

ΕΙΔΙΚΑ ΘΕΜΑΤΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

Πρωτόκολλο εργαστηριακής βιοδοκιμής για το λεπιδόπτερο
Tuta absoluta

16/03/2023

Τμήματα Α1/Β1

Άρης Ηλίας

Κατερίνα Κρέμη

Απαραίτητα υλικά

- Φυτά τομάτας
- Κωνικές φιάλες
- Πιπέτες
- Τρυβλία
- Δίσκοι
- Vials
- Parafilm
- Απορροφητικό χαρτί
- Lightbox (φωτεινή πηγή)
- Πινέλα
- Βελόνες
- Ψαλίδι
- Κουτιά βιοδοκιμής
- Γάντια
- Εργαστηριακή ποδιά
- H₂O
- Triton x
- Σκεύασμα
- Ζυγός

Πειραματική διαδικασία

Ωοθεσία



Tuta absoluta

Έκθεση προνυμφών
σταδίου L2-L3

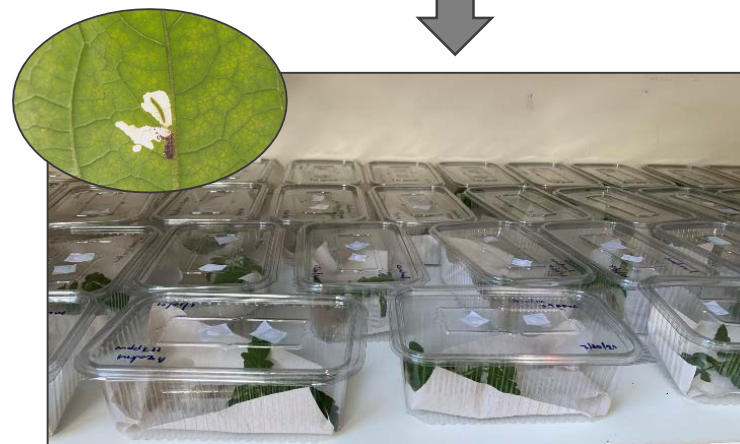


Εμβάπτιση σε διαλύματα
σκευάσματος



Καταμέτρηση
θνησιμότητας και
ανάλυση probit

Προσθήκη νερού στα
vials κάθε 2 ημέρες



Εικόνα 2: Έκθεση προνυμφών L2/L3 στο εντομοκτόνο Emamectin benzoate με το τροποποιημένο πρωτόκολλο της μεθόδου IRAC 022. Η % θνησιμότητα προσδιορίζεται 1 εβδομάδα μετά την έκθεση στο σκεύασμα (τελευταίο προνυμφικό στάδιο ή νυμφη).

Προετοιμασία πληθυσμού για τοξικολογική βιοδοκιμή

Ωοθεσία



Πληθυσμός ΤΥΜΠ21_4

- Φύτευση και ανάπτυξη φυτών για ανάγκες πειράματος.
- Συλλογή ενηλίκων από την εκτροφή και μεταφορά σε κλωβό για ωοθεσία.
- Αφαίρεση ενηλίκων μετά από 2 μέρες (συγχρονισμός ωοθεσίας)
- Παρακολούθηση εξέλιξης προνυμφικής ανάπτυξης και προγραμματισμός βιοδοκιμής.
- Τα προσβεβλημένα φυτά διατηρούνται χωριστά έως ότου οι προνύμφες φτάσουν στο κατάλληλο στάδιο για την βιοδοκιμή.

Έκθεση προνυμφών σταδίου L2-L3



Προετοιμασία διαλυμάτων και συγκεντρώσεων

Σκεύασμα AFFIRM 095SC δ.ο. Emamectin benzoate 0,95%

Συγκεντρώσεις βιοδοκιμής (ppm): 100-30-10-3

Υπολογισμός πρώτης δόσης 100ppm όγκου 100ml

(Πόσα mg x 0,95/100)/0,1L=100 ppm (mg/L)

(Πόσα mg x 0,0095)/0,1L=100 ppm (mg/L)

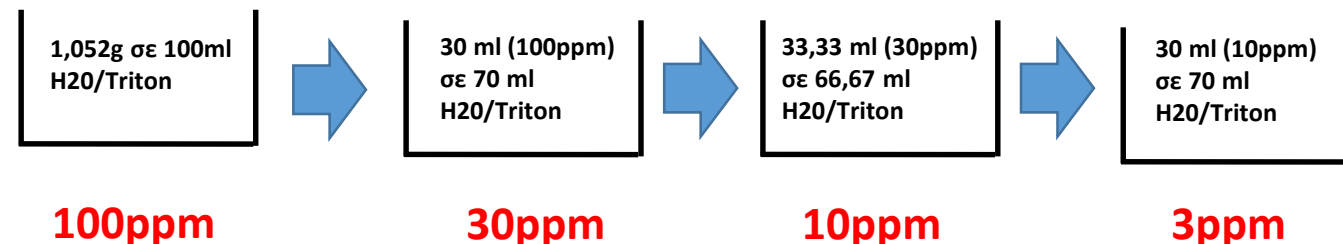
Πόσα mg =(100 mg/L x 0,1L)/0,0095

1052 mg ή 1,052 g σκευάσματος σε 100ml H₂O/Triton x 0,1%

Παρασκευή υπόλοιπων αραιώσεων διαδοχικών αραιώσεων βάσει του τύπου $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ (τελικός όγκος διαλυμάτων 100ml).

$100\text{ppm} \times V_1\text{ml} = 30\text{ppm} \times 100\text{ml}$ → $V_1 = 30\text{ml}$ (100ppm) + 70ml H₂O

Για τις συγκεντρώσεις και το μάρτυρα χρησιμοποιούμε διάλυμα H₂O + Triton 0,1%



Προετοιμασία φύλλων/δίσκων/κουτιών βιοδοκιμών



- Κοπή κλάδων από καθαρά φυτά τομάτας
- Τοποθέτηση τμήματος χαρτιού στο κατώτερο μέρος του στελέχους
- Τοποθέτηση νερού στα μπουκάλια (vials) που θα εισαχθούν τα φυτά
- Σφράγισμα των vials με parafilm και έλεγχος στεγανότητας
- Τοποθέτηση απορροφητικού χαρτιού στους δίσκους
- Τοποθέτηση τμήματος χαρτιού στο κάτω μέρος των κουτιών των βιοδοκιμών



Εμβάπτιση φύλλων στα διαλύματα του σκευάσματος



- Ανάδευση διαλυμάτων στις κωνικές φιάλες και μεταφοράς του σε τρυβλία petri
- Εμβάπτιση φύλλων στα διαλύματα (πρώτα το control και μετά τις δόσεις από την χαμηλότερη στην υψηλότερη)
- Εμβάπτιση φύλλων στο σκεύασμα για σωστή και πλήρη διαβροχή τους
- Μεταφορά φύλλων σε δίσκους προκειμένου να στεγνώσουν (20-30 λεπτά).
- Τοποθέτηση φύλλων σε κουτιά βιοδοκιμών.



Εμβάπτιση με την παρακάτω σειρά

Μάρτυρας – 3 ppm – 10ppm – 30ppm – 100 ppm

Μεταφορά προνυμφών στα φυτά των βιοδοκιμών



- Κάθε ομάδα θα ετοιμάσει 1 συγκέντρωση και μάρτυρα (2 επαναλήψεις/επέμβαση)
 - Σε κάθε κουτί συλλέγονται 5 προνύμφες L2/L3 σταδίου.
 - 1 κουτί / φοιτητής (label)
 - Συλλογή προνυμφών από προσβεβλημένα φυτά τομάτας στο lightbox με λαβίδα και πινέλο και μεταφορά τους στα κουτιά των βιοδοκιμών.
 - **Προσοχή να μην θανατώνονται οι προνύμφες λόγω χειρισμού**
 - Μεταφορά φύλλων σε δίσκους προκειμένου να στεγνώσουν (20-30 λεπτά).
 - Τοποθέτηση φύλλων σε κουτιά βιοδοκιμών.
 - Απόρριψη διαλυμάτων σε δοχεία συλλογής αποβλήτων
 - Πλύσιμο κωνικών φιαλών, τρυβλίων κλπ
-
- Προσθήκη νερού στα vials των βιοδοκιμών (κάθε 2 ημέρες)
 - Καταμέτρηση θνησιμότητας στις 23/3 (η κάθε ομάδα τα κουτιά της)