

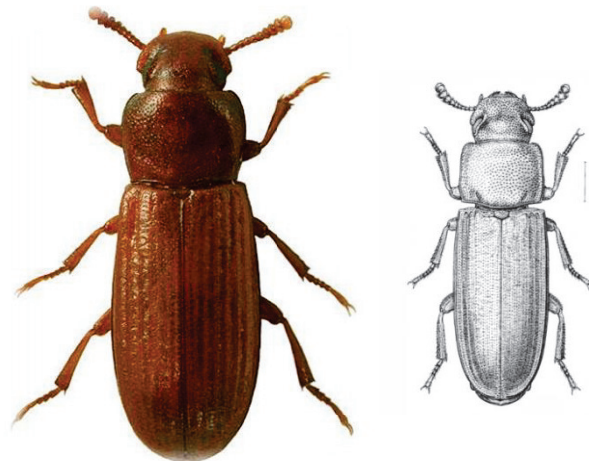


ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ

Πτυχιακή διατριβή

της Γαζέπη Μαρίας Α.Μ. 11587

«Εργαστηριακή μελέτη της εντομοπαθογόνου δράσης μυκήτων της τάξης Hypocreales για την αντιμετώπιση του κολεοπτέρου *Tribolium confusum* (Coleoptera:Tenebrionidae) σε τέσσερις διαφορετικούς ξενιστές»



Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Δρ. Καραναστάση Ειρήνη

ΑΜΑΛΙΑΔΑ 2018

«Εργαστηριακή μελέτη της εντομοπαθογόνου δράσης μυκήτων της τάξης Hyrocerales για την αντιμετώπιση του κολεοπτέρου *Tribolium confusum* (Coleoptera:Tenebrionidae) σε τέσσερις διαφορετικούς ξενιστές»

...στην φοιτητική μου οικογένεια «Κ11»

Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	6
Περίληψη.....	7
1. Εισαγωγή.....	8
1.1 Γενικά	8
1.1.1 Έντομα αποθηκών	10
1.2 Το έντομο <i>Tribolium confusum</i>	11
1.2.1 Ταξινόμηση εντόμου	11
1.2.2 Γεωγραφική κατανομή του <i>Tribolium confusum</i>	12
1.2.3 Μορφολογία εντόμου	13
1.2.5 Βιολογικός κύκλος <i>Tribolium confusum</i>	16
1.2.6 Προσβολές και ζημιά του <i>Tribolium confusum</i>	18
1.2.7 Αντιμετώπιση	19
1.3 Εντομοπαθογόνοι μύκητες	25
1.3.1 Μύκητες του γένους <i>Beauveria</i>	28
1.3.2 Μύκητες του γένους <i>Metarhizium</i>	30
1.3.3 Μύκητες του γένους <i>Isaria</i>	32
2. Σκοπός της εργασίας	33
3. Μέθοδοι και υλικά	34
3.1 Οργανισμοί.....	34
3.1.1 Έντομο του πειράματος.....	34
3.1.2 Εντομοπαθογόνοι μικροοργανισμοί.....	35
3.2 Παρασκευή Ελαιωρημάτων Εντομοπαθογόνων Μυκήτων.....	36
3.3 Μελέτη της επίδρασης των εντομοπαθογόνων μυκήτων απομονώσεων <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> και <i>Isaria fumosorosea</i> επί νεαρών ακμαίων του εντόμου.	38

3.4 Στατιστική επεξεργασία	42
4. Αποτελέσματα	43
5. Συζήτηση.....	48
6. Βιβλιογραφία.....	50

Πρόλογος

Η εν λόγω πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε κατά κύριο λόγο στο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Δυτικής Ελλάδος στην Αμαλιάδα, επίσης μέρος κάποιων δραστηριοτήτων έγιναν στο Ινστιτούτο Προστασίας Φυτών στην Πάτρα. Με την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής δεν θα μπορούσα να παραλείψω, να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους εκείνους που με βοήθησαν να διεκπεραιώσω το έργο μου.

Οφείλω να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα μου Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ειρήνη Καραναστάση που βοήθησε στην πραγματοποίηση του πειραματικού σταδίου καθώς και στην ψυχολογική υποστήριξη. Σημαντική ήταν η συνεισφορά του Δρ. Σπυρίδων Μαντζούκα που υπήρξε αρωγός στην προσπάθεια αυτή.

Τέλος ένα τεράστιο ευχαριστώ στην ενεργή και δυνατή ομάδα του εργαστηρίου μας, που απαρτίζεται από τις φίλες και συμφοιτήτριες μου Ζήκου Αθανασία, Ρόδη Αναστασία και Βάσω Τριανταφύλλου. Η βοήθεια τους ήταν πολύτιμη σε όλα τα στάδια της πτυχιακής διατριβής καθώς και σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη

Στην παρούσα πειραματική πτυχιακή εργασία, σκοπός ήταν να μελετηθεί η επίδραση των εντομοπαθογόνων μυκήτων *Beauveria bassiana* Balsamo (Vuillemin) (Hypocreales: Cordycipitaceae), *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) και *Isaria fumosorosea* (Wize) Brown&Smith (Hypocreales: Clavicipitaceae) από την συλλογή του Δρα. Μαντζούκα, οι οποίοι έχουν απομονωθεί από ελληνικά εδάφη. Ακμαία του κολεοπτέρου *Tribolium confusum* ψεκάστηκαν με διαλύματα κονιδίων των παραπάνω μυκήτων σε συγκεκριμένες ποσότητες σε τέσσερα διαφορετικά προϊόντα ρύζι, σιτάρι, καρύδι και αραχίδα. Τα αποτελέσματα αυτής της διατριβής προσφέρουν ισχυρές ενδείξεις, αφού με επιτυχία λειτούργησε η χρησιμοποίηση ορισμένων στελεχών των εντομοπαθογόνων μυκήτων στον έλεγχο των νεαρών ακμαίων του *T. confusum*.

1. Εισαγωγή

1.1 Γενικά

Με τον όρο αποθήκευση εννοούμε τους χειρισμούς μετά τη συγκομιδή, κατά την επεξεργασία, τη συσκευασία και μεταφορά των γεωργικών προϊόντων και τροφίμων. Τα αποθηκευμένα προϊόντα υφίστανται προσβολές από μικροοργανισμούς, αρθρόποδα και τρωκτικά είτε συνεργιστικά, είτε μεμονωμένα, με αποτέλεσμα την ποιοτική αλλά και ποσοτική υποβάθμισή τους. Οι σημαντικότερες ζημιές που συναντάμε στα αποθηκευμένα προϊόντα οφείλονται σε διάφορα αρθρόποδα και συγκεκριμένα στις τάξεις εντόμων Κολεόπτερα, Λεπιδόπτερα.

Τα αποθηκευμένα προϊόντα είναι πολύ σημαντικής σημασίας για τον άνθρωπο, καθώς αυτά αποτελούν την κύρια μορφή ενέργειας στη διατροφή του σε καθημερινή βάση. Ο άνθρωπος από την αρχαιότητα ακόμα, αποθήκευε τα τρόφιμά του για να τα καταναλώνει σταδιακά. Σήμερα, η αποθήκευση των γεωργικών προϊόντων από τους παραγωγούς σε όλο τον κόσμο γίνεται κυρίως για την εξασφάλιση καλύτερων τιμών με τη μετέπειτα μεταπώλησή τους. Ακόμη τα αρθρόποδα μπορούν να προσβάλλουν μέσα στα σπίτια τρόφιμα ή ρούχα προκαλούν ζημιές σε μουσειακές συλλογές (βαλσαμωμένα ζώα, εντομολογικές συλλογές, στολές, υφάσματα, ταπετσαρίες κ.λπ.). Επίσης αλλεργικά φαινόμενα μπορούν να εμφανιστούν όταν τα σωματικά τμήματα κάποιων νεκρών εντόμων, που έχουν κονιορτοποιηθεί, εισέλθουν στον οργανισμό μέσω της αναπνευστικής οδού (Σταμόπουλος Δ., 1995). Οπότε είναι σαφές πως η αντιμετώπιση αυτών των εντόμων είναι αναγκαία, διότι πρόκειται για ένα πρόβλημα που μπορεί να επεκταθεί και να φέρει ζημιές απεριόριστες.

Σύμφωνα με υπολογισμούς του F.A.O. (Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών), οι απώλειες σε έτοιμο προϊόν κατά την αποθήκευση ανέρχονται στο 17% περίπου της παγκόσμιας παραγωγής (10% από έντομα και 7% περίπου από ακάρεα, τρωκτικά και ασθένειες)(Γραφ.1), οι δε ποσότητες που αναλίσκονται από έντομα στις αποθήκες και τις καλλιέργειες, μόνο των σιτηρών, θα μπορούσαν να αποτρέψουν τους λιμούς στις υπό υπανάπτυκτες χώρες (Μπουχέλος1996). Ακόμα σύμφωνα με τον F.A.O. , οι απώλειες που έχουν οι λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες σε κάθε είδους εδώδιμους

σπόρους, ανέρχονται σε περίπου 810 εκ. τόνους. Αντιλαμβανόμαστε πως αυτές οι απώλειες θα επηρεάσουν αρνητικά όλους τους τομείς, άρα σχετίζεται άμεσα και με τον οικονομικό τομέα καθώς θα έχουμε μείωση του προϊόντος άρα και μείωση στο κέρδος των πωλήσεων.

Γράφημα 1. Οι απώλειες σε έτοιμο προϊόν κατά την αποθήκευση (Πηγή: F.A.O.)



Η αποθήκευση και η συντήρηση των προϊόντων αυτών (σιτηρών και αλεύρων κυρίως) χρήζει ιδιαίτερης σημασίας εξαιτίας των συχνών προσβολών από έντομα εχθρούς που μειώνουν και υποβαθμίζουν την ποιότητά τους. Ο μόνος τρόπος όμως για να προστατευτεί το αποθηκευμένο προϊόν, είναι με την παρέμβαση του ανθρώπου, που καταφεύγει στη δημιουργία διαφόρων μεθόδων ανίχνευσης και αντιμετώπισης των εχθρών αυτών. Οι μέθοδοι ανίχνευσης, με την πάροδο του χρόνου έχουν εξελιχθεί και παρέχουν όσο το δυνατόν μεγαλύτερη προστασία στο ίδιο το προϊόν, στο χώρο που αποθηκεύεται και στον άνθρωπο που το διαχειρίζεται και το καταναλώνει. Παρόλες τις εξελιγμένες μορφές μεθόδων ανίχνευσης εντόμων εχθρών που ανακαλύπτονται σταδιακά, είναι επίσης σημαντικό να τηρούνται ορισμένες προϋποθέσεις τόσο στην αποθήκευση όσο και στην μετέπειτα επεξεργασία του αποθηκευμένου προϊόντος, έτσι ώστε να περιορίζονται οι απώλειές του από τους εχθρούς αυτούς, προκαλώντας μηδενική οικονομική ζημία στον παραγωγό. Άρα η αντιμετώπιση των εντόμων αυτών είναι ένα σημαντικό κομμάτι που ωφελεί τους παραγωγούς, τους διαχειριστές, τους πωλητές αλλά τον κάθε καταναλωτή.

1.1.1 Έντομα αποθηκών

«Έντομο αποθηκών θεωρείται κάθε είδος εντόμου που προσβάλλει και ζημιώνει άμεσα ένα προϊόν και μπορεί να αναπαραχθεί σε μια αποθήκη ή χώρο που φιλοξενεί για αρκετό χρονικό διάστημα γεωργικά προϊόντα ή τρόφιμα» (Μπουχέλος 1996). Υπάρχουν διάφορες οικογένειες εντόμων με τις πιο γνωστές να ανήκουν στις τάξεις των Κολεόπτερων και των Λεπιδόπτερων. Χαρακτηριστικό των εντόμων αποθηκών είναι η γεωγραφική τους εξάπλωση, επειδή μπορούν να ταξιδεύουν σε όλο τον κόσμο κυρίως με τη βοήθεια του ανθρώπου. Το μέγεθος τους είναι μικρό και χαρακτηρίζονται ως τέλειοι ζωικοί εχθροί γιατί μπορούν να βρουν πολύ εύκολα καταφύγιο σε διάφορους χώρους αποθήκευσης αλλά και να αποφύγουν πανεύκολα τους φυσικούς ζωικούς εχθρούς τους.

Τα έντομα αποθηκών μπορούμε να τα κατατάξουμε με διάφορους τρόπους ανάλογα με τις ιδιαιτερότητες τους τις διατροφικές τους προτιμήσεις, την οικογένεια ή την οικονομική σημασία τους. Ορισμένα έντομα προσβάλλουν αποκλειστικά καρπούς ενός συγκεκριμένου είδους ή οικογένειας (π.χ. τα κολεόπτερα της οικ. Bruchidae μόνο καρπούς ψυχανθών και το *Lasioderma serricorne* μόνο αποθηκευμένο καπνό). Άλλα έντομα προσβάλλουν ένα πλήθος ειδών αποθηκευμένων προϊόντων (π.χ. τα είδη του γένους *Ephestia* προσβάλλουν άλευρα, σπόρους δημητριακών, σύκα, σταφίδες, καπνό, κακάο). Ορισμένα δεν προσβάλλουν ολόκληρους σπόρους αλλά κυρίως σπασμένους ή ήδη προσβεβλημένους (πχ *T. confusum*, *Oryzaephilus surinamensis*). Άλλα πάλι τρέφονται και ολοκληρώνουν τον βιολογικό κύκλο τους μέσα σε ένα μόνο σπόρο (*Sitophilus granarius*). Σχεδόν όλα τα λεπιδόπτερα σχηματίζουν μετάξινες θήκες ή "τροφικά καταφύγια" όπου προσβάλλουν μεγάλο αριθμό σπόρων (*Ephestia kuhniella*, *Pyralis farinalis*, *Corcyca cephalonica* κ.α.).

1.2 Το έντομο *Tribolium confusum*

1.2.1 Ταξινόμηση εντόμου

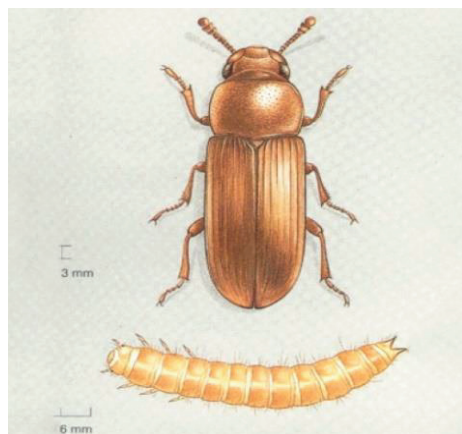
Το κολεόπτερο *T. confusum* είναι ολομετάβολο έντομο, ανήκει στην οικογένεια Tenebrionidae και είναι το δεύτερο κύριο έντομο αποθηκευμένων προϊόντων μετά το *T. castaneum* που προκαλεί μεγάλα οικονομικά προβλήματα στα παραγόμενα είδη. Μπορεί να βρεθεί σε σπόρους δημητριακών, φασόλια, μπαχαρικά, μακαρόνια, άλευρα όλων των ειδών. Η συστηματική ταξινόμηση του γένους *Tribolium* παρουσιάζεται αναλυτικά στον πίνακα 1 που ακολουθεί:

Πίνακας 1. Συστηματική ταξινόμηση του *Tribolium confusum*

ΒΑΣΙΛΕΙΟ	ANIMALIA
ΦΥΛΟ	ΑΡΘΡΟΠΟΔΑ (ARTHROPODA)
ΚΛΑΣΗ	ENTOMA (INSECTA)
ΤΑΞΗ	ΚΟΛΕΟΠΤΕΡΑ (COLEOPTERA)
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	TENEBRIONIDAE
ΓΕΝΟΣ	<i>Tribolium</i>
ΕΙΔΟΣ	<i>T. confusum</i>

Οικογένεια Tenebrionidae

Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει πολυάριθμα είδη εντόμων που ζουν κυρίως στις θερμές χώρες. Τα τέλεια έντομα έχουν μέγεθος μεταβλητό από μικρό μέχρι μεγάλο και ο χρωματισμός τους είναι γενικά μαύρος. Οι μπροστινές ισχιακές κοιλότητες είναι κλειστές πίσω και τα μπροστινά ισχία είναι σφαιροειδή. Οι προνύμφες είναι επιμήκειες και αρκετά σκληρές. Τα μπροστινά τους πόδια είναι δυνατά και φέρνουν ισχυρά αγκάθια. (Εικ.1) Τα πόδια των προνυμφών τους επιτρέπουν να μετακινούνται άνετα μέσα σε οργανικές ουσίες. Τα περισσότερα των Tenebrionidae παραμένουν σε σκοτεινούς τόπους υπόγεια και υπόγειες φωλιές άλλων εντόμων γενικά σε ακαλλιέργητα και χωρίς ήλιο μέρη.



Εικόνα 1. Ακμαίο και προνύμφη του *Tribolium confusum* της οικογένειας Tenebrionidae. (https://www.google.gr/search?biw=1366&bih=662&tbn=isch&sa=1&ei=fCbzWvBCMaQUc2rsqAD&q=tribolium+confusum&oq=TRIBOLIUM+CO&gs_l=img.1.0.0i19k1l3j0i30i19k112.4950.5919.0.8374.3.3.0.0.0.0.258.657.0j1j2.3.0...0...1c.1.64.img..0.3.653...0j0i30k1j0i8i30k1j0i5i30k1.0.GVL7G3E7cHs)

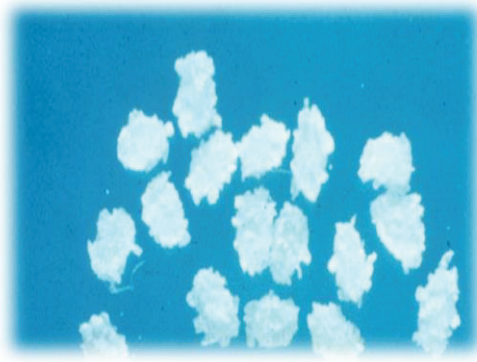
1.2.2 Γεωγραφική κατανομή του *Tribolium confusum*

Είναι διαδεδομένο σε αρκετά μέρη της γης. Έντομο γνωστό από τους αρχαίους χρόνους για τις ζημιές του. Βρέθηκε σε τάφους των Φαραώ στην Αίγυπτο το 2500 π.Χ. και έχει εντοπιστεί και στην Ελλάδα σε αποθηκευμένα σιτηρά και σταφίδα. Η εμφάνισή του οφείλεται σε αναμολύνσεις με τα μέσα μεταφοράς και υλικών συσκευασίας. Το *Tribolium confusum* στην Ελλάδα παρατηρήθηκε το 1978-1980 μαζί με άλλα κολεόπτερα. Σε σχετική έρευνα που πραγματοποιήθηκε προκειμένου να αναγνωριστούν τα είδη των κολεοπτέρων που προσβάλλουν τα αποθηκευμένα δημητριακά και προϊόντα. Ελήφθησαν 4419 δείγματα, από τις περισσότερες περιοχές της ηπειρωτικής Ελλάδας και την Κρήτη. Τα δείγματα ήταν αποθηκευμένο σιτάρι, κριθάρι, αραβόσιτος, άλευρα, πίτυρα και άχυρα. Βρέθηκαν συνολικά 72 είδη κολεοπτέρων, τα 22 από τα οποία αποτελούν νέες καταγραφές για τη χώρα. Τα 25 είδη προσβάλλουν απευθείας τα αποθηκευμένα προϊόντα, ενώ τα υπόλοιπα είναι κυρίως μυκητοφάγα ή αρπακτικά. Επιπλέον, βρέθηκαν είδη κολεοπτέρων που δεν θεωρούνται αποθηκών και είναι κυρίως ξυλοφάγα, σαπροφάγα ή προσβάλλουν το προϊόν μόνο στον αγρό. Κυρίως στα άλευρα και στα πίτυρα ,πολυπληθέστερα είδη είναι τα *C. ferrugineus*, *T. confusum* και *T. castaneum* (Αθανασίου & Μπουχέλος, 2003).

Από όλα τα παραπάνω είδη τα 25, τα οποία θεωρούνται παράσιτα αποκλειστικά αποθηκευμένων προϊόντων, συνθέτουν την εικόνα του πληθυσμού των εντόμων από την άποψη των ενηλίκων κολεοπτέρων στις περιοχές που μελετήθηκαν, ενώ 10 παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά σε περιοχές ελληνικών αποθηκευμένων προϊόντων (*T. confusum*, *Tribolium castaneum*, *Cryptolestes ferrugineus*, *Sitophilus oryzae*, *Sitophilus sgranarius*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Oryzaephilus mercator*, *Palorus subdepressus*, *Rhyssopertha dominica* και *Lasioder maserricorne*).

1.2.3 Μορφολογία εντόμου

Ωό: έχει μικροσκοπικό μέγεθος και το μήκος του είναι 0,6 mm. Έχει υπόλευκο χρώμα και πάνω του έχει ειδικά εξαρτήματα ώστε να μπορεί να προσκολλάται στις διάφορες επιφάνειες (Εικ.2).



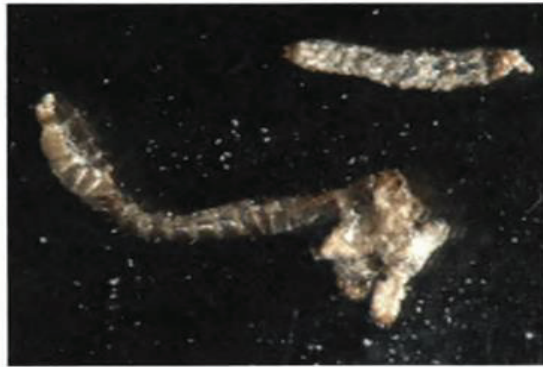
Εικόνα 2. Ωά του *T.confusum*

(<https://www.google.gr/search?q=tribolium+confusum&hl=el&source=lnms&tbm=isch&sa>)

Προνύμφη: έχει μήκος 4-5 mm, είναι ωχροκίτρινη ευκέφαλη με χρώμα καφέ. Το σώμα είναι επίμηκες με νευρώσεις, έχει 3 ζευγάρια πόδια και τρίχες στα πλάγια του σώματος, ενώ το τελευταίο κοιλιακό τμήμα είναι χιτινισμένο και φέρει μία δικρανοειδή απόφυση. Στα τελευταία προνυμφικά στάδια η προνύμφη παίρνει χρώμα κιτρινοκαστανό, ενώ το χιτινισμένο δερμάτιο της γίνεται σκληρότερο (Εικ. 3). Για να πάει στο επόμενο στάδιο η προνύμφη εκδύεται και γίνεται νύμφη, αφήνοντας ενδύματα (Εικ.4).

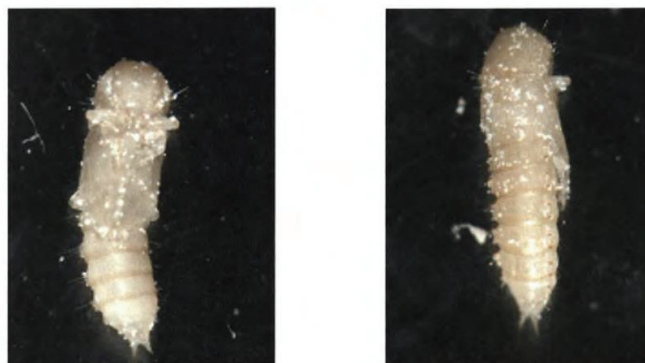


Εικόνα 3. Προνύμφες του είδους *Tribolium confusum*.
(<https://www.google.gr/search?q=tribolium+confusum>)



Εικόνα 4. Εκδύματα προνύμφης του είδους *Tribolium confusum*.
(<https://www.google.gr/search?q=tribolium+confusum>)

Νύμφη (πούπα): Έχει μήκος σώματος 3-4 mm και έχει χρώμα άσπρο προς το ελαφρύ καφέ (Εικ. 5).

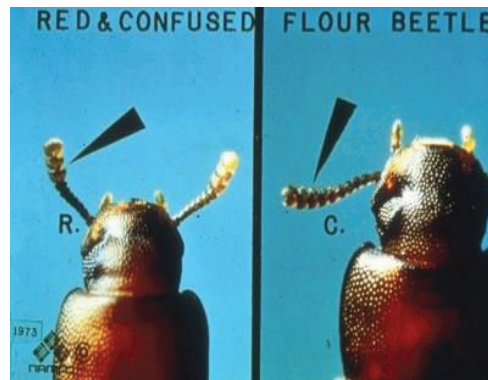


Εικόνα 5. Νύμφες του είδους *Tribolium confusum* (<https://www.google.gr/search?q=tribolium+confusum>)

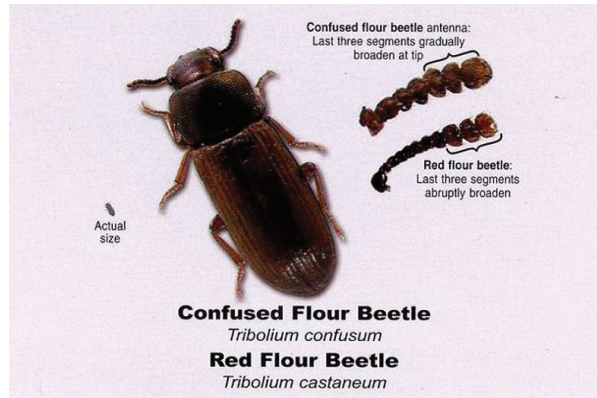
Ενήλικο (ακμαίο): έχει σώμα επίμηκες, πιεσμένο, λείο χωρίς τρίχες με μήκος 3-4 mm και χρώμα ερυθροκαστανό, η κεφαλή και το επιθωράκιο έχουν πολλά μικρά στίγματα (αδένες) τα οποία εκκρίνουν ουσίες οι οποίες προσδίδουν μια δυσάρεστη οσμή στα προϊόντα τα οποία προσβάλλουν (Εικ. 6). Ακόμη τα άρθρα των κεραιών του μεγαλώνουν βαθμιαία και το πιλίδιο υπερβαίνει πλευρικά το χείλος του οφθαλμού, από αυτά το ξεχωρίζουμε από το *T. castaneum* (Εικ.7,8). Επίσης τα ενήλικα δεν έχουν τη δυνατότητα να πετούν.



Εικόνα 6. Ακμαίο άτομο *Tribolium confusum*.(<https://www.google.gr/search?q=tribolium+confusum>)



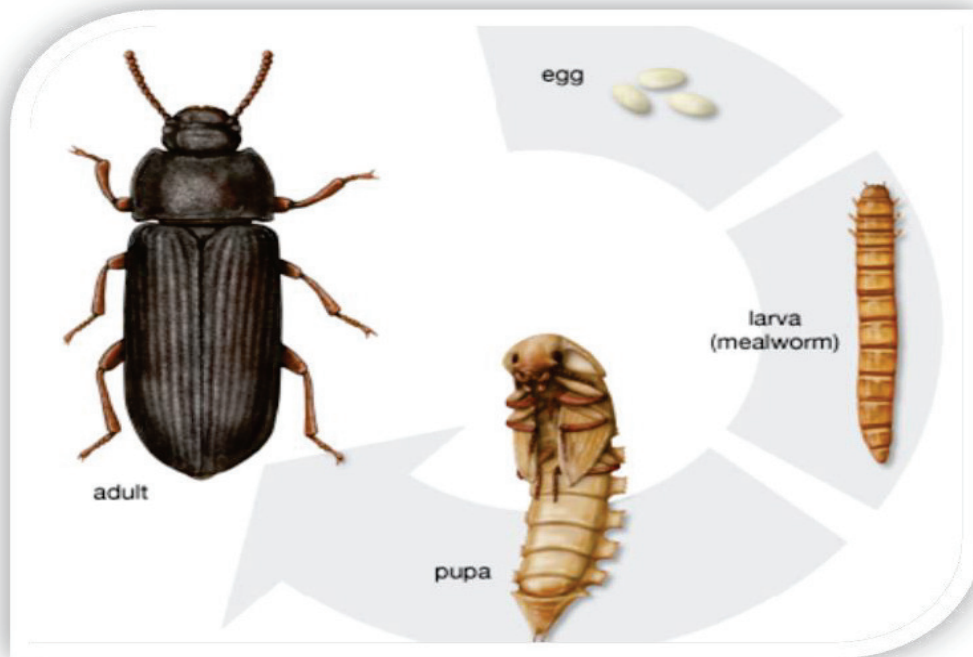
Εικόνα 7. Ακμαία άτομα *Tribolium confusum* (δεξιά) και *Tribolium castaneum* (αριστερά)
(<https://www.google.gr/search?q=tribolium+confusum>)



Εικόνα 8. Διαφορές των πλιδίων των κεραιών των *Tribolium castaneum*, *Tribolium confusum* (<https://www.google.gr/search?q=tribolium+confusum>)

1.2.5 Βιολογικός κύκλος *Tribolium confusum*

Ο βιολογικός κύκλος του εντόμου διαρκεί 7-12 εβδομάδες και υπάρχουν 3-5 γενεές σε ένα έτος στους μη θερμαινόμενους χώρους (Εικ.9). Γενικά, ο βιολογικός κύκλος του εντόμου επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, την υγρασία αλλά και την καταλληλότητα της τροφής. Τα ενήλικα μπορούν να ζήσουν για περισσότερα από τρία χρόνια ανάλογα βέβαια με τις περιβαλλοντικές συνθήκες και την επάρκεια της τροφής. Τα θηλυκά μπορούν να ζουν περίπου δύο χρόνια και γεννούν 300-400 ωά σε πέντε έως οχτώ μήνες (2 έως 5 ώα την ημέρα). Τα ωά εκκολάπτονται μεταξύ 15°C και 40°C, σε αυτό το στάδιο δεν φαίνεται να παίζει ρόλο το ποσοστό της υγρασίας. Η προνυμφική ανάπτυξη διαρκεί περίπου 22 έως 100 ημέρες, ανάλογα βέβαια με την καταλληλότητα της τροφής τη θερμοκρασία και το ποσοστό της υγρασίας. Το στάδιο της νύμφης διαρκεί 7-8 ημέρες όπου έχουμε μεταμόρφωση της νύμφης σε ενήλικο έντομο. Τα έντομο μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασία 28-30°C και υγρασία 70-90%, ενώ σε θερμοκρασίες κάτω των 20°C παύει να αναπτύσσεται και να τρέφεται (Howe, 1960). Έχει παρατηρηθεί ότι αναπτύσσεται ταχύτερα σε σπασμένους σπόρους παρά σε ολόκληρους, διότι το περισπέρμιο του ολόκληρου σπόρου το εμποδίζει να εισχωρήσει στο εσωτερικό του (Ford, 1937).



Εικόνα 9. Βιολογικός κύκλος του *Tribolium confusum*
(<https://www.google.gr/search?q=tribolium+confusum>)

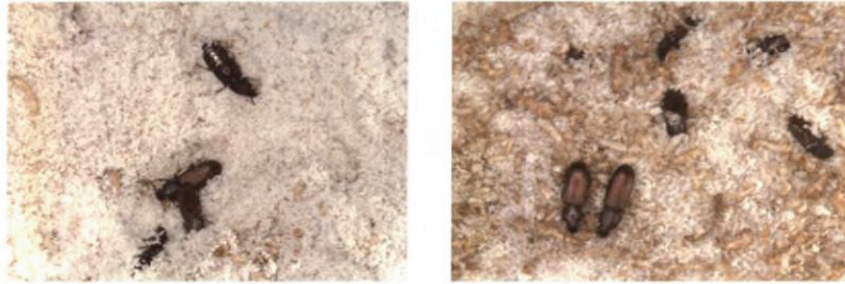
Ακόμη όταν η τροφή δεν είναι κατάλληλη, επιμηκύνεται ο βιολογικός του κύκλος σε 60-140 ημέρες, ενώ στο προνυμφικό στάδιο υπάρχει αύξηση των εκδύσεων από 6-7 που είναι το σύνηθες σε 12-13. Επίσης, τα ενήλικα εκδηλώνουν κανιβαλισμό και όταν υπάρχει έλλειψη τροφής τρώνε τις προνύμφες και τα ωά τους καθώς και τα νεκρά έντομα (Σταμόπουλος, 2008).

1.2.6 Προσβολές και ζημιά του *Tribolium confusum*



Εικόνα 10. Προσβολή σίτου από *Tribolium confusum*
(<https://www.google.gr/search?q=tribolium+confusum>)

Το έντομο *T. confusum* το βρίσκουμε συνήθως σε αποθήκες που υπάρχουν ενστικισμένοι ή σε σωρούς, σπόροι και άλευρα (Εικ.10), σε αλευρόμυλους και γενικά σε μέρη όπου γίνεται επεξεργασία αμυλούχων προϊόντων (Day, 1996), ενώ υπάρχει πιθανότητα να τα βρούμε ακόμη και σε κατοικίες. Δεν προσβάλλουν τον άνθρωπο και τα ζώα αλλά έχει βρεθεί ότι τα προσβεβλημένα προϊόντα περιέχουν κινόνες που παράγονται από τα έντομα. Οι κινόνες μπορεί να προκαλέσουν δερματίτιδες, ερυθήματα, φλύκταινες, ερεθισμούς στα μάτια ακόμη και καρκινογενέσεις (Σταμόπουλος, 1999). Οι προνύμφες και τα ενήλικα τρέφονται ακόμη με σπόρους κεχριού, σόργου και αραχίδας. Επίσης προσβάλλει αλεύρι σιταριού, σόγιας και καλαμποκιού, τα οποία είναι κύρια συστατικά των ιχθυοτροφών, όπως και πίτουρα, βρώμη, ρύζι, βρίζα, κριθάρι, ξηρούς καρπούς, σπόρους δημητριακών, αποξηραμένα φρούτα, όσπρια (φασόλια και μπιζέλια), βαμβακόσπορο, σοκολάτα (γάλακτος), γάλα σε σκόνη, ηλιόσπορους, σπόρους βίκου, καπνό, μουσειακές συλλογές (Bennett, 2003). Οι προνύμφες που τρέφονται με τα διάφορα άλευρα αφήνουν εκδύματα και αποχωρήματα, τα οποία δίνουν γκρι προς το καφέ χρωματισμό στα διάφορα άλευρα, ενώ τα ενήλικα έντομα με τα στίγματα (αδένες) που έχουν στο θώρακά τους εκκρίνουν ουσίες οι οποίες δίνουν άσχημη οσμή στα προϊόντα που προσβάλλουν (Εικ.11). Στις δύο αυτές περιπτώσεις, τόσο οι προνύμφες όσο και τα ενήλικα, υποβαθμίζουν την εικόνα και την ποιότητα των προϊόντων που προσβάλλουν (Baldwin & Fasoulo, 2003).



Εικόνα 11. Προσβολή του *Tribolium confusum* σε αλεύρι. Διακρίνονται προνύμφες, ενήλικα και εκδύματα (<https://www.google.gr/search?q=tribolium+confusum>)

Οι ζημιές που προκαλούνται στα αποθηκευμένα προϊόντα μπορούν να επεκταθούν σε απεριόριστου μεγέθους καταστροφές, είτε σε οικονομικό επίπεδο, είτε σε ποσοτικό και ποιοτικό αλλά και σε προβλήματα σχετιζόμενα με την υγεία του ανθρώπου. Καταλαβαίνουμε την σημαντικότητα για την επίλυση αυτού του θέματος που αφορά όχι μόνο τους παραγωγούς και τους προμηθευτές αλλά και όλους εμάς τους καταναλωτές.

1.2.7 Αντιμετώπιση

Πριν προβούμε στην αντιμετώπιση του εντόμου, καλό είναι να εφαρμόσουμε προληπτικά μέτρα προστασίας όπως :

1. Σχολαστική και μεθοδική καθαριότητα.
2. Απομάκρυνση άχρηστων και πρωτογενών εστιών μόλυνσης.
3. Σκούπισμα οροφής, τοίχων, δαπέδων κ.τ.λ από υπολείμματα που είχαν αποθηκευτεί νωρίτερα.
4. Απεντόμωση και γενικότερα σωστούς χειρισμούς υγιεινής, καθαριότητας, αποστειρώσεις κ.τ.λ.

Επιπλέον, το ποσοστό υγρασίας του αποθηκευμένου προϊόντος (σπόρου) δεν πρέπει να ξεπερνάει το 14%, αφού όσο αυξάνεται η υγρασία τόσο πιο εύκολη είναι η προσβολή. Μπορούμε να κάνουμε αποξήρανσή του το προϊόν για περισσότερη προστασία προσέχοντας όμως γιατί αν η θερμοκρασία αυξηθεί υπερβολικά, υποβαθμίζεται η ποιότητα του σπόρου. Η διάρκεια και ο τρόπος αποξήρανσης είναι συγκεκριμένα για κάθε προϊόν

που προορίζεται για αποθήκευση. Επιπλέον, οι συνθήκες περιβάλλοντος μέσα στον αποθηκευτικό χώρο παίζουν σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και την εξάπλωση των εντόμων εχθρών αλλά και διαφόρων ειδών μυκήτων. Τα επίπεδα υγρασίας και θερμοκρασίας πρέπει να είναι ελεγχόμενα και να ρυθμίζονται έτσι ώστε να μην δημιουργούνται ευνοϊκές συνθήκες για οποιαδήποτε προσβολή. Η καταλληλότητα του χώρου αποθήκευσης, όπως η στεγανότητα, και τα κατάλληλα μονωτικά υλικά επιδρούν θετικά στις προσβολές. Όμως εφόσον παρατηρήσουμε επιμόλυνση των αποθηκευμένων προϊόντων και έχουμε κάνει σωστή διάγνωση θα πρέπει να προβούμε στα κατάλληλα μέτρα αντιμετώπισης.

Η **αντιμετώπιση** των εντόμων αποθηκών, και συγκεκριμένα του *T.confusum*, γίνεται με τις παρακάτω μεθόδους που μπορούν να εφαρμοστούν μεμονωμένα ή σε συνδυασμό.

- **Χημικές μέθοδοι**
- **Βιοτεχνικές και βιοτεχνολογικές μέθοδοι**
- **Φυσικές μέθοδοι**
- **Βιολογικές μέθοδοι**

ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ: Η χημική καταπολέμηση είναι η πιο γρήγορη, η πιο οικονομική και κάποιες φορές η πιο αποτελεσματική μέθοδος που μπορεί να εφαρμοστεί για την αντιμετώπιση των εντόμων αποθηκών. Τα σκευάσματα που χρησιμοποιούνται είναι κυρίως οργανοφωσφορικά, πυρεθρινοειδή και καρβαμιδικά και κάποια άλλα υπό μορφή καπνογόνων. Πρέπει να είναι αποτελεσματικά και να θανατώνουν αμέσως τον οργανισμό στόχο χωρίς να επηρεάζουν τον υπόλοιπο χώρο και τον ανθρώπινο οργανισμό, αλλά να μην διαθέτουν και μεγάλη υπολειμματική διάρκεια με μη αποδεκτά υπολείμματα στα προϊόντα. Υπάρχουν οργανοφωσφορικά σκευάσματα όπως το pyrimiphos-methyl και το chlorpyrifos-methyl που μπορούν να δώσουν ικανοποιητικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση του *Tribolium confusum*. Το είδος αυτό έχει αναπτύξει ανθεκτικότητα στα σκευάσματα malathion και lindane. Τα κοινά εντομοκτόνα εφαρμόζονται πριν ή κατά την εισαγωγή των προϊόντων στην αποθήκη. Ακόμα χρησιμοποιούμε και καπνογόνα που

δρουν μέσω των ατμών και μπορεί να είναι ουσίες όπως φωσφίνη ,η εφαρμογή τους μπορεί να γίνει είτε σε άδειες αποθήκες είτε σε γεμάτες.

ΒΙΟΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ: Οι βιοτεχνικές μέθοδοι αφορούν τη χρήση παγίδων και φερομόνων, ή τη χρήση ρυθμιστών ανάπτυξης εντόμων. Οι παγίδες και οι φερομόνες έχουν σκοπό να γνωστοποιήσουν και να ανιχνεύσουν την παρουσία διαφόρων εντόμων εχθρών, καθώς και τη διακύμανση του πληθυσμού τους. Γνωρίζοντας το είδος και τον πληθυσμό του εντόμου επιλέγεται έγκαιρα η μέθοδος και ο χρόνος αντιμετώπισης των εντομολογικών προσβολών. Υπάρχουν διάφορων ειδών παγίδες ,επιφανειακές, εναέριες, τύπου σόντας, φωτεινές ή ηλεκτρικές. Από αυτές, το τελευταίο είδους εκμεταλλεύεται το φαινόμενο του φωτοτροπισμού. Προσελκύουν και θανατώνουν τα έντομα με χρήση ηλεκτρικού ρεύματος, μόνο όμως όσα εμφανίζουν θετικό φωτοτροπισμό. Σε έντομα που εμφανίζουν αρνητικό φωτοτροπισμό τέτοιου είδους παγίδες δεν είναι αποτελεσματικές όπως συμβαίνει στην περίπτωση του *Tribolium confusum*. Στη χρήση ρυθμιστών ανάπτυξης ανήκουν οι μιμητές ορμόνης νεότητας, οι ανταγωνιστές εκδυστεροειδών και οι παρεμποδιστές σύνθεσης χιτίνης. Οι ουσίες αυτές εμποδίζουν την μεταμόρφωση των ατελών σταδίων των εντόμων ή πολλές φορές και την εκκολαψιμότητα των ωών.

ΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ: Σε αυτού του είδους την καταπολέμηση, ανήκουν οι τεχνητές τροποποιήσεις που μπορούν να προκληθούν στον περιβάλλοντα χώρο της αποθήκης, με μεταβολές στην υγρασία και θερμοκρασία τόσο του περιβάλλοντος όσο και του ίδιου του αποθηκευμένου προϊόντος, με τη χρήση ακτινοβολιών, με χρήση ελεγχόμενων ατμοσφαιρών κ.ά. Η υγρασία αποτελεί έναν από τους πιο κρίσιμους παράγοντες που ευνοεί την ανάπτυξη των εντόμων αλλά και κάποιων ειδών μυκήτων που είναι ιδιαίτερα επιβλαβής στο αποθηκευμένο προϊόν με την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών τους, τις μυκοτοξίνες. Η ξήρανση των προϊόντων είναι ιδιαίτερα σημαντική, εφόσον δεν προκαλείται η αλλοίωση τους, και γίνεται συνήθως με χρήση ανεμιστήρων που τροφοδοτούν θερμό αέρα. Η μεταβολή της θερμοκρασίας ωστόσο, είναι η πιο αποτελεσματική μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί καθώς τα έντομα δεν μπορούν να αναπτυχθούν και να αναπαραχθούν σε θερμοκρασίες μικρότερες από 13°C και

μεγαλύτερες από 35°C. Η διάρκεια της εφαρμογής των ακραίων θερμοκρασιών εξαρτάται από το είδος του αποθηκευτικού υλικού, το είδος του εντόμου, το στάδιο ανάπτυξης του και την αντοχή που παρουσιάζει στις μεταβολές της θερμοκρασίας. Η χρήση των υψηλών θερμοκρασιών είναι πιο αποτελεσματική, όμως μπορεί να είναι καταστρεπτική για την ποιότητα και διάρκεια ζωής του αποθηκευμένου υλικού. Παρόλο του μεγάλου ποσοστού θνησιμότητας στις υψηλές θερμοκρασίες, η επίδραση χαμηλών θεωρείται καλύτερη μέθοδος διαχείρισης. Είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική χωρίς να προκαλεί αλλοιώσεις και υποβαθμίσεις των συστατικών του αποθηκευμένου προϊόντος. Έχει την ικανότητα, είτε να μειώνει το ρυθμό ανάπτυξης, διατροφής, αναπαραγωγής, είτε να μειώνει το ποσοστό επιβίωσης των εντόμων εχθρών, ωστόσο χρήζει ιδιαίτερης προσοχής διότι έκθεση για μεγάλο χρονικό διάστημα προκαλεί ανθεκτικότητα των εντόμων. Μια ακόμα εξίσου σημαντική και αποτελεσματική μέθοδος είναι η χρήση ελεγχόμενων ατμοσφαιρών. Η μέθοδος αυτή αποσκοπεί στον έλεγχο του πληθυσμού εντόμων που προσβάλλουν προϊόντα σε καλά κλεισμένους και μεγάλους χώρους (σιλό), μεταβάλλοντας τη σύνθεση του ατμοσφαιρικού αέρα. Η μεταβολή αυτή μπορεί να γίνει με πρόσθεση CO₂ ή N₂, ή με αφαίρεση O₂, ή με παράλληλη μεταβολή της σχετικής υγρασίας και της ατμοσφαιρικής πίεσεως. Η θνησιμότητα των εντόμων μπορεί να αυξηθεί με συνδυασμό των παραπάνω μεθόδων έως και 98% για τα είδη *T. confusum*.

ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ: Η βιολογική καταπολέμηση ορίζεται ως η μελέτη και χρήση παρασίτων, θηρευτών και παθογόνων οργανισμών για τον έλεγχο των πληθυσμών των επιβλαβών οργανισμών. Στη φύση, οι περισσότεροι οργανισμοί αποτελούν λεία για άλλους οργανισμούς, γεγονός που σε πολλές περιπτώσεις οδηγεί σε δραστική μείωση των πληθυσμών του θηρευόμενου είδους. Αυτή την απλή αρχή εκμεταλλεύεται η βιολογική καταπολέμηση για να αντιμετωπίσει τους εχθρούς και τις ασθένειες των καλλιεργειών. Μια δεύτερη αρχή είναι ότι στόχος στη βιολογική καταπολέμηση είναι ο περιορισμός σε χαμηλά επίπεδα παρά η εξολόθρευση του επιζήμιου οργανισμού.

Οι οργανισμοί που μπορούν και ελέγχουν τους επιζήμιους για τα συμφέροντά μας οργανισμούς ονομάζονται φυσικοί εχθροί. Υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες φυσικών εχθρών:

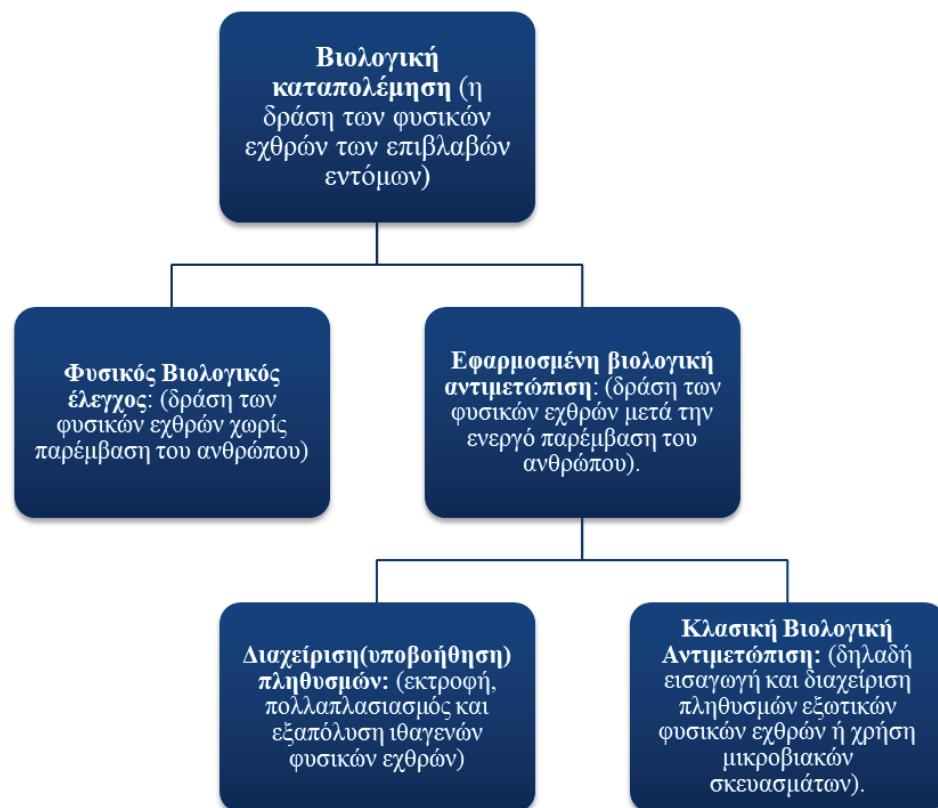
1. Αρπακτικά έντομα
2. Έντομα που παρασιτούν άλλα έντομα (παρασιτοειδή)
3. Παθογόνα (όπως βακτήρια, ιοί και μύκητες) και τέλος
4. Φυτοφάγα έντομα για την καταπολέμηση ζιζανίων.

Στους εντομοπαθογόνους μικροοργανισμούς περιλαμβάνονται οι μύκητες, τα βακτήρια και τα πρωτόζωα αλλά και οι ιοί και οι νηματώδεις. Από τα πιο γνωστά παραδείγματα χρήσης εντομοπαθογόνων μικροοργανισμών είναι το βακτήριο *Bacillus thuringiensis* που χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση προνυμφών λεπιδοπτέρων εντόμων αλλά και δίπτερων, όπως κουνούπια ακόμη και κολεοπτέρων. Σήμερα κυκλοφορούν στο εμπόριο αρκετά σκευάσματα που φέρουν ως «δραστική ουσία» βακτήρια, μύκητες, ιούς και νηματώδεις.

Η Βιολογική Αντιμετώπιση διακρίνεται σε **Φυσική** (δράση των φυσικών εχθρών χωρίς παρέμβαση του ανθρώπου) και σε **Εφαρμοσμένη** (δράση των φυσικών εχθρών μετά την ενεργό παρέμβαση του ανθρώπου). Η Εφαρμοσμένη Βιολογική Αντιμετώπιση διακρίνεται σε Διαχείριση πληθυσμών (εκτροφή, πολλαπλασιασμός και εξαπόλυση ιθαγενών φυσικών εχθρών) και σε Κλασική Βιολογική Αντιμετώπιση (δηλαδή εισαγωγή και διαχείριση πληθυσμών εξωτικών φυσικών εχθρών ή χρήση μικροβιακών σκευασμάτων) (Εικ.12).

Στις μέρες μας υπολογίζεται ότι η φυσική βιολογική καταπολέμηση λαμβάνει χώρα χωρίς ανθρώπινη παρέμβαση σε 55,5 δισεκατομμύρια εκτάρια στα χερσαία οικοσυστήματα του πλανήτη. Στα δασικά και αγροτικά οικοσυστήματα, υπάρχουν περίπου 100.000 είδη δυνητικά επιζήμιων εντόμων εκ των οποίων το 95% ελέγχεται με φυσικό τρόπο από τους εχθρούς του. Ο ρόλος της βιολογικής καταπολέμησης στα θαλάσσια και γλυκέων υδάτων οικοσυστήματα δεν έχει πλήρως αποτιμηθεί, αλλά υπολογίζεται ότι είναι εξίσου σημαντικός. Η φυσική βιολογική καταπολέμηση εξασφαλίζει ότι ο πλανήτης παραμένει «πράσινος» και ότι τα φυτά μπορούν να συνεχίζουν να παράγουν αρκετή βιομάζα για τη συντήρηση άλλων μορφών ζωής. Η κλασική βιολογική καταπολέμηση υπολογίζεται ότι εφαρμόζεται σε 350 εκατομμύρια εκτάρια παγκοσμίως και παρουσιάζει μια εξαιρετική σχέση κόστους/οφέλους, της τάξης του 1:20-500. Μόλις ο εισαχθείς

φυσικός εχθρός εγκατασταθεί με επιτυχία, συνεισφέρει κάθε χρόνο στον έλεγχο του επιζήμιου οργανισμού χωρίς να απαιτούνται επιπλέον έξοδα. Οι εκτιμήσεις για την συνολική έκταση στην οποία εφαρμόζεται η βιολογική καταπολέμηση εξαπολύοντας φυσικούς εχθρούς φθάνουν τα 16 εκατομμύρια εκτάρια παγκοσμίως με μια αναλογία κόστους/οφέλους της τάξης του 1:2-5, η οποία είναι παρόμοια με τη χρήση φυτοφαρμάκων.



Εικόνα 12. Σχεδιάγραμμα βιολογικής καταπολέμησης.

Επίσης φυσικές ουσίες χρησιμοποιούνται ευρέως για την αντιμετώπιση των εντόμων των αποθηκευμένων προϊόντων. Όσον αφορά τους εντομοπαθογόνους μικροοργανισμούς μελέτες έχουν δείξει την αποτελεσματικότητα των εντομοπαθογόνων μυκήτων *B. bassiana* και *M. anisopliae*. Οι μύκητες αυτοί μπορούν να επιζήσουν πάνω στα σιτηρά και να αναπαραχθούν παράγοντας μεγαλύτερο αριθμό παθογόνων σπορίων

(Athanassiou et al., 2008). Σε δημοσιευμένες βιοδοκιμές έχουν δοκιμαστεί διάφορα είδη μυκήτων παρουσιάζοντας συχνά αμφιταλαντευόμενα αποτελέσματα. Άρα αντιλαμβανόμαστε πως η χρήση της βιολογική καταπολέμησης στην αντιμετώπιση των εντόμων αποθηκών αλλά και γενικότερα έχει να κάνει με το συμφέρον του ανθρώπου (παραγωγού ,προμηθευτή, καταναλωτή), το οικονομικό όφελος και την προστασία του πλανήτη.

1.3 Εντομοπαθογόνοι μύκητες

Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες, σε σχέση με άλλους μικροοργανισμούς (βακτήρια, ιοί κτλ), έχουν να προσφέρουν πολλά στην βιολογική καταπολέμηση. Τα τελευταία χρόνια η επιστήμη εκμεταλλεύεται τις ικανότητες αυτών των μυκήτων ως προς την εντομοκτόνο δράση τους και όχι μόνο. Το σύνολο των ειδών τους ξεπερνά τα 720, από τα οποία, περισσότερα από 80 γένη έχουν απομονωθεί από έντομα, αλλά μέχρι σήμερα ένας μικρός αριθμός τους έχει αξιοποιηθεί ως βιοεντομοκτόνα, εξαιτίας της εξάρτησης από υψηλή σχετική υγρασία στο περιβάλλον και της έλλειψης γνώσεων σχετικά με τους παράγοντες που επηρεάζουν την τοξικότητά τους (Mc Coyetal, 1998). Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες, αυτοί οι μικροοργανισμοί που δεν περιέχουν χλωροφύλλη κατατάσσονται ταξινομικά στο υποφύλο των Ασκομυκήτων και συγκεκριμένα στην τάξη των Hyrocrales, με κύρια γένη τα *Beauveria*, *Metarhizium* και *Isaria*.

Στη μειωμένη αξιοποίησή τους, συμβάλλουν και οι τοξίνες που παράγουν αυτά τα παθογόνα και που μπορεί να είναι επιβλαβείς για τον άνθρωπο και τα ζώα. Επιπλέον, μερικοί μύκητες είναι πολύ απαιτητικοί ως προς την καλλιέργειά τους και παρουσιάζουν δυσκολίες στη μαζική παραγωγή τους, ενώ όσοι είναι εύκολο να καλλιεργηθούν, εμφανίζουν εξασθένηση ύστερα από μακροχρόνια παραγωγή σε τεχνητά μέσα. Συχνά εξαρτώνται πολύ από το περιβάλλον, κυρίως όσον αφορά τα αρχικά στάδια μόλυνσης. Έτσι, οι πιο σημαντικοί παράγοντες στην εκδήλωση ασθένειας από τα παθογόνα αυτά, είναι η θερμοκρασία και η υγρασία. Η σχετική υγρασία περιβάλλοντος στις περισσότερες περιπτώσεις θα πρέπει να είναι πολύ αυξημένη, δηλαδή, μεγαλύτερη από 85-90%, ώστε να επιτυγχάνεται αποτελεσματική δράση των εντομοπαθογόνων μυκήτων.

Η εισχώρηση του μύκητα στα έντομα δεν γίνεται μόνο μέσω του στόματος, αλλά πραγματοποιείται και από τον εξωσκελετό, αρκεί το σπόριο του μύκητα να βρει την

κατάλληλη υγρασία για να βλαστήσει. Στους εντομοπαθογόνους μύκητες, χαρακτηριστικό είναι ότι τα έντομα προσβάλλονται, όχι μόνο στο στάδιο της προνύμφης ή νύμφης, αλλά και στο στάδιο του ακμαίου. Όταν ένα έντομο προσβληθεί από ένα παθογόνο μύκητα, ο μύκητας διαπερνά τον εξωσκελετό και αναπτύσσει το μυκήλιο του σταδιακά, στο εσωτερικό του εντόμου, κατακλύζοντας έτσι όλους τους ιστούς, ενώ με τις τοξίνες που παράγει, έχει σαν αποτέλεσμα τη θανάτωση του ξενιστή. Στη συνέχεια ο μύκητας εμφανίζεται εξωτερικά του σώματος του εντόμου με μυκήλιο και επανθήσεις, ενώ στον εξωσκελετό παρατηρούνται κονιδιοφόροι από τους οποίους γίνεται η διασπορά του παθογόνου (Gillespie, 2000).

Ο βιολογικός κύκλος των εντομοπαθογόνων μυκήτων συγχρονίζεται με αυτόν του ξενιστή αλλά και με τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν (Shahid et al, 2012). Ακόμα, η μόλυνση μπορεί να ανασταλεί λόγω της χαμηλής υγρασίας, της αδυναμίας να χρησιμοποιηθούν οι διαθέσιμοι θρεπτικοί παράγοντες στον εξωσκελετό του εντόμου αλλά και εξαιτίας της έλλειψης των απαραίτητων παραγόντων για την αναγνώριση του ξενιστή (Sierotzki et al, 2000, Pell et al, 2001, Shaw et al, 2002). Επίσης παρατηρούμε αλλαγές στην συμπεριφορά του εντόμου κυρίως στην μετακίνηση, την ωτοκία και την διατροφή. Η μείωση της διατροφής του εντόμου είναι μια από τις εμφανείς αλλαγές. Ακολουθούν η δυσκολία στην κίνηση και εμφανίζονται διαταραχές στην ωτοκία. Η μόλυνση διαρκεί σχεδόν 4 ώρες και μετά το πέρας 3 έως 7 ημερών επέρχεται και ο θάνατος του ξενιστή από ασιτία (Hajek 1989, Husaain et al, 2009, Shahid et Al, 2012).

Ο κύκλος ανάπτυξης των εντομοπαθογόνων μυκήτων *in vivo* περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

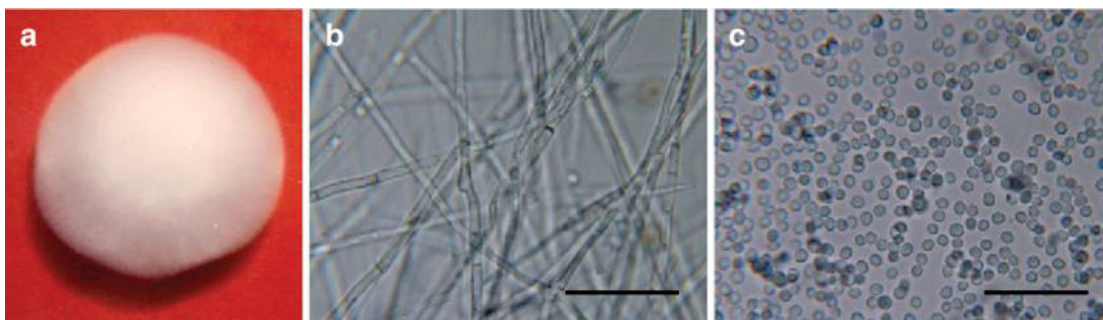
1. Προσκόλληση του κονιδίου στην επιδερμίδα του ξενιστή,
2. Σχηματισμός βλαστικού σωλήνα,
3. Διάτρηση της επιδερμίδας,
4. Παραγωγή ενζύμων προς διευκόλυνση της διαδικασίας εισβολής,
5. Βλαστική ανάπτυξη στο εσωτερικό του εντόμου,
6. Χρήση των θρεπτικών και εγκατάσταση,
7. Παραγωγή τοξινών και μολυσματικών παραγόντων για την καταστολή της άμυνας του ξενιστή και

8. Παραγωγή εξωτερικών κονιδιοφόρων μετά το θάνατο του εντόμου (Hajek et al. 2007, Xiong et al. 2012).

Το αποτέλεσμα της μόλυνσης εξαρτάται από την ικανότητα του μύκητα να μολύνει, από την ικανότητα του εντόμου να αμύνεται και από ένα μεγάλο αριθμό βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων και αλληλεπιδράσεων (Shahid et al, 2012). Μέσα στο σώμα του ξενιστή – εντόμου το παθογόνο πολλαπλασιάζεται με τμήματα υφών και βλαστοσπόρια. Τα τμήματα των υφών ποικίλουν σε μέγεθος και σχήμα. Η είσοδος του μύκητα στο εσωτερικό του εντόμου καταλήγει σε αποδιοργάνωση των φυσιολογικών λειτουργιών και στην ανάπτυξη της ασθένειας. Η διείσδυση του μύκητα πραγματοποιείται μεταξύ 24 ωρών και 48 ωρών, κάτω από ιδανικές συνθήκες (Wraight et al. 1990). Όταν όμως εισχωρήσει ο μύκητας, επέρχεται συνήθως και ο θάνατος του ξενιστή , καταστροφή των ιστών από τις τοξίνες και η προκαλούμενη εξ αιτίας του μύκητα αστία (Xiong et al. 2012). Στην αναγνώριση των ξενιστών συμμετέχουν γονίδια και προϊόντα εξειδικευμένων γονιδίων παθογένειας του μύκητα καθώς και γονίδια ανθεκτικότητας του ξενιστή.

Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες περιέχουν ένα πολύπλοκο σύστημα σήμανσης (περιλαμβάνει G πρωτεΐνες, υποδοχείς, κινάσες και δευτερογενή μηνυματοφόρα μόρια) που ρόλο. Η είσοδος του παθογόνου στο εσωτερικό του εντόμου – ξενιστή καταλήγει στην αποδιοργάνωση των φυσιολογικών λειτουργιών του (Hajek et al. 2007). Το τελικό αποτέλεσμα τέτοιων πολύπλοκων διεργασιών καθορίζει τη συμβατότητα μύκητα – ξενιστή καθώς και την ταχύτητα με τη οποία οι εντομοπαθογόνοι μύκητες εισέρχονται στην αιμολέμφο και προκαλούν το θάνατο στο έντομο.

1.3.1 Μύκητες του γένους *Beauveria*



Εικόνα 13. Μακροσκοπική (a) και μικροσκοπική (b,c) μορφολογία απομόνωσης *Beauveria bassiana*. μετά από συντήρηση 1 έτους με κατάψυξη γλυκερόλης στους -20°C . Η αποικία (a), οι υφές (b) και τα κονίδια (c) του *B. bassiana* που αναπτύσσονται σε μέσο PDA. Μπαρ 10 μm . (<https://www.google.gr/search?q=tribolium+confusum>)

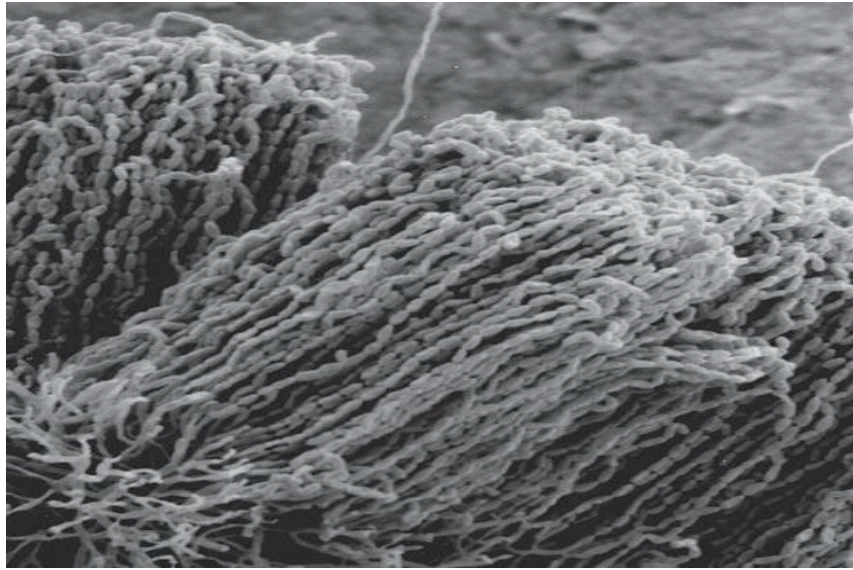
Ο εντομοπαθογόνος μύκητας *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycota: Hyphomycetes) είναι ένας μίτοσπορικός εντομοπαθογόνος μύκητας που παρασιτεί σε ένα μεγάλο εύρος αρθρόποδων. Το όνομα του, το πήρε από τον Ιταλό εντομολόγο Agostino Bassi, ο οποίος και το ανακάλυψε το 1835 ως αίτιο για την άσπρη επίστρωση (μούχλα) (Εικ.13) που βρέθηκε πάνω στο *Bombyx mori*. (Robertson et al., 2007). Η παθογενετική του ικανότητα εναντίον εντόμων έχει μελετηθεί ευρέως τα τελευταία χρόνια (Fargues et al., 1997). Συνιστάται για την καταπολέμηση αφίδων, θριπών, αλευρωδών, κολεοπτέρων, ημιπτέρων κ.α..



Εικόνα 14. *Beauveria bassiana* σε ακμαίο του γένους *Tribolium* της τάξης των Κολεοπτέρων. (<https://www.google.gr/search?q=tribolium+confusum>)

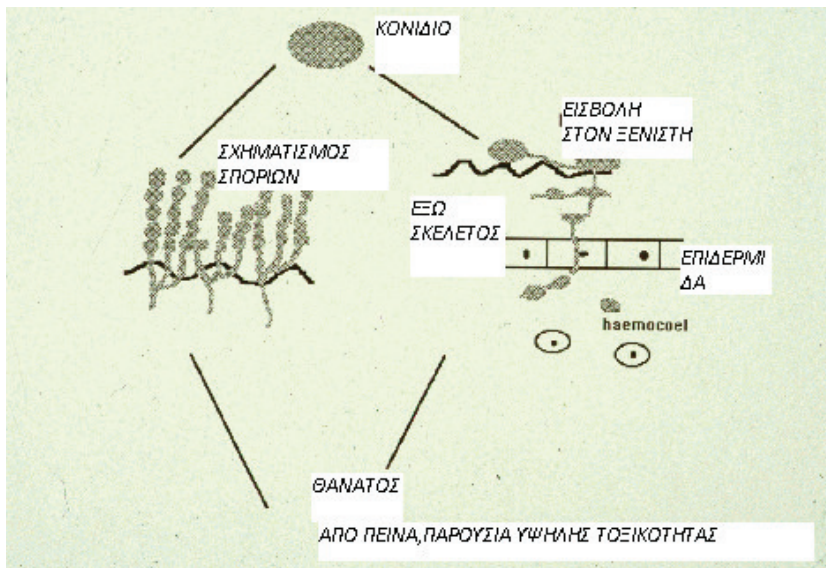
Επίσης δύναται να προσβάλλει προνύμφες λεπιδοπτέρων (Hassanloui et al., 2006). Ο εντομοπαθογόνος αυτός μύκητας εισβάλλει στο σώμα του εντόμου. Τα κονίδια του έρχονται σε επαφή με τον εξωσκελετό του και αφού βλαστήσουν, τον διαπερνούν και αναπτύσσουν υφές, παράγοντας τοξίνες αφυδατώνοντας τα έντομα και στερώντας τα από θρεπτικά στοιχεία και τελικά θανατώνοντάς τα. Η υψηλή υγρασία είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό των κονιδίων και η μόλυνση ολοκληρώνεται μέσα σε 24-48 ώρες αναλόγως της θερμοκρασίας. Το έντομο μπορεί να επιζήσει μέχρι και 3-5 μέρες αφού μολυνθεί. Όταν ο μύκητας τελικά σκοτώσει το έντομο αναπτύσσει μία λευκή εξάνθηση γύρω από το σώμα του (Εικ.14), η οποία παράγει εκατομμύρια νέα σπόρια που απελευθερώνονται στο περιβάλλον. Τα κονίδια του μύκητα είναι μονοκύτταρα, απλοειδή και υδρόφοβα (Rehner and Buckley, 2005). Στην Ευρώπη κυκλοφορούν εμπορικά σκευάσματα με βάση τον μύκητα *B. bassiana* όπως τα Naturalis-L, Bio-power, Botanigard κ.α.

1.3.2 Μύκητες του γένους *Metarhizium*



Εικόνα 14. Ο μύκητας *Metarhizium anisopliae* όπως φαίνεται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (<https://www.google.gr/search?q=tribolium+confusum>)

Το είδος *Metarhizium anisopliae* απέκτησε το όνομα του όταν το 1879 ο Ι.Ι. Mechnikov, το απομόνωσε από το κολεόπτερο *Anisoplia austriaca*. Γνωστός παλαιότερα ως *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, είναι ένας μύκητας που συναντάμε σε ολόκληρο τον κόσμο, αναπτύσσεται φυσικά στο έδαφος και προσβάλλει διάφορα έντομα λειτουργώντας σαν παράσιτο. Στην συνέχεια τον χρησιμοποίησε για τον έλεγχο του κολεοπτέρου *Cleonus punctiventris* και ο οποίος τελικά το συνέστησε για τη βιολογική αντιμετώπιση εντόμων. Το κοινό όνομα με το οποίο αποδίδεται η ασθένεια που προκαλούν οι μύκητες του γένους *Metarhizium* είναι –green muscardine- εξαιτίας των πράσινων κονιδίων που καλύπτουν τα νεκρά έντομα. Έχει αναφερθεί ότι προσβάλλει περίπου 200 είδη εντόμων (Robertson et al. 2007) και άλλων αρthropόδων. Οι μύκητες του είδους *M. anisopliae* ήταν οι πρώτοι παγκοσμίως που χρησιμοποιήθηκαν μαζικά για τον έλεγχο των εντόμων (Driver et al. 2000). Αν και παρουσιάζει μεγάλα ποσοστά θνησιμότητας στα έντομα δεν αποτελεί κίνδυνο για τα θηλαστικά παρά μόνο μπορεί να προκαλέσει αλλεργικές αντιδράσεις σε ευαίσθητα άτομα.



Εικόνα 15. Βιολογικός κύκλος του μύκητα *M. anisopliae* (<http://www.bath.ac.uk/bio-sci/research/profiles/charnley.html>)

Τα στελέχη του είδους *M. anisopliae* μπορούν να παραχθούν εύκολα σε ζυμωτήρες όμως το μυκήλιο τους δεν έχει εντομοκτόνο δράση. Αντίθετα τα βλαστοσπόρια και τα κονίδια τους είναι βιολογικώς δραστικά και έχουν την ικανότητα να μολύνουν και να θανατώνουν τον ξενιστή. Σύμφωνα με τον Tulloch (1976), οι μύκητες αυτού του είδους έχουν δυο τύπους ανάλογα με το μέγεθος των κονιδίων. Ο πρώτος τύπος *M. anisopliae* με κονίδια 3,5 – 9,0 μm και ο δεύτερος *M. anisopliae* var *major* με κονίδια 9,0 – 18,0 μm (Driver et al. 2000). Τα στελέχη του είδους *M. anisopliae* εισέρχονται στον ξενιστή τους από τους πόρους του τραχειακού συστήματος (Leger 2006) (Εικ.16). Μετά το πέρας 18 ωρών εισέρχονται στο εσωτερικό του εντόμου με την μορφή απρεσσορίων και παράγουν κονίδια με σχήμα μακριών, διακλαδιζομένων υφών και σχηματίζουν νηματοειδή κελιά (Leger 2006). Στους μύκητες του είδους *M. anisopliae*, το μυκήλιο αποτελεί τον κύριο τρόπο ανάπτυξής του. Η ραγδαία ανάπτυξή του έχει ως αποτέλεσμα το έντομο να γεμίσει μυκήλια τα οποία καταστρέφουν τα εσωτερικά όργανά του (Leger 2006,). Το έντομο μπορεί να επιζήσει μέχρι και 5-15 μέρες αφού μολυνθεί.

1.3.3 Μύκητες του γένους *Isaria*



Εικόνα 16. Εργαστηριακή καλλιέργεια του μύκητα *Isaria fumosorosea*.
(<https://www.google.gr/search?q=tribolium+confusum>)

Το *Isaria fumosorosea* είναι ένας εντομοπαθογόνος μύκητας, παλαιότερα γνωστός ως *Paecilomyces fumosoroseus*. Υπόσχεται να συμβάλει ως βιολογικό παρασιτοκτόνο με εκτεταμένο εύρος ξενιστών. Το κοινό όνομα με το οποίο αποδίδεται η ασθένεια που προκαλούν οι μύκητες του γένους *Isaria* είναι – pink muscardine- εξαιτίας των ροζ χρώματος κονιδίων που καλύπτουν τα νεκρά έντομα.

Το *I. fumosorosea*, ακριβώς όπως το *B. bassiana*, παράγει κόνidia σε στερεό υπόστρωμα και βλαστοσπόρια σε υγρό. Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν από την ερευνητική μονάδα USDA-ARS διαπιστώθηκε ότι τα βλαστοσπόρια βλαστάνουν ταχύτερα και σε μεγαλύτερο ποσοστό στον εξωσκελετό του αλευρώδη σε σχέση με τα κόνidia. Η διαπίστωση αυτή δείχνει ότι η χρήση των βλαστοσπορίων για την ανάπτυξη των εμπορικών σκευασμάτων θα ήταν συμφέρουσα συγκριτικά με τη χρήση των κονιδίων. Διάφορα γεωργικά προϊόντα έχουν εξεταστεί ως συστατικά σκευασμάτων και μερικά υπόσχονται τη διατήρηση της βιωσιμότητας των βλαστοσπορίων στο πέρασμα του χρόνου. Ο μύκητας δεν αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες άνω των 32°C και δε θεωρείται ότι είναι παθογόνος για τους ανθρώπους. Ακόμη ένας ελπιδοφόρος μύκητας που έχει να συμβάλει στην βιολογική καταπολέμηση.

2. Σκοπός της εργασίας

Στα πλαίσια της βιολογικής γεωργίας θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν οι εντομοπαθογόνοι μύκητες ως εντομοκτόνα, γεγονός που θα αποτελούσε ένα σπουδαίο εργαλείο στον τρόπο αντιμετώπισης των επιβλαβών εχθρών. Αυτή η μελέτη μπορεί να επιφέρει μεγάλο οικονομικό όφελος, αφού θα δώσει σημαντικά στοιχεία απαραίτητα για την διαχείριση των εχθρών των καλλιεργειών. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η χρήση τριών εντομοπαθογόνων μυκήτων για την αντιμετώπιση ενός από τους σπουδαιότερους εχθρούς των αποθηκευμένων προϊόντων του Κολεοπτέρου *Tribolium confusum*.

3. Μέθοδοι και υλικά

3.1 Οργανισμοί

3.1.1 Έντομο του πειράματος



Εικόνα 17. *Tribolium confusum* σε τριβλίο στο εργαστήριο Φυτοπροστασίας - Φαρμακολογίας του ΤΕΙ Δυτικής Ελλάδας (Φωτογραφία Γαζέπη Μαρία με dslr nikon d5200)

Η εκτροφή του *T. confusum* (Εικ.18) έλαβε χώρα στο ΤΕΙ Δυτικής Ελλάδας στο εργαστήριο Φυτοπροστασίας - Φαρμακολογίας, σε αποστειρωμένο αλεύρι αναμεμιγμένο με μαγιά. Σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του εντόμου, οι επικρατούσες συνθήκες ήταν στους $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, υγρασίας 60-70% Σ.Υ. και φωτοπεριόδου 16:8 ώρες Φ:Σ. Τα έντομα αναπτύσσονταν σε υάλινα βάζα, στα οποία πραγματοποιούνταν τακτικές αραιώσεις, ώστε να αποφεύγεται ο συνωστισμός που θα επηρέαζε την ανάπτυξη και τη πρόσληψη τροφής των προνυμφών (Εικ.19).



Εικόνα 18. Εκτροφή του *Tribolium confusum* σε αποστειρωμένο αλεύρι αναμεμιγμένο με μαγιά σε βάζα στο εργαστήριο Φυτοπροστασίας - Φαρμακολογίας του ΤΕΙ Δυτικής Ελλάδας. (Φωτογραφία Γαζέπη Μαρία με dslr nikon d5200)

3.1.2 Εντομοπαθογόνοι μικροοργανισμοί

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι εντομοπαθογόνοι μύκητες *Beauveria bassiana* Balsamo (Vuillemin) (Hypocreales: Cordycitaceae), *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) και *Isaria fumosorosea* (Wize) Brown&Smith (Hypocreales: Clavicipitaceae) από την συλλογή του Δρ.Σπυρίδων Μαντζούκα. Οι απομονώσεις διατηρούνταν σε τρυβλία Petri επί θρεπτικού υλικού SDA (Sabouraud Dextrose Agar, Sigma - Aldrich) σε θερμοκρασίες $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ και ανανεώνονταν κάθε μήνα (Εικ.20). Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες απομονώθηκαν με την μέθοδο Galleria Bait που χρησιμοποιεί το έντομο *Galleria mellonella* ως δόλωμα) (Zimmermann 1986), και τη μέθοδο των ημικλεκτικών υποστρωμάτων.



Εικόνα 19. Ανάπτυξη των εντομοπαθογόνων μυκήτων επί Sabouraud Dextrose Agar (SDA) στο εργαστήριο Φυτοπροστασίας - Φαρμακολογίας του ΤΕΙ Δυτικής Ελλάδας.

3.2 Παρασκευή Εναιωρημάτων Εντομοπαθογόνων Μυκήτων

Προκειμένου να παρασκευαστούν τα εναιωρήματα για τις ανάγκες των πειραμάτων, οι μύκητες καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία Petri 9cm με θρεπτικό υλικό Sabouraud Dextrose Agar, τα οποία αφέθηκαν να αναπτυχτούν στο σκοτάδι για 15 μέρες στους $25^{\circ}\text{C}\pm 1$ και είχαν ασφαλιστεί με Parafilm® για να προστατευτούν από επιμολύνσεις. Το θρεπτικό Sabouraud Dextrose Agar, προσαρμόστηκε εν μέρει για τη καλλιέργεια και τη ταυτοποίηση των μυκήτων. Συνολικά προστέθηκαν 20 μονάδες πενικιλίνη και 40 μικρογραμμάρια στρεπτομυκίνη ή διυδροστρεπτομυκίνη ανά ml του μέσου, στο αποστειρωμένο και λιωμένο μέσο στους $45 - 50^{\circ}\text{C}$, υπό ασηπτικές συνθήκες. Αυτές οι επιθυμητές συγκεντρώσεις της πενικιλίνης μπορούν εύκολα να παρασκευασθούν διαλύοντας τα περιεχόμενα ενός φιαλιδίου πενικιλίνης που περιέχει 100.000 μονάδες πενικιλίνης σε 10 ml αποστειρωμένου νερού 2 ml αυτού του διαλύματος, προστίθενται σε 1 lt αποστειρωμένου μέσου, στους $45 - 50^{\circ}\text{C}$, υπό ασηπτικές συνθήκες (0,2 ml / 100 ml του μέσου). Για να παρασκευασθούν οι επιθυμητές συγκεντρώσεις στρεπτομυκίνης στο ίδιο μέσο, διαλύονται 1.000.000 μικρογραμμάρια στρεπτομυκίνης σε 10 ml αποστειρωμένου νερού. Ένα (1) ml αυτού του διαλύματος προστίθεται σε 9 ml αποσταγμένου νερού, για να δώσει ένα διάλυμα, τ' οποίο να περιέχει 10.000 micrograms στρεπτομυκίνης / ml. Στο κάθε λίτρο του μέσου, προστίθενται 4 ml αυτού του διαλύματος για να παρατηρηθούν 40 micrograms / ml. (0,4 ml για 100 ml μέσου). Για να ενυδατωθεί ξανά το μέσο, προστίθενται 65g Bacto – Sabouraud Dextrose Agar σε 1000 ml κρύου αποστειρωμένου νερού και θερμαίνονται με βράσιμο για να διαλυθεί το μέσο εντελώς. Έπειτα το διάλυμα τοποθετήθηκε σε κωνικές φιάλες με κλειστά πώματα κι αποστειρώθηκε στο κλίβανο για 15 λεπτά σε 15% πίεση (121°C). Η τελική αντίδραση του μέσου είναι: pH 5,6. «Φρέσκα» κονίδια συλλέχτηκαν από τις καλλιέργειες 15 ημερών για να

χρησιμοποιηθούν στα πειράματα μας. Τα εναιωρήματα κονιδίων μας παρασκευάστηκαν με «ξύσιμο», με την χρήση αποστειρωμένου μεταλλικού γάντζου στην επιφάνεια των τρυβλίων Petri. Τα κονίδια μεταφέρονταν σε φιάλες των 500ml που περιείχαν 50ml αποστειρωμένου νερού που περιείχε 0.05% Tergitol® NP9.

Το διάλυμα κονιδίων φιλτραρίστηκε διαμέσου αρκετών στρωμάτων αποστειρωμένου πανιού - «τούλι» μικρής διατομής- και στη συνέχεια το διάλυμα ομογενοποιήθηκε για 5 λεπτά με την βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα (Goett el και Inglis 1997, Quesada – Moraga et al. 2007). Στην συνέχεια σε οπτικό μικροσκόπιο (400x) χρησιμοποιήθηκε αιματοκυτό μετρο Neubauer για το καθορισμό των επιθυμητών δόσεων. Η βλάστηση των κονιδίων ήταν 95%. Αυτό εκτιμήθηκε με την εξέταση κονιδίων των μυκήτων με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου (40x) υστέρη από την επώαση τους στο σκοτάδι και μετά το πέρας 24 ωρών.

3.3 Μελέτη της επίδρασης των εντομοπαθογόνων μυκήτων απομονώσεων *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* και *Isaria fumosorosea* επί νεαρών ακμαίων του εντόμου.



Εικόνα 20. Ψεκασμός εντομοπαθογόνων μυκήτων στο εργαστήριο Φυτοπροστασίας - Φαρμακολογίας του ΤΕΙ Δυτικής Ελλάδας. (Φωτογραφικό υλικό Γαζέπη Μαρία)

Για την μελέτη της επίδρασης των εντομοπαθογόνων μυκήτων έπρεπε να γίνει ψεκασμός των μυκήτων στα νεαρά ακμαία του εντόμου. Η εκτροφή κοσκινίστηκε και ξεχωρίστηκαν τα ακμαία από τις προνύμφες έτσι ώστε να πάρουμε τον πληθυσμό που χρειάστηκε για το πείραμα . Η εφαρμογή του πειράματος έγινε υπό ασηπτικές συνθήκες για προστασία από επιμολύνσεις. Όργανα και υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εφαρμογή:

- Ξηραντήριο (για 12 ώρες τα προϊόντα ρύζι, σιτάρι ,αραχίδα και καρύδι για αποστείρωση και για απώλεια περιττής υγρασίας)

- Γάντια
- Πηγή φωτός (για βελτίωση όρασης)
- Κόσκινα (για διαχωρισμό ακμαίων από εκτροφές)
- Ζύγος ακριβείας
- Τρυβλία Petri των 10gr
- Πλαστικά λευκά δοχεία πολλαπλών χρήσεων
- Λαβίδες
- Λίχνος Bunsen (για καύση – αποστείρωση εργαλείων)
- Αιθανόλη
- Βελόνα- καρφίτσα (η οποία χρειάστηκε για άνοιγμα πόρων στις επιφάνειες των τρυβλίων)
- Ταινία Parafilm
- Ψεκαστήρας χειρός όγκου 500ml (τα εναιωρήματα των μυκήτων).

Για την μελέτη αυτή, τα ακμαία του εντόμου ψεκάστηκαν με την χρήση αποστειρωμένου ψεκαστήρα χειρός όγκου 500ml (Εικ. 21). Χρησιμοποιήθηκαν εναιωρήματα κονιδίων με πυκνότητα 10^8 κονίδια/ml. Τα ακμαία έντομα ψεκάστηκαν απευθείας με το εναιώρημα των κονιδίων σε πλαστικά λευκά δοχεία που περιείχαν 10g αποστειρωμένου σίτου, αραχίδας, ρυζιού και καρυδιού. Στην συνέχεια χρονομετρήθηκαν για 2 δευτερόλεπτα και αφού έμεινε ο μύκητας στο προϊόν το κατάλληλο χρόνο τα τοποθετήσαμε στα τρυβλία Petri 10g, βάζοντας στο κάθε τρυβλίο από 10 νεαρά ακμαία (Εικ.22). Κλείνοντας περιμετρικά τα τρυβλία με Parafilm.



Εικόνα 21. Τρυβλία Petri με 10gr αποστειρωμένου προϊόντος (σίτου, αραχίδιας, ρυζιού και καρυδιού) στο εργαστήριο Φυτοπροστασίας - Φαρμακολογίας του ΤΕΙ Δυτικής Ελλάδας (Φωτογραφικό υλικό Γαζέπη Μαρία)

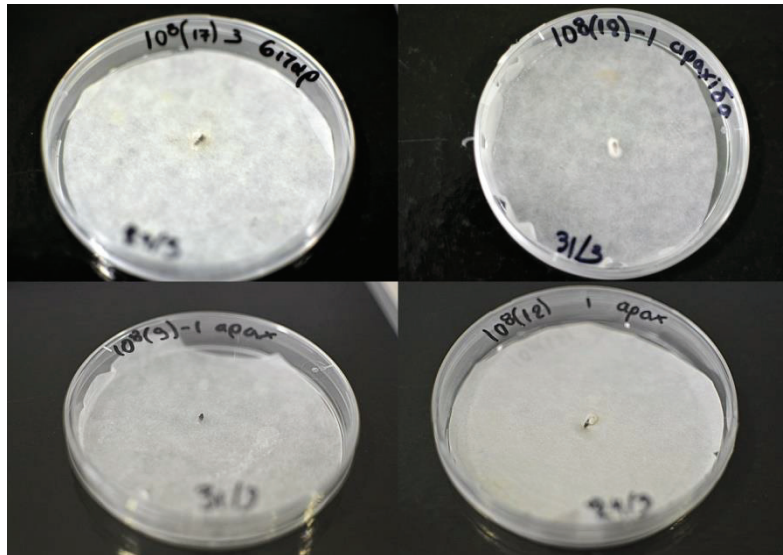
Η θνησιμότητα των ακμαίων καταγραφόταν καθημερινά για 10 ημέρες. Τα νεκρά ακμαία απομακρύνονταν από τα τρυβλία Petri και αποστειρώνονταν επιφανειακά (σε υποχλωριώδες Νάτριο NaOC 12%) για να αποφευχθεί η σαπροφυτική φάση του μύκητα. Στη συνέχεια τα αποστειρωμένα ακμαία τοποθετούνταν σε τρυβλία Petri που περιείχαν υγρό διηθητικό χαρτί έως ότου να γίνει εμφανές το μυκήλιο του μύκητα (Εικ.26). Για τον καθορισμό της αιτίας θανάτου και τον προσδιορισμό του παθογόνου, κάθε νεκρό έντομο εξεταζόταν με την βοήθεια στερεοσκοπίου (Εικ.23, 24).



Εικόνα 22. Καταγραφή καθημερινά για είκοσι μία ημέρες των νεκρών ακμαίων, με την βοήθεια στερεοσκοπίου. (Φωτογραφικό υλικό Γαζέπη Μαρία, στο ΤΕΙ Δυτικής Ελλάδος-Αμαλιάδα)



Εικόνα 23. Με την βοήθεια στερεοσκοπίου γινόταν ο διαχωρισμός των νεκρών ακμαίων. (Φωτογραφικό υλικό Γαζέπη Μαρία, στο εργαστήριο Φυτοπροστασίας - Φαρμακολογίας του ΤΕΙ Δυτικής Ελλάδας)



Εικόνα 24. Τρυβλία Petri με διηθητικό χαρτί εμποτισμένο με νερό για την παρατήρηση της εμφάνισης του μυκήλιου του μύκητα. (Φωτογραφικό υλικό Γαζέπη Μαρία, στο στο εργαστήριο Φυτοπροστασίας - Φαρμακολογίας του ΤΕΙ Δυτικής Ελλάδας)

3.4 Στατιστική επεξεργασία

Η αποτελεσματικότητα όλων των στελεχών επί των προνυμφών υπολογίστηκε με τον τύπο του Abbott (Abbott 1925, Kurstak 1982). Το στατιστικό πακέτο IBMSPSS (IBMcor., IL, USA, version23.0) χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση της διακύμανσης των δεδομένων. Τα δεδομένα, όπου κρίνονταν αναγκαίο μετατρέπονταν κατάλληλα (\arcsin) προκειμένου να τηρηθούν οι προϋποθέσεις της παραμετρικής ανάλυσης για ίσες παραλλακτικότητες μεταξύ των μεταχειρίσεων. Ο χρόνος επιβίωσης των ακμαίων του *T. confusum* υπολογίστηκε με ανάλυση Kaplan-Meier και η σύγκριση έγινε με το τεστ Log Rank (Mantel-Cox).

4. Αποτελέσματα

Πίνακας 2. Ο μέσος χρόνος επιβίωσης των ακμαίων του εντόμου ανά χειρισμό στους 25°C (n=30) (Kaplan-Meier) (Log Rank (Mantel-Cox) (σε επίπεδο σημαντικότητας 95%). 12: *I. fumosorosea*, 17: *M. anisopliae var anisopliae*, 18: *B. bassiana*

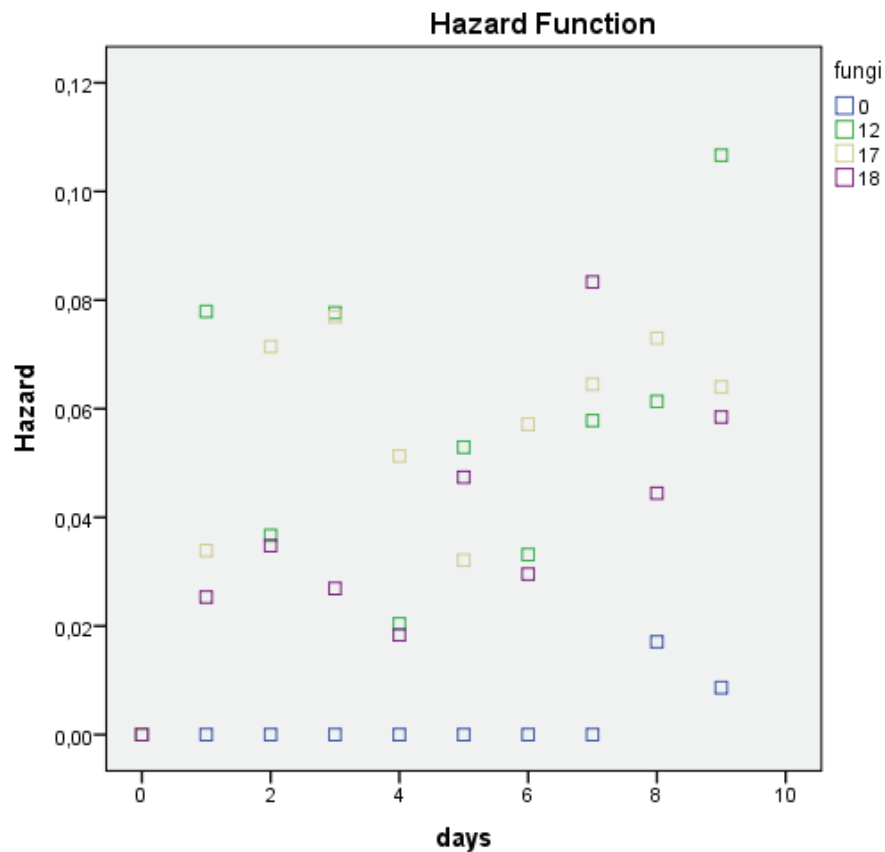
Percentiles

Προϊόν	Μύκητας	25,0%		50,0%		75,0%	
		Estimate	Std. Error	Estimate	Std. Error	Estimate	Std. Error
Σιτάρι	12			9,000	,685	8,000	,627
	17					10,000	.
	18					9,000	1,004
	Overall					9,000	,515
Ρύζι	12					9,000	.
	17					7,000	3,229
Καρύδι	12					10,000	.
	17	.	.	8,000	1,366	6,000	1,255
	18					6,000	1,615
	Overall					8,000	1,128
Αραχίδα	12			5,000	1,357	2,000	,692
	17	6,000	,854	4,000	1,249	2,000	,449
	18			10,000	,905	7,000	,645
	Overall			8,000	,980	3,000	,717
Overall	Overall					8,000	,506

Η ανάλυση επιβίωσης Kaplan-Meier (Log Rank (Mantel-Cox)) για το σιτάρι, υποδεικνύει ότι ο μέσος συνολικός χρόνος επιβίωσης για τα ακμαία Lt50 για τον μύκητα *I. fumosorosea* ήταν 9±0.7 ημέρες και Lt75 ήταν 8±0.6 ημέρες, για τον μύκητα *M. anisopliae* Lt75 ήταν 10±0.0 και τέλος για το μύκητα *B. Bassiana* Lt75 ήταν 9±1 ημέρες.

Για το ρύζι, η ανάλυση επιβίωσης Kaplan-Meier (Log Rank (Mantel-Cox)), υποδεικνύει ότι ο μέσος συνολικός χρόνος επιβίωσης για τα ακμαία Lt75 για τον μύκητα *I. fumosorosea* ήταν 9 ± 0.0 ημέρες και για τον μύκητα *M. anisopliae* Lt75 ήταν 7 ± 3 ημέρες. Η ανάλυση επιβίωσης Kaplan-Meier (Log Rank (Mantel-Cox)) για το Καρύδι, υποδεικνύει ότι ο μέσος συνολικός χρόνος επιβίωσης για τα ακμαία Lt75 για τον μύκητα *I. fumosorosea* ήταν 10 ± 0.0 ημέρες, για τον μύκητα *M. anisopliae* ήταν Lt 50 8 ± 1.3 ημέρες και Lt75 ήταν 10 ± 0.0 ημέρες και τέλος για το μύκητα *B. bassiana* Lt75 ήταν 8 ± 1.2 ημέρες. Για την αραχίδα, η ανάλυση επιβίωσης Kaplan-Meier (Log Rank (Mantel-Cox)), υποδεικνύει ότι ο μέσος συνολικός χρόνος επιβίωσης για τα ακμαία Lt 50 για τον μύκητα *I. fumosorosea* ήταν 5 ± 1.3 ημέρες και Lt75 2 ± 0.6 ημέρες, για τον μύκητα *M. anisopliae* ήταν Lt 25 6 ± 0.8 ημέρες Lt50 ήταν 4 ± 1.2 ημέρες και Lt 75 2 ± 0.4 ημέρες και για το μύκητα *B. bassiana* Lt50 ήταν 10 ± 0.9 ημέρες και Lt75 3 ± 0.7 ημέρες (Πίν 2).

Στο Διάγραμμα 1 παρατηρούμε την θνησιμότητα εκφρασμένη ως τοξικότητα δηλαδή η επίδραση περιοριστικού παράγοντα-μύκητα με μεταφρασμένη την θνησιμότητα σε Hazard που μας δείχνει την επίδραση του παράγοντα στον πληθυσμό του εντόμου. Ο μύκητας *I. fumosorosea* (12) είχε μεγαλύτερη θνησιμότητα στο τέλος του πειράματος συνολικά, αντίθετα, η επίδραση του μύκητα *B. bassiana* (18) ήταν μικρότερη συνολικά.



Διάγραμμα1. Καμπύλες τοξικότητας (Kaplan-Meier) (η θνησιμότητα είναι μεταφρασμένη σε τοξικότητα¹) των ακμαίων του εντόμου *T. confusum* σε εργαστηριακές συνθήκες μετά την επίδραση των εντομοπαθογόνων μυκήτων (25°C, RH 70%) (n=30)(Log Rank (Mantel-Cox)). 12: *I. fumosorosea*, 17: *M. anisopliae* var *anisopliae*, 18: *B. bassiana*

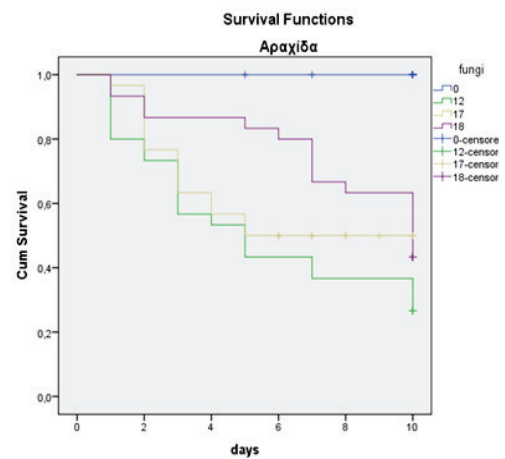
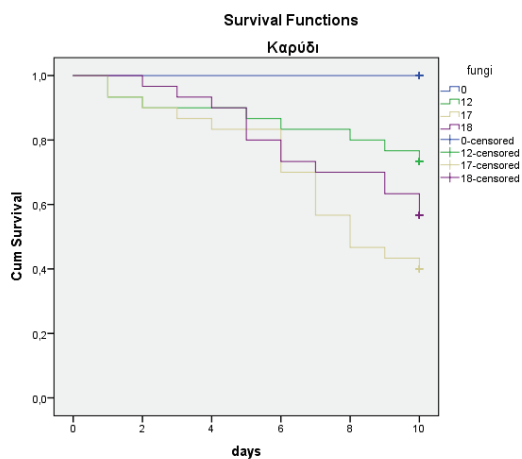
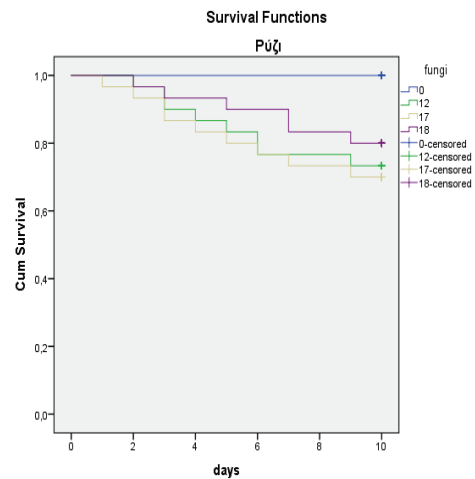
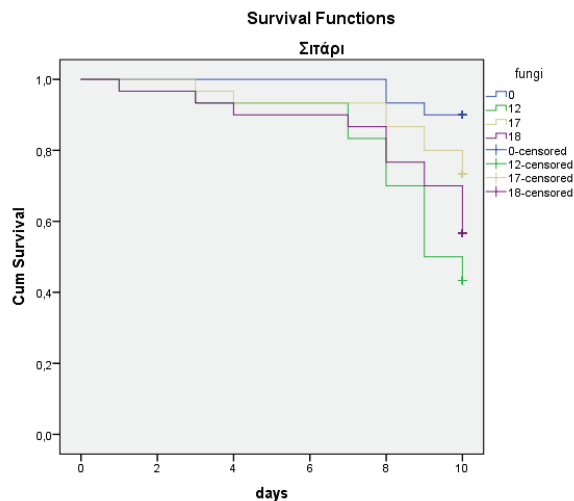
Στο Πίνακα 3. καταγράφονται τα στατιστικά αποτελέσματα ως προς τη θνησιμότητα που εντοπίστηκαν μεταξύ των μεμονωμένων και συνδυαστικών δόσεων με την ανάλυση επιβίωσης Kaplan-Meier (έλεγχος Log Rank και έλεγχος Mantel-Cox για κατά ζεύγη συγκρίσεις).

¹ Η τοξικότητα (θνησιμότητα μεταφρασμένη) αναφέρεται στο ποσοστό θανάτου για ένα έμβιο οργανισμό συγκεκριμένης ηλικίας λόγω επίδρασης ενός παράγοντα α.

Πίνακας 3. Log Rank pairwise σύγκριση (Mantel-Cox) μεταξύ των συνδυασμών των παθογόνων μικροοργανισμών (Kaplan–Meiers survival analysis, $P<0.05$) ανά χειρισμό στους 25°C (n=30(σε επίπεδο σημαντικότητας 95%). 12:*I. fumosorosea*, 17: *M. anisopliae var anisopliae*, 18: *B. bassiana*

		Μάρτυρας		12		17		18		
		Μύκητας	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	Μάρτυρας				52,535	,000	67,940	,000	40,438	,000
	12		52,535	,000			1,224	,269	2,076	,150
	17		67,940	,000	1,224	,269			7,679	,006
	18		40,438	,000	2,076	,150	7,679	,006		

a. Adjusted for product.



Διάγραμμα 2. Καμπύλες επιβίωσης (Kaplan-Meier) των ακμαίων του εντόμου *T. confusum* σε εργαστηριακές συνθήκες μετά την επίδραση των εντομοπαθογόνων μυκήτων (25°C, RH 70%) (n=30) (Log Rank (Mantel-Cox)) 12: *I. fumosorosea*, 17: *M. anisopliae* var *anisopliae*, 18: *B. bassiana*

Στο Διάγραμμα 2 παρατηρούμε την θνησιμότητα εκφρασμένη ως επιβίωση ανά προϊόν. Η επίδραση με τον μύκητα *M. anisopliae* (17) ήταν μεγαλύτερη στο τέλος του πειράματος σε όλα τα προϊόντα, εκτός του σιταριού όπου η επίδραση του μύκητα *I. fumosorosea* (12) φαίνεται να ήταν μεγαλύτερη. Αντίθετα, η επίδραση μύκητα *I. fumosorosea* (12) ήταν μικρότερη σε όλα τα προϊόντα εκτός του ρυζιού, όπου στο ρύζι η επίδραση του μύκητα *B. bassiana* (18) φαίνεται να ήταν η μικρότερη.

5. Συζήτηση

Η σύγχρονη τάση στο πεδίο της παραγωγής προϊόντων με ολοκληρωμένες μεθόδους παραγωγής και διαχείρισης ευνοεί την ανάπτυξη βιολογικών σκευασμάτων, που τείνουν να αντικαταστήσουν τα χημικά-συνθετικά σκευάσματα με τα οποία αντιμετώπιζονταν οι ασθένειες και οι προσβολές των καλλιεργειών. Για το σκοπό αυτό, πολλά είδη εντομοπαθογόνων μυκήτων έχουν χρησιμοποιηθεί εναντίον διαφόρων επιβλαβών εντόμων για τις καλλιέργειες και έχουν δείξει ικανοποιητικά επίπεδα ελέγχου. Αρκετά είδη εξ αυτών έχουν αναφερθεί ως σημαντικοί παράγοντες αντιμετώπισης επιζήμιων εντόμων - εχθρών στις αποθήκες, όπως οι εντομοπαθογόνοι μύκητες της τάξης *Hyocreales* *M. anisopliae*, *B. bassiana* και *I. fumosorosea* (Sevimetal. 2010, Pogetto et al. 2012). Οι ετήσιες απώλειες μετά τη συγκομιδή των αγροτικών προϊόντων που προκαλούνται από τα έντομα, τις μικροβιακές μολύνσεις και άλλους παράγοντες υπολογίζονται γύρω στο 10 - 25% παγκοσμίως. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν μέχρι σήμερα ήταν αποτελεσματικές όμως δεν είχαν οικολογικό προσανατολισμό. Η βιολογική αντιμετώπιση εισήγαγε έναν νέο τρόπο καταπολέμησης με την χρησιμοποίηση φαρμάκων που αποτελούνταν από μύκητες ή φυσικές ουσίες. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την δημιουργία «πράσινων» φαρμάκων.

Στην παρούσα μελέτη καταβλήθηκε μία προσπάθεια να μελετηθεί η εντομοπαθογόνος δράση των μυκήτων *B. bassiana*, *M. anisopliae* και *I. fumosorosea* επί των νεαρών ακμαίων του εντόμου *T. confusum*. Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων των παρατηρούμε ότι το πιο αποτελεσματικός εντομοπαθογόνος μύκητας στο σύνολό ήταν ο *I. fumosorosea* (12). Επιμέρους, ανά προϊόν έχουμε επίδραση με τον *M. anisopliae* (17) όπου ήταν μεγαλύτερη στο τέλος του πειράματος σε όλα τα προϊόντα, εκτός του σίτου όπου η επίδραση του *I. fumosorosea* (12) φαίνεται να ήταν μεγαλύτερη. Αντίθετα, η

επίδραση *I. fumosorosea* (12) ήταν μικρότερη σε όλα τα προϊόντα εκτός του ρυζιού όπου η επίδραση του μύκητα *B. bassiana* (18) φαίνεται να ήταν μικρότερη. Οι Rice et al. (1999) αναφέρουν θνησιμότητα περίπου στο 80% του *T. confusum*, μετά από 21 ημέρες σε ρύζι και ότι η θνησιμότητα των *S. oryzae* L. ήταν περίπου 50%. Επίσης οι Moino et al (1998) αναφέρουν θνησιμότητα 80% του *S. oryzae* σε μίγμα καλαμποκιού, ρυζιού και αλεύρου μετά από 10 ημέρες. Ταυτόχρονα, οι Hidalgo et al αναφέρουν επίσης ότι η θνησιμότητα των *S. zea mais* σε αλεύρι με την εφαρμογή με *B. bassiana* (10^{10} κονίδια/g) έφτασε το 100% μετά από 7 ημέρες. Τέλος, οι Adane et al αναφέρουν ότι η χαμηλότερη δόση με την εφαρμογή με *M. anisopliae* (10^4 κονίδια ml⁻¹) εμφάνισε σε θνησιμότητα 88% του εντόμου *T. confusum* μετά από 8 ημέρες σε αραβόσιτο.

Τα αποτελέσματά μας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η χρήση των εντομοπαθογόνων μυκήτων μπορεί να αποτελέσει σημαντικό παράγοντα για τον έλεγχο των ακμαίων του κολεοπτέρου *T. confusum*. Οι πληροφορίες αυτές μπορεί να φανούν ιδιαίτερα χρήσιμες στο μέλλον για τον έλεγχο του εντόμου και να αξιοποιηθούν κατάλληλα μέσα από ολοκληρωμένα προγράμματα διαχείρισης εντόμων στην αποθήκη.

6. Βιβλιογραφία

- Abbott, W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18, 265-267.
- Abdel Rahman Khaled M., Barta M., Cagan L., 2010. Effect of combining *Beauveria bassiana* and *Nosema pyrausta* on the mortality of *Ostrinia nubilalis*, Cent. Eur. J. Biol. 5: 472-480.
- Altre, J. A., και Vandenberg, J. D., 2001. Factors Influencing the Infectivity of Isolates of *Paecilomyces fumosoroseus* against Diamondback Moth, *Plutella xylostella*. Journal of Invertebrate Pathology. 78: 31–36.
- Athanassiou C.G., Kavallieratos N.G., Dimizas C.B., Vayias B.J., Tsakiri J.B., Mikeli N.H., Meletsis C.M., Tomanovic Z., (2008). Persistence and efficacy of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) and diatomaceous earth against *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) and *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae) on wheat and maize, Crop Protection 27: 1303-1311
- Avantaggiato, G., Quaranta, F., Desiderio, E., Visconti, A., 2002. Fumonisin contamination of maize hybrids visible damaged by *Sesamia*. J. Sci. Food Agric. 83, 13–18.
- Baldwin R. and Fasoulo T., 2003. Confused flour beetle, *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae). University of Florida, institute of food and agricultural sciences, department of entomology and nematology.http://creatures.ifas.edu/urban/beetles/red_flour_beetle (html)
- Bennett S.M., 2003. Stored products insects, *Tribolium confusum* (Coleoptera:Tenebrionidae). <http://www.ma.utexas.edu>
- Bischoff, J.F., Rehner, S.A., Humber, R.A., 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* line age. Mycologia 101, 512-530.
- Brownbridge, M, (1991) Native *Bacillus thuringiensis* isolates for the management of lepidopteran cereal pests. Insect Sci. Appl. 12, 57-61
- Butron A., Malvar R.A., Carream.E., Ordas A. & Velasco P. 1999: Resistance of maize inbreds to pink stem borer. Crop Prot. 39: 102–107.
- Butron, A., Sandoya, G., Santiago, R., Orda's, A., Rial, A., Malvar, R.A., 2006a. Searching for new sources of pink stem borer resistance in maize. Genet. Resour. Crop Evol. 53, 1455–1462.

- Costa, S.D., Barbercheck, M.E., Kennedy, G.G., 2001. Mortality of Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) after sublethal stress with the CRYIII deltaendotoxin of *Bacillus thuringiensis* and subsequent exposure to *Beauveria bassiana*. J. Invertebr. Pathol. 77, 173–179.
- Cox, F. E. G., 2001. Concomitant infections, parasites and immune responses. Parasitology. 122: 23–38.
- Day E., 1996. Confused flour beetle, *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae). Virginia polytechnic institute and state university, insect identification laboratory <http://ext.vt.edu/departments/entomology/factsheets/confused.html>
- Dimas I., Pitta E. and Angelopoulos K., 2007. Corn Stalk Borer (*Sesamia nonagrioides*) Infestation on Sorghum in Central Greece. Phytoparasitica 35(2): 191-193.
- Driver, F., Milner, R.J., True man, W.H.A., 2000 A Taxonomic revision of *Metarhizium* based on sequence analysis of ribosomal DNA. Mycological Res.104: 135-151
- Fargues, J., Delmas, J. C. και Lebrun, R. A., 1997. Leaf consumption by larvae of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) infected with the entomopathogen, *Beauveria bassiana*. Journal of Economic Ent. 87: 67–71.
- Ford J., 1937. Research on populations of *Tribolium confusum* and bearing on ecological theory (special review). *The Journal of Animal Ecology* 6, 1937, 1-14.<http://links.jstor.org/sici>
- Furlong MJ, Groden EJ, 2001 Evaluation of synergistic interactions between the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) pathogen *Beauveria bassiana* and the insecticides, imidacloprid and cyromazine. Econ. Entomol., 94(2): 344–356.
- Gillespie, A. T., Bailey A. M., Cobb B., Vilcinskis A. 2000. Fungi as elicitors of insect immune responses. Arch Insect Biochem Physiol. 44: 49-68.
- Hajek, A. E., 1989. Food consumption by *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) larvae infected with *Entomophaga maimaiga* (Zygomycetes: Entomophthorales). Environmental Entom. 18: 723–727.
- Hajek, A. E., McManus, M. L., Delalibera Jr. I., 2007. A review of introductions of pathogens and nematodes for classical biological control of insects and mites. Biol. Con. 41: 1-13.
- Hassanloui, R.T., Pakdel, A.K., Goettel, M. and Mozaffari, J., (2006). Variation in virulence of *Beauveria bassiana* isolates and its relatedness to some morphological characteristics. Biocontrol Science & Technology, 2006, 16(5/6). p.p. 525-534.

- Hilder, V.A., Boulter, D., 1999. Genetic engineering of crop plants for insect resistance—a critical review. *Crop Prot.* 18, 177–191.
- Howe R.W., 1960. The effects of temperature and humidity on the rate of development and the mortality of *Tribolium confusum* Duval. (Coleoptera:Tenebrionidae). *Ann. appl. Biol.*,48 (1960), 363-376.
- Jacques R.P., Morris O.N., 1981.Compatibility of pathogens with other methods of pest control and with different crops, In: Burges H.D., Hussey N.W., (Eds.), *Microbial Control of Insect and Mites*, Academic Press, New York,.
- Jegorov, A., Sedmera, P., Matha, V., Simek, P., Zahradnickova, Landa, Z., Eyal, J.,1994. Beauverolides L and La from *Beauveria tenella* and *Paecilomyces fumosoroseus*. *Phytochemistry.* 37: 1301–1303.
- Kryukov V. Yu., Khodyrev V. P., Yaroslavtseva O. N., Kamenova A. S., Duisembekov B. A., and Glupov V. V., 2009. Synergistic Action of Entomopathogenic Hyphomycetes and the Bacteria *Bacillus thuringiensis* ssp. morrisoni in the Infection of Colorado Potato Beetle *Leptinotarsa decemlineata*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, Vol. 45, No. 5, pp. 511–516.
- Lacey, L.A. and Brooks, W.A. 1997. *Biological techniques series – Manual of techniques in insect pathology*. Academic press, London.
- Lefebvre, A. 1827. Description de divers insects in edits. *Ann. Soc. Linn. Paris* 6, 98.
- Leger, R. J., 2006. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:6647-6652.
- Lewis, L.C., Berry, E.C., Obrycki, J.J., Bing, L.A., 1996. Aptness of insecticides (*Bacillus thuringiensis* and carbofuran) with endophytic *Beauveria bassiana*, in suppressing larval populations of the European corn borer. *Agriculture Ecosystems & Environment* 57, 27–34.
- Lewis, L.C., Bing, L.A., 1991. *Bacillus thuringiensis* Berliner and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin for European corn borer control: program for immediate and season long suppression. *Canadian Entomologist* 123, 387–393.
- Lopez C., Elizaguirre M. & Albajes R. 2003: Courtship and mating behaviour of the Mediterranean corn borer, *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *Spanish J. Agr. Res.* 1: 43–51

- Malvar, R.A., Buton, A., Ordas, B., Santiago, R., 2008. Causes of natural resistance to stem borers in maize. In: Burton, E.N., Williams, P.V. (Eds.), *Crop Protection Research Advances*. Nova Science Publishers, Inc., pp. 57–100.
- McCoy, C. W., Samson, R. A., Boucias, D. G., 1988. Entomogenous fungi. In: Ignoffo CM (ed) *CRC Handbook of Natural Pesticides vol V. Microbial insecticides, part A. Entomogenous protozoa and fungi*. CRC Press, Bocaaton, FL, pp 151–236
- Mietkiewski, R., Gorski, R., 1995. Growth of selected entomopathogenic fungi species and isolates on media containing insecticides. *Acta Mycol.* 30, 27–33.
- Moore, D., Prior, C., 1996. Myco insecticides. In: Upadhyay, R.K., Mukerjee, K.G., Rajak, R.L. (Eds.), *IPM system in Agriculture, Vol. II. Biocontrol in Emerging Biotechnology*. Aditya Books Private Ltd, N. Delhi, pp. 25–56.
- Pevling, R., Weyrich, J., 1992. Effects of neem oil, *B. bassiana* and Dieldrin on non target tenebrionid beetle in desert zone of the Republic of Niger. *Biological control of Locusts and Gras hoppers: Proceedings of the Workshop held at International Institute of Tropical Agriculture: Cotonou, Republic of Nenin, April–May 1991, Wallingford, UK, CABI*, pp. 321–336.
- Quesada-Moraga, Enrique,. Navas – Cortez, Juan A, Maranhao, Elizabeth A. A., Ortiz - urquiza, Almudena, Candido Santiago Alvarez., 2007. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycological Research* III 947 – 966.
- Rehner, S. A., & Buckley, E. (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97: Pages 84-98.
- Riba G., Marcandier S., Richard G., Larget I., 1983. Sensibilité de la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*) (Lep.: Pyralidae) aux hypomycètes entomopathogènes, *Entomophaga*, 28, 55-64.
- Robertson J. L., Preisler H.K., Russel M.R., Savin N.E., 2007. *Pesticide bioassays with arthropods*, second edition, CRC, Boca Raton pp 196.
- Sandner, H., Cichy, D., 1967. Research on the eVectiveness of fungal and bacterial insecticides. *Ekol. Pol. Ser. A* 15, 325–333.
- SAS Institute Inc. 2011. SAS OnlineDoc®. Version 18. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina

- Shahid, A. A., Rao, Q. A., Baskhsh, A. και Husnain, T., 2012. Entomopathogenic fungi as biological controllers: new insights into their virulence and pathogenicity. Arch. Biol. Sci. 64(1): 21-42.
- Sierotzki, H., Camastral, F., Shah, P. A., Aebi, M., Tuor, U., 2000. Biological characteristics of selected *Erynia neoaphidis* isolates. Mycol Res. 104: 213–219.
- Sobek, E.A., Munkvold, G.P., 1999. European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) larvae as vectors of *Fusarium moniliforme*, causing kernel rot and symptom less infection of maize kernels. J. Econ. Entomol. 92, 503–509.
- Thomas, M.B., Watson, E.L., Valverde-Garcia, P., 2003. Mixed infections and insect pathogen interactions. Ecol. Lett. 6, 183–188.
- Van Rensburg JBJ, Van Den Berg J, 1992. Infestation patterns of stalk borers *Busseola fusca* Fuller (Lep.: Noctuidae) and *Chilo partellus* Swinhoe (Lep.: Pyralidae) in sorghum. J Entomol Soc South Afr 55:197–212
- Velasco, P., Revilla, P., Butro' n, B., Orda' s, B., Orda' s, A., Malvar, R.A., 2002. Ear damage of sweet corn inbreds and their hybrids under multiple corn borer infestation. Crop Sci. 42, 724–729.
- Wraight, S. P., Butt, T. M., Galaini-Wraight, S., Allee, L. L., Soper, R. S., Roberts, D.W., 1990. Germination and infection processes of entomophothoralean fungus *Erynia radicans* on the potato leafhopper *Empoasca fabae*. J. Invert. Pathol. 56:157-174.
- Wraight, S. P., Ramos, M. E, 2005. Synergistic interaction between *Beauveria bassiana* and *Bacillus thuringiensis tenebrionis*-based biopesticides applied against field populations of Colorado potato beetle larvae. J. Invertebr. Pathol.90: 139–150.
- Wraight, S.P., Ramos, M.E., 2005. Synergistic interaction between *Beauveria bassiana* - and *Bacillus thuringiensis tenebrionis*-based biopesticides applied against field populations of Colorado potato beetle larvae. J. Invertebr. Pathol. 90, 139–150.
- Xiao-Mu Maa,, Xiao-Xia Liu, Xia Ning, Bo Zhang, Fei Han, Xiu-Min Guan, Yun-Feng Tan Qing-Wen Zhang, 2009. Effects of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and *Beauveria bassiana* on Asiatic corn borer (Lepidoptera: Crambidae). Journal of Invertebrate Pathology 99:123–128
- Xiong, Qi., Xie, Yingping., Zhua, Yougmin., Xuea, Jiaoliang., Lib, Jie., Fanb, Renjun., 2012. Morphological and ultrastructural characterization of *Carposinas asakii* larvae (Lepidoptera: Carposinidae) infected by *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales: Clavicipitaceae). Micron. 44: 303–311

- Zimmermann, G., 1986. The *Galleria* bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil. *J. Appl. Ent.* 102: 213–215.
- Zimmermann, G., 1993. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pestic. Sci.* 37, 375–379.
- Αθανασίου Χ.Γ., και Μπουχέλος Κ.Θ., (2003) Κολεόπτερα αποθηκευμένων δημητριακών και συναφών προϊόντων στην Ελλάδα. 8^ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο, Χαλκίδα 2-5 Νοεμβρίου 1999., σελ. 215.
- Μαντζούκας Σ., 2013. Βιολογικός έλεγχος του Λεπιδόπτερου *Sesamia nonagrioides* L. Σε καλλιέργεια γλυκού σόργου (*Sorghum bicolor* L) .Εργαστηριακή μελέτη της εντομοπαθογόνου δράσης τριών μυκήτων της τάξης Hyrocerales καθώς και μελέτης της ενδοφυτικής και εντομοπαθογόνου συμπεριφοράς τους σε συνθήκες πεδίου. Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Βιολογίας
- Μαντζούκας, Σ., 2008. Έρευνα για την ανεύρεση εντομοπαθογόνων μυκήτων στα εδάφη της Ελλάδας. Διατμηματικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων- ΤΕΙ Ηπείρου.
- Μαντζούκας, Σ., 2012. Διερεύνηση της επίδρασης του εκχυλίσματος κρόκου στην αύξηση εντομοπαθογόνων μυκήτων, με τη μέθοδο των ημικλεκτικών υποστρωμάτων και στην αποτελεσματικότητα τους επί των προνυμφών του εντόμου *Sesamia nonagrioides*. Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών, Πανεπιστημίο Πατρών.
- Μπουχέλος, Κ.Θ., (1996). Έντομα αποθηκευμένων γεωργικών προϊόντων και τροφίμων. Πανεπιστημιακές παραδόσεις Γεωργική; Εντομολογίας. Εκδ. Γ.Π.Α., Αθήνα: 1-6,.
- Πέκας Α. Ειδικό άρθρο Βιολογική καταπολέμηση στη Γεωργία: Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnicade Valencia, Γεωργία - Κτηνοτροφία, τεύχος 7/2009
- Σταμόπουλος. Κ., 1995. Έντομα αποθηκών μεγάλων καλλιεργειών και λαχανικών. Εκδόσεις ΖΗΤΗ. Θεσσαλονίκη. Σταμόπουλος Δ.Κ., 1999. Έντομα αποθηκών και μεγάλων καλλιεργειών και λαχανικών. Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη, σελ.254.4
- Σταμόπουλος Δ.Κ., 2008. Εχθροί αποθηκευμένων προϊόντων, μουσείων και κατοικιών. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος, σελ 237.