, με την πρώτη να περιέχει όλους τους Ελληνικούς και τη δεύτερη όλους τους Γαλλικούς πληθυσμούς. Σε συμφωνία με αυτόν το διαχωρισμό ήταν και τα αποτελέσματα που προέκυψαν και από την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου. Εντός της Ελλάδας, δεν διαπιστώθηκε γεωγραφικός διαχωρισμός μεταξύ των πληθυσμών που συλλέχθηκαν από τη Βόρεια, Κεντρική και Νότια Ελλάδα ακόμα και σε περιπτώσεις όπου οι οπωρώνες απείχαν μεταξύ τους απόσταση μεγαλύτερη των 300km. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι οι ελληνικοί πληθυσμοί δεν είναι χωρισμένοι σε υποπληθυσμούς, ανεξάρτητα από το μικροκλίμα και την τοπογραφία της κάθε περιοχής. Επιπλέον, δεν ήταν εφικτή η ομαδοποίηση των πληθυσμών βάσει των ξενιστών από τους οποίους προήλθαν. Επομένως, φαίνεται ότι δεν υπάρχουν διαφορετικές φυλές του εντόμου που αποικίζουν τους διαφορετικούς ξενιστές. Το ίδιο φαινόμενο διαπιστώθηκε και για τους γαλλικούς πληθυσμούς τόσο μεταξύ πληθυσμών από οπωρώνες μηλιάς όσο και μεταξύ διαφορετικών ξενιστών.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν υψηλή γονιδιακή ροή ακόμα και μεταξύ απομακρυσμένων πληθυσμών και εκ πρώτης όψεως έρχονται σε αντίθεση με τις εκτιμήσεις της διασποράς και της ικανότητας πτήσης του εντόμου που έδειξαν ότι το έντομο δεν διασπείρεται σε μεγάλες αποστάσεις και μόνο ένας πολύ μικρός αριθμός ατόμων κάθε πληθυσμού μπορεί να μετακινηθεί σε μεγαλύτερη απόσταση με τα άτομα αυτά πιθανώς να μην είναι σε θέση να μεταβάλλουν τη γενετική σύσταση των τοπικών πληθυσμών. Δηλαδή, παρόλο που η γονιδιακή ροή μεταξύ πληθυσμών μεταναστευτικών ειδών με ικανότητα πτήσης σε μεγάλες αποστάσεις όπως το *Plutella xylostella* (L.), *Vanessa atalanta* (L.), είναι σύνηθες φαινόμενο (Endersby *et al.* 2006) σε αυτήν τη μελέτη φαίνεται να ισχύει και για την καρπόκαφα που είναι ένα μη-μεταναστευτικό είδος. Συνήθως σε τέτοια είδη η γενετική σύσταση των τοπικών πληθυσμών που απέχουν μεταξύ τους απόσταση μεγαλύτερη από 20Km είναι διαφορετική (Harpen *et al.* 2003). Ωστόσο, η ροή γονιδίων μεταξύ των ελληνικών πληθυσμών μπορεί να εξηγηθεί με την ανθρώπινη δραστηριότητα, ιδιαίτερα ταξιδιωτών, από την εμπορική μεταφορά ή από τα

μεταφερόμενα κενά δοχεία συλλογής φρούτων και τη μεταφορά προσβεβλημένων καρπών, μέσω των οποίων πραγματοποιείται παράλληλα και η μεταφορά του εντόμου. Επίσης με το φαινόμενο του *stepping stone*, δηλαδή τη σταδιακή μεταφορά γονιδίων από οπωρώνα σε οπωρώνα και από περιοχή σε περιοχή σε βάθος χρόνου.

Παρόμοιες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για το έντομο σε άλλες χώρες έχουν δώσει αντιφατικά αποτελέσματα. Έτσι, οι *Buès et al.* (1995) μελέτησαν Γαλλικούς πληθυσμούς από οπωρώνες με μήλα, αχλάδια και καρύδια, με τη χρήση αλλοενζύμων. Διαπίστωσαν υψηλό βαθμό ομοιότητας μεταξύ των πληθυσμών από τους διαφορετικούς ξενιστές και ως πιθανή αιτία πρότειναν τη μετανάστευση από τον κύριο ξενιστή, τα μήλα, στους δευτερεύοντες περιστασιακούς ξενιστές που είναι τα αχλαδιά και τα καρύδια. Αν και αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στη χρήση αλλοενζύμων ως δείκτες, οι *Franck et al.* (2007) μελέτησαν 27 πληθυσμούς από Γαλλία, Ιταλία, Αρμενία και Χιλή με τη χρήση επτά μικροδορυφόρων, διαπίστωσαν απομόνωση λόγω απόστασης στην υπερεθνική κλίμακα και γενετική διαφοροποίηση των πληθυσμών. Ωστόσο, μεταξύ των 24 γαλλικών πληθυσμών δεν βρέθηκε κάποιο στοιχείο γεωγραφικής δομής μεταξύ των οπωρώνων Γαλλικών πληθυσμών. Ωστόσο, διαπίστωσαν γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών από διαφορετικές χώρες. Επιπλέον, σε ένα μικρό ποσοστό, 1% για τα δείγματα της Γαλλίας και 3% για τα δείγματα της Ιταλίας, δεν κατέσται δυνατός ο προσδιορισμός της χώρας προέλευσης. Μικρή γενετική διαφοροποίηση βρέθηκε και σε πληθυσμούς από τις κύριες μηλοπαραγωγικές περιοχές της Χιλής, ακόμα και σε περιπτώσεις που η απόσταση μεταξύ των οπωρώνων ήταν μεγαλύτερη από 185 Km. Βρέθηκε με την χρήση πέντε μικροδορυφορικών γενετικών δεικτών, χαμηλή γενετική διαφοροποίηση μεταξύ 11 πληθυσμών ακόμα και σε περιπτώσεις που η απόσταση μεταξύ των οπωρώνων ήταν μεγαλύτερη από 185 Km (*Fuentes-Contreras et al.* 2007).

Αντίθετα, τα αποτελέσματα σε πληθυσμούς από χώρες της Κεντρικής Ευρώπης, έδειξαν μικρή γονιδιακή ροή μεταξύ των πληθυσμών. Έτσι, οι *Thaler et al.* (2008), με την εφαρμογή δεικτών AFLP, διαπίστωσαν υψηλό βαθμό γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών που συλλέχθηκαν από την Ιταλία, Αυστρία και Γερμανία. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι *Tim et al.* (2006), οι οποίοι μελέτησαν τη γονιδιακή ροή μεταξύ πληθυσμών από τη Νότια Αφρική χρησιμοποιώντας τους ίδους μοριακούς δείκτες. Σημαντική γενετική

διαφοροποίηση παρατηρήθηκε μεταξύ των πληθυσμών, ακόμα και σε περιπτώσεις που η απόσταση των οπωρώνων ήταν μικρότερη του 1 Km. Στους πληθυσμούς του εντόμου που προήλθαν από διαφορετικούς ξενιστές, όπως αχλάδια και πυρηνόκαρπα, δεν προέκυψε σημαντική γενετική διαφοροποίηση. Τέλος, η ανάλυση 15 πληθυσμών από διάφορους ξενιστές από την Ελβετία με τη χρήση εννιά μικροδορυφόρων έδειξε υψηλή γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των δειγμάτων που προέρχονταν τους διαφορετικούς ξενιστές καθώς και μεταξύ των πληθυσμών από μηλιά από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές (Chen & Dorn 2009).

Τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών μπορεί να είναι αντιφατικά λόγω διάφορων παραμέτρων. Αρχικά, οι μελέτες αυτές δεν βασίζονται όλες στους ίδιους μοριακούς δείκτες οπότε είναι αναμενόμενο και η διακριτική ικανότητα να ποικίλλει. Ωστόσο, ακόμα και με την εφαρμογή των ίδιων δεικτών, υπάρχουν περιπτώσεις όπου αναφέρεται τόσο υψηλή όσο και χαμηλή γονιδιακή ροή μεταξύ πληθυσμών. Είναι πιθανόν, ότι αυτή η απόκλιση οφείλεται στις διαφορετικές γεωγραφικές τοπογραφίες και περιβαλλοντικές συνθήκες αλλά και στην παράμετρο του χρόνου, με περιοχές με παλαιά εγκαθιδρυμένους οπωρώνες να δείχνουν και μεγαλύτερη γενετική διαφοροποίηση.

8.4.3. Πρακτικές προεκτάσεις

Οι πληθυσμιακές γενετικές μελέτες συμβάλλουν στην κατανόηση της εξελικτικής ιστορίας και δυναμικής του είδους καθώς και στην πορεία διασποράς του από το αρχικό σημείο εμφάνισης μέχρι την εγκαθίδρυσή του σε άλλες γεωγραφικές περιοχές. Οι πληροφορίες για τη γενετική δομή των φυσικών πληθυσμών μπορούν να δώσουν απαντήσεις σε ένα εύρος ερωτημάτων, όπως σε φαινόμενα μετανάστευσης και εισβολής σε νέες περιοχές καλλιέργειας. Επιπλέον, οι μελέτες της γενετικής σύστασης των πληθυσμών καθώς και της γονιδιακής ροής και της διασποράς των εντομών μπορεί να παρέχουν σημαντικές πληροφορίες σε προγράμματα ολοκληρωμένης καταπολέμησης. Η γνώση της ομοιότητας μεταξύ των πληθυσμών βοηθούν στην κοινή διαχείρισή τους σε μεγάλη έκταση μειώνοντας το κόστος της καταπολέμησης. Η μελέτη της γενετικής σύστασης των τοπικών πληθυσμών καθώς και το μέγεθος της γονιδιακής ροής μπορούν να μειώσουν τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις από τις άσκοπες εφαρμογές των

φυτοπροστατευτικών ουσιών και να συμβάλουν στην καθυστέρηση εμφάνισης ανθεκτικότητας.

Η γνώση της ικανότητας πτήσης συμβάλει στην καλύτερη εφαρμογή προγραμμάτων αποτροπής σύζευξης γνωρίζοντας την απόσταση πέρα από την οποία τα μέλη ενός δεδομένου είδους διασκορπίζονται μέσα στον οπωρώνα και την τοποθέτηση των φερομονικών παγίδων σε κατάλληλες αποστάσεις ώστε να είναι αποτελεσματικές για τις συλλήψεις των αρσενικών ατόμων (Chen & Don 2009). Επιπλέον, σε προγράμματα εξαπόλυσης στείρων εντόμων, η γνώση της ικανότητας πτήσης αλλά και της γενετικής σύστασης των πληθυσμών που εξαπολύονται καθώς και των πληθυσμών στην περιοχή που εφαρμόζονται, είναι σημαντική για την επιτυχή καταπολέμηση (Tim *et al.* 2006). Η υψηλή γονιδιακή ροή μπορεί να καθυστερήσει την εμφάνιση γονιδίων ανθεκτικότητας λόγω της ανάμιξης και της σύζευξης ευαίσθητων ατόμων με ανθεκτικά. Ωστόσο, τα υψηλά επίπεδα της γονιδιακής ροής μπορεί να προωθήσουν την εξέλιξη της ανθεκτικότητας όταν ανθεκτικά άτομα μετακινούνται στον ευαίσθητο πληθυσμό (Slatkin 1987).

Από την παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε ότι μεταξύ γειτονικών οπωρώνων παρατηρήθηκε μετακίνηση πληθυσμών. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει την ανάγκη της συνεργασίας μεταξύ των καλλιεργητών για τον έλεγχο του εντόμου σε μεγαλύτερη κλίμακα με τις ίδιες μεθόδους καταπολέμησης. Επιπλέον κρίνεται αναγκαία η εκχέρωση εγκαταλελειμμένων οπωρώνων γιατί δημιουργούνται καταφύγια για τα έντομα.

9. Γενική Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη συνέβαλλε στην αύξηση της γνώσης μας σε διάφορους τομείς του βιολογικού κύκλου της καρπόκαψας, της ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα και της γενετικής δομής πληθυσμών της. Οι πληροφορίες που αποκτήθηκαν έχουν κοινό παρονομαστή και στοχεύουν στην ολοκληρωμένη διαχείριση του εντόμου. Αρχικά, αξιολογήθηκαν δύο τεχνητά σιτηρέσια ώστε να επιτευχθεί η αποτελεσματική και ταυτόχρονα οικονομική εκτροφή των προνυμφών σε εργαστηριακές συνθήκες. Στη συνέχεια, διευκρινίστηκε η αξιοπιστία μοντέλων της φαινολογίας του εντόμου και η δυνατότητα εφαρμογής τους στη χώρα μας. Ακολούθως, μελετήθηκε η ανάπτυξη ανθεκτικότητας πληθυσμών της καρπόκαψας σε διάφορα εντομοκτόνα και των μοριακών και βιοχημικών μηχανισμών που εμπλέκονται σε αυτήν. Επιπλέον, εξετάστηκε η ικανότητα πτήσης και η διασπορά του εντόμου εφαρμόζοντας δύο εναλλακτικές προσεγγίσεις. Τέλος, διερευνήθηκε η γενετική ποικιλότητα πληθυσμών της καρπόκαψας από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και από διαφορετικούς ξενιστές καθώς και η γονιδιακή ροή τόσο μεταξύ τους όσο και σε σύγκριση με πληθυσμούς από τη Γαλλία.

Σχετικά με την αξιολόγηση των δύο σιτηρεσίων παρατηρήθηκε ότι ο χρόνος ολοκλήρωσης των προνυμφικών σταδίων στο σιτηρέσιο «*Manduca Premix-Heliothis Premix*» ήταν μικρότερος. Επιπλέον, το βάρος των νυμφών ήταν μεγαλύτερο ανεξαρτήτως της πυκνότητας εκτροφής σε σύγκριση με το σιτηρέσιο *Ivaldi-Sender*. Είναι γνωστό ότι η ικανοποιητική εκτροφή των προνυμφών στα Λεπιδόπτερα είναι από τους σημαντικότερους παράγοντες που έχουν επιπτώσεις στην επιβίωση και την αναπαραγωγή των ενηλίκων. Επομένως παρόλο που το κόστος για την εκτροφή των προνυμφών είναι πενταπλάσιο σε σχέση με το σιτηρέσιο *Ivaldi-Sender*, το σιτηρέσιο «*Manduca Premix-Heliothis Premix*» προτείνεται ως καταλληλότερο για την εκτροφή των προνυμφών της *C. pomonella*.

Εξετάζοντας την πιστότητα των μοντέλων πρόγνωσης σε δύο μηλοπαραγωγικές περιοχές της Ελλάδος (Αγιά Λάρισας και Ζαγορά Μαγνησίας) παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ της εμφάνισης των ενηλίκων, βάσει των καμπυλών πτήσης, και των ημερομηνιών που προέκυψαν από τα τρία μοντέλα. Από το γεγονός αυτό γίνεται αντιληπτή η ανάγκη για τη μελέτη του ρυθμού ανάπτυξης ελληνικών πληθυσμών και για την ανάπτυξη καινούριων μαθηματικών μοντέλων που να προσομοιώνουν με ακρίβεια τους πληθυσμούς ανάλογα με τις

περιοχές προέλευσης. Επιπλέον, από τη μελέτη των καμπύλων πτήσεων σε αυτές τις δύο περιοχές, προέκυψε ότι στην Αγιά υπάρχουν τέσσερις γενεές του εντόμου το έτος, ενώ στη Ζαγορά τρεις με τέσσερις γενεές, γεγονός που θα πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν κατά τη φυτοπροστασία.

Η μειωμένη αποτελεσματικότητα διαφόρων ομάδων εντομοκτόνων έχει διαπιστωθεί στις κύριες μηλοπαραγωγικές περιοχές ανά τον κόσμο. Οι βιοδοκιμές, που πραγματοποιήθηκαν με εφαρμογή διαγνωστικών δόσεων, σε διάφορα στάδια του εντόμου, έδειξαν ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε πληθυσμούς από τις κύριες μηλοπαραγωγικές περιοχές της Ελλάδας, κυρίως στα οργανοφωσφορικά (azinphos – methyl, chlorpyrifos – methyl, phosalone) και πυρεθροειδή εντομοκτόνα (deltamethrin). Επίσης, ανθεκτικότητα διαπιστώθηκε στους ρυθμιστές ανάπτυξης όπως το diflubenzuron, triflumuron και tebufenozide και νεονικοτινοειδή (thiacloprid). Οι πληθυσμοί που εμφάνισαν την υψηλότερη ανθεκτικότητα διαπιστώθηκαν στις περιοχές της Αλεξάνδρειας Ημαθίας και Αγιά Λάρισας. Ωστόσο, τα αποτελέσματα των βιοδομικών έδειξαν ότι το methoxyfenozide (μιμητές της εκδυσόνης) είναι σχετικά αποτελεσματικό εναντίον του *C. pomonella*.

Ένα σοβαρό βήμα στην αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας είναι ο προσδιορισμός της διασταυρούμενης ανθεκτικότητας. Ο προσδιορισμός των κατηγοριών της είναι ουσιώδης για να εφαρμόζεται εναλλαγή εντομοκτόνων ώστε να αποφεύγεται η συνεχής επιλογή του ίδιου ανθεκτικού μηχανισμού. Δυστυχώς και στην Ελλάδα για τα περισσότερα εντομοκτόνα που εξετάστηκαν διαπιστώθηκε διασταυρούμενη ανθεκτικότητα τόσο μεταξύ παλαιότερων εντομοκτόνων (οργανοφωσφορικά, πυρεθροειδή, νεονικοτινοειδή) όσο και για τους ρυθμιστές ανάπτυξης.

Οι πιο σημαντικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας αφορούν είτε στην αυξημένη ικανότητα των εντόμων να αποικοδομούν τα εντομοκτόνα, είτε στη δομική μεταβολή των στόχων τους. Από τη μελέτη διαπιστώθηκε ότι ο κύριος μηχανισμός που εμπλέκεται στην εμφάνιση ανθεκτικότητας στους ελληνικούς πληθυσμούς είναι η αυξημένη δραστηριότητα των οξειδασών μικτής λειτουργίας (MFO). Επιπλέον, η μειωμένη δραστηριότητα των καρβοξυλεστερασών (EST) φαίνεται να συσχετίζεται με το φαινόμενο της ανθεκτικότητας.

Η μελέτη της διασποράς του εντόμου, πραγματοποιήθηκε με δύο εναλλακτικές μεθόδους. Συγκεκριμένα, με την εξαπόλυση σημασμένων αρσενικών και θηλυκών ατόμων και καταγραφή των συλλήψεών τους σε παγίδες τύπου Δέλτα που

περιείχαν καίρομόνης και σεξουαλική φερομόνη και με την ανάλυση συγγένειας (Kinship analysis) μεταξύ ενήλικων ατόμων με τη χρήση μικροδορυφορικών δεικτών DNA. Πρέπει να σημειωθεί ότι είναι η πρώτη φορά που πραγματοποιείται παρακολούθηση της διασποράς των θηλυκών ατόμων του εντόμου *C. pomonella* με παγίδες τύπου Δέλτα που περιείχαν καίρομόνη. Τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων παρουσίασαν διαφορές. Έτσι, με την πρώτη μέθοδο διαπιστώθηκε ότι ο μεγαλύτερος αριθμός ατόμων μετακινήθηκε σε σχετικά μικρή απόσταση (40m) ενώ λίγα μόνο άτομα εντοπίστηκαν σε μεγαλύτερη απόσταση (80m) από το σημείο εξαπόλυσης. Τα αποτελέσματα της Kinship analysis έδειξαν ότι η πλειονότητα των ατόμων μετακινήθηκε πάλι σε σχετικά μικρή απόσταση (80m), μεγαλύτερη ωστόσο από αυτήν που διαπιστώθηκε με την πρώτη μεθοδολογία, ενώ λίγα μόνο άτομα εντοπίστηκαν και σε απόσταση 240m. Η διαφορά αυτή πιθανότατα οφείλεται στο ότι οι δοκιμές πατρότητας καθιστούν δυνατή την παρατήρηση της διασποράς του εντόμου κατά τη διάρκεια της ζωής του με φυσικό τρόπο χωρίς την ανθρώπινη παρέμβαση. Ωστόσο και από τις δύο μεθόδους διαπιστώθηκε ότι το έντομο αυτό είναι κυρίως στατικό, ενώ μπορεί μέσα στον πληθυσμό να υπάρχουν άτομα με σχετικά μεγαλύτερη ικανότητα πτήσης.

Η γενετική δομή πληθυσμών του *C. pomonella* από διάφορους ξενιστές από την Ελλάδα και τη Γαλλία, μελετήθηκε με την χρήση 11 μικροδορυφορικών δεικτών DNA. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης διαχώρισαν τους πληθυσμούς σε δύο ομάδες, με την πρώτη να περιέχει τους Ελληνικούς και τη δεύτερη αυτούς από τη Γαλλία. Δεν διαπιστώθηκε διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών που συλλέχθηκαν από τη Βόρεια, Κεντρική και Νότια Ελλάδα, αλλά ούτε και σύμφωνα τον ξενιστή προέλευσης (μηλιά, αχλαδιά, καρυδιά). Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και για τους Γαλλικούς πληθυσμούς. Η υψηλή γονιδιακή ροή μεταξύ των πληθυσμών δεν μπορεί να δικαιολογηθεί από την διασπορά του εντόμου γιατί όπως διαπιστώθηκε δεν μετακινείται συνήθως σε μεγάλες αποστάσεις. Μια πιθανή εξήγηση για τη ροή γονιδίων μεταξύ πληθυσμών από διαφορετικές περιοχές είναι η ανθρώπινη δραστηριότητα και ιδιαίτερα μέσω των μεταφερόμενων κενών δοχείων συλλογής φρούτων και τη μεταφορά προσβεβλημένων καρπών που πραγματοποιείται μέσω του εμπορίου.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι το *C. pomonella* είναι ένα είδος που στην Ελλάδα δεν παρουσιάζει ιδιαίτερη γενετική ποικιλότητα, ακόμα και μεταξύ απομακρυσμένων πληθυσμών. Η γνώση της

ομοιότητας μεταξύ των πληθυσμών καθιστά δυνατή την κοινή διαχείριση του εντόμου σε μεγάλη έκταση, με τον ίδιο τρόπο αντιμετώπισης μειώνοντας έτσι το κόστος της καταπολέμησης. Ωστόσο, η εμφάνιση ανθεκτικότητας καθώς και η διαπίστωση διασταυρούμενης ανθεκτικότητας μεταξύ των περισσοτέρων εντομοκτόνων, υποδηλώνει ότι η εφαρμογή ενός προγράμματος εναλλαγής εντομοκτόνων προκειμένου να καθυστερήσει η ανθεκτικότητα, ίσως δεν θα έχει την αναμενόμενη επιτυχία. Συνεπώς, κρίνεται αναγκαίο να βελτιωθούν οι μέθοδοι καταπολέμησης με εναλλακτικές μεθόδους, όπως μικροβιακά εντομοκτόνα, συστήματα μαζικής παγίδευσης ή χρήσης της μεθόδου σύγχυσης της σύζευξης. Επίσης, η ανάπτυξη μοντέλων πρόγνωσης εμφάνισης του εντόμου, τα οποία θα είναι προσαρμοσμένα στους ελληνικούς πληθυσμούς θα συμβάλουν στην ακριβή εφαρμογή των μέσων καταπολέμησης στο κατάλληλο στάδιο, μειώνοντας τη συχνότητα εφαρμογής των χημικών εντομοκτόνων που οδηγούν στην εμφάνιση ανθεκτικότητας με την επιλογή των αντίστοιχων γονιδίων.

Βιβλιογραφία

- Abbott, W. S. (1925).** A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18: 265–267.
- Agnew, P., Hide, M., Sidobre, C., Michalakis, Y. (2002).** A minimalist approach to the effects of density-dependent competition on insect life-history traits. *Ecological Entomology*, 27, 396-402.
- Anthony, N., Unruh, T., Ganser, D., French-Constant, R. (1998).** Duplication of the Rdl GABA receptor subunit gene in an insecticide-resistant aphid, *Myzus persicae*. *Mol. Gen. Genet.* 260: 165–175.
- Audemard, H. (1976).** Etude démoécologique du Carpocapse (*Laspeyresia pomonella* L.) en verger de pommiers de la basse vallée du Rhône. Posaibilités d'organisation d'une lutte intégrée. Thèse Docteur-Ingénieur, Université F. Rabelais, Tours, 365 pp.
- Audemard, H. (1984).** Protection intégrée en verger de poiriers: Lutte contre les arthropodes ravageurs. In: IOBC-WPRS, Integrated Control of Pear Psyllids. WPRS, Bulletin, VII, 5: 373-382.
- Audemard, H., El Idrissi, M. A. (1979).** Etude de la sensibilité des poires aux attaques de Carpocapse (*Laspeyresia pomonella* L.): premiers résultats. Comptes Rendus de l'Académie d'Agriculture de France, 65: 427-437.
- Avise, C. J., Arnold, J., Ball, M. R., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, E. J., Reeb, A. C., Saunders, C. N. (1987).** Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics, *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 18: 489–522.
- Avise, J. C. (2000).** Phylogeography: the history and formation of species. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Ayala, F. J. (1982).** Population and evolutionary genetics: A primer. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 2727 Sand Hill Road Menlo Park, California 94025.
- Babilis, N., Mazomenos, B. E. (1992).** Pheromone production in *Sesamia nonagrioides*: diel periodicity and effect of age and mating. *J. Insect Physiol.*, 38: 561–564.

- Ballard, J., Ellis., D. J., Payne, C. C. (2000).** Uptake of granulovirus from the surface of apples and leaves by first instar larvae of the codling moth *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Olethreutidae). *Biocontr. Sci. Technol.*, 10: 617-625.
- Barnes, M. M. (1991).** Codling Moth Occurrence, Host Race Formation, and Damage Chapter 5.1.1. Tortricid Pests: Their Biology, Natural Enemies and Control. Edited by L.P.S. van der Geest and H.H. Evenhuis. Elsevier, Amsterdam and New York. Pages 313-328.
- Bathon, H., Singh, P., Clare, G. K. (1991).** Population dynamics of the codling moth. Tortricid Pests (ed. by L. P. S. van der Geest and H. H. Evenhuis), pp. 283-293. World Crop Pests. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands.
- Bathon, H., Singh, P., Clare, K. G. (1991).** Rearing Methods Chapter 5 Tortricid Pests: Their Biology, Natural Enemies and Control. Edited by L.P.S. van der Geest and H.H. Evenhuis. Elsevier, Amsterdam and New York. Pages 283-293.
- Baudry, E., Solingac, M., Garnery, L., Gries, M., Cornuet, J-M., Koeniger, N. (1998).** Relatedness among honeybees (*Apis mellifera*) of a drone congregation. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 265: 2009-2014.
- Bauerfeind, S. S., Fischer K. (2005).** Effects of food stress and density in different life stages on reproduction in a butterfly. *Oikos* 111: 514–524.
- Beeman, R., W, Schmidt B. A. (1982).** Biochemical and genetic aspects of malathion-specific resistance in the Indian meal moth (Lepidoptera: Pyralidae). *J Econ Entomol.*, 75: 945–949.
- Berrigan, D., Charnov, E. L. (1994).** Reaction norms for age and size at maturity in response to temperature: a puzzle for life historians. *Oikos*, 70, 474-478.
- Black, W. C., IV. (1993).** PCR with arbitrary primers: approach with care. *Insect Mol. Biol.*, 2: 1-6.
- Blanckenhorn, W. U. (1998).** Adaptive phenotypic plasticity in growth, development, and body size in the yellow dung fly. *Evolution*, 52, 1394-1407.
- Bloem, S., Bloem, K. A., Carpenter, J. E., Calkins, C. O. (2001).** Season-long releases of partially sterile males for control of codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae), in Washington apples. *Environ. Entomol.* 30: 763-769.

- Bloem, S., Bloem, K. A., Knight, K. L. (1998).** Assessing the quality of mass-reared codling moths (Lepidoptera: Tortricidae) by using field Release-recapture tests. *Journal of Economic Entomology*, 91: 1122-1130.
- Blomefield, T. L. (1994).** Codling moth resistance: is it here, and how do we manage it? *Deciduous Fruit Grower*, 44: 130-132.
- Blouin, S. L. (2003).** DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *TRENDS in Ecology and Evolution*, 18: 503-511.
- Boivin, T., Bouvier, J. C., Chadoeuf, J., Beslay, D., Sauphanor, B. (2003).** Constraints on adaptative mutations in the codling moth *Cydia pomonella* (L.): measuring fitness trade-offs and natural selection. *Heredity* 90:107–113.
- Borash, D. J., Ho, G. T. (2001).** Patterns of selection: stress resistance and energy storage in density-dependent populations of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 47, 1349-1356.
- Bosch, M. D., Voltes, T. M., Riedl, H., Tora, P., Sarasua, J. M., Avilla. J. (1999).** Evaluación de la resistencia de poblaciones españolas de carpocapsa (*Cydia pomonella* (L.)) a metil-azinfos. *Phytoma*, 109: 40-51.
- Bourguet, D., Berrada, S., Raymond, M., Fournier, D. (1997).** Acetylcholinesterase and choline acetyltransferase: Hypothesis of two interacting enzymes for insecticide resistance. *Pesticide Science*, 51:276-282.
- Bouvier, J. C., Boivin, T., Beslay, D., Sauphanor, B. (2002).** Age-dependent response to insecticide and enzymatic variation in susceptible and resistant codling moth larvae. *Arch Insect Biochem Physiol*, 51: 55–66.
- Bovey, P. (1966).** Le carpocapse ou ver des pommes et des poires. In: A.S. Balachowsky (Ed.), *Entomologie Appliquee à l'Agriculture*. Tome II. Masson, Paris, Vol. 1, pp. 653-734.
- Bradford, M., (1976).** A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248–254.
- Bradshaw, W. E., Holzapfel, C. M. (1989).** Life-historical consequences of density-dependent selection in the pitcher-plantmosquito, *Wyeomyia smithii*. *Am. Nat.* 133: 869–887.
- Brattsten, L. B. (1979).** Biochemical defense mechanisms in herbivores against plant allelochemicals. In Rosenthal G.A., Janzen D.H. *Herbivores, their*

interaction with secondary plant metabolites. Academic Press. New York, New York. 718 pp.

- Briegel, H. (1990)**. Metabolic relationship between female body size, reserves and fecundity of *Aedes aegyptii*. *Journal of Insect Physiology*, 36: 165-172.
- Brinton, F. E., Proverbs, M. D., Carty, B. E. (1969)**. Artificial diet for mass production of the codling moth, *Carpocapsa pomonella* (Lepidoptera: Olethreutidae). *Can. Ent*, 101: 577-584.
- Brookfield, J. F. Y., Parkin, D. T. (1992)**. Use of single-locus DNA probes in the establishment of relatedness in wild population. *Heredity*, 70, 660-663.
- Brown T. A. (2002)**. Genomes. Second Edition. BIOS Scientific Publishers Ltd.
- Brown, J. J., Kainoh, Y. (1992)**. Host castration by *Ascogaster* spp. (Hymenoptera: Braconidae). *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, 85: 67-71.
- Brown, W. M. (1983)**. Evolution of animal mitochondrial DNA. Nei, M. and Koehn, R. K. (eds) *In Evolution of Genes and Proteins*. Sinauer, Sunderland MA, 62–88.
- Brown, W. M. (1985)**. The mitochondrial genome of animals. Pp. 95-130, *In Molecular Evolutionary Genetics* (R. J. MacIntyre, ed.). Plenum, New York
- Brun-Barale, A., Bouvier, J. C, Pauron, D., Bergé, J. B, Sauphanor, B. (2005)**. Involvement of a sodium channel mutation in pyrethroid resistance in *Cydia pomonella* L. and development of a diagnostic test. *Pest Manag Sci*, 61: 549–554.
- Buckingham, D. S., Biggin, C. P., Sattelle, M. B., Brown, A. L., Sattelle, B. D. (2005)**. Insect GABA receptors: splicing, editing and targeting by antiparasitics and insecticides. *Mol. Pharmacol*, 68: 942–951.
- Buès, R., Toubon, J. F. (1992)**. Polymorphisme enzymatique dans différentes populations de *Cydia pomonella* L. (Lep. Tortricidae). *Acta Oecologica-International Journal of Ecology*, 13: 583–591.
- Bull, D. L., Patterson, R. S. (1993)**. Characterization of pyrethroid resistance in a strain of the German cockroach (Dyctioptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology*, 86: 20-25.
- Burt, A., Carter, D.A., White, T.J., Taylor, J.W. (1994)**. DNA sequencing with arbitrary primer pairs. *Molecular Ecology*, 3: 523-525.

- Bush, M., Abdel-Aal, Y., Rock, G. (1993).** Parathion resistance and esterase activity in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) from North Carolina. *J Econ Entomol*, 86: 660–666.
- Cameron, E. C., Franck, P., Oldroyd, B. P. (2004).** Genetic structure of nest aggregation and drone congregation of the southeast Asian stingless bee *Trigona collina*. *Mol. Ecol.*, 13: 2357–2364.
- Campbell, P. M., Trott, J. F., Claudianos, C., Smyth, K. A., Russell, R. J., Oakeshott, J. G. (1997).** Biochemistry of esterases associated with organophosphate resistance in *Lucilia cuprina* with comparisons to putative orthologues in other Diptera. *Biochemical Genetics*, 35: 17-40.
- Carlson, R. N., Tulsieram L. K., Glaubitz, J. C., Lunk, V. W. K., Kauffeldt, C., Rutledge R. (1991).** Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. *Theoretical and Applied Genetics*, 83: 194-200.
- Cassanelli, S., Reyes, M., Rault, M., Manicardi, G. C, Sauphanor, B. (2006).** Acetylcholinesterase mutation in an insecticide-resistant population of the codling moth *Cydia pomonella* (L.) *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36: 642–653.
- Chakraborty, R., Jin L. (1993).** A unified approach to study hyper-variable polymorphisms: statistical considerations of determining relatedness and population distances. In *DNA fingerprinting: state of the science* (ed. S. D. J. Pena, R. Chakraborty, J.T. Eppelen & A. Jeffrey), pp. 153-175. Basel: Birkhauser.
- Charmillot, J. P., Gourmelon, A., Fabre L. A., Pasquier, D. (2001).** Ovicidal and larvicidal effectiveness of several insect growth inhibitors and regulators on the codling moth *Cydia pomonella* L. (Lep., Tortricidae) *J. Appl. Ent.*, 125: 147-153.
- Charmillot, P. J., Hofer, D., Pasquier D. (2000).** Attract and kill: a new method for control of the codling moth *Cydia pomonella* *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 94: 211–216.
- Charmillot, P. J., Pasquier, D., Hofer, D. (2002).** Control of codling moth *Cydia pomonella* by autosterilisation. *IOBC wprs Bulletin Vol. 259*: 117-121.
- Charmillot, P. J., Pasquier, D., Sauphanor, B., Bouvier, J. C., Olivier, R. (1999).** Carpacse des pommes: premier cas de résistance au diflubenzuron en Suisse. *Rev Suisse Vitic Arboric Hortic*, 31: 129–132.

- Charmillot, P. J., Pasquier, D., Schmid, A., Emery, S., de Montmollin, A., Desbaillet, C., Perrottet, M., Bolay, J. M., Zuber, M. (1997).** Lutte par confusion contre les vers de la grappe eudémis et cochylis en Suisse. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture*, 29: 291–299.
- Chelvanayagam, G., Parker, W. M., Board, G. P. (2001).** Fly fishing for GSTs: a unified nomenclature for mammalian and insect glutathione transferases. *Chem. Biol. Interact.*, 133: 256–260.
- Chen, B. E., Kondo, M., Garnier, A., Watson, F. L., Puettmann-Holgado, R., Lamar, D. R., Schmucker, D. (2006).** The molecular diversity of Dscam is functionally required for neuronal wiring specificity in *Drosophila*. *Cell*, 125(3): 607-20.
- Chen, H. M., Dorn, S. (2009).** Microsatellites reveal genetic differentiation among populations in an insect species with high genetic variability in dispersal, the codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) *Bulletin of Entomological Research*, 1-11.
- Chen, X. J., Butow, A. R. (2005).** The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat. Rev. Genet.*, 6 (11): 815-825.
- Clayton, D. A. (1982).** Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*. 28(4): 693–705.
- Credland, P. F., Dick, K. M., Wright, A. W. (1986).** Relationships between larval density, adult size and egg production in the cowpea seed beetle, *Callosobruchus maculatus*. *Ecological Entomology*, 11: 41-50.
- Croft, A. B., Riedl, W. H., (1991).** Chemical Control and Resistance to Pesticides of the Codling Moth Chapter 5.1.5 Tortricid Pests: Their Biology, Natural Enemies and Control. Edited by L.P.S. van der Geest and H. H. Evenhuis. Elsevier, Amsterdam and New York. Pages 371-387.
- Cui F., Lin L. F., Qiao C. L., Xu, Y., Marquine, M., Weill, M., Raymond, M. 2006.** Insecticide resistance in Chinese populations of the *Culex pipiens* complex through esterase overproduction. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 120(3): 211-220.
- Daborn, P. J., Yen, J. L., Bogwitz, M. R., Le Goff, G., Feil, E., Jeffers, S., Tijet, N., Perry, T., Heckel, D., Batterham, P., Feyereisen, R., Wilson, T. G., Ffrench-Constant, R. (2002).** A single P450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science*, 297: 2253-2256.

- De Barro, P. J. (2005).** Genetic structure of the whitefly *Bemisia tabaci* in the Asia-Pacific region revealed using microsatellite markers. *Mol Ecol*, 14: 3695-3718.
- Denholm, I., Rowland, M. W. (1992).** Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: theory and practice. *Annual Review of Entomology*, 37: 91–112.
- Denholm, I., White, J. C. (1987).** Characterization of the structure activity relationship of kdr and two variants of superkdr to pyrethroids in the housefly (*Musca domestica*). *Pestic. Sci.*, 19: 209-220.
- Denno, R. F., McClure, M. S., Ott, J. R. (1995).** Interspecific interactions in phytophagous insects: competition revisited and resurrected. *Annu. Rev. Entomol.*, 40: 297–331.
- Denno, R. F., Roderick, G. K. (1992).** Density-related dispersal in planthoppers: effects of interspecific crowding. *Ecology*, 73: 1323–1334.
- Devonshire, A. L., Byrne, F. J., Moores, G. D., Williamson S. (1998).** Biochemical and molecular characterization of insecticide-insensitive acetylcholinesterases in resistant insects. pp. 491–496. In: Doctor, B.P., Taylor, P., Quinn, D.M., Rotundo, R.L., Gentry, M.K. (Eds) Structure and Function of Cholinesterases and Related Proteins, Plenum Press, New York.
- Devonshire, A. L., Field, L. M. (1991).** Gene amplification and insecticide resistance. *Annual Review of Entomology*, 36: 1-23.
- Dickson, R. C. (1940).** Factors governing the induction of diapause in the oriental fruit moth. *Ann. Ent. Soc. Amer.*, 42 (4): 511-37.
- Dickson, R. C., Barnes, M. M., Turzan, C. L. (1952).** Continuous rearing of the codling moth. *J. Econ. Entomol.*, 45: 66-68.
- Doichuangam, K., Thornhill, R.A. (1992).** Penetration, excretion and metabolism of ¹⁴C malathion in susceptible and resistant strain of *Plutella xylostella*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 101(3): 583-588.
- Dunley, J. E., Welter, C. S. (2000).** Correlated insecticide cross-resistance in azinphosmethyl resistant codling moth (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Econ. Entomol.* 93: 955-962.
- Eberle, K. E., Jehle, J. A. (2006).** Field resistance of codling moth against *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV) is autosomal and incompletely dominant inherited. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93: 201-206.

- El-Shazly, Mohamed, M., Refaie, M. M. (2002).** Larvicidal effect of the juvenile hormone mimics pyriproxyfen on *Culex pipiens*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 18(4): 321-328.
- Endersby, N. M., McKechnie, S. W., Ridland, P. M., Weeks, A. R. (2006).** Microsatellites reveal a lack of structure in Australian populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Molecular Ecology*, 15: 107–118.
- Excoffier L., Smouse P. E., Quattro J. M. (1992).** Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479–491.
- Fagerström, T., Wiklund, C. (1982).** Why do males emerge before females? Protandry as a mating strategy in male and female butterflies. *Oecologia* 52: 164–166.
- Falcon, A. L., Huber, H. (1991).** Biological Control of the Codling Moth Chapter 5.1.4. Tortricid Pests: Their Biology, Natural Enemies and Control. Edited by L.P.S. van der Geest and H.H. Evenhuis. Elsevier, Amsterdam and New York. Pages 355-369.
- Fantinou, A. A., Perdikis, C. D., Stamogiannis N. (2008).** Effect larval crowding on the life history traits of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) *Eur. J. Entomol*, 105: 625-630.
- Farnham, A. W., Murray, A. W. A., Sawicki, R. M., Ferro, D. N., Harwood, R. F. (1973).** Intraspecific larval competition by the codling moth, *Laspeyresia pomonella*. *Environmental Entomology*, 2: 783-789.
- Farra, M. D., Flint. W. P. (1930).** Rearing codling moth larvae throughout the year (*Carpocapsa pomonella*). *J. Econ. Entomol.* 23: 41-4.
- Ffrench-Constant, R. H., Pittendrigh, B., Vaughan, A., Antony N. (1998).** Why are there so few resistance-associated mutations in the insecticide target genes? *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 353: 1685-1693.
- Fischer, K., Fiedler, K. (2001).** Effects of larval starvation on adult life-history traits in the butterfly species *Lycaena tityrus* (Lepidoptera: Lycaenidae). *Entomol. Gener.*, 25: 249–254.
- Fonseca, D. M., Atkinson, C. T., Fliescher, R. C. (1998).** Microsatellite primers for *Culex pipiens quinquefasciatus*, the vector of avian malaria in Hawaii. *Mol. Ecol.* 7: 1613-1621.

- Fournier, D., Bride, J. M., Mouchès, C., Raymond, M., Magnin, M., Bergé, J. B., Pasteur, N., Georghiou, G. P. (1987).** Biochemical characterization of the esterase A1 and B1 associated with organophosphate resistance in the *Culex pipiens* L. complex. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 27: 211-217.
- Fournier, D., Mutero, A., Pralavorio, M., Bride, J. M. (1993).** Drosophila acetylcholinesterase: Mechanisms of resistance to organophosphates. *Chemical Biological Interactions*, 87: 233-238.
- Franck P., Guirin F., Loiseau A., Sauphanor B. (2005).** Isolation and characterisation of microsatellite loci in the codling moth *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera, Tortricidae). *Molecular Ecology Notes*, 5: 99–102.
- Franck P., Reyes M., Olivares J., Sauphanor B. (2007).** Genetic architecture in codling moth populations: comparison between microsatellite and insecticide resistance markers. *Molecular Ecology*, 16: 3554-3564.
- Fuentes-Contreras E., Espinoza J. L., Lavandero B., Ramírez C. C. (2006).** Population Genetic Structure of Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) from Apple Orchards in Central Chile. *J. Econ. Entomol.*, 101(1): 190-198.
- Fuentes-Contreras E., Reyes M., Barros W., Sauphanor B. (2007).** Evaluation of azinphosmethyl resistance and activity of detoxifying enzymes in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) from central Chile. *Journal of Economic Entomology*, 100: 551–556.
- Futuko, T. R. (1990).** Mechanism of Action of Organophosphorus and Carbamate Insecticide Environmental Health Perspectives Vol 87, pp 245-254.
- Futuyma J. D. (1995).** Εξελικτική Βιολογία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, σελ 149-184.
- Garcia-Gutierrez, C., Gonzales-Maldonado M. B., Medrano-Roldan H., Chairez-Hernandez, I. (2004).** Evaluación de la cepa BbP1 de *Beauveria bassiana*, Mycotrol[®], Meta-Sin[®] y azinfos-metilico contra *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) en laboratorio y campo. *Folia Entomol. Mex.*, 43: 1-7.
- Gibbs, M., Lacey L. A., Jones, M. J., Moore, A. J. (2004).** Intraspecific competition in the speckled wood butterfly: *Pararge aegeria* effect of rearing density and gender on larval life history: *J. Insect Sci.* 4: 1–6.
- Gilomee, J. H., Riedl. H. (1998).** A century of codling moth control in South Africa. I. Historical perspective. *J. S. Afr. Soc. Hort. Sci.* 8: 27-31.

- Goldstein, D. B., Linares, A. R., Cavalli-Sforza, L. L., Feldman, M. W. (1995).** Anevaluation of genetic distance for use with microsatellite loci. *Genetics*, 139: 463-471.
- Graf, J. F. (1993).** The role of insect growth regulators in arthropod control. *Parasitol. Today*, 9 (12): 471-474.
- Guennelon, G., Audemard, H., Fremond, J. C., Ammari, M. A. (1981).** Progrès réalisés dans l'élevage permanent du carpocapse (*Laspeyresia pomonella* L) sur milieu artificiel. *Agronomie*, 1: 59-64.
- Guerrero, F. D., Jamroz, R. C., Kammlah, D., Kunz, S. E. (1997).** Toxicological and molecular characterization of pyrethroid-resistant horn flies, *Haematobia irritans*: Identification of kdr and super-kdr point mutations. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 8: 745-755.
- Hadrys, H., Balick M., Schierwater, B. (1992).** Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology, *Mol. Ecol.*, 2: 79-87.
- Hagelberg, E. (1994).** Mitochondrial DNA in ancient bone. In *Ancient DNA*, edited by B. Herrmann and S. Hummel. (New York: Springer Verlag), pp. 195-204.
- Hagley, E. A. C. (1971).** The occurrence of fungal diseases of the codling moth in unsprayed apple orchards in Ontario. *Proceedings of the Entomological Society of Ontario*, 101: 45-48.
- Hamilton, D. W., Hathaway, D. O. (1966).** Codling moth. In (C. N. Smith (editor)) *Insect Colonization and Mass Production*. Pp. 339-354. Academic Press, N. Y.
- Hansson L. (1991).** Dispersal and connectivity in metapopulations. *Biological Journal of the Linnean Society*, 42: 89–103.
- Harper, G. L., Goulson, D., Maclean, N. (2003).** Microsatellite markers to assess the influence of population size, isolation and demographic change on the genetic structure of the UK butterfly *Polyommatus bellargus*. *Molecular Ecology*, 12: 3349–3357.
- Hastings A., Harrison S. (1994).** Metapopulation dynamics and genetics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 25: 167-188.
- Hedrick, P. (1992).** Shooting the RAPDs. *Nature*, 355: 679-680.
- Hemingway, J., (2000).** The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31: 1009-1015.

- Horak, M. (1991).** Morphology, Phylogeny and Systematics Chapter 1.1. Tortricid Pests: Their Biology, Natural Enemies and Control. Edited by L.P.S. van der Geest and H.H. Evenhuis. Elsevier, Amsterdam and New York. Pages 1-22.
- Hough, W. S. (1928).** Relative resistance to arsenical poisoning of two codling moth strains. *J Econ Entomol*, 21: 325–329.
- Howell, J. F. (1971).** Problems involved in rearing the codling moth on diet in trays *J. Econ. Entomol*, 64: 631-636.
- Howell, J. F. (1972).** Rearing the codling moth on soya, wheat germ starch medium. *J. Econ. Entomol*. 65: 636-637.
- Howell, J. F. (1991).** Reproductive Biology Chapter 2.3. Tortricid Pests: Their Biology, Natural Enemies and Control. Edited by L.P.S. van der Geest and H.H. Evenhuis. Elsevier, Amsterdam and New York. Pages 157-174.
- Huang, S. H., Hu, T. N., Yao, E. Y., Wu, Y. C., Chiang, W. S., Sun, N. C. (1998).** Molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28: 651–658.
- Huber, K., Mousson, L., Rodhain, F., Failloux, A-B. (1999).** Microsatellite sequences as markers for population genetic studies of the mosquito *Aedes aegypti*, the vector of dengue viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 61: 1001-1003.
- Hunter, D. M. (2004).** Advances in the control of locusts (Orthoptera: Acrididae) in eastern Australia: from crop protection to preventive control. *Australian Journal of Entomology*, 43, 293–303.
- Ioannidis, P. M. (1999).** Insecticide resistance problems in Greece. pp. 36-49. in Denholm, I. & Ioannidis P.M. (Eds). *Combating Insecticide Resistance*. Agrotypos SA, Athens, Greece
- Jermey, T. (1967).** Experiments on the factors governing diapause in the codling moth, *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera, Tortricidae). *Acts. Phytopathologica*, 2: 49-60.
- Soleño, J., Anguiano, L., de D'Angelo, A. P., Cichón, L., Fernández D., Montagna, C. (2008).** Toxicological and biochemical response to azinphos-methyl in *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) among orchards from the Argentinian Patagonia *Pest Manag Sci*, 64: 964-970.

- Karl, S. A., Avise, J. C. (1993).** PCR-based assays of Mendelian polymorphisms from anonymous single-copy nuclear DNA: Techniques and applications for population genetics. *Mol. Biol. Evol.*, 10: 342-361.
- Keil S., Gu H. N., Dorn S. (2001).** Response of *Cydia pomonella* to selection on mobility: laboratory evaluation and field verification. *Ecol. Entomol*, 26: 495-501.
- Kimi, Y. J., Lee, S. H., Lee, S. W., Ahn Y. J. (2004).** Fenpyroximate resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): cross resistance and biochemical resistance mechanisms. *Pest Manag. Sci.*, 60: 1001-6.
- Kimura M. T. (1992).** Tethered-flight activity of drosophilids (Diptera: Drosophilidae), in relation to habitat and resource distribution. *Journal of Insect Behavior*, 5: 395-401.
- Knight, A. L., Brunner, J. F., Alston, D. (1994).** Survey of azinphos methyl resistance in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in Washington and Utah. *Journal of Economic Entomology*, 87: 285-292.
- Lacey, L. A., Arthurs, S. P. (2005).** New method for testing solar sensitivity of commercial formulations of the granulovirus of codling moth (*Cydia pomonella*, Lepidoptera: Tortricidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 90: 85-90.
- Lacey, L. A., Neven, L. G., Headrick H. L., Fritts, R. Jr. (2005).** Factors affecting entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) for control of overwintering codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in fruit bins. *J. Econ. Entomol.*, 98: 1863-1869.
- Lacey, L. A., Unruh T. R. (2005).** Biological control of codling moth (*Cydia pomonella*, Lepidoptera: Tortricidae) and its role in integrated pest management, with emphasis on entomopathogens. *Vedalia*, 12 (1): 33-60.
- Lacey, L. A., Unruh. T. R. (1998).** Entomopathogenic nematodes for control of codling moth: effect of nematode species, dosage, temperature and humidity under laboratory and simulated field conditions. *Biol. Contr.*, 13: 190-197.
- Landolt, P. J., Guédot, C. (2008).** Field attraction of codling moths (Lepidoptera: Tortricidae) to apple and pear fruit, with quantitation of kairomones from attractive ripe fruit. *Ann. Entomol. Soc.*, 101 (3): 675-681.
- Leonard, D. E. (1968).** Effects of density of larvae on the biology of the gypsy moth, *Porthetria dispar*. *Entomol. Exp. Appl.*, 11: 291-304.

- Lindquist, E. E., Sabelis, M. W., Bruin, J. (Eds). (1996).** Eriophyoid mites: Their biology, natural enemies and control. Vol 1B. Elsevier, Amsterdam.
- Liu, N., Scott, J. G. (1998).** Increased transcription of CYP6D1 causes Cytochrome P450-mediated insecticide resistance in housefly. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28: 531-535.
- Liu, Z., Williamson, M. S., Lansdell, S. J., Denholm, I., Han, Z., Millar, N. S. (2005).** A nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (Brown planthopper). *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America* 102: 8420-8425.
- Lloyd, D. C. (1958).** Memorandum on natural enemies of the codling moth, *Carpocapsa pomonella* (L.). Unpublished Report. Comm. Inst. Contrib., Trinidad.
- Lockwood, J. A., Byford, R. L., Story, R. N., Sparks, T. C., Quisenberry, S. S. (1985).** Behavioral resistance to the pyrethroids in the horn fly, *Haematobia irritans*. *Environmental Entomology*, 14: 873-880.
- Loxdale H. D., Lushai G. (2001).** Use of genetic diversity in movement studies of flying insects. Pp 361 - 386 In Woiwod, I.P., Reynolds, D. R. & Thomas, C.D (eds.), Royal Entomological Society 20th International Symposium volume *Insect movement: mechanisms and consequences*, Imperial College, London; September 13 – 14, 1999. CABI, Wallingford, U.K.
- Malloch, G., Hight, F., Kasprowicz, L., Pickup, J., Neilson, R., Fenton B. (2006).** Microsatellite marker analysis of peach–potato aphids (*Myzus persicae*, Homoptera: Aphididae) from Scottish suction traps. *Bulletin of Entomological Research*, 96: 1–10.
- Mani E., Wildbolz T. (1977).** The dispersal of male codling moths (*Laspeyresia pomonella* L.) in the Upper Rhine Valley. *Journal of Applied Entomology*, 83: 161–168.
- Mansour, M., Mohamad F. (2004).** Effects of gamma radiation on codling moth, *Cydia pomonella* (L.) eggs. *Radiation Physics and Chemistry*, 71: 1125–1128.
- Mantel, N. (1967).** The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res*, 27: 209-220.

- Martin, G. B., Williams, J. G. K., Tanksley, S. D. (1991).** Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*, 88: 2336-2340.
- McKenzie, J. A. (1996).** Ecological and evolutionary aspects of insecticide resistance. Environmental Intelligence Unit. R.G. Landes Company
- Melander, A. L. (1914).** Can insects become resistant to sprays? *Journal of Economic Entomology*, 7: 167-173.
- Meyer, A. (1993).** Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Vol. 2 (Mochachka, P. W. & Mommsen, T. P., eds), pp. 1–38. Amsterdam: Elsevier.
- Miller, N. J., Birley A. J., Overall A. D. J., Tatchell G. M. (2003).** Population genetic structure of the lettuce root aphid, *Pemphigus bursarius* (L.), in relation to geographic distance, gene flow and host plant usage. *Heredity*, 91: 217–223.
- Mills, N. J. (2003).** Augmentation in orchards: improving the efficacy of *Trichogramma* inundation, pp 130-135. In: Proc. 1st International Symposium on the Biological Control of Arthropods. USDA Forest Service Publ. FHTET - 03-05. Washington, D.C.
- Miyazaki, M., Ohyama, K., Dunlap, D. Y., Matsumura, F. (1996).** Cloning and sequencing of the *para*-type sodium channel gene from susceptible and *kdr*-resistant German cockroaches (*Blattella germanica*) and housefly (*Musca domestica*). *Molecular and General Genetic*, 252: 61-68.
- Moffit, H. R., Westigrad, P. H., Mantey, K. D., Van de Baan H. E. (1988).** Resistance to diflubenzuron in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae). *J Econ Entomol*, 81: 1511-1515.
- Moritz, C., Dowling, E. T., Brown, M. W. (1987).** Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 18: 269-292 .
- Morton N. E. (1995).** Lods, past and present. *Genetics*, 140: 7-12.
- Mota-Sanchez, D., Hollingworth, R. M., Grafius, E. J., Moyer, D. (2006).** Resistance and cross-resistance to neonicotinoid insecticides and spinosad in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Pest Management Science*, 62 (1): 30-37.

- Mouchès, C., Pasteur, N., Bergé, J. B., Hyrien, O., Raymond, M., Robert de Saint Vincent, B., de Silvestri, M., Georghiou, G. P. (1986).** Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a Californian *Culex* mosquito. *Science*, 233: 778-780.
- Mutero, A., Bride, J. M., Pralavorio, M., Fournier, D. (1994).** *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase: Identification and expression of two mutations responsible for cold and heat-sensitive phenotypes. *Molecular and General Genetic*, 243 (6): 699-705.
- Mutero, A., Pralavorio, M., Bride, J. M., Fournier, D. (1994).** Resistance associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 5922–5926.
- Nauen, R., Stumpf, N. (2002).** Fluorimetric microplate assay to measure Glutathione S-transferase activity in insects and mites using monochlorobimane. *Analytical Biochemistry*, 303: 194-198.
- Nauen, R., Stumpf, N., Elbert, A. (2003).** Toxicological and mechanistic studies on neonicotinoids cross resistance in Q-type *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Pest Manag Sci*, 58: 868–875.
- Navajas, M. J., Thistlewood, H. M. A., Lagnel, J., Hughes, C. (1998).** Microsatellite sequences are under-represented in two mite genomes. *Insect Mol. Biol.* 7: 249-256.
- Navon, A. (1968).** Progress report on rearing of the codling moth, In Radiation Radioisotopes and Rearing Methods in the Control of Insect Pests. Pp. 105-106. Int. atom. Energy Ag., Vienna (Panel Proc. Ser.).
- Newcomb R. D, Campbell P. M, Ollis D. L, Cheah, E., Russell R. J., Oakeshott J. G. (1997).** A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. *Proc Natl Acad Sci*, 24: 7464–7468.
- Ninsin, K., Tanaka, T. (2005).** Synergism and stability of acetamiprid resistance in a laboratory colony of *Plutella xylostella*. *Pest Manag Sci*, 61: 723–727.
- Oppenoorth, F. J. (1985).** Biochemistry and genetics of insecticide resistance. In Kerkut G.A., Gilbert, L.I. (Eds) *Comprehensive Insect physiology, Biochemistry, and Pharmacology*. Pergamon press, Oxford. Vol. 12 pp. 731-774.

- Oppenoorth, F. J., van Asperen, K. (1960).** Allelic Genes in the Housefly Producing Modified Enzymes That Cause Organophosphate Resistance. *Science* 132: 298-299.
- Pasquier, D., Charmillot, P. J. (2003).** Effectiveness of twelve insecticides applied topically to diapausing larvae of the codling moth, *Cydia pomonella* L. *Pest Management Science*, 60: 305–308.
- Perry, T., McKenzie, A. J., Batterham P. (2007).** A Da6 knockout strain of *Drosophila melanogaster* confers a high level of resistance to spinosad. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37: 184–188.
- Peterson M. A., Denno R. F. (1998).** The influence of dispersal and diet breadth on patterns of genetic isolation by distance in polyphagous insects. *Am Naturalist*, 152: 438–446.
- Piry, S., Alapetite, A., Cornuet, J. M., Paetkau, D., Baudouin, L., Estoup, A. (2004)** GeneClass2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *Journal of Heredity*, 95: 536-539.
- Poirié, M., Pasteur, N. (1991).** La résistance des insectes aux insecticides. *La Recherche*, 22: 874-882.
- Pritchard, J. K, Wen, W. (2003).** *Documentation for the STRUCTURE software, Version 2.* Chicago. Available at <http://pritch.bds.uchicago.edu>.
- Pritchard, J., K, Stephens, M., Donnelly, P. (2000).** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945–959.
- Quayle, H. J. (1926).** The codling moth in walnuts. University of California Agricultural Experiment Station, Oakland, CA, Bulletin 402, 33 pp.
- Queller, D., C., Goodnight, K. F. (1989).** Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*, 43, 258-275.
- Rang, C., Lacey, L. A., Frutos, R. (2000).** The crystal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thompsoni* display a synergistic activity against the codling moth, *Cydia pomonella*. *Curr. Microbiol.*, 40: 200-204.
- Rannala, B., Mountaain, L. J. (1997).** Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 9197-9201.
- Ranson, H., Prapanthadara, L., Hemingway, J. (1997).** Cloning and characterization of two glutathione S-transferases from a DDT-resistant strain of *Anopheles gambiae*. *Biochem. J.*, 324: 97–102.

- Raymond M., Rousset F. (1995).** GENEPOP (version 1.2): a population genetics software for exact test and ecumenicism. *J. Hered.*, 86: 248-249.
- Reuveny, H., Cohen, E. (2004).** Resistance of the codling moth *Cydia pomonella* (L.) (Lep.:Tortricidae) to pesticides in Israel. *J Appl Entomol.*, 128: 645–651.
- Reyes, M., Franck, P., Charmillot, P. J., Ioriatti, C., Olivares, J., Pasqualini, E., Sauphanor, B. (2007).** Diversity of insecticide resistance mechanisms and spectrum in European populations of the Codling moth, *Cydia pomonella*. *Pest Management Science*, 63: 890–902.
- Reyes, M., Franck, P., Olivares, J. Margaritopoulos, J., Knight, A., Sauphanor, B. (2008).** Worldwide variability of insecticide resistance mechanisms in the codling moth, *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). *Bulletin of Entomological Research*, 1 -11.
- Reyes, M., Sauphanor, B. (2008).** Resistance monitoring in codling moth: a need for standardization. *Pest Management Science*, 64: 945–953.
- Rhinds, M., Gries, G., Ho, C. T., Chew, P. S. (2002).** Dispersal by bagworm larvae, *Metisa plana*: effects of population density, larval sex, and host plant attributes. *Ecol. Entomol.*, 27: 204–212.
- Riedl, H., Zelger, R. (1994).** Erste Ergebnisse der Untersuchungen zur Resistenz des Apfelwicklers gegenüber Diflubenzuron. *Obstbau-Weinbau*, 94: 107-109.
- Rock, G. C. (1967).** Aseptic rearing of the codling moth on synthetic diets: ascorbic acid and fatty acid requirements. *J. Econ. Entomol.* 60: 1002-1005.
- Roehrich, R. (1963).** Le Carpocapse (*Laspeyresia pomonella* L.). Developpement comparé sur pommes et sur noix. *Revue de Zoologie Agricole*, 62: 58-62.
- Rousset, F. (2000).** Genetic differentiation between individuals. *Journal of Evolutionary Biology*, 13, 58-62.
- Salazar, C. G. (1984).** Prediction of induction and termination of diapause in the codling moth (*Cydia pomonella* L.) (Lepidoptera: Tortricidae). MSc Thesis, Michigan State University, Department of Entomology, East Lansing, MI, 116pp.
- Brar S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Valéro, J. R., Surampalli, R. Y. (2008).** Wastewater sludges as novel growth substrates for rearing codling moth larvae. *World J. Microbiol Biotechnol*, 24: 2849–2857
- Sauphanor, B., Avilla, J., Charmillot, P. J., Ioriatti, C., Michele, S., Matias, C., et al. (1998a).** Coping with insecticide resistance in fruit production: the

example of codlingmoth in Europe, in *Book of Abstracts*, ed. by Brunnhofer V and Soldan T. *Inst. Entomol., Acad. Sci. Czech Republic*, 747 pp.

- Sauphanor, B., Bouvier, J. C. (1995).** Cross resistance between benzoylureas and benzoylhydrazines in the codling moth, *Cydia pomonella* L. *Pestic Sci*, 45: 369-375.
- Sauphanor, B., Bouvier, J. C., Brosse, V. (1998b).** Spectrum of insecticide resistance in *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) in southeastern France. *J Econ Entomol*, 91: 1225-1231.
- Sauphanor, B., Brosse, V., Bouvier, J. C., Speich, P., Micoud, A., Martinet, Ch. (2000).** Monitoring resistance to diflubenzuron and deltamethrin in French codling moth populations (*Cydia pomonella*). *Pest Management Science*, 56: 74–82.
- Sauphanor, B., Brosse, V., Monier, C., Bouvier, J. C. (1998c).** Differential ovicidal and larvicidal resistance to benzoylureas in the codling moth, *Cydia pomonella*. *Entomol. Exp. Appl.*, 88: 247-253.
- Sauphanor, B., Cuany, A., Bouvier, J. C, Brose, V., Berge, J. B. (1997).** Mechanism of resistance to deltamethrin in field populations of *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). *Pestic Biochem Physiol*, 58: 109–117.
- Sauphanor. B., Benoit, M., Bouvier, J. C., Perron. G., Fremond, J. C. (1994).** Un cas de résistance du carpocapse des pommes au diflubenzuron dans le sud-est de la France. *Phytoma*, 458: 46–49.
- Sawicki, R., Singh, P. S., Mondal, K. A., Benes, H., Zimniak, P. (2003).** Cloning, expression and biochemical characterization of one Epsilon-class (GST-3) and ten Deltaclass (GST-1) glutathione S-transferases from *Drosophila melanogaster*, and identification of additional nine members of the Epsilon class. *Biochem. J.* 370: 661–669.
- Schlötterer, C. (2000).** Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109: 365–371.
- Schlotterer, C. (1998).** Molecular genetic analysis of populations. A practical approach. Second edition. Oxford University Press.
- Schmith, L. C. (1955).** DDT resistance in codling moth: a report on the 1954-1955 control trials. *J. Dept. Agric. South Aust.*, 60: 185–187.

- Schneider S., Roessli D., Excoffier L. (2000).** *Arelquin. A software for population genetic data analysis, Version 2.0.* Geneva, Switzerland: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva.
- Schug, M. D, Wetterstrand, K. A, Gaudette, M. S, et al. (1998).** The distribution and frequency of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Ecology*, 7: 57–70.
- Schumacher P., Weber D. C., Hagger C., Dorn S. (1997a).** Heritability of flight distance for *Cydia pomonella*. *Entomologia experimentalis et applicata*, 85: 169-175.
- Schumacher P., Weyeneth A., Weber D. C., Dorn S. (1997b).** Long flights in *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) measured by a flight mill: influence of sex, mating status and age. *Physiological Entomology*, 22: 149-160.
- Scott, (1999).** Molecular basis of insecticide resistance: cytochromes P450. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29: 757-777.
- Scott, J.G. (1989).** Cross-resistance to the biological insecticide abamectin in pyrethroid-resistant house flies. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 34: 27-31.
- Shel'deshova, G. G. (1967).** Ecological factors determining the distribution of the codling moth *Laspeyresia pomonella* L. (Lepidoptera, Tortricidae) in the northern and southern hemispheres. *Entomological Review*, 46: 349-361.
- Siddall, J. B. (1976).** Insect growth regulators and insect control: a critical appraisal. *Environ Health Perspect*, 14: 119–126.
- Slatkin, M. (1987).** Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, 236, 787-792.
- Smaghe, G., Viñuela, E., van Limbergen, H., Budia, F., Tirry, L. (1999).** Nonsteroidal moulting hormone agonists: effects on protein synthesis and cuticle formation in Colorado potato beetle larvae. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 93: 1–8.
- Smissaert, H. R. (1964).** Cholinesterase inhibition in spider mite susceptible and resistant to organophosphate. *Science* 143: 129-131.
- Soderlund, D. M. (1997).** Molecular mechanisms of insecticide resistance. In: Sjut, V. (ed.) *Molecular Mechanisms of Resistance to Agrochemicals*. Springer: Berlin, pp.21-56.

- Stará, J., Kocourek, F. (2007).** Insecticide Resistance and Cross-Resistance in Populations of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) in Central Europe. *J. Econ. Entomol.*, 100: 1587-1595.
- Tabashnik B. E. (1991).** Determining the mode of inheritance of pesticide resistance with backcross experiments. *J Econ Entomol*, 84: 703–712.
- Taylor, F., Feyereinsen, R. (1996).** Molecular biology and evolution of resistance to toxicants. *Molecular Biology and Evolution*, 13: 719-734.
- Thaler R., Brandstätter A., Meraner A., Chabicovski M., Parson W., Zelger R., Dalla Via J., Dallinger R. (2008).** Molecular phylogeny and population structure of the codling moth (*Cydia pomonella*) in Central Europe: II. AFLP analysis reflects human-aided local adaptation of a global pest species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48: 838-849.
- Theron, P. P. A. (1974).** Studies on the provision of hosts for the mass-rearing of codling moth parasites. *Union So. Africa Sci. Bul.* 262: 1-45.
- Thompson E. A. (1975).** The estimation of pairwise relationships. *Ann. Hum. Genet. Lond.*, 39: 173-188.
- Thwaite, W. G., Williams, G. D., Hately, M. A. (1993).** Extent and significance of azinphos-methyl resistance in codling moth in Australia, pp. 166-168. In S. Corey, D. Dall, and W. Milne [eds.], *Pest Control and Sustainable Agriculture*, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Melbourne, Australia.
- Timm A. E., Geertsema H., Warnich L. (2006).** Gene flow among *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) geographic and host populations in South Africa. *Journal of Economic Entomology*, 99: 341–348.
- Toba H. H., Howell, J. F. (1991).** An improved system for mass-rearing codling moth. *J. Entomol. Soc. Br. Columbia*, 88: 22-27.
- Tomizawa, M., Casida, J. E. (2004).** Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of Selective Action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45: 247-268.
- Tomizawa, M., Latli, B., Casida, J. E. (1999).** Structure and function of insect nicotinic acetylcholine receptors studies with nicotinoid insecticide affinity probes. In *Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor*. Yamamoto, I., Casida, J.E. (Eds), pp. 271–292. Springer, Tokyo.

- Townsend M. G., Busvine J. R., 1969.** The mechanism of malathion resistance in the blowfly *Chrysomya putoria*. *Entomol Exp Appl*, 12: 243–267.
- Tysona, R., Thistlewoodb, H., Gary, J., Juddb, R. (2007).** Modelling dispersal of sterile male codling moths, *Cydia pomonella*, across orchard boundaries. *Ecological modelling*, 205: 1–12.
- United Nations. 1992.** Agenda 21.
- Usmani, K. A., Knowles, C. O. (2001).** DEF sensitive esterases in homogenates of larval and adult *Helicoverpa zea*, *Spodoptera frugiperda* and *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol*, 94: 884–891.
- Villate, F., Ziliani, P., Marcel, V., Menozzi, P., Fournier, D. (2000).** A high number of mutations in insect acetylcholinesterase may provide insecticide resistance. *Pestic Biochem Physiol*, 67: 95–102.
- Vontas, J. G., Small G. J., Hemingway J. (2000).** Comparison of esterase gene amplification, gene expression and esterase activity in insecticide susceptible and resistance of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (St_1). *Insect Mol. Biol.*, 9: 655-660.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995).** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414.
- Waldner, W. (1993).** Rückblick und Vorschau auf die Bekämpfung des Apfelwicklers. *Obstbau-Weinbau* 12: 355–357.
- Walker, C. H. (1998).** Birds. In: Calow P. (Ed), *Handbook of Ecotoxicology*, Blackwell Science Ltd, Oxford, United Kingdom, 328-338.
- Wang, Z., Weber, J. L., Zhong, G., Tanksley, S. D. (1994).** Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 88: 1–6.
- Wearing, C. H. (1979).** Integrated control of apple pests in New Zealand. 10. Population dynamics of codling moth in Nelson. *New Zealand Journal of Zoology*, 6: 165-199.
- Wei, Y., Appel, A. G., Moar, W., Liu, N. (2001).** Pyrethroid resistance and cross-resistance in the German cockroach, *Blattella germanica* (L). *Pest Management Science*, 57: 1055-1059.
- Weir, B. S., Cockerham C. C. (1984).** Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358–1370.

- Welsh, J., Petersen, C., McClelland, M. (1991).** Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. *Nucleic Acids Res*, 20: 303–306.
- Welter, S. C., Varela, L., Freeman, R. (1991).** Codling moth resistance to azinphosmethyl in California. *Resistant Pest Management Newsletter*, 3: 12.
- Westwood, M. N. (1978).** Temperate-Zone Pomology. W.H. Freeman, San Francisco, CA, 428 pp.
- Wheelock, C. E., Shan, G., Ottea, J. (2005).** Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. *Journal of Pesticide Science*, 30 (2): 75-83.
- Wildbolz, T. (1958).** Über die Orientierung des Apfelwicklers bei der Eiablage. *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft*, 31: 25-34.
- Wildbolz, Th. (1970).** Problèmes de la lutte intégrée contre le Carpocapse. In: Proceedings of the 4th OILB Symposium on Integrated Control in Orchards 9-12 October 1969, Avignon. OILB, Zurich: 63-73.
- Wolstenholme J. A., Rogers, T. A. (2005).** Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology*, 131: 85-95.
- Yu, J. S. (2002).** Biochemical characteristics of microsomal and cytosolic glutathione S-transferases in larvae of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 72: 100–110.
- Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. (2002).** Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11: 1-16.
- Zhao, J., Li, Y., Collins, H., Gusukuma-minuto, L., Mau, R., Thompson, G., Shelton, A. (2002).** Monitoring and characterization of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to spinosad. *Journal of Economic Entomology*, 95: 430-436.
- Zhou X., Faktor O., Applebaum S. W., Coll M. (2000).** Population structure of the pestiferous moth *Helicoverpa armigera* in the Eastern Mediterranean using RAPD analysis. *Heredity*, 85: 251–25.
- Τζανακάκης Μ. Ε. (1995).** Εντομολογία. University Studio Press, Θεσσαλονίκη.
- Τζανακάκης Μ. Ε., Κατσόγιαννος, Β. Ι. (1998).** Έντομα καρποφόρων δέντρων και αμπέλου, Εκδόσεις ΑγροΤύπος, Αθήνα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Tampon glycine pH 10.4 (500ml)

1. Υλικά

- Glycine (MB = 111,53)
- NaOH
- Απεσταγμένο νερό

2. Προετοιμασία

1. Διαλύονται 2,062gr glycine σε 100ml απεσταγμένο νερό
2. Ρυθμίζεται το pH με προσθήκη 0,9gr NaOH
3. Συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό έως τα 500ml
4. Το διάλυμα (Tampon glycine pH 10.4) φυλάσσεται σε συνθήκες δωματίου

Tampon phosphate pH 6.5 50mM (800ml)

1. Υλικά

- $\text{H}_2\text{NaO}_4\text{P}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MB =156,01)
- $\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MB = 372,24)
- EDTA (MB=372,24)
- Απεσταγμένο νερό

2. Διαλύματα

- 0,2M $\text{H}_2\text{NaO}_4\text{P}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$: Σε 1lt απεσταγμένο νερό προστίθενται 31,202gr $\text{H}_2\text{NaO}_4\text{P}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 0,2M $\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$: Σε 1lt απεσταγμένο νερό προστίθενται 39,2gr $\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 0,5M EDTA: Σε 1ml απεσταγμένο νερό προστίθενται 0,18612gr EDTA

3. Εκτέλεση

1. Διαλύονται 128ml 2M $\text{H}_2\text{NaO}_4\text{P}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ σε 500ml απεσταγμένο νερό
2. Ρυθμίζεται το pH με προσθήκη 72ml 0,2M $\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$
3. Συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό έως τα 800ml
4. Διαλύονται στο διάλυμα 160μl 0,5M EDTA και 12,4gr DTT

5. Το διάλυμα (Tampon phosphate pH 6.5 50mM) φυλάσσεται στους 4°C

Tampon phosphate pH 7.2 50mM (1000ml)

1. Υλικά

- $\text{H}_2\text{NaO}_4\text{P} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MB = 156,01)
- $\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MB = 372,24)
- EDTA (MB=372,24)
- Απεσταγμένο νερό

2. Διαλύματα

- 0,2M $\text{H}_2\text{NaO}_4\text{P} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: Σε 1lt απεσταγμένο νερό προστίθενται 31,202gr $\text{H}_2\text{NaO}_4\text{P} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 0,2M $\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: Σε 1lt απεσταγμένο νερό προστίθενται 39,2gr $\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 0,5M EDTA: Σε 1ml απεσταγμένο νερό προστίθενται 0,18612gr EDTA

3. Παρασκευή

1. Διαλύονται 190ml 2M $\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ σε 650ml απεσταγμένο νερό
2. Ρυθμίζεται το pH με προσθήκη 60ml 0,2M $\text{H}_2\text{NaO}_4\text{P} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
3. Συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό έως τα 1000ml
4. Διαλύονται στο διάλυμα 200ml 0,5M EDTA και 15,5gr DTT
5. Το διάλυμα (Tampon phosphate pH 6.5 50mM) φυλάσσεται στους 4°C

Tampon Hepes 50 mM (pH 7.0) (250ml)

1. Υλικά

- Hepes (MB = 238,3)
- NaOH
- Απεσταγμένο νερό

2. Προετοιμασία

1. Διαλύονται 2.978,7mgr Herpes σε 200ml απεσταγμένου νερού
2. Ρυθμίζεται το pH με προσθήκη 1,1gr NaOH
3. Συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό έως τα 250ml
4. Το διάλυμα Tampon Herpes 50 mM (pH 7.0) φυλάσσεται στους 4°C

Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης

1. Υλικά

- Ακρυλαμίδη
- Bis-ακρυλαμίδη
- Amonium Persulate
- Ουρία
- 20X TBE
- TEMED
- Bind silane (Promega)
- Αιθανόλη 100%
- Οξικό οξύ
- Sigmacode (Sigma)

2. Προετοιμασία διαλυμάτων

- **Μητρικό διάλυμα Πολυακρυλαμίδης 30%:** 29 gr ακρυλαμίδης + 1 gr Bis-ακρυλαμίδης διαλύονται σε 70 ml dH₂O και στη συνέχεια διηθούνται και συμπληρώνονται με dH₂O έως τα 100 ml. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.
- **Διάλυμα APS (Amonium Persulate) 20%:** 0,1 gr APS διαλύεται σε 500μl dH₂O

3. Προετοιμασία

Παρασκευή Πηκτής πολυακρυλαμίδης 6%		
25ml	50ml	70ml
2,4 gr Ουρίας	4,8 gr Ουρίας	6,72 gr Ουρίας
5ml μητρικού διαλύματος πολυακρυλαμίδης	10ml μητρικού διαλύματος πολυακρυλαμίδης	14 ml μητρικού διαλύματος πολυακρυλαμίδης
1,25 ml 20X TBE	2,5ml 20X TBE	3,5ml 20X TBE

Και στις δυο περιπτώσεις, το διάλυμα διηθείται και συμπληρώνεται με dH₂O έως τα 25 ή τα 50 ή τα 70 ml αντίστοιχα.

Για να αρχίσει ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης, στο παραπάνω διάλυμα προσθέτουμε: TEMED και APS

25ml	50ml	70ml
25 μl TEMED	50μl TEMED	70 μl TEMED
150 μl διαλύματος APS (Amonium Persulfate) 20%	300μl διαλύματος APS (Amonium Persulfate) 20%	420 μl διαλύματος APS (Amonium Persulfate) 20%

Αμέσως το διάλυμα χύνεται στη συσκευή πηκτής και τοποθετείται η χτένα δημιουργίας πηγαδιών.

Παρασκευή Πηκτής πολυακρυλαμίδης 8%		
25ml	50ml	70ml
2,4gr Ουρίας	4,8 gr Ουρίας	6,72 gr Ουρίας
6,65ml μητρικού διαλύματος πολυακρυλαμίδης	13.3ml μητρικού διαλύματος πολυακρυλαμίδης	18,62 ml μητρικού διαλύματος πολυακρυλαμίδης
1,25ml TBE 20X	2,5ml TBE 20X	3,5ml TBE 20X

Και στις δυο περιπτώσεις, το διάλυμα διηθείται και συμπληρώνεται με dH_2O έως τα 25 ή τα 50 ή τα 70 ml αντίστοιχα.

Για να αρχίσει ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης, στο παραπάνω διάλυμα προσθέτουμε :

25ml	50ml	70ml
25 μl TEMED	50μl TEMED	70 μl TEMED
150 μl διαλύματος APS (Amonium Persulfate) 20%	300μl διαλύματος APS (Amonium Persulfate) 20%	420 μl διαλύματος APS (Amonium Persulfate) 20%

Αμέσως το διάλυμα χύνεται στη συσκευή πηκτής και τοποθετείται η χτένα δημιουργίας πηγαδιών.

Παρασκευή Πηκτής πολυακρυλαμίδης 8% (Μεγάλο GEL 1mm)	
75ml	100ml
31,5 gr ουρίας	41,9 gr ουρίας
5,78 gr Acrylamide	7,7 gr Acrylamide
0,2 gr Bis-acrylamide	0,27 gr Bis-acrylamide
3,75 ml TBE 20X	4,98 ml TBE 20X

Και στις δυο περιπτώσεις ακολουθεί διήθηση στο διάλυμα και συμπληρώνεται με dH₂O έως τα 75 ml ή τα 100 αντίστοιχα.

Για να αρχίσει ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης, στο παραπάνω διάλυμα προσθέτουμε :

75ml	100ml
37,5 μl TEMED	50 μl TEMED
200μl APS 20%	266μl APS 20%

Αμέσως το διάλυμα χύνεται στη συσκευή πηκτής και τοποθετείται η χτένα δημιουργίας πηγαδιών.

Χρώση πηκτώματος ακρυλαμίδης

1. Υλικά

- Αιθανόλη
- AgNO₃
- NaBH₄
- οξικό οξύ
- φορμαλδεϋδη (HCHO)

2. Διαλύματα

Διάλυμα 1: Σε 72 ml ddH₂O προστίθενται 8 ml αιθανόλης και 10λ οξικό οξύ και ο όγκος ρυθμίζεται στα 400ml με H₂O.

Διάλυμα 2: Διαλύεται 1gr AgNO₃ σε 1lt H₂O

Διάλυμα 3: Περιέχει 3 gr NaOH, 0,01 gr NaBH₄ και 0.8 ml HCHO σε τελικό όγκο 200ml

3. Προετοιμασία

Το πήκτωμα απομακρύνεται από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και επωάζεται:

- Με το Διάλυμα I, δύο φορές (200 ml κάθε φορά) για 3 min έκαστη
- Με το Διάλυμα II (200ml) για 10 min. Ενδιάμεσα ξεπλένουμε δύο φορές με dH₂O, για 2 min την κάθε φορά
- Με το Διάλυμα III (200ml) μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες (15-20min).

Παρασκευή πηκτώματος αгарόζης

1. Υλικά

Tris – base

Acetic Acid

EDTA 0,5M

Αγαρόζη

Βρωμιούχο αιθίδιο

2. Διαλύματα

- 50xTAE

50 X TAE	
250 ml	100 ml
60,5 gr Tris – base	24,20 Tris – base
14,25 ml Acetic Acid	5,7 ml Acetic Acid
25 ml EDTA 0,5M	10 ml EDTA 0,5M

- **Βρωμιούχο αιθίδιο:** 10mg βρωμιούχου αιθιδίου διαλύονται σε 1ml dH₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκοτάδι.

• Διάλυμα EDTA 0.5M pH 8

EDTA 0,5 pH 8			
	<u>50ml</u>	<u>100ml</u>	<u>800ml</u>
EDTA (gr)	11,63	23,26	186,1
NaOH (gr)	1,25	2,5	20,0
H ₂ O (gr)	50	100	800

Το διάλυμα φυλάσσεται στους 8⁰C.

3. Προετοιμασία

1. Σε κωνική φιάλη, τοποθετούνται 50 ml διαλύματος 1xTAE και 1 gr αгарόζης.
2. Το μίγμα τοποθετείται στο μαγνητικό αναδευτήρα και αναδύεται με θέρμανση, μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές.
3. Αφού κρυώσει λίγο το διάλυμα, προσθίθεται 1 μl βρωμιούχο αιθίδιο.
4. Το διάλυμα αναδύεται και χύνεται στη συσκευή πηκτής, όπου έχει ήδη τοποθετηθεί η χτένα για τη δημιουργία των πηγαδιών.
5. Το πήκτωμα πήζει σε θερμοκρασία δωματίου σε ~15min

Μέτρηση ενεργότητας MFOs

1. Υλικά

- Tampon phosphate buffer 50mM (pH 7.2)
- 7-ethoxycoumarine (7EC) 20mM διαλυμένο σε αιθανόλη (φυλάσσεται στους - 20°C)
- Αιθανόλη
- Glycine buffer (pH 10.4): Περιέχει 50% tampon glycine pH 10.4 και 50% αιθανόλη
- micro tubes
- micro pipettes
- microplates (96 wells)
- falcons των 50 ml

2. Διαλύματα

- **7-ethoxycoumarine (7EC) 20mM:** Σε 10ml αιθανόλης προστίθονται 0,03804gr 7-ethoxycoumarine
- **Διάλυμα-A:** Σε πλαστικό φιαλίδιο προστίθονται 200μl 7EC 20mM και στη συνέχεια ο όγκος συμπληρώνεται έως τα 10ml με Tampon phosphate buffer 50mM (pH 7,2)

3. Προετοιμασία

1. Σε πλαστικό φιαλίδιο χωρητικότητας 1,5 ml, τοποθετείται ένα μέρος του σώματος του εντόμου. Για τα ενήλικα το μισό τμήμα της κοιλιάς.
2. Προστίθονται 100μl Διαλύματος-A
3. Πραγματοποιείται επώαση σε σκοτεινό θάλαμο, στους 23°C για 4 h
4. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 1min στις 2000 στροφές στους 25°C
5. Η αντίδραση σταματάει μετά από 4 h με την προσθήκη 50 μl glycine buffer και 50 μl αιθανόλης
6. Χρησιμοποιούνται 12 πλαστικά φιαλίδια χωρητικότητας 1,5 ml στα οποία τοποθετούνται 50 μl glycine buffer και 50 μl αιθανόλης από τη αρχή της αντίδρασης (πριν την επώαση) ως μάρτυρας
7. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα πλάκα (96 πηγαδιών).

8. Ο φθορισμός μετρείται χρησιμοποιώντας φίλτρο με 380 nm για τη διέγερση και 465 nm για την εκπομπή.

Πρότυπη καμπύλη MFOs

1. Υλικά

- 7-Hydroxycoumarin (7OH)
- Tampon glycine pH 10.4
- Tampon phosphate pH 7.2
- Αιθανόλη

2. Διαλύματα

- **Μητρικό διάλυμα** περιεκτικότητας 1000ng 7OH/μl: Σε 5ml αιθανόλης προστίθενται 0.005gr 7OH.
- **Διάλυμα Ε** περιεκτικότητας 100ng 7OH/μl: Σε 1ml από το Μητρικό διάλυμα προστίθενται 9ml αιθανόλης.
- **Διάλυμα D** περιεκτικότητας 10ng 7OH/μl: Σε 500μl από το Μητρικό διάλυμα προστίθενται 49.5ml αιθανόλης.
- **Διάλυμα C** περιεκτικότητας 1ng 7OH/μl: Σε 1ml από το Διάλυμα D προστίθενται 9ml αιθανόλης.

3. Προετοιμασία

Η πρότυπη καμπύλη υπολογίζεται από τη σχέση που εκφράζει το λογάριθμο της συγκέντρωσης του 7OH, σε ng, ως συνάρτηση της λογαριθμιμένης τιμής του OD που προκύπτει από το φθορισμόμετρο. Η δημιουργία της καμπύλης βασίζεται στον Πίνακα 1.

- Στην πρώτη γραμμή αναγράφονται οι αριθμοί των πλαστικών φιαλίδων που στο τέλος μεταφέρονται στο κελί της μικροπλάκας με τον ίδιο αριθμό που χρησιμοποιήθηκαν.
- Στη δεύτερη γραμμή αναγράφονται οι συγκεντρώσεις, σε ng από το 7OH, που χρησιμοποιούνται.

- Στην τρίτη γραμμή αναγράφεται η ποσότητα από το Tampon glycine (μl) που προστίθεται. Για όλες τις περιπτώσεις παραμένει σταθερή στα 100 μl.
- Στην τέταρτη γραμμή αναγράφονται οι ποσότητες από το Tampon phosphate (μl) που χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα.
- Στην πέμπτη γραμμή αναγράφονται οι ποσότητες από τα διαλύματα C, D και E σε (μl) που προστίθενται, ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση του 7OH σε ng.
- Στην έκτη γραμμή αναγράφονται ποια διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση, με αποτέλεσμα να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση του 7OH σε ng.

1. Η τελική ποσότητα σε κάθε πλαστικό φιαλίδιο είναι 200 μl. Η ποσότητα του Tampon glycine παραμένει σταθερή (100 μl) ενώ αλλάζει μόνο η ποσότητα από τα διαλύματα C, D και E. Επομένως η τελική συγκέντρωση 32 ng 7OH στο erpendrof tube με τον αριθμό 7 επιτεύχθηκε με την προσθήκη 68 μl Tampon phosphate και 32 μl από το διάλυμα C. Η ίδια μεθοδολογία εφαρμόζεται και για τα υπόλοιπα πλαστικά φιαλίδια.

2. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 1min στις 2000 στροφές στους 25°C

3. Ακολουθεί επώαση σε σκοτεινό θάλαμο, στους 23°C για 4 h

4. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 1min στις 2000 στροφές στους 25°C

5. Το διάλυμα μεταφέρεται σε νέα πλάκα

6. Ο φθορισμός μετρείται χρησιμοποιώντας φίλτρο με 380 nm για τη διέγερση και 465 nm για την εκπομπή και προκύπτουν οι αντίστοιχες τιμές των OD.

Πίνακας 1. Ποσότητες για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης

A/A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ng 7OH	0	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
Tampon glycine (μl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Υπόστρωμα (μl) Tampon phosphate pH 7.2	100	99	98	96	92	84	68	36	87,2	74,4	48,8	89,8
Διαλύματα C,D,E (μl)	-	1	2	4	8	16	32	64	12,8	25,6	51,2	10,2
	Διάλυμα C							Διάλυμα D			Διάλ.Ε	

Από την πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης προκύπτει γραμμική εξίσωση της μορφής $y=ax+b$ η οποία χρησιμοποιείται στη συνέχεια για την μετατροπή των τιμών του φθορισμόμετρου, των διαφορετικών δειγμάτων, σε pg 7OH/min.

Μετατροπή τιμών OD σε pg 7OH / min / mg

Από τον υπολογισμό της πρότυπης καμπύλης υπολογίζονται οι συντελεστές a και b της γραμμικής εξίσωσης $y=ax+b$. Στη συνέχεια για την μετατροπή των OD σε pg 7OH/min χρησιμοποιείται η εξίσωση $F(x)=((EXP(((LOG(F3-$$$5)-2,3009)/0,6783)*2,3))*1000)/240$.

$F3$ = Η τιμή σε OD για το δείγμα που βρίσκεται στο κελί F3

$$$$5$ = Ο μέσος όρος του μάρτυρα

2,3009 = Ο συντελεστής a από τη γραμμική εξίσωση $y=ax+b$ που προκύπτει από την πρότυπη καμπύλη.

0,6783 = Ο συντελεστής b από τη γραμμική εξίσωση $y=ax+b$ που προκύπτει από την πρότυπη καμπύλη.

2,3 = Σταθερά

1000 = Η μετατροπή των ng σε pg

240 = Ο χρόνος (4x60)

Τέλος, για την μετατροπή των pg 7OH/min σε pg 7OH/min/mg διαιρείται η τιμή του $F(x)$ με την τιμή της πρωτεΐνης που μετρήθηκε στο αντίστοιχο δείγμα.

Εκτίμηση ολικής πρωτεΐνης

Για την εκτίμηση της ποσότητας των ολικών πρωτεϊνών του εντόμου χρησιμοποιείται 1 μl ομογενοποιημάτος σε 2 επαναλήψεις. Για κάθε έντομο προστίθενται σε 2 βοθρία, 1 μl ομογενοποιημάτος και 300 μl διαλύματος που προκύπτει από αραιώση διαλύματος BioRad (BioRad) σε απεσταγμένο νερό με αναλογία ενός όγκου BioRad προς τρεις όγκους απεσταγμένου νερού. Για το μάρτυρα χρησιμοποιούνται 2 επαναλήψεις και στο βοθρίο προστίθενται μόνο 300 μl διαλύματος που προκύπτει από αραιώση διαλύματος BioRad (BioRad) σε απεσταγμένο νερό με αναλογία ενός όγκου BioRad προς τρεις όγκους απεσταγμένου νερού. Η πλάκα παραμένει σε σκοτεινό μέρος επί 5 min σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) και λαμβάνεται η ένδειξη του φασματοφωτόμετρου (OD: optical density) για το τελικό σημείο της αντίδρασης (end point) στα 630 nm. Πριν τη διαδικασία εκτίμησης της ολικής ποσότητας πρωτεϊνών του εντόμου κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης του οργάνου με πρότυπα διαλύματα BSA (Bovine Serum Albumin) συγκεντρώσεων 0, 1, 2, 5, 7, 5, 10 και 15 μg/ml.

Υπολογίζεται ότι η σχέση που εκφράζει την ποσότητα ολικής πρωτεΐνης (Y) ως συνάρτηση της τιμής OD (X) του οργάνου είναι γραμμική της μορφής $y=0,1 x (x-0,07)$. Με βάση τη συγκεκριμένη εξίσωση υπολογίζεται η ποσότητα ολικών πρωτεϊνών του εντόμου (μg ολικής πρωτεΐνης/ έντομο) αφού προηγουμένως διαιρεθεί με την αρχική ποσότητα πρωτεΐνης.

Μέτρηση ενεργότητας GST

1. Υλικά

- Glutathione (GSH) 100 mM, MB= 307.3
- Tampon Hepes 50 mM, MB= 283 (Sigma H-3375)
- NaOH
- Chlorobimane (MCB) 0.3 mM, MB= 226.7 (Fluka code:69899)

- Απεσταγμένο νερό
- Αιθανόλη

2. Διαλύματα

• A - GSH, 100 mM

1. Προστίθενται 30,7mg GSH σε 1ml απεσταγμένο νερό και παρασκευάζεται πάντα την ώρα που εκτελείται το πείραμα

• B - Chlorobimane (MCB) 30 mM

1. Προστίθενται 6,8mg MCB σε 1ml αιθανόλης και παρασκευάζεται πάντα την ώρα που εκτελείται το πείραμα

• Διάλυμα A₁

1. Προστίθενται 720μl GSH, 100 mM σε 17,6ml Tampon HEPES 50 mM (pH 7.0)

• Διάλυμα B₁

1. Προστίθενται 250μl Chlorobimane (MCB) 30 mM σε 2250μl Tampon HEPES 50 mM (pH 7.0).

3. Εκτέλεση

1. Σε κάθε βοθρίο της μικροπλάκας (96 βοθρίων) προστίθενται 30μl από το ένζυμο. Για κάθε έντομο εκτελούνται δύο επαναλήψεις.
2. Στην μικροπλάκα αφήνονται 8 πηγάδια χωρίς ένζυμο, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας. Εκεί, αντί για ένζυμο προστίθενται 30μl Tampon HEPES 50 mM (pH 7.0)
3. Σε κάθε βοθρίο προστίθενται 150μl από το διάλυμα A₁
4. Στη συνέχεια προστίθενται 20μl από το διάλυμα B₁
5. Ακολουθεί επώαση για 20min στους 22°C.
6. Ο φθορισμός μετρείται χρησιμοποιώντας φίλτρο με 380 nm για τη διέγερση και 465 nm για την εκπομπή

Μετατροπή OD σε UF/mg πρωτεΐνης

Προκύπτει από τον τύπο $(A2 - A21) / A21$, όπου

- A₂ = η ένδειξη από το φθορισμόμετρο για το δείγμα που βρίσκεται στο κελί A₂

- **\$M\$5**= Ο μέσος όρος από τα δείγματα του μάρτυρα
- **A21**= Η τιμή της πρωτεΐνης που μετρείται από το δείγμα A2

Μέτρηση ενεργότητας εστερασών

1.Υλικά

- Acetate
- β- nathyl acetate
- Fast-garnet
- Sodium dodecyl sulfate (SDS)
- Sodium phosphate buffer 50mM (pH 7,2)
- Sodium phosphate buffer 50mM (pH 6,5)
- Tampon Hepes 50 mM, MB= 283 (Sigma H-3375)
- Απεσταγμένο νερό

2. Διαλύματα

- **Διάλυμα-B**: Προστίθενται 18,8mg β- nathyl acetate σε 1 ml ακετόνης και ο όγκος συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό ως τα 10 ml.
- **Τελικό διάλυμα**: Σε falcon των 50 ml προστίθενται 5,5 ml από το διάλυμα-B, 8,25 ml Sodium phosphate (pH 6,5) και 33ml απεσταγμένο νερό
- **Διάλυμα χρωματισμού**: Σε falcon των 50 ml προστίθενται 30mg Fast garnet , 350mg SDS και 10ml απεσταγμένο νερό.

3.Προετοιμασία

1. Σε κάθε βοθρίο της μικροπλάκας (96 βοθρίων) προστίθενται 90μl από το τελικό διάλυμα και 90μl από το ένζυμο των εντόμων.
2. Στην μικροπλάκα αφήνονται 8 πηγάδια χωρίς ένζυμο τα οποία χρησιμοποιούνται ως μάρτυρας. Εκεί, αντί για ένζυμο προστίθενται 90μl Sodium phosphate (pH 7,2)
3. Ακολουθεί επώαση για 15 min στους 30°C.
4. Στη συνέχεια προστίθενται 20μl από το «διάλυμα χρωματισμού».

5. Ακολουθεί επώαση για 15 min, σε θερμοκρασία δωματίου και η απορρόφηση μετρίεται στα 492 nm

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης

1. Υλικά

- Β naphthol
- β- nathyl acetate
- Acetate
- Sodium phosphate buffer 50mM (pH 6,5)
- Fast-garnet
- SDS
- d H₂O

2. Διαλύματα

- **Μητρικό διάλυμα** περιεκτικότητας 1000ng β-nathol/μl: Σε 1ml ακετόνης και 4ml d H₂O προστίθενται 0.005gr β-nathol
- **Διάλυμα Ε** περιεκτικότητας 100ng β-nathol /μl: Σε 1ml από το Μητρικό διάλυμα προστίθενται 2ml ακετόνης και 7ml d H₂O
- **Διάλυμα D** περιεκτικότητας 10ng β-nathol /μl: Σε 500μl από το Μητρικό διάλυμα προστίθενται 10ml ακετόνης και 39,5ml d H₂O
- **Διάλυμα C** περιεκτικότητας 1ng β-nathol /μl: Σε 1ml Διάλυμα D προστίθενται 2ml ακετόνης και 7ml d H₂O
- **Διάλυμα υποστρώματος**
 1. **Διάλυμα W:** Σε 1ml ακετόνης προστίθενται 18,8mg β- nathyl acetate και ο όγκος συμπληρώνεται ως τα 100 ml με d H₂O
 2. **Τελικό διάλυμα:** Σε 8,25 ml Sodium phosphate buffer 50mM (pH 6,5) προστίθενται 33 ml d H₂O και 5,5 ml από το διάλυμα W
- **Διάλυμα χρωματισμού:** Σε 10ml απεσταγμένου νερού προστίθενται 30mg Fast garden και 0,35gr SDS.

3. Προετοιμασία

Η πρότυπη καμπύλη υπολογίζεται από τη σχέση που εκφράζει το λογάριθμο των συγκεντρώσεων του β-nathol σε ng, ως συνάρτηση των τιμών του OD που προκύπτουν από το φθορισμόμετρο. Η δημιουργία της πρότυπης καμπύλης βασίζεται στον Πίνακα 2.

Σε κάθε βοθρίο της πλάκας (96 wells) προστίθεται η αντίστοιχη ποσότητα του υποστρώματος και στη συνέχεια η αντίστοιχη ποσότητα από τα διάφορα διαλύματα του β-nathol, όπως αναγράφεται στον Πίνακα 2.

1. Ακολουθεί επώαση για 15 min στους 30°C.
2. Στη συνέχεια προστίθενται 20μl από το «διάλυμα χρωματισμού».
3. Ακολουθεί επώαση για 15 min, σε θερμοκρασία δωματίου και η απορρόφηση μετρείται στα 492 nm

Από την πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης προκύπτει γραμμική εξίσωση της μορφής $y=ax+b$ η οποία χρησιμοποιείται στη συνέχεια για την μετατροπή των τιμών του φθορισμόμετρου, των διαφορετικών δειγμάτων, σε nmole/mg/min b naphthol.

Πίνακας 2. Δημιουργία πρότυπης καμπύλης

A/A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Z	0	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1020	2040	4090	8190
Q	180	179	178	176	172	164	148	116	167.2	154.4	128.2	169.8	159.6	139.1	98.1
R	0	1	2	4	8	16	32	64	12.8	25.6	51.2	10.2	20.4	40.9	81.9
T	Διάλυμα C						Διάλυμα D				Διάλυμα E				
U	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

1. A/A = Ο αριθμός των κελιών της μικροπλάκας
2. Z = Τα ng του B naphthol
3. Q = Η ποσότητα του υποστρώματος σε μl
4. R = Η ποσότητα από τα διάφορα διαλύματα του β-nathol σε μl
5. T = Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται σε κάθε περίπτωση.
6. U = Η ποσότητα του διαλύματος χρωματισμού

Μετατροπή OD σε nmole / mg πρωτεΐνης / min b naphthol

Για να μετατραπούν οι τιμές (OD) σε nmole/mg/min b naphthol χρησιμοποιείται ο τύπος $\frac{(((T3)/0,000332)/(R3*0,0005))/144,179)/15}$

- **T3** = Η ένδειξη από το φασματοφωτόμετρο για τη δραστικότητα των εστερασών του δείγματος T3 μείον την ένδειξη του μαρτύρα σε (OD).
- **0,000332** = Ο συντελεστής b από τη γραμμική εξίσωση $y=bx+a$ που προκύπτει από την πρότυπη καμπύλη.
- **R3** = Η τιμή σε mg/ml της ολικής πρωτεΐνης για το δείγμα που βρίσκεται στο κελί T3
- **0,0005** = Η ποσότητα του ομογενοποιημένου δηλ. 0,5ml
- **144,179** = Το M.B. του b παρθηθολ
- **15** = Ο χρόνος επώασης

Πρωτόκολλο απομόνωσης DNA με 5% Chelex 100 (Bio-Rad)

1. Υλικά

- Chelex 100 (Bio-Rad)
- Απεσταγμένο νερό

2. Εκτέλεση

1. Σε tube με 40μl 5% Chelex 100 (Bio-Rad) ομογενοποιείται ένα πόδι από ένα ενήλικο άτομο *Cydia pomonella*
2. Πραγματοποιείται vortex για 5-10 sec
3. Ακολουθεί επώαση στους 56°C για 35 min
4. Ακολούθως επώαση στους 95°C για 15 min
5. Πραγματοποιείται vortex για 5-10 sec
6. Φυγοκέντρηση στις 1200rpm για 2 min
7. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο tube
8. Αποθήκευση στους -20°C

PCR-RFLP για ταυτοποίηση της τροποποιημένης AChE

1. Υλικά

- Για την PCR χρησιμοποιούνται οι εξής εκκινητές:
ACE1-CP-F2 CGC TCG GTT TCC TTT TCT TTG ACA
ACE1-CP-R8 GTA AAA TGG TAG TCA CCC ACC AT
- Για την πέψη χρησιμοποιείται το ένζυμο *Apo I*

2. Εκτέλεση

Η PCR περιλαμβάνει: 20 ng DNA, 15 pmol ACE1-CP-F2, 15 pmol ACE1-CP-R8, 200μM dNTPs, 2.5 U Taq Polymerase (1U), 1x buffer, 1.5mM MgCl₂, και dH₂O μέχρι τελικό όγκο 25 μl

Οι συνθήκες πολλαπλασιασμού του DNA στόχου είναι 4 min στους 95°C, 35 κύκλοι με 40 sec στους 95°C, 40 sec στους 53°C, 1 min στους 72°C, και 10 min στους 72°C.

Στη συνέχεια λαμβάνονται 5 μl από το προϊόν της PCR και προσθίθονται 1U από το ένζυμο *Aro I* μαζί με buffer 1x. Η αντίδραση επωάζεται στους 50°C για 1 h. Το προϊόν της πέψης ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα ακρυλαμίδης στο οποίο πραγματοποιείται χρώση νιτρικού αργύρου. Αν υπάρχει η μετάλλαξη (GTT) σε ομοζυγωτία, το άτομο είναι ανθεκτικό και δεν υπάρχει η θέση αναγνώρισης της *Aro I*, οπότε προκύπτει μία ζώνη στις 745 bp. Αν δεν υπάρχει η μετάλλαξη (TTT), το άτομο είναι ευαίσθητο και προκύπτουν δυο ζώνες, 405 bp και 340 bp αντίστοιχα.

PCR-RFLP για ταυτοποίηση της μεταλλαγής *kdr*

1. Υλικά

- Για την PCR χρησιμοποιούνται οι εξής εκκινητές:
CpNaF TAG AGA GCA TGT GGG ATT GC
CpNaR AAT TTC GTA GCC CTT GAT CG
- Για την πέψη χρησιμοποιείται το ένζυμο *Tsp509I*

2. Εκτέλεση

Η PCR περιλαμβάνει: 20 ng DNA, 50 ng DNA στόχου, 1 μονάδα Taq Πολυμεράσης, 2,5 mM dNTPs, 50 mM από τον κάθε primer, 25 mM MgCl₂, 1X reaction buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris pH 9,0) και αποστειρωμένου νερού μέχρι τελικό όγκο 25 μl.

Οι συνθήκες πολλαπλασιασμού του DNA στόχου για την *kdr*, είναι 3 min στους 94°C, 35 κύκλοι με 30 sec στους 94°C, 1 min στους 55°C και 45 sec στους 72°C, Στη συνέχεια λαμβάνονται 5 μl από το προϊόν της PCR και προσθίθονται 2U από το ένζυμο *Tsp509I* μαζί με buffer 1x, σε τελικό όγκο αντίδρασης 20μl. Η αντίδραση επωάζεται στους 65°C ολονύκτια. Το προϊόν της πέψης ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα ακρυλαμίδης στο οποίο πραγματοποιείται χρώση νιτρικού αργύρου. Αν υπάρχει η μετάλλαξη (AATT) σε ομοζυγωτία, το άτομο είναι ανθεκτικό και θα υπάρχει η θέση αναγνώρισης του *Tsp509I*, οπότε προκύπτει μία ζώνη στις 80bp και μία στις 32bp. Αν δεν υπάρχει η μετάλλαξη (TTT), το άτομο είναι ευαίσθητο και προκύπτει μία ζώνη στις 112bp. Στην περίπτωση που το άτομο είναι ετερόζυγο, προκύπτουν ζώνες 112bp, 80bp και 32bp.

