



**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΔΥΤΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ

“Μελέτη αλληλεπίδρασης δύο παθογόνων
παραγόντων για την αντιμετώπιση του
κολεοπτέρου *Sitophilus oryzae*”



**Πτυχιακή εργασία της φοιτήτριας
ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗΣ Α.Μ. 11731**

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

Δρ Ειρήνη Καρανασάση

ΑΜΑΛΙΑΔΑ 2017

“Μελέτη αλληλεπίδρασης δύο παθογόνων
παραγόντων για την αντιμετώπιση του
κολεόπτερου *Sitophilus oryzae*”

ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

Πτυχιακή εργασία

Περιεχόμενα

Πρόλογος	5
Περίληψη	6
1. Εισαγωγή	7
1.1. Γενικά	7
1.2 Έντομα και αποθηκευμένο προϊόν	7
1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν το μέγεθος της προσβολής των αποθηκευμένων προϊόντων	8
1.4 Κυριότεροι εντομολογικοί εχθροί αποθηκών	10
ΤΑΞΗ ΛΕΠΙΔΟΠΤΕΡΑ	10
ΤΑΞΗ ΚΟΛΕΟΠΤΕΡΑ	12
1.5 Το έντομο <i>Sitophilus oryzae</i>	15
1.5.1 Ταξινόμική θέση του Εντόμου	15
1.5.2 Περιγραφή του Εντόμου	16
1.5.3 Βιολογία του Εντόμου	16
1.5.4 Ξενιστές- Προσβολές του Εντόμου	17
1.5.5 Αντιμετώπιση του Εντόμου	18
1.5.6 Βιολογική Αντιμετώπιση	18
1.5.7 Εντομοπαθογόνοι μύκητες	21
1.5.8 Εμπορικά μικροβιακά σκευάσματα με βάση μύκητες	25
1.6 Ο μύκητας <i>Beauveria bassiana</i>	26
1.7 Ο μύκητας <i>Isaria fumosorosea</i>	29
1.8 Συνδυασμός εντομοπαθογόνων μικροοργανισμών	30
1.9 Σκοπός Εργασίας	31
2. Υλικά και μέθοδοι	32
2.1. Ζωντανοί Οργανισμοί	32
2.1.1 Το Έντομο <i>Sitophilus oryzae</i>	32
2.1.2 Εντομοπαθογόνοι μικροοργανισμοί	32
2.1.3 Παρασκευή Εναιωρημάτων Εντομοπαθογόνων Μυκήτων	32
2.2 Μελέτη της επίδραση της συνδυαστικής εφαρμογής των εντομοπαθογόνων μυκήτων επί νεαρών ακμαίων του εντόμου	34
2.3 Μαθηματική Μέθοδος προσδιορισμού της αλληλεπίδρασης των παθογόνων	34
2.4 Στατιστική επεξεργασία	35
3. Αποτελέσματα	36
3.1 Στατιστική επεξεργασία	36
4. Συζήτηση	40
5. Βιβλιογραφία	42

Πρόλογος

Η παρούσα πτυχιακή εργασία έλαβε χώρα κατά βάση στο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Δυτικής Ελλάδας, καθώς επίσης και στο Ινστιτούτο Προστασίας Φυτών στην Πάτρα όπου πραγματοποιήθηκαν κάποιες συγκεκριμένες δραστηριότητες.

Με το πέρας της πτυχιακής μου εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους συνέβαλλαν στην ολοκλήρωση της.

Αρχικά τον εισηγητή της πτυχιακής εργασίας Δρ.Ματζούκα Σπυρίδων για την συνεχή καθοδήγηση και επίβλεψη σε κάθε βήμα της πειραματικής διαδικασίας.

Εν συνεχεία θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον πλώνα όλης αυτής της διαδικασίας που δεν είναι άλλος από την αγαπητή επίκουρο καθηγήτρια Ειρήνη Καραναστάση για την πολύτιμη στήριξη και βοήθεια της.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τις συμφοιτήτριες μου Ζήκου Αθανασία, Ρόδη Αναστασία, Γαζέπη Μαρία, Μπέσκου Παναγιώτα και Τριάντη Μαρία για την βοήθεια τους καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Περίληψη

Στη παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η αλληλεπίδραση μεταξύ των εντομοπαθογόνων μυκήτων *Beauveria bassiana* Balsamo (Vuillemin) (Hypocreales: Cordycipitaceae) και *Isaria fumosorosea* (Wize) Brown & Smith (Hypocreales: Clavicipitaceae) σε νεαρά ακμαία του εντόμου *Sitophilus oryzae* (Linnaeus) (Coleoptera: Curculionidae)

Νεαρά ακμαία *Sitophilus oryzae* ψεκάστηκαν με διαλύματα κονιδίων των παραπάνω εντομοπαθογόνων μυκήτων σε συγκεκριμένες δόσεις μεμονωμένα ή σε συνδυασμό. Επίσης, η συνδυασμένη δράση των μικροοργανισμών υπολογίστηκε στο τέλος του πειράματος και βρέθηκε προσθετική σε πέντε συνδυασμούς ενώ σε πέντε συνδυασμούς, η συνδυαστική δράση των παθογόνων βρέθηκε αρνητική και χαρακτηρίζεται ως ανταγωνιστική.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας προσφέρουν ισχυρές ενδείξεις για επιτυχή χρησιμοποίηση ορισμένων στελεχών των εντομοπαθογόνων μυκήτων στον έλεγχο των ακμαίων του εντόμου *S. oryzae*.

1. Εισαγωγή

1.1. Γενικά

Οι ολοένα αυξανόμενες ανάγκες του κόσμου για τρόφιμα, ώθησαν την γεωργία να λάβει μέριμνα για την προστασία της παραγωγής τόσο στον αγρό όσο και κατά την αποθήκευση των προϊόντων.

Με τον όρο αποθήκευση εννοούμε τους «μετασυγκομιστικούς» χειρισμούς που αφορούν την επεξεργασία την βιομηχανοποίηση αλλά και την συσκευασία και μεταφορά των γεωργικών προϊόντων και τροφίμων. Η αποθήκευση γίνεται μέσα σε διάφορους χώρους, στους οποίους λαμβάνουν χώρα όλα τα μετασυγκομιστικά στάδια, δηλαδή τα στάδια μετά την συγκομιδή έως και την τελική διάθεση του προϊόντος στην αγορά.

1.2 Έντομα και αποθηκευμένο προϊόν

Έντομο αποθηκών θεωρείται κάθε είδος εντόμου που προσβάλει και ζημιώνει άμεσα ένα προϊόν και μπορεί να αναπτυχθεί και να αναπαραχθεί σε μία αποθήκη ή χώρο που φιλοξενεί για αρκετό χρονικό διάστημα γεωργικά προϊόντα ή τρόφιμα. Βέβαια στους αποθηκευτικούς χώρους συναντούμε και άλλα έντομα τα οποία δεν τρέφονται με τα αποθηκευμένα προϊόντα αλλά με μύκητες ή και με άλλα έντομα ή αρθρόποδα (αρπακτικά ή παράσιτα). Τέτοια έντομα μπορούν να θεωρηθούν χρήσιμοι δείκτες για προϊόντα που είναι προσβεβλημένα ή βρίσκονται σε κακή κατάσταση αλλά η παρουσία τους και μόνο είναι ικανή να υποβαθμίσει την ποιότητα των αποθηκευμένων προϊόντων. Στις Η.Π.Α. το σιτάρι θεωρείται προσβεβλημένο όταν πληθυσμός δυο ή περισσότερων εντόμων εχθρών, βρεθεί σε 1 κιλό βάρους, αντιπροσωπευτικού δείγματος αποθηκευμένου προϊόντος (Anonymous, 1994).

Τα περισσότερα είδη εντόμων αποθηκών ανήκουν στην τάξη Κολεόπτερα με επόμενη την τάξη Λεπιδόπτερα. Από την τάξη Υμενόπτερα τα περισσότερα έντομα που απαντώνται στους αποθηκευτικούς χώρους ανήκουν στις οικογένειες Ichneumonidae, Braconidae, Pteromalidae και παρασιτούν πληθυσμούς εντόμων αποθηκών. Ελάχιστα είναι τα Ημίπτερα (κυρίως Οικ. Reduviidae και Anthocoridae)

που είναι αρπακτικά διαφόρων ειδών που ζουν στους αποθηκευτικούς χώρους, ενώ ύπαρξη ειδών άλλων τάξεων κρίνεται μάλλον συμπτωματική και σπάνια.

Υπάρχουν επίσης είδη εντόμων όπως τα Κολεόπτερα της οικογένειας Bruchidae, που ενώ είναι εχθροί των καλλιεργειών εντούτοις είναι ικανά να διαχειμάσουν στο ξηρό αποθηκευμένο προϊόν, χρησιμοποιώντας την αποθήκη για να περάσουν στην επόμενη καλλιεργητική περίοδο. Αρκετά από τα έντομα αυτά, με μικρές αλλαγές στις συνήθειες τους, έχουν γίνει γνήσια έντομα αποθηκών.

Τα περισσότερα έντομα που προσβάλλουν αποθηκευμένα γεωργικά προϊόντα και τρόφιμα έχουν ευρεία γεωγραφική εξάπλωση. Η εξάπλωση αυτή παρατηρείται τόσο σε έντομα που έχουν ικανότητα πτήσεως όσο και σε έντομα τα οποία δεν εμφανίζουν την ικανότητα αυτή. Η «μείωση» των αποστάσεων που έχει πραγματοποιηθεί με τα μέσα μαζικής μεταφοράς, καθώς και το διεθνές εμπόριο με την ολοένα αυξανόμενη διακίνηση των προϊόντων επιτρέπουν στα έντομα αποθηκών να μεταφέρονται και να αναπτύσσονται σε περιοχές οι οποίες απέχουν μεγάλες γεωγραφικές αποστάσεις.

1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν το μέγεθος της προσβολής των αποθηκευμένων προϊόντων

Συμπεριφορά και δραστηριότητα των εντόμων

Το μέγεθος της προσβολής ενός αποθηκευμένου προϊόντος επηρεάζεται σε πολύ μεγάλο βαθμό από την δραστηριότητα και συμπεριφορά των εντόμων που τρέφονται και αναπαράγονται στην αποθήκη. Υπάρχουν έντομα που προσβάλλουν αποκλειστικά κακής ποιότητας σπόρους πιθανότατα προσβεβλημένους από άλλα έντομα ή μικροοργανισμούς. Τα έντομα αυτά είναι επιζήμια μόνο όταν πληρούνται οι παραπάνω προϋποθέσεις. Αρκετά έντομα, κατά την διάρκεια του βιολογικού τους κύκλου, προσβάλλουν περισσότερους από έναν καρπούς ενώ άλλα συμπληρώνουν την ανάπτυξη τους μόνο σε έναν καρπό. Στην πρώτη περίπτωση οι ζημιές που αναμένονται λογικά είναι μεγαλύτερες αν και κάθε φορά θα πρέπει να συνυπολογίζουμε την γονιμότητα του εντόμου, τον αριθμό των γενεών που μπορεί να έχει, την ύπαρξη ή μη διαπαύσεως κ.τ.λ.

Καταλληλότητα και μέτρα προστασίας των αποθηκευτικών χώρων

Οι αποθηκευτικοί χώροι θα πρέπει να είναι σωστά σχεδιασμένοι ώστε να μην επιτρέπουν την εύκολη είσοδο και εγκατάσταση εντομολογικών ή άλλων εχθρών. Στα παράθυρα πρέπει να τοποθετείται ψιλή σίτα που θα παρεμποδίζει την είσοδο των εντόμων στο εσωτερικό της αποθήκης, οι πόρτες θα πρέπει να κλείνουν πολύ καλά χωρίς να αφήνουν ανοίγματα και δεν θα πρέπει να υπάρχουν ρωγμές στους τοίχους και στις οροφές. Επίσης στα δάπεδα θα πρέπει να είναι εφικτός ο εύκολος καθαρισμός τους και δεν θα πρέπει να υπάρχουν μέρη που θα προσφέρουν καταφύγιο στα έντομα. Τέλος θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να επιτρέπεται η εύκολη προσπέλαση για καθαρισμό και εφαρμογή εντομοκτόνων ουσιών στις εγκαταστάσεις κλιματισμού, κεντρικής θέρμανσεως και αποχετεύσεως.

Μικροκλίμα των αποθηκευτικών χώρων

Η θερμοκρασία που επικρατεί στον αποθηκευτικό χώρο αλλά και η υγρασία τόσο του περιβάλλοντος χώρου όσο και του αποθηκευμένου προϊόντος, επιδρούν στο μέγεθος των εντομολογικών προσβολών. Ο ρόλος των δύο αυτών παραγόντων είναι καθοριστικός, καθώς επιδρά:

- Στη διάπαυση των εντόμων.
- Στη γονιμότητά τους.
- Στην δραστηριότητά τους.
- Στη διάρκεια του βιολογικού κύκλου τους, προκαλώντας αύξηση ή μείωση του αριθμού γενεών.

Χωροταξική μελέτη της αποθήκης

Θα πρέπει να λαμβάνεται ιδιαίτερη μέριμνα για την εκλογή του χώρου που πρόκειται να φιλοξενήσει τα προς αποθήκευση προϊόντα. Χώροι οι οποίοι γειτονεύουν με πιθανές άλλες εστίες μόλυνσης (π.χ. άλλα εργοστάσια επεξεργασίας φυτικών προϊόντων, αποθήκες, χωματερές κ.λ.π.), εμφανίζουν τις περισσότερες πιθανότητες να μολυνθούν από διάφορα αρθρόποδα και μικροοργανισμούς.

Υγειονομική κατάσταση του προϊόντος πριν την αποθήκευση

Εάν τα προϊόντα είναι ήδη προσβεβλημένα από τον αγρό, ή προσβλήθηκαν κατά την μεταφορά τους στην αποθήκη τότε λογικά το μέγεθος της προσβολής μέσα

στην αποθήκη θα αυξηθεί και τα προϊόντα αυτά θα αποτελέσουν εστίες «μολύνσεως» για τα άλλα προϊόντα που θα εισαχθούν αργότερα.

Ικανότητα πτήσεως των εντόμων

Η ικανότητα ενός εντόμου να πετάει σε μακρινές αποστάσεις, αυξάνει τις πιθανότητες προσβολής αποθηκευμένων προϊόντων που απέχουν μεταξύ τους ικανή απόσταση, όπως επίσης και τη γρήγορη επαναμόλυνση ήδη απεντομομένων προϊόντων.

1.4 Κυριότεροι εντομολογικοί εχθροί αποθηκών

ΤΑΞΗ ΛΕΠΙΔΟΠΤΕΡΑ

Οικογένεια Pyralidae

***Ephestia kuhniela* «Μεσογειακό σκουλήκι των αλεύρων»**

Προσβάλλει άλευρα και σπόρους σιτηρών, όσπρια, ξηρούς καρπούς, πίτουρα γύρη στις κυψέλες των μελισσών κ.α.

***Ephestia cautella* «Σκουλήκι των σύκων, σταφίδας»**

Προσβάλλει κυρίως ξηραινόμενα και ξερά σύκα, άλλα και πολλά άλλα ξηρά φρούτα και καρπούς (σταφίδες, δαμάσκηνα, βερίκοκα, χουρμάδες, φιστίκια, αμύγδαλα) ενώ προσβάλλει λιγότερο το αλεύρι, τα πίτουρα, τα μπισκότα, τη σοκολάτα και τις ζωοτροφές.

***Ephestia elutella* «Σκουλήκι του καπνού ή του κακάο»**

Εκτός από τα καπνόφυλλα προσβάλλει και κακάο, σοκολάτα, αλεύρι, ζυμαρικά, σπόρους σιτηρών και οπώρες, αφυδατωμένα λαχανικά, πλακούντες κ.α

***Plodia interpunctella* «Κοινό σκουλήκι αποθηκών»**

Είναι έντομο πολυφάγο. Εκτός από διάφορα είδη σπόρων και τα προϊόντα τους, προσβάλλει όλα σχεδόν τα είδη ξηρών σπόρων και οπωρών, αποξηραμένες φυτικές και ζωικές ουσίες (βοτανικές και ζωολογικές συλλογές), σκόνη γάλακτος, σοκολάτα, γύρη στις κυψέλες των μελισσών κ.α.

***Pyralis farinalis* «Σκουλήκι των αλεύρων»**

Προσβάλλει κυρίως άλευρα και σπόρους σιτηρών αλλά και διάφορα άλλα φυτικά υλικά και αλλοιωμένα προϊόντα.

***Corcyra cephalonica* «Σκουλήκι του ρυζιού»**

Στην Ελλάδα έχει προκαλέσει σοβαρές ζημιές σε μαύρη κορινθιακή σταφίδα και σουλτανίνα αχρηστεύοντας το αποθηκευμένο προϊόν ενώ διεθνώς αναφέρεται ως εχθρός των σπόρων και αλεύρων του ρυζιού καθώς και αλεύρων άλλων σιτηρών (σίτου, αραβοσίτου).

Οικογένεια Tineidae

***Tinea granella* «Τίνα των σπόρων»**

Εκτός από τους σπόρους σιτηρών είναι δυνατόν να προσβάλλει και σπόρους ψυχανθών, άλευρα, ξηρές οπώρες, ξηρούς καρπούς, τρόφιμα και ζωοτροφές. Σε περιπτώσεις μεγαλύτερης προσβολής, η επιφάνεια των σωρών των σπόρων καλύπτεται από ιστούς μετάξιμων νημάτων και αποτελεί χαρακτηριστικό της προσβολής από το έντομο. Τα προσβεβλημένα προϊόντα, παίρνουν δυσάρεστη οσμή και γεύση.

Οικογένεια Gelechidae

Sitotroga cerealella «Σιτοτρώγα»

Είναι σοβαρός εχθρός των σπόρων όλων των σιτηρών αλλά και μερικών αυτοφυών αγρωστωδών. Δεν δημιουργούνται νήματα στην επιφάνεια των προϊόντων αλλά εκτός από τις απώλειες σε βάρος και βλαστικότητα οι σπόροι αποκτούν δυσάρεστη οσμή και γεύση ενώ το κριθάρι γίνεται και ακατάλληλο για ζυθοποίηση.

ΤΑΞΗ ΚΟΛΕΟΠΤΕΡΑ

Οικογένεια Curculionidae

Sitophilus granarius «Σκαθάρι του σιταριού»

Προσβάλλει κυρίως ξηρούς σπόρους δημητριακών (σιτάρι, ρύζι, βρώμη, κριθάρι, σόργο, σίκαλη, αραβόσιτο). Σπανιότερα προσβάλλει και όσπρια (ρεβίθια).

Sitophilus oryzae «Σκαθάρι του ρυζιού»

Προσβάλλει ρύζι και σπόρους δημητριακών. Μπορεί επίσης να προσβάλλει, αλλά σε μικρότερο βαθμό, αλευρώδη προϊόντα, βαμβακόσπορο, όσπρια, ξηρούς καρπούς, κ.α.

Οικογένεια Tenebrionidae

Tribolium confusum «Σκαθάρι ή ψείρα των αλεύρων»

Είναι σοβαρός εχθρός σε όλα τα είδη σπόρων, (σιτηρά, όσπρια), άλευρα, πίτυρα, ελαιώδεις σπόρους και πλακούντες (ζωοτροφές), μπαχαρικά και μεγάλη ποικιλία ξηρών φυτικών υλών (ρίζες, φρούτα, καρπούς)

***Tribolium castaneum* «Σκούρο σκαθάρι των αλεύρων»**

Οι προσβολές του είναι όμοιες με αυτές του *T. confusum*. Επίσης έχει παρατηρηθεί να θπροσβάλει και βαμβακόσπορο.

***Tenebrio molitor* «Μεγάλο σκαθάρι των αλεύρων»**

Προσβάλει άλευρα πίτυρα, σιτηρά, νεκρά έντομα, και άλλες ζωικές και φυτικές ύλες.

Οικογένεια Ostomidae (= Trogositidae)

***Tenebroides mauritanicus* «Σκαθάρι των σπόρων»**

Η προνύμφη προσβάλει σπόρους σιτηρών ήδη προσβεβλημένους από *Sitophilus* ή *Sitotroga*, άλευρα, πίτυρα, παξιμάδια, βαμβακόσπορο κ.α. Το τέλειο τρέφεται από άλλα έντομα αποθηκών (σαρκοφάγο).

Οικογένεια Cucujidae

***Oryzaephilus surinamensis* «Οδοντωτό σκαθάρι των σπόρων»**

Προσβάλει σπόρους σιτηρών, σταφίδα, είδη διατροφής (ψωμί, ζυμαρικά, μπισκότα, ξηροί καρποί), ελαιούχοι σπόροι, ξηρά όσπρια, κακάο, καφέ, αποξηραμένα φυτά, πάντοτε σε συνεργασία με άλλα επιζήμια σε αυτά έντομα.

***Cryptolestes ferrugineus* «Σιταρόψειρα»**

Προσβάλει σπόρους σιτηρών. Σε αποθήκες υπερέχει σε πληθυσμό ενώ σε αλευρόμυλους υπερέχει το συγγενές *C. turcicus*.

Οικογένεια Bostrychidae

***Rhyzopertha dominica* «Σκαθάρι του ρυζιού»**

Είναι το πολυπληθέστερο έντομο αποθηκών σε αποθηκευμένο ρύζι και σιτάρι στην Ελλάδα. Προσβάλλει επίσης κριθάρι, καλαμπόκι, μπισκότα και άλλα προϊόντα αλεύρου.

Οικογένεια Anobiidae

***Lasioderma serricorne* «Σκαθάρι ή ψείρα του ξηρού καπνού»**

Είναι ο κύριος εχθρός του αποθηκευμένου καπνού (μαζί με το *E. elutella*). Έχει τεράστια ποικιλία τροφικών προτιμήσεων όπως τσιγάρα, πούρα, κακάο, σοκολάτα, μπαχαρικά, ζυμαρικά, αρωματικά φυτά, έντομα και φυτά σε συλλογές, ξηρές σπόρες, ελαιώδεις σπόρους και πλακούντες, χαρούπια, όσπρια, αυτοφυή φυτά στην ύπαιθρο κ.α.

Οικογένεια Nitidulidae

***Carpophilus hemipterus* «Σκαθάρι των ξηρών φρούτων»**

Στις αποθήκες προσβάλλει κυρίως σύκα και αποξηραμένα βερίκοκα, χουρμάδες, σταφίδες, μπανάνες κ.α. Έχει βρεθεί και σε ξηρούς καρπούς, άλευρα, κακάο, τρούφα, σπόρους σιτηρών, αμυλώδη βιομηχανικά προϊόντα κ.α.

Οικογένεια Bruchidae

***Acanthoscelides obtectus* «Βρούχος των φασολιών»**

Προσβάλλει κυρίως φασόλια όλων των ποικιλιών αλλά και σόγια. Ανάλογες προσβολές σε όσπρια προκαλούν τα συγγενή είδη:

Bruchus pisorum κοινώς Βρούχος των μπιζελιών

B. rufimanus κοινώς Βρούχος των κουκιών

B. lentis κοινώς Βρούχος της φακής

Οικογένεια Dermestidae

***Anthrenus museorum* και *A. verbasci* «Σκαθάρια των μουσείων»**

Οι προνύμφες προσβάλλουν συνήθως ζωικές ύλες, νεκρά έντομα, και ζώα σε συλλογές και μουσεία αλλά και μάλλινα, τάπητες, βαμβακερά, δέρμα, και γουναρικά.

***Trogoderma granarium* «Τρωγόδερμα των σπόρων»**

Αντίθετα με τα υπόλοιπα Dermestidae, τρέφεται αποκλειστικά με φυτικές ύλες και είναι καταστρεπτικό στα αποθηκευμένα σιτηρά. Επίσης προσβάλλει ελαιώδεις σπόρους και πλακούντες. Αποτελεί «έντομο καραντίνας» σε πολλές χώρες.

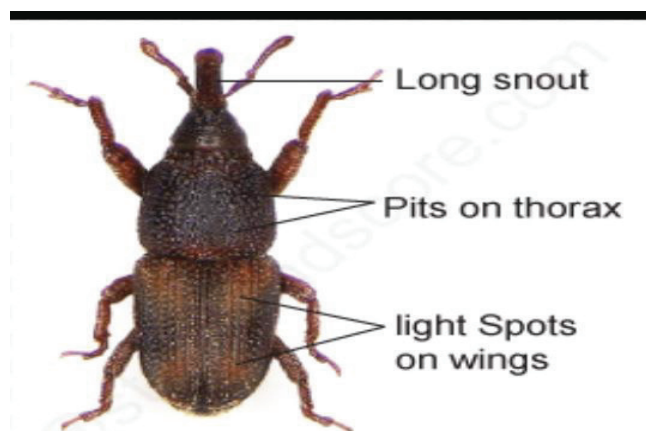
1.5 Το έντομο *Sitophilus oryzae*

1.5.1 Ταξινομική θέση του Εντόμου

<u>Τάξη</u>	<u>Coleoptera</u>
<u>Υπόταξη</u>	<u>Polyphaga</u>
<u>Οικογένεια</u>	<u>Curculionidae</u>
<u>Κοινή ονομασία</u>	<u>Σκαθάρι ρυζιού</u>

1.5.2 Περιγραφή του Εντόμου

Το τέλειο έντομο μοιάζει με το συγγενές του είδος *S. granarius*, από το οποίο ξεχωρίζει ως προς το ότι φέρει οπίσθιο ζεύγος μεμβρανοειδών πτερύγων. Το μήκος του κυμαίνεται στα 2-3 mm, ενώ το χρώμα του είναι κόκκινο-καφέ έως και μαύρο με τέσσερις ανοιχτόχρωμες κηλίδες (υπέρυθρες ή κιτρινωπές) από δυο σε κάθε έλυτρο. Στο προθώρακα τα κοιλώματα είναι πυκνά, κυκλικά ή πολυγωνικά. Η προνύμφη είναι ευκέφαλη, σαρκώδης, άποδη με λευκό χρωματισμό. Μικρή κεφαλή χρώματος καστανού και μήκος της είναι περίπου 2.5 mm.

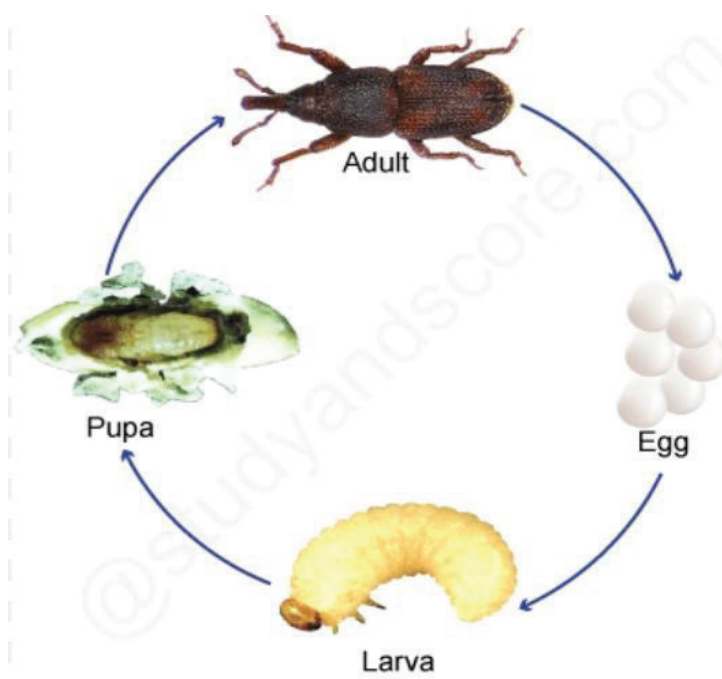


Εικόνα 1. Τα μέρη του σώματος εντόμου *Sitophilus oryzae*
(https://www.google.gr/search?q=sitophilus+oryzae&tbm=isch&source=iu&ictx=1&fir=BgHyh4JpEk9IoM%253A%252CQruK8_OmfsBELM%252C_&usg=__uYwQoFSUZFc6pVbu1aex-aIlCE%3D&sa=X&ved=0ahUKEwi9t_zS6drZAhWBAIoKHdV9Ap0Q_h0IlgEwCw#imgrc=BgHyh4JpEk9IoM:)

1.5.3 Βιολογία του Εντόμου

Τα ακμαία ζουν περίπου τέσσερις με πέντε μήνες. Τα θηλυκά συζευγνούνται αμέσως μετά την έξοδο τους από τους σπόρους και δυο εβδομάδες μετά αρχίζουν να γεννούν τα ωά τους. Ο αριθμός τους κυμαίνεται από 200 έως 400, ενώ η θερμοκρασία του περιβάλλοντος και η σκληρότητα του σπόρου καθορίζουν τον ημερήσιο αριθμό που είναι περίπου 4. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις που μπορούν να εναποθέσουν και περισσότερα με αποτέλεσμα να αναπτυχθούν παραπάνω από μια προνύμφες σε ένα μόνο σπόρο, κυρίως σε δημητριακά και μεγάλους σπόρους, όπως ο αραβόσιτος. Σε θερμά κλίματα μπορούν να ξεπεράσουν τις τέσσερις γενεές κατά έτος. Ο πλήρης βιολογικός τους κύκλος διαρκεί 26 έως 32 ημέρες κατά τους ζεστούς καλοκαιρινούς

μήνες αλλά απαιτείται ένα πολύ μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για την ολοκλήρωση του κατά τη διάρκεια ψυχρότερου καιρού. Οι προνύμφες εκκολάπτονται από τα ωά σε περίπου τρεις ημέρες και παραμένουν στο σπόρο για περίπου 18 ημέρες. Το στάδιο της νύμφης διαρκεί κατά μέσο όρο 6 ημέρες και τα νεαρά ακμαία παραμένουν στο σπόρο για 3 έως 4 ημέρες έως ότου να δημιουργήσουν μια μικρή κυκλική οπή και να εμφανιστούν. Αρέσκεται σε θερμό και σχετικά υγρό περιβάλλον και η ανάπτυξη του είναι δυνατή σε θερμοκρασίες από 15.2°C μέχρι 34°C.



Εικόνα 2. Στάδια βιολογικού κύκλου του εντόμου *Sitophilus oryzae* (https://www.google.gr/search?q=sitophilus+oryzae&tbm=isch&source=iu&ictx=1&fir=BgHyh4JpEk9IoM%253A%252CQruK8_OmfsBELM%252C_&usg=__uYwQoFSUZFpC6pVbu1aex-allCE%3D&sa=X&ved=0ahUKewi9t_zS6drZAhWBAJoKHdV9Ap0Q_h0llgEwCw#imgrc=zEQYMUuYz6NRTM:)

1.5.4 Ξενιστές- Προσβολές του Εντόμου

Προσβάλλει τους σπόρους των σιτηρών όπως σιτάρι, κριθάρι, σίκαλη. Είναι περισσότερο κοσμοπολίτικο είδος από το συγγενές *Sitophilus granarius* και γενικά προσβάλλει τα ίδια προϊόντα με αυτό, όπως επίσης τα όσπρια, τους ξηρούς καρπούς και τον αποθηκευμένο βάμβακα. Ακόμη προκαλούν ζημιές σε μήλα και αχλάδια, και απομύζουν τους χυμούς τους με σκοπό να δημιουργήσουν κοιλότητες και να κρυφτούν μέσα στο καρπό.

1.5.5 Αντιμετώπιση του Εντόμου

Ο έλεγχος των πληθυσμών των εντόμων αποθηκευμένων προϊόντων εξαρτάται κυρίως από τις συνεχείς εφαρμογές υγρών και αέριων εντομοκτόνων. Αν και είναι αποτελεσματικές, η επανειλημμένη χρήση τους για αρκετές δεκαετίες έχει διαταράξει το σύστημα βιολογικού ελέγχου από τους φυσικούς εχθρούς και οδήγησε σε εστίες εντόμων, εκτεταμένη ανάπτυξη αντοχής, ανεπιθύμητες επιδράσεις σε οργανισμούς μη στόχους και προβλήματα περιβάλλοντος και ανθρώπινης υγείας. Τα υποκαπνηστικά όπως το μεθυλοβρωμίδιο και η φωσφίνη εξακολουθούν να είναι τα πιο αποτελεσματικά για τη προστασία από την προσβολή από έντομα αποθηκευμένων τροφίμων, ζωοτροφών και άλλων αγροτικών προϊόντων.

Επιπροσθέτως ορισμένα έντομα αποθηκευμένου προϊόντος έχουν βρεθεί ότι έχουν αναπτύξει αντίσταση στα παραπάνω υποκαπνηστικά. Αυτά τα προβλήματα έχουν επισημάνει την ανάγκη για την ανάπτυξη νέων τύπων επιλεκτικών εναλλακτικών λύσεων καταπολέμησης εντόμων, πέραν των χημικών, που διακρίνονται στις εξής κατηγορίες:

- Μηχανικές
- Φυσικές
- Βιοτεχνολογικές
- Βιολογικές

1.5.6 Βιολογική Αντιμετώπιση

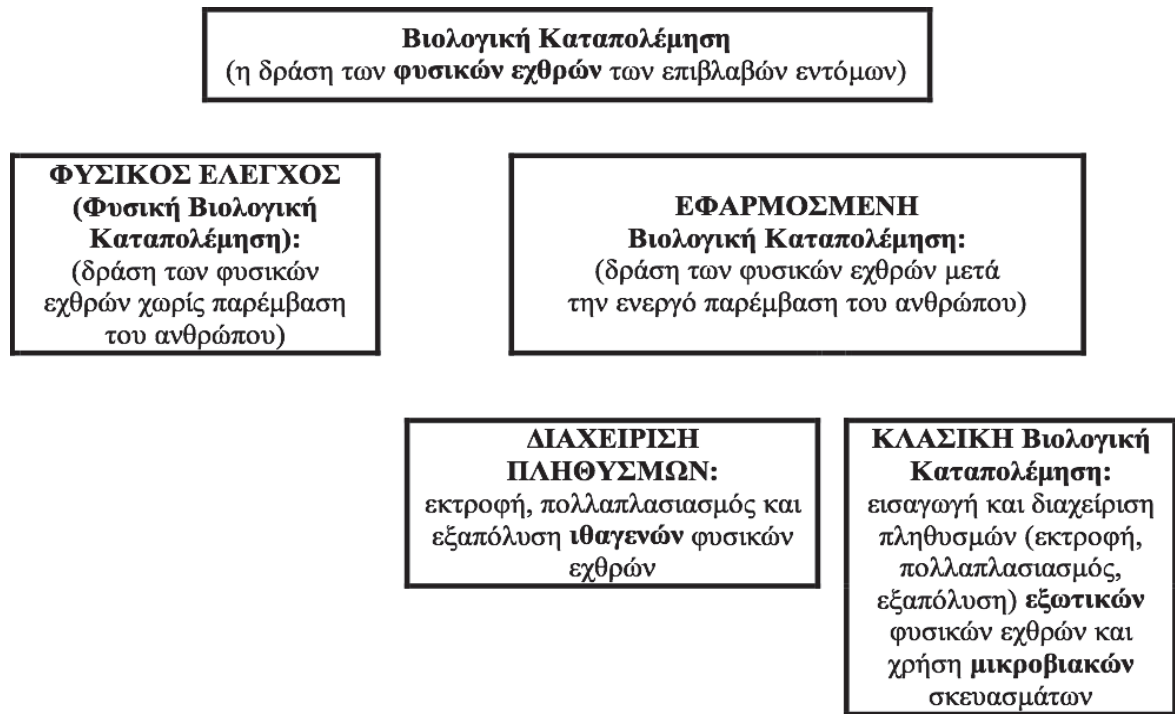
Ο όρος Βιολογική Αντιμετώπιση ή Βιολογική Καταπολέμηση χρησιμοποιείται για να περιγράψει την δράση ζωντανών οργανισμών (παρασιτοειδή, αρπακτικά, παθογόνα) που αποτελούν φυσικούς εχθρούς για διάφορα επιβλαβή έντομα, με στόχο τον περιορισμό του πληθυσμού τους. Περιλαμβάνει την χρήση σαπροφυτικών κυρίως μικροοργανισμών που καταστέλλουν την δραστηριότητα του φυτοπαθογόνου αιτίου, παρεμποδίζουν τη μόλυνση ή περιορίζουν την εκδήλωση μιας ασθένειας, με στόχο την εξασφάλιση της υγείας του φυτού. Η βιολογική αντιμετώπιση των ασθενειών στηρίζεται στις αρχές της φυτοπαθολογίας, της μικροβιολογίας, της εδαφολογίας, της

κυτταρολογίας και φυσιολογίας των φυτών και της βιοχημείας, ενώ παράλληλα αφορά την αλληλεπίδραση του φυτού, του παθογόνου παράγοντα και του φυσικού περιβάλλοντος (Τζάμος, 2007).

Διακρίνεται σε Φυσική Βιολογική Καταπολέμηση, που αναφέρεται στην δράση των φυσικών εχθρών των επιβλαβών εντόμων χωρίς την παρέμβαση του ανθρώπου, και σε Εφαρμοσμένη Βιολογική Καταπολέμηση, που αφορά τη δράση των φυσικών εχθρών των επιβλαβών εντόμων μετά την ενεργό παρέμβαση του ανθρώπου. Η Εφαρμοσμένη Βιολογική Καταπολέμηση με τη σειρά της διακρίνεται σε Διαχείριση πληθυσμών (εκτροφή, πολλαπλασιασμός και εξαπόλυση ιθαγενών φυσικών εχθρών) και σε Κλασική Βιολογική Καταπολέμηση (εισαγωγή και διαχείριση πληθυσμών εξωτικών φυσικών εχθρών και χρήση μικροβιακών σκευασμάτων) (Katsoyannos, 1996; Kontodimas et al., 2004). Στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 2.), συνοψίζονται οι κατηγορίες της βιολογικής καταπολέμησης έτσι όπως περιγράφηκαν από τους Κοντοδήμα και Ανάγνου (2003).

Η βιολογική καταπολέμηση αποτελεί τη σημαντικότερη κατηγορία καταπολέμησης παθογόνων εντόμων και ασθενειών στα πλαίσια της ολοκληρωμένης αντιμετώπισης. Η ολοκληρωμένη αντιμετώπιση αφορά ένα σύστημα αντιμετώπισης εχθρών και ασθενειών των καλλιεργειών που βασίζεται στο συνδυασμό καλλιεργητικών, βιολογικών, βιοτεχνολογικών και χημικών (εκλεκτικών) φυτοπροστατευτικών μέσων, με τέτοιο τρόπο ώστε να επιτευχθεί ο καλύτερος δυνατός έλεγχος. Οι περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς επίσης και η δυναμική των πληθυσμών των εντόμων είναι αυτές που θα υποδείξουν τις κατάλληλες μεθόδους και τεχνικές που πρέπει να χρησιμοποιηθούν στην εκάστοτε περίπτωση.

Ταυτόχρονα, η παραγωγικότητα του μέσου που θα χρησιμοποιηθεί, η ποιότητά του, η οικονομικότητά του και η ασφάλεια του χρήστη, του καταναλωτή και του περιβάλλοντος, είναι κύριες παράμετροι που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά τη διαδικασία επιλογής των κατάλληλων μέσων (Λυκουρέσης, 1995).



Εικόνα 3. Η Βιολογική Καταπολέμηση (Κοντοδήμας και Ανάγνου, 2003).

Σκοπός της ολοκληρωμένης αντιμετώπισης είναι η διατήρηση του πληθυσμού του εχθρού σε επίπεδα τέτοια ώστε να μη δημιουργεί πρόβλημα, ενώ απώτεροι στόχοι είναι η αποφυγή οικονομικής ζημιάς της καλλιέργειας, η προστασία της δημόσιας υγείας, η προστασία του περιβάλλοντος, η μείωση του κόστους παραγωγής και φυσικά η παραγωγή προϊόντων ανώτερης ποιότητας (Λυκουρέσης, 1995).

Δυστυχώς η αντιμετώπιση ήδη υπαρχόντων ασθενειών σε κάποια καλλιέργεια δεν έχει πρακτική σημασία μιας και είναι οικονομικά ασύμφορη και σε αρκετές περιπτώσεις ανέφικτη. Γι' αυτό το λόγο ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί τα τελευταία χρόνια στην έννοια της πρόληψης. Συνδυάζοντας λοιπόν παραδοσιακά στοιχεία αντιμετώπισης μιας ασθένειας με πιο σύγχρονες πληροφορίες, έχουν δημιουργηθεί πιο σύγχρονες προσεγγίσεις ως προς την ολοκληρωμένη αντιμετώπιση μιας ασθένειας (Τζάμος, 2007).

Πιο συγκεκριμένα, οι γενικές αρχές της ολοκληρωμένης αντιμετώπισης των ασθενειών έχουν ως βάση παραδοσιακές αρχές και έννοιες που ισχύουν διαχρονικά. Αρχικό όμως μέλημα πλέον είναι η αποφυγή της ασθένειας μέσω της επιλογής της τοποθεσίας και της εποχής σποράς έτσι ώστε να αποφεύγονται μέρη και περίοδοι όπου επικρατούν δυσμενείς συνθήκες όσον αφορά συγκεκριμένο παθογόνο.

Παράλληλα, η παρεμπόδιση της εισαγωγής ενός παθογόνου σε μια περιοχή και η καταστροφή φυτών που έχουν ήδη μολυνθεί είναι πολύ σημαντικές. Τέλος, η χρήση φυτοπροστατευτικών μεθόδων συμπεριλαμβανομένης και της βιολογικής καταπολέμησης που χρησιμοποιείται πλέον κατά κόρον, είναι απαραίτητη για την προστασία των καλλιργειών (Τζάμος, 2007). Στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 4), παρουσιάζονται αναλυτικά όλες οι κατηγορίες της ολοκληρωμένης βιολογικής αντιμετώπισης των εχθρών των καλλιεργούμενων φυτών.

1.5.7 Εντομοπαθογόνοι μύκητες

Οι μύκητες αυτοί, είναι πολλά υποσχόμενοι μικροοργανισμοί, όσο αφορά τη βιολογική καταπολέμηση, μιας και μέχρι τώρα έχουν ταυτοποιηθεί και απομονωθεί πάνω από 700 είδη εντομοπαθογόνων μυκήτων. Οι μυκητολογικές ασθένειες είναι κοινές και ευρέως διαδεδομένες μεταξύ των εντόμων, ενώ πολύ συχνό είναι το φαινόμενο εντομολογικοί πληθυσμοί να αποδεκατίζονται θεαματικά από επιζωοτίες. Οι απαιτήσεις τους σε υψηλές θερμοκρασίες και η μεγάλη τους εξάρτηση από υψηλή σχετική υγρασία στο περιβάλλον (>85-90%, ώστε να επιτυγχάνεται αποτελεσματική δράση των εντομοπαθογόνων μυκήτων), αιτιολογεί το γεγονός ότι εντομοπαθογόνοι μύκητες συναντιούνται σε έντομα ζώντα σε διαφορετικές κατοικίες όπως φρέσκο νερό, έδαφος, επιφάνεια εδάφους και εναέριες τοποθεσίες (Lacey and Brooks, 1997).

Εντομοπαθογόνοι μύκητες απαντώνται σε όλες τις ταξινομικές κατηγορίες εκτός από τους ανώτερους Βασιδιομύκητες και ορισμένους Hyphomycetes (denatiaceous Hyphomycetes). Μεταξύ τους υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση στο βαθμό μολυσματικότητας. Μπορεί να αποτελούν υποχρεωτικά παθογόνα, ευκαιριακά παθογόνα που προσβάλουν εξασθενημένους ξενιστές, έως και συμβιωτικοί μικροοργανισμοί. Η πλειονότητα τους βρίσκεται στους Entomophthorales (τάξη Zygomycetes) και στην τάξη Hyphomycetes. Οι Entomophthorales χαρακτηρίζονται από υψηλή εξειδίκευση προς τον ξενιστή και μεγάλες πιθανότητες επιζωοτολογίας. Οι Hyphomycetes έχουν μεγαλύτερα φάσμα ξενιστών και αναπτύσσονται ευκολότερα *in vitro* (Lacey and Brooks, 1997; Obernik, 2009). Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 1) παρουσιάζονται οι βασικές τάξεις των μυκήτων που προκαλούν κάποια ασθένεια σε έντομα- εχθρούς των καλλιργειών.

Ουσιαστικά, όλες οι τάξεις των εντόμων είναι ευαίσθητες σε μυκητολογικές

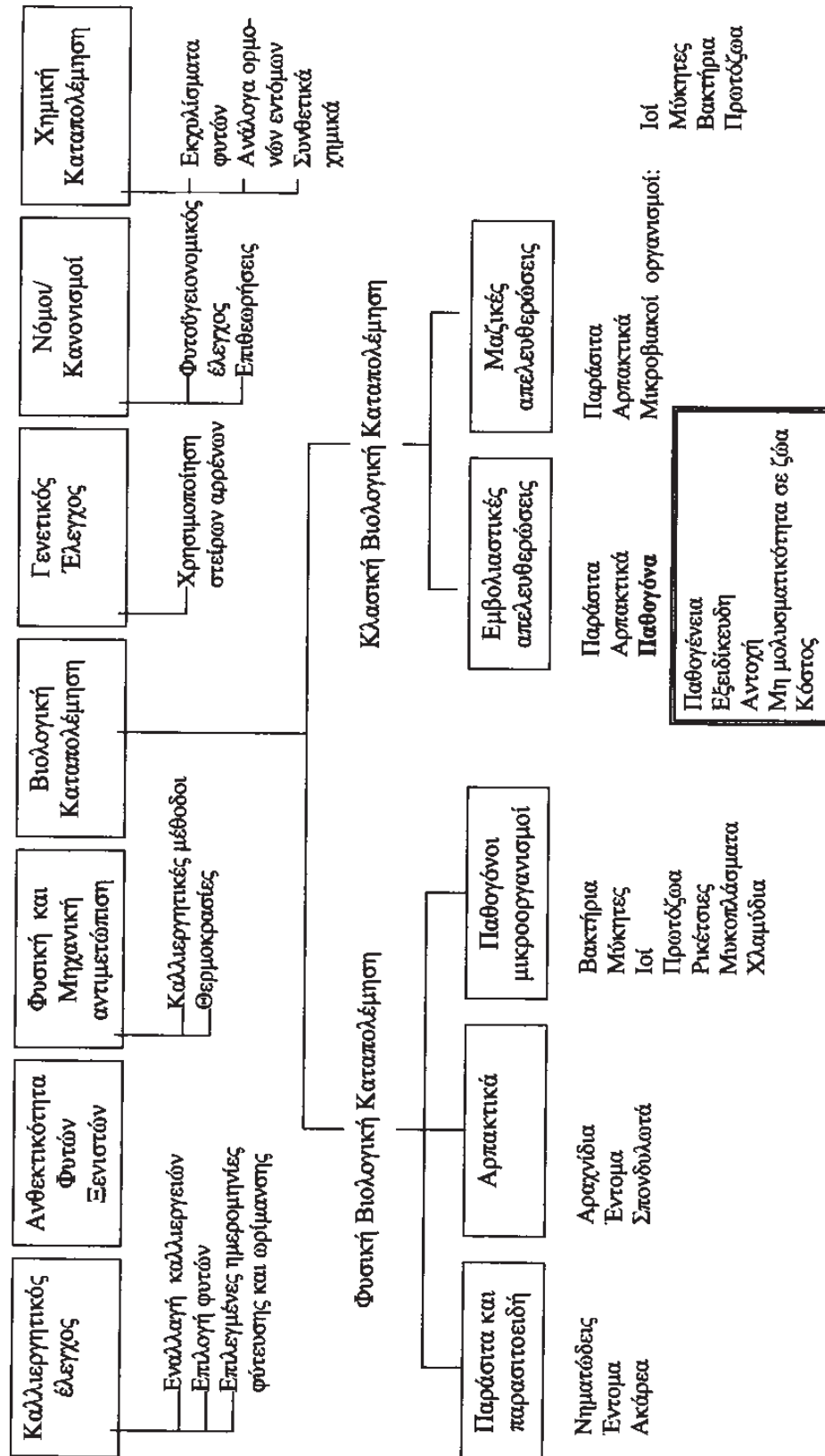
ασθένειες (Lacey and Brooks, 1997). Ειδικά όσο αφορά τα μυζητικά έντομα, οι μύκητες είναι τα σημαντικότερα παθογόνα παράσιτα καθώς λόγω του μυζητικού τρόπου λήψης της τροφής τους, τα παθογόνα βακτήρια δεν μπορούν να εισαχθούν και να προκαλέσουν εντερικά προβλήματα σε αυτά.

Συγκεκριμένα, οι μύκητες προσβάλλουν σε σημαντικό ποσοστό τα Κολεόπτερα, σε αντίθεση με ιολογικές και βακτηριολογικές ασθένειες που είναι σπάνιες μεταξύ των ειδών αυτής της τάξης. Ως επί το πλείστον, πολύ ευπαθή σε μυκητολογικές μολύνσεις, είναι τα Λεπιδόπτερα (προνύμφες), από τα Ημίπτερα (και ειδικότερα από τα Homoptera) είναι οι αφίδες, είδη που ανήκουν στις Οικογένειες Cicadidae και Coccidae, από τα Υμενόπτερα είναι τα Vespoidea, από τα Κολεόπτερα είναι ορισμένα είδη της οικογένειας Scarabeidae και από τα Δίπτερα είναι είδη του γένους Hylemyia καθώς και τα κουνούπια (Lacey and Brooks, 1997; Obernik, 2009).

Η εξειδίκευση ως προς το έντομο-ξενιστή ποικίλει σημαντικά μεταξύ των εντομοπαθογόνων μυκήτων, καθώς είναι πιθανό να σχετίζεται με την φυσιολογική κατάσταση του ξενιστή, με τις ιδιότητες του δερματίου, τις θρεπτικές απαιτήσεις του μύκητα καθώς και με την άμυνα του ξενιστή, σε μερικές περιπτώσεις (Tanada, 1993).

Παράλληλα, υπάρχουν μύκητες που μολύνουν ένα μεγάλο φάσμα ξενιστών και άλλοι που περιορίζονται σε λίγα ή και ένα μόνο είδος εντόμου. Στους εντομοπαθογόνους αυτούς μύκητες, χαρακτηριστικό είναι ότι τα έντομα προσβάλλονται, όχι μόνο στο στάδιο της προνύμφης ή νύμφης, αλλά και στο στάδιο του ακμαίου. Η είσοδος του μύκητα στα έντομα γίνεται δια της στοματικής οδού καθώς και από την επιδερμίδα σε οποιοδήποτε μέρος του σώματος, αρκεί να επικρατεί κατάλληλη υγρασία έτσι ώστε το σπόριο του μύκητα να βλαστήσει (Lacey and Brooks, 1997).

Ολοκληρωμένη Αντιμετώπιση Εχθρών



Εικόνα 4. Η ολοκληρωμένη αντιμετώπιση εχθρών (Κοντοδήμας και Ανάγνου 2003).

Πίνακας 1.Σημαντικότερες τάξεις και είδη εντομοπαθογόνων

Κατηγορίες Εντομοπαθογόνων Μυκήτων	Τάξη	Είδος
Φυτομύκητες	Entomophthorales	<i>Entomophthora</i> spp.
		<i>Zoophthora</i> spp.
Ασκομύκητες	Blastocladales	<i>Erynia</i> spp.
		<i>Massospora cicadina</i>
		<i>Conidiobolus</i> spp.
		<i>Coelomomyces</i> spp.
		<i>Lagenidium giganteum</i>
		<i>Bettsia</i> spp.
		<i>Ascophaera apis</i>
		<i>Myriangium</i> spp.
		<i>Cordyceps</i> spp.
		<i>Torrubiella</i> spp.
Ατελείς Μύκητες	Sphaeriales	<i>Hypocrella</i> spp.
		<i>Beauveria bassiana</i>
		<i>Metarrhizium anisopliae</i>
		<i>Spicaria (=Nomuraea) rileyi</i>
		<i>Paecilomyces</i> spp.
		<i>Hirsutella thompsonii</i>
		<i>Culicomycetes clavosporus</i>
		<i>Verticillium lecanii</i>
		<i>Tolyposcladium cylindrosporum</i>
		<i>Aschersonia aleurodis</i>
Ατελείς Μύκητες	Moniliales	<i>Paecilomyces</i> spp.
		<i>Hirsutella thompsonii</i>
Ατελείς Μύκητες	Sphaeropsidales	<i>Culicomycetes clavosporus</i>
		<i>Verticillium lecanii</i>

Κατά την προσβολή ενός εντόμου από έναν παθογόνο μύκητα, γίνεται προσκόλληση των κονιδίων στον εξωσκελετό του εντόμου, τα οποία βλασταίνουν και στη συνέχεια διεισδύουν στον εξωσκελετό. Αφού ο μύκητας διαπεράσει την επιδερμίδα, εγκαθίσταται εκεί με αποτέλεσμα να αναπτύσσει σιγά-σιγά στην αιμολέμφο και στο εσωτερικό του εντόμου να αναπτύσσεται το μυκήλιο του. Αυτό κατ' επέκταση κατακλύζει όλους τους ιστούς, ενώ ταυτόχρονα παράγονται τοξίνες που επιφέρουν τη θανάτωση του ξενιστή. Στη συνέχεια, το μυκήλιο του μύκητα σε συνδυασμό με επανθίσεις, εμφανίζονται και παρατηρούνται στην επιδερμίδα του εντόμου κονιδιοφόροι από τους οποίους γίνεται η διασπορά του παθογόνου.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι μύκητες εντοπίζονται σε συγκεκριμένα όργανα του ξενιστή τους, όπως για παράδειγμα οι μύκητες *Massospora cicadina* και

Strongwells eacastrans που απαντώνται μόνο στην κοιλιακή χώρα των ενήλικων εντόμων (Poinar, 1978).

Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν πολλά είδη μυκήτων που προκαλούν ασθένειες σε έντομα, μόλις 10 από αυτά χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο κάποιων από αυτών. Αυτό συμβαίνει αφενός γιατί η αποτελεσματικότητά τους εξαρτάται από την ύπαρξη συγκεκριμένων συνθηκών υγρασίας και θερμοκρασίας και αφετέρου επειδή μερικοί μύκητες είναι πολύ απαιτητικοί ως προς την καλλιέργειά τους και παρουσιάζουν δυσκολίες για τη μαζική παραγωγή τους, ενώ όσοι είναι εύκολο να καλλιεργηθούν, εμφανίζουν εξασθένηση ύστερα από μακροχρόνια παραγωγή σε τεχνητά μέσα. Επιπλέον, λόγω έλλειψης γνώσεων σχετικά με τους παράγοντες που επηρεάζουν την τοξικότητά τους. Ενδεχομένως οι τοξίνες που παράγουν μπορεί να είναι επιβλαβείς για τον άνθρωπο και τα ζώα (Lacey and Brooks, 1997; Obernik, 2009).

1.5.8 Εμπορικά μικροβιακά σκευάσματα με βάση μύκητες

Κατά τον Γιαμβριά (1991), κυκλοφορούν λίγα παρασκευάσματα που έχουν ως βάση εντομοπαθογόνους μύκητες. Ένα από αυτά έχει το μύκητα *Beauveria bassiana* ως δραστικό παράγοντα. Ο πολλαπλασιασμός του γίνεται με τη μορφή των βλαστοσπορίων. Παλαιότερα είχε κυκλοφορήσει ένα τέτοιο παρασκεύασμα στις Η.Π.Α από την εταιρία Nutrilite και στη Ρωσία παράγεται με το όνομα BOVERIN. Στην Ελλάδα κυκλοφορεί σήμερα το σκεύασμα Naturalis.

Το 1976, η Abbott Laboratories ανέπτυξε μέθοδο για την παραγωγή βρέξιμης σκόνης με βάση το μύκητα *Hirsutella thompsoni* με μεγάλη περιεκτικότητα σε κονίδια. Την ίδια περίπου εποχή, στις Η.Π.Α, εφάρμοσαν διάφορες μεθόδους για παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα παρασκευασμάτων με βάση το *Nomura earileyi*, το *Entomophthora thaxteri* και στη Ρωσία το *Aschersonia leurodis*. Τελευταία έχει κυκλοφορήσει στο εμπόριο από την Ολλανδική εταιρία Koppert ένα μυκητολογικό παρασκεύασμα το MYCOTAL σε μορφή βρέξιμης σκόνης που έχει ως βάση κονιδιοσπόρια του μύκητα *Verticillium lecanii* και έχει δραστική ικανότητα μεγάλη, εναντίον του εντόμου *Trialeurodes vaporariorum*, του γνωστού αλευρώδη των θερμοκηπίων.

Πολλά από αυτά τα παρασκευάσματα που περιέχουν μύκητες, έχουν χρησιμοποιηθεί στην πράξη με πολύ καλά αποτελέσματα σε διάφορες καλλιέργειες,

ακόμη και για την καταπολέμηση εντόμων υγειονομικής σημασίας. Έτσι, εκτός από το MYCOTAL, αποτελεσματικό εναντίων πολλών αφίδων είναι το VERTALEC με βάση το *V. lecanii*, ενώ για την καταπολέμηση του βοτρυτή στον φυτοπαθολογικό τομέα υπάρχει το βιολογικό σκεύασμα TRICHODEX που περιέχει σπόρια του μύκητα *Trichoderma harzianum* (φυλή T39). Τα τρία αυτά βιολογικά προϊόντα, κυκλοφορούν σήμερα με ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Αν και η βιομηχανική παραγωγή σκευασμάτων με εντομοπαθογόνους μύκητες είναι φτωχή, η παραγωγή από κρατικούς φορείς και Ερευνητικά Ιδρύματα, διαφόρων μυκητολογικών σκευασμάτων για χρήση σε περιορισμένη έκταση, είναι αρκετά πιο σημαντική, καθώς οι μύκητες είναι ικανότατα παθογόνα για τη μείωση των πληθυσμών των επιβλαβών εντόμων καλλιέργειών και η χρησιμοποίησή τους στην πράξη έχει προχωρήσει σε ικανοποιητικό στάδιο.

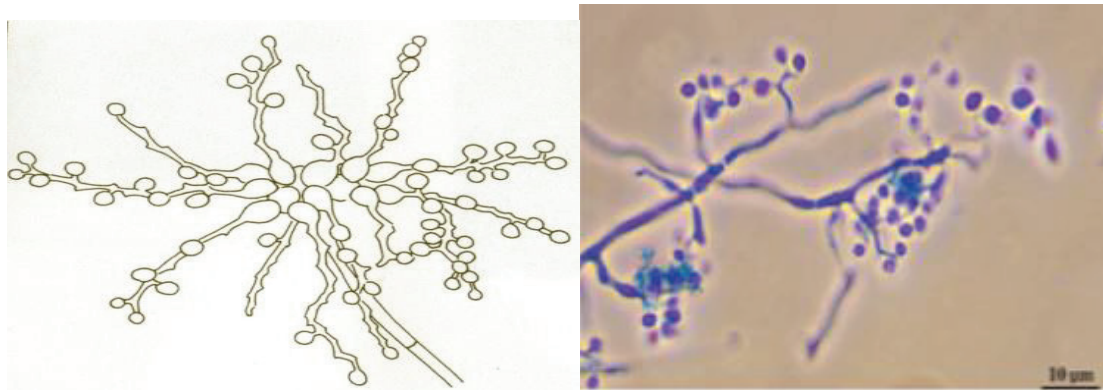
1.6 Ο μύκητας *Beauveria bassiana*

Ο μύκητας *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Moniliales) είναι ευρέως διαδεδομένος στη φύση και έχει την ικανότητα να προσβάλλει πάνω από 200 είδη εντόμων όπως θρίπες, αλευρώδεις, αφίδες, ακάρεα, τερμίτες, οικιακές μύγες, Κολεόπτερα κ.α. Η προέλευση του βιολογικού ελέγχου χρονολογείται τον 19^ο αιώνα, όταν ο Ιταλός επιστήμονας Agostino Bassi αφιέρωσε περισσότερα από 30 έτη μελετώντας την ασθένεια «whitemuscardinie» στο *Bombyx mori* (L) και τελικά απέδειξε ότι ο μύκητας *B. bassiana* είναι το αίτιο της ασθένειας. Ο μύκητας παράγει τρεις τύπους σπορίων: τα λεπτά, μονοκύτταρα σπόρια, γνωστά ως βλαστοσπόρια τα οποία παράγονται σε υγρή καλλιέργεια (Bidochkaetal, 1987), τα κονίδια τα οποία παράγονται σε στερεό υλικό και τα κονίδια τα οποία παράγονται σε υγρή καλλιέργεια.

Όσον αφορά τη βιωσιμότητα και των τριών τύπων του *B. bassiana*, οι Hedegus και συνεργάτες (1991) απέδειξαν ότι η θερμοκρασία -70°C είναι η καλύτερη για αποθήκευση για μεγάλη χρονική περίοδο. Αντίθετα τα κονίδια του *B. bassiana* και άλλων εντομοπαθογόνων μυκήτων χάνουν τη βιωσιμότητα τους όταν αποθηκευτούν σε υψηλές θερμοκρασίες. 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.



Εικόνα 4. Ο μύκητας *Beauveria bassiana* από καλλιέργεια στον ΕΛΓΟ Δήμητρα, Ινστιτούτο Φυτοπροστασίας, Πάτρας.



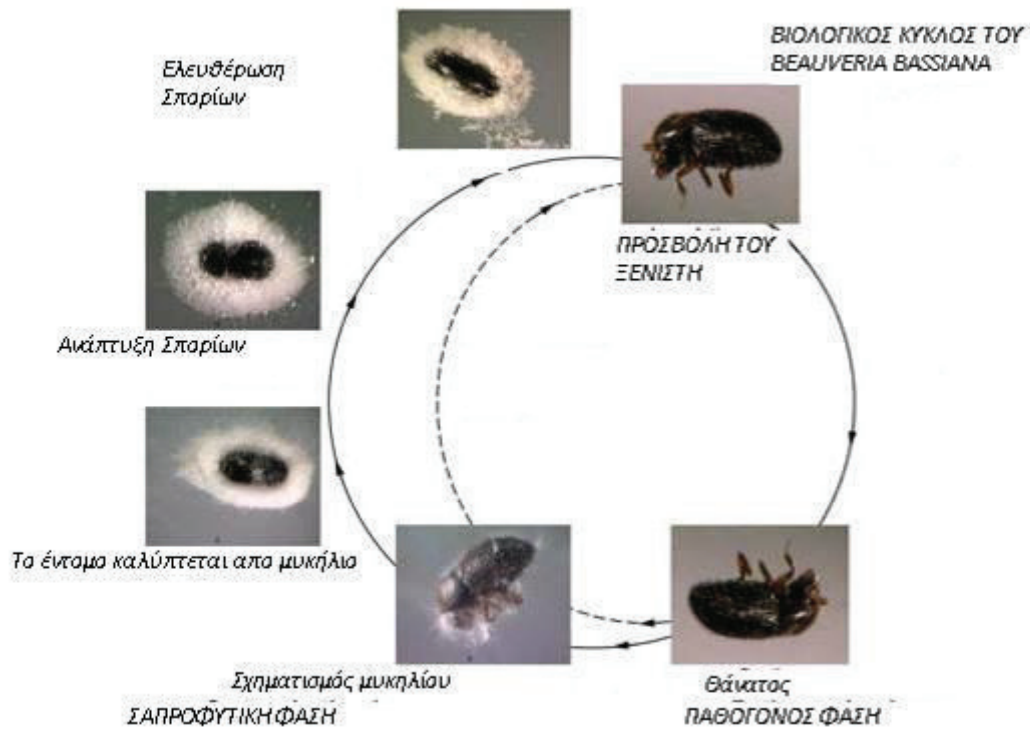
Εικόνα 5. Ο μύκητας *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin

Ο εντομοπαθογόνος αυτός μύκητας εισβάλλει στο σώμα του εντόμου. Τα κονίδια του έρχονται σε επαφή με την επιδερμίδα του εντόμου και αφού βλαστήσουν, διαπερνούν την επιδερμίδα και πολλαπλασιάζονται μέσα στο σώμα του εντόμου. Τα κονίδια του μύκητα είναι μονοκύτταρα, απλοειδή και υδρόφοβα (Rehner & Buckley, 2005). Ο βιολογικός κύκλος ενός εντομοπαθογόνου μύκητα περιλαμβάνει μια σειρά διαδοχικών διαδικασιών, οι οποίες εξαρτώνται από εσωτερικούς και εξωτερικούς παράγοντες. Αυτοί οι παράγοντες, είναι υπεύθυνοι για το αν ο μύκητας θα εισβάλει μέσω της επιδερμίδας ή όχι. Οι διαδικασίες που αναφέρομαι παραπάνω συνοψίζονται στα ακόλουθα βήματα:

- Προσκόλληση των κονιδίων στην επιδερμίδα του ξενιστή
- Δημιουργία βλαστικού σωλήνα
- Διατήρηση της επιδερμίδας

- Παραγωγή ενζύμων για τη διευκόλυνση της εισβολής
- Βλαστική ανάπτυξη στο εσωτερικό του εντόμου
- Χρήση και εγκατάσταση των θρεπτικών
- Παραγωγή ενζύμων και τοξινών για την ανάπτυξη του μύκητα και την αναστολή της άμυνας του ξενιστή
- Παραγωγή εξωτερικών κονιδιοφόρων μετά το θάνατο του εντόμου

Στην Ευρώπη κυκλοφορούν εμπορικά σκευάσματα όπως τα Metab, Naturalis-L, Bio-power, Botanigard κ.α. Ο μύκητας αυτός δεν παρουσιάζει φυτοτοξικότητα ούτε δημιουργεί τοξικότητες σε πτηνά, ζώα και ψάρια (Copping, 2001).



Εικόνα 6. Βιολογικός Κύκλος του Beauveria bassiana.

1.7 Ο μύκητας *Isaria fumosorosea*

Οι μύκητες του είδους *Isaria fumosorosea* (Wize) Brown και Smith (Hydrocreales: Clavicipitaceae), αναφέρονται ως βιολογικοί παράγοντες για τον έλεγχο βλαβερών εντόμων. Το κοινό όνομα με το οποίο αποδίδεται η ασθένεια που προκαλούν οι μύκητες του γένους *Isaria* είναι «pink muscardine» εξαιτίας του ροζ χρώματος κονιδίων που καλύπτουν τα νεκρά έντομα (Εικ. 7).

Τα κονίδια του έρχονται σε επαφή με την επιδερμίδα του εντόμου και αφού βλαστήσουν, διαπερνούν την επιδερμίδα και πολλαπλασιάζονται μέσα στο σώμα του εντόμου και εισέρχονται στην αιμολέμφο.

Οι μύκητες αυτού είδους, ακριβώς όπως το *B. bassiana*, παράγουν κονίδια σε στερεό υπόστρωμα και βλαστοσπόρια σε υγρό υπόστρωμα (Jegorovetal. 1994). Στην Ευρώπη κυκλοφορεί το εμπορικό σκεύασμα PreFeRal με ένδειξη εναντίον του *Trialeurodes vaporariorum* σε τομάτα και αγγούρι. Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην ερευνητική μονάδα USDA-ARS (Illinois) διαπιστώθηκε ότι τα βλαστοσπόρια βλαστάνουν ταχύτερα και σε μεγαλύτερο ποσοστό στην επιδερμίδα του αλευρώδη σε σχέση με τα κονίδια. 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.



Εικόνα 7. Αποικίες του εντομοπαθογόνου μύκητα *I. fumosorosea* σε θρεπτικό μέσο SDA.

1.8 Συνδυασμός εντομοπαθογόνων μικροοργανισμών

Η χρήση ενός εντομοπαθογόνου μύκητα ταυτόχρονα με άλλο παθογόνο μικροοργανισμό έχει ως στόχο την αύξηση της αποτελεσματικότητας και την επιτάχυνση του θανάτου του εντόμου εχθρού. Αυτή η προσέγγιση βασίστηκε πάνω στην υπόθεση ότι το έντομο θα αποδυναμωθεί από την παρουσία του πρώτου παθογόνου με συνέπεια να μολυνθεί πιο εύκολα από το δεύτερο παθογόνο. Με την πάροδο των ετών πραγματοποιήθηκαν πολλές μελέτες για την αλληλεπίδραση των εντομοπαθογόνων μικροοργανισμών, με έμφαση στη σχέση τους με τον ξενιστή και/ή την δυναμική των παθογόνων αυτών. Ωστόσο, η πλειονότητα των μελετών αυτών αφορούσε την σχέση ενός παθογόνου με ένα ξενιστή. Όμως υπάρχουν ενδείξεις σε πλειάδα συστημάτων ξενιστή-παθογόνου πως υφίστανται «μεικτές» μολύνσεις και αυτές περιλαμβάνουν δυο ή περισσότερους παθογόνους παράγοντες (Cox, 2001, Read και Taylor, 2001). Οι «μεικτές» μολύνσεις είναι συνηθισμένες και ίσως να αποτελούν τον κανόνα (Cox, 2001, Read και Taylor, 2001). Για παράδειγμα «μεικτές» μολύνσεις έχουν παρατηρηθεί σε διάφορους ξενιστές όπως θηλαστικά (Behnkeetal, 2001, Cox 2001), πτηνά (Forbesetal, 1999), ερπετά (Lainson, 2002) και ψάρια (Barkeretal, 2002). Δεδομένου ότι τα έντομα απειλούνται από μεγάλο αριθμό παθογόνων ενδεχόμενως να υποδεικνύεται ταυτόχρονη έκθεση σε παθογόνους μικροοργανισμούς (Ishii et al, 2002). Επομένως, οι «μεικτές» μολύνσεις μπορεί να είναι πιθανές και για τα έντομα ξενιστές.

Σε συνδυασμούς παθογόνων μικροοργανισμών ενδέχεται να παρουσιαστούν πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις που έχουν ως παρεπόμενο την αύξηση της αποτελεσματικότητας του ενός ή και των δυο, την μείωση της αποτελεσματικότητας του ενός ή και των δυο, την μείωση του ενός και την αύξηση του άλλου (Cox, 2001). Επίσης, η αλληλεπίδραση μεταξύ των παθογόνων μπορεί να οριστεί είτε σαν θετική είτε σαν αρνητική. Η θετική αλληλεπίδραση μεταφράζεται είτε ως συνέργεια είτε ως προσθετική σχέση μεταξύ τους ενώ η αρνητική αλληλεπίδραση αντιστοιχεί στον ανταγωνισμό των παθογόνων. Μελέτες αναφέρουν ότι η σχέση μεταξύ των παθογόνων ήταν τις περισσότερες φορές προσθετική (Charnley και Collins, 2007). Επομένως «μεικτές» μολύνσεις μπορούν να επιφέρουν δραματικές αλλαγές στη δυναμική του πληθυσμού του ξενιστή κάτι που μέχρι σήμερα δεν έχει λάβει την απαιτούμενη προσοχή.

1.9 Σκοπός Εργασίας

Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες αποτελούν σημαντικό εργαλείο για την αντιμετώπιση των επιβλαβών εντόμων και παρουσιάζουν μεγάλο οικονομικό ενδιαφέρον. Η μελέτη τους ενδεχομένως να δώσει σημαντικά στοιχεία απαραίτητα για τη διαχείριση των εχθρών των αποθηκών. Σκοπός ήταν η μελέτη συνδυασμών των μυκήτων, προφανώς για την ενίσχυση αυτής εναντίον των εντόμων στόχων αλλά και τον προσδιορισμό των αλληλεπιδράσεων τους, επί των νεαρών ακμαίων του εντόμου *S. oryzae*.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Ζωντανοί Οργανισμοί

2.1.1 Το Έντομο *Sitophilus oryzae*

Η εκτροφή του *Sitophilus oryzae* έλαβε χώρα στο ΤΕΙ Δυτικής Ελλάδας στο εργαστήριο και αναπτύχθηκε μέσα σε αποστειρωμένο αλεύρι αναμεμιγμένο με μαγιά. Σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του εντόμου το δωμάτιο βρισκόταν σε σταθερή θερμοκρασία 25°C. Τα έντομα βρισκόντουσαν και αναπτυσσόταν μέσα σε βάζα και πραγματοποιούνταν αραιώσεις, ώστε να αποφευχθεί ο συνωστισμός που θα επηρέαζε την ανάπτυξη και τη πρόσληψη τροφής των προνυμφών. Σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης του εντόμου, τα έντομα βρίσκονταν σε δωμάτιο με σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας 25±1°C, Σ.Υ. 60 – 70% και φωτοπεριόδου 16:8 ώρες Φ:Σ.

2.1.2 Εντομοπαθογόνοι μικροοργανισμοί

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι εντομοπαθογόνοι μύκητες *Beauveria bassiana* Balsamo (Vuillemin) (Hypocreales: Cordycipitaceae και *Isaria fumosorosea* (Wize) Brown & Smith (Hypocreales: Clavicipitaceae) από τη συλλογή του Δρ Σπυρίδωνα Μαντζούκα. Οι απομονώσεις διατηρούνταν σε τρυβλία Petri επί θρεπτικού υλικού SDA (Sabouraud Dextrose Agar, Sigma - Aldrich) σε θερμοκρασίες 5±1°C και ανανεώνονταν κάθε μήνα (Εικ. 3). Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες απομονώθηκαν με την μέθοδο της χρήσης του εντόμου *Galleria mellonella* ως δολώματος (Μέθοδο *Galleria Bait*) (Zimmermann 1986) και με τη μέθοδο των ημιεκλεκτικών υποστρωμάτων.

2.1.3 Παρασκευή Εναιωρημάτων Εντομοπαθογόνων Μυκήτων

Προκειμένου να παρασκευαστούν τα εναιωρήματα για τις ανάγκες των πειραμάτων οι μύκητες καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία Petri 9cm με Sabouraud Dextrose Agar, τα οποία αφέθηκαν να αναπτυχθούν στο σκοτάδι για 15 μέρες στους 25°C±1

και είχαν ασφαλιστεί με Parafilm® για να προστατευτούν από επιμολύνσεις. Συνολικά, 20 μονάδες πενικιλίνη και 40μg στρεπτομυκίνη ή διυδροστρεπτομυκίνη/ml μέσου, προστίθενται στο αποστειρωμένο και λιωμένο μέσο στους 45–50°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 10ml αποστειρωμένου νερού, 2ml αυτού του διαλύματος, προστίθενται σε 1lt αποστειρωμένου μέσου, στους 45–50°C, υπό ασηπτικές συνθήκες (0.2ml/10ml μέσου). Για να παρασκευασθούν οι επιθυμητές συγκεντρώσεις στρεπτομυκίνης στο ίδιο μέσο, διαλύονται 10⁶ μικρογραμμάρια στρεπτομυκίνης σε 10ml αποστειρωμένου νερού. Ένα (1) ml αυτού του διαλύματος προστίθεται σε 9ml απεσταγμένου νερού, για να δώσει ένα διάλυμα, το οποίο να περιέχει 10000μg στρεπτομυκίνης / ml. Στο κάθε λίτρο του μέσου, προστίθενται 4ml αυτού του διαλύματος για να παρατηρηθούν 40μg / ml. (0.4ml για 100ml μέσου). Για να ενυδατωθεί ξανά το μέσο, προστίθενται 65g από το Bacto – Sabouraud Dextrose Agar σε 1000ml κρύου αποστειρωμένου νερού και θερμαίνονται με βράσιμο για να διαλυθεί το μέσο εντελώς. Έπειτα διανέμεται στα σωληνάκια στα μπουκαλάκια κι αποστειρώνεται 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. Τα εναιωρήματα κονιδίων 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 μικρής διατομής- και στη συνέχεια το διάλυμα ομογενοποιήθηκε για 5 λεπτά με την βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα (Goettel και Inglis 1997, Quesada – Moragaetal. 2007). Στην συνέχεια σε οπτικό μικροσκόπιο (400x) χρησιμοποιήθηκε αιματοκυτταρόμετρο 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) υστέρτα από την επώαση τους στο σκοτάδι και μετά το πέρας εικοσιτεσσάρων ωρών.



Εικόνα 8. Ανάπτυξη των εντομοπαθογόνων μυκήτων επί Sabouraud Dextrose Agar (SDA) στο TEI Δυτικής Ελλάδας στο εργαστήριο.

2.2 Μελέτη της επίδραση της συνδυαστικής εφαρμογής των εντομοπαθογόνων μυκήτων επί νεαρών ακμαίων του εντόμου

Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης, τα ακμαία του εντόμου ψεκάστηκαν με την χρήση αποστειρωμένου ψεκαστήρα χειρός, όγκου 50ml. Χρησιμοποιήθηκαν εναιωρήματα κονιδίων με πυκνότητα 10^4 , 10^6 , 10^8 κονίδια/ml για τους εντομοπαθογόνους μύκητες. Τα ακμαία ψεκάστηκαν απευθείας με το εναιώρημα των κονιδίων σε τρυβλίο Petri με 10g αποστειρωμένου σίτου. Η θνησιμότητα των προνυμφών καταγραφόταν καθημερινά για 21 ημέρες. Οι νεκρές προνύμφες απομακρύνθηκαν από τα τρυβλία Petri και αποστειρώθηκαν επιφανειακά για να αποφευχθεί η σαπροφυτική φάση του μύκητα. Στη συνέχεια, οι αποστειρωμένες προνύμφες τοποθετήθηκαν σε τρυβλία Petri που περιείχαν υγρό διηθητικό χαρτί έως ότου εμφανιστεί το μυκήλιο του μύκητα. Για τον καθορισμό της αιτίας θανάτου και τον προσδιορισμό του παθογόνου κάθε νεκρή προνύμφη εξεταζόταν με την βοήθεια στερεοσκοπίου.

2.3 Μαθηματική Μέθοδος προσδιορισμού της αλληλεπίδρασης των παθογόνων

Η αλληλεπίδραση μεταξύ των παθογόνων υπολογίστηκε από τον τύπο των Robertson και Preisler: $PE = P_0 + (1 - P_0) * (P_1) + (1 - P_0) * (1 - P_1) * (P_2)$ όπου: PE η αναμενόμενη θνησιμότητα από συνδυασμό των δυο παθογόνων, P0 η θνησιμότητα

του μάρτυρα, P1 η θνησιμότητα του πρώτου παθογόνου και P2 η θνησιμότητα του δευτέρου παθογόνου. Η κατανομή προσδιορίστηκε από τον μαθηματικό τύπο χ^2 : $\chi^2 = (L0 - LE)^2 / LE + (D0 - DE)^2 / DE$ όπου: L0 ο αριθμός των ζωντανών προνυμφών που παρατηρήθηκε, D0 ο αριθμός των νεκρών προνυμφών που παρατηρήθηκε, LE ο αριθμός των αναμενόμενων ζωντανών προνυμφών και DE ο αριθμός των αναμενόμενων νεκρών προνυμφών. Ο μαθηματικός τύπος χρησιμοποιήθηκε για να ελέγξουμε την υπόθεση ανεξάρτητη - ταυτόχρονη σχέση (df=1, P=0.05). Αν $\chi^2 < 3.84$, η σχέση ορίζεται ως προσθετική. Αν $\chi^2 > 3.84$ και η θνησιμότητα που παρατηρήσαμε είναι μεγαλύτερη από την αναμενόμενη, η σχέση ορίζεται ως συνεργιστική. Αντίθετα αν $\chi^2 > 3.84$ και η θνησιμότητα που παρατηρήσαμε είναι μικρότερη από την αναμενόμενη, η σχέση ορίζεται ως ανταγωνιστική. Η παραπάνω μαθηματική φόρμουλα χρησιμοποιήθηκε για να υπολογιστεί η αλληλεπίδραση των παθογόνων μετά από οκτώ, δεκατρείς και δεκαέξι ημέρες (Mantzoukas et al, 2013).

2.4 Στατιστική επεξεργασία

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

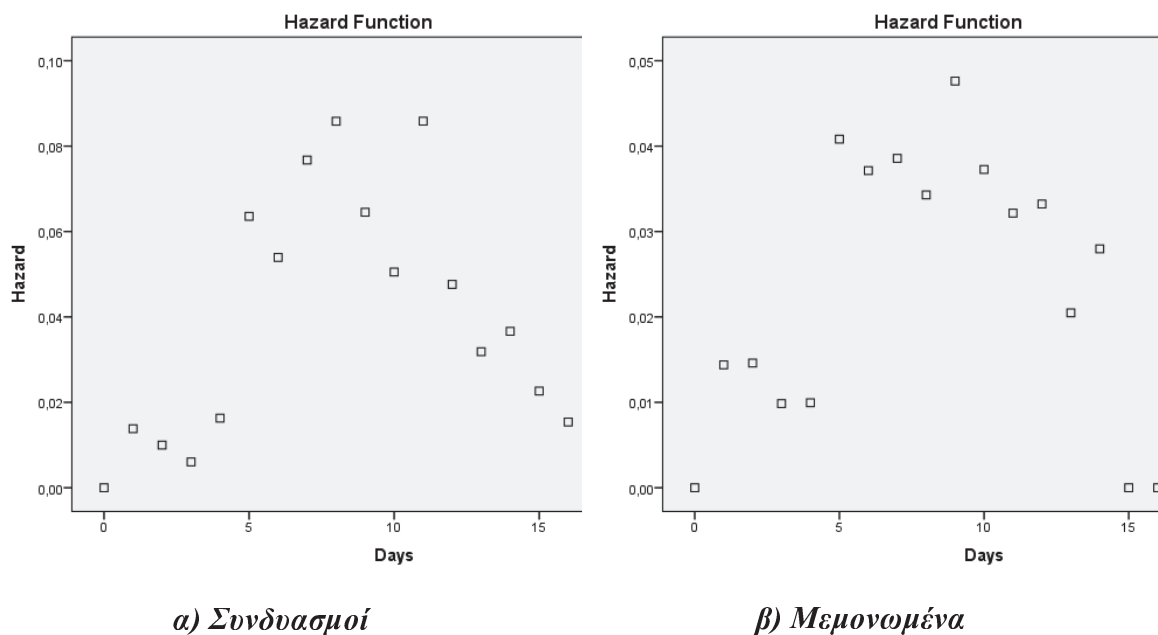
Τύπος του Abbott για την αποτελεσματικότητα:

$$\text{αποτελεσματικότητα} = \left[1 - \left(\frac{\text{τελικός πληθυσμός στην επέμβαση}}{\text{αρχικός πληθυσμός στην επέμβαση}} \times \frac{\text{αρχικός πληθυσμός στο μάρτυρα}}{\text{τελικός πληθυσμός στο μάρτυρα}} \right) \times 100 \right]$$

3. Αποτελέσματα

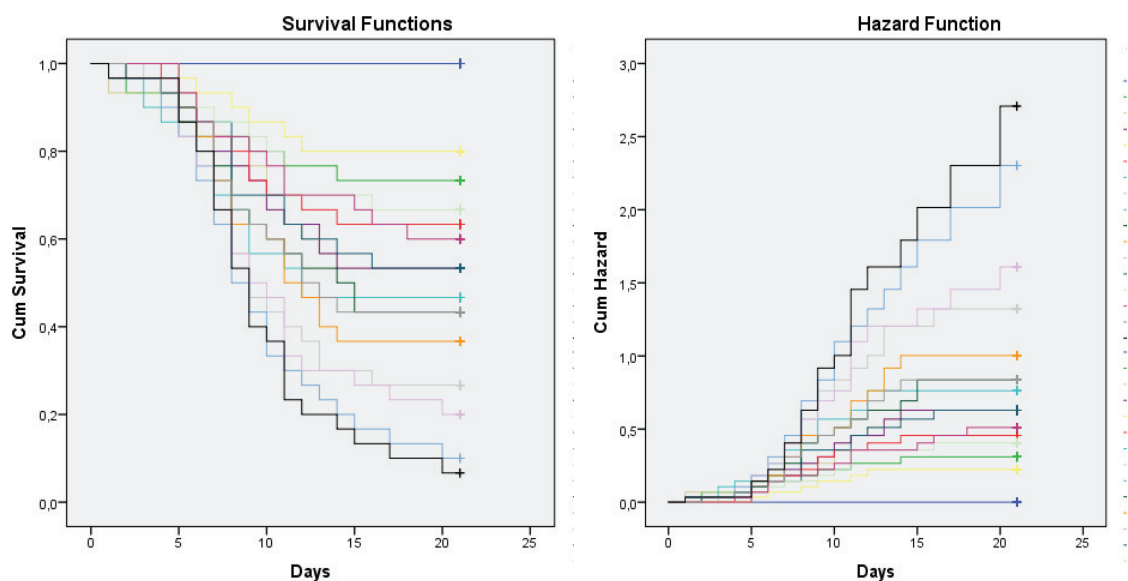
3.1 Στατιστική επεξεργασία

Μελέτη της επίδρασης της συνδυαστικής εφαρμογής των εντομοπαθογόνων μυκήτων *B. bassiana* και *I. fumosorosea* επί των ακμαίων του εντόμου.



Διάγραμμα 1. Καμπύλες τοξικότητας ανά μέρα των παθογόνων (Kaplan-Meier) επί ακμαίων εντόμου *S. oryzae* μετά από την μεμονωμένη και συνδυασμένη δράση των παθογόνων σε εργαστηριακές συνθήκες (25 °C, RH 70%) (n=30)

Η ανάλυση επιβίωσης Kaplan-Meier (Breslow Generalized Wilcoxon test) για τις συνδυαστικές δόσεις, υποδεικνύει ότι ο μέσος συνολικός χρόνος επιβίωσης για τα ακμαία Lt50 ήταν 11 ± 0.7 ημέρες και Lt75 ήταν 7 ± 0.3 (Chi-Square: 3.153, df=1, P=.076) (Διαγρ 1.) για τους συνδυασμούς των εντομοπαθογόνων μυκήτων. Η ανάλυση επιβίωσης Kaplan-Meier (Breslow Generalized Wilcoxon test) για τις μεμονωμένες δόσεις, υποδεικνύει ότι ο μέσος συνολικός χρόνος επιβίωσης Lt75 για τα ακμαία ήταν 9 ± 0.9 ημέρες (Chi-Square: 1.296, df=1, P=.255) (Διαγρ 1.). Με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης Kaplan-Meier, επιλέχθηκε ο χρόνος λήξης των μετρήσεων μας για τον υπολογισμό των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των παθογόνων.



Διάγραμμα2. Καμπύλες επιβίωσης και τοξικότητας (Kaplan-Meier) των ακμαίων του εντόμου *S. oryzae* μετά από την μεμονωμένη και συνδυασμένη δράση των παθογόνων σε εργαστηριακές συνθήκες (25 °C, RH 70%) (n=30) (Breslow Generalized Wilcoxon test) (1: Μάρτυρας, 2: Bb 10⁴, 3: Bb 10⁶, 4: Bb 10⁸, 5: If 10⁴, 6: If 10⁶, 7: If 10⁸, c1: Bb-If 10⁸ -10⁴, c2: If-Bb 10⁶ -10⁶, c3: Bb-If 10⁴ -10⁸, c4: If-Bb 10⁸ -10⁶, c5: Bb-If 10⁶ -10⁸, c6: If-Bb 10⁴ -10⁴, c7: Bb-If 10⁴ -10⁴, c8: Bb-If 10⁶ -10⁶, c9: If-Bb 10⁸ -10⁸, c10: Bb-If 10⁸ -10⁸)

Στο Διάγραμμα 2 παρατηρούμε την θνησιμότητα εκφρασμένη ως Επιβίωση και Τοξικότητα όπου η επίδραση του συνδυασμού c9 (0.15 CumSurvival, 2.65CumHazard, 21 ημέρες) ήταν μεγαλύτερη Αντίθετα, η επίδραση του συνδυασμού c6 (0.7CumSurvival, 0.4CumHazard, 21 ημέρες) ήταν μικρότερη. Στο Πίνακα 2 παρουσιάζεται ο μέσος χρόνος επιβίωσης των ακμαίων του εντόμου ανά χειρισμό. Ο μέσος χρόνος επιβίωσης των ακμαίων στους συνδυασμούς με μικρότερο για τους c9 και c10 ενώ με τον μεγαλύτερο χρόνο επιβίωσης ήταν οι συνδυασμοί c6 και c7. Ο μέσος χρόνος επιβίωσης των ακμαίων στις μεμονωμένες δόσεις ήταν ο μικρότερος για την δόση 7 ενώ ο μεγαλύτερος για την δόση 5. Ο συνολικός μέσος χρόνος επιβίωσης ήταν για του συνδυασμούς 13 ημέρες και για τις μεμονωμένες δόσεις 16 ημέρες. Με βάση τις παραπάνω συνθήκες, τα σημεία που επιλέχθηκαν ήταν εικοστή πρώτη ημέρα όπου και σε όλες τις περιπτώσεις η αλληλεπίδραση των παθογόνων ήταν προσθετική (Πιν.3.).

Μέσος χρόνος επιβίωσης

Συνδυασμοί	Υπολογισμένο	Std. Error	Κατώτερο	Ανώτερο	Μεμονωμένα	Υπολογι			
						σμένο	Std. Error	Κατώτερο	Ανώτερο
c1	11,733	1,128	9,522	13,945	2	17,200	1,215	14,818	19,582
c10	10,100	,979	8,181	12,019	3	15,067	1,254	12,608	17,525
c2	13,967	1,233	11,549	16,384	4	15,200	1,208	12,833	17,567
c3	13,267	1,154	11,005	15,528	5	18,500	,935	16,667	20,333
c4	11,333	1,110	9,158	13,509	6	16,300	1,172	14,003	18,597
c5	15,200	1,230	12,790	17,610	7	13,567	1,334	10,952	16,181
c6	17,033	1,081	14,915	19,151	Overall	15,972	,501	14,990	16,955
c7	16,567	1,107	14,396	18,737					
c8	13,800	1,233	11,383	16,217					
c9	9,933	,872	8,225	11,642					
Overall	13,293	,379	12,550	14,037					

Πίνακας 2. Ο μέσος χρόνος επιβίωσης των ακμαίων του εντόμου ανά χειρισμό στους 25οC (n=30)(Kaplan-Meier)(BreslowGeneralizedWilcoxontest)(σε επίπεδο σημαντικότητας 95%). (2: Bb 104, 3: Bb 106, 4: Bb 108, 5: If 104,6: If 106, 7: If 108, c1: Bb-If 108 -104, c2: If-Bb 106 -106, c3: Bb-If 104 -108,c4: If-Bb 108 -106, c5: Bb-If 106 -108, c6:If-Bb 104 -104, c7: Bb-If 104 -104, c8: Bb-If 106 -106, c9: If-Bb 108 -108, c10: Bb-If 108 -108)

Πυκνότητα		Θνησιμότητα (%)		χ^2 (1 df, P=0.05)	Αλληλδραση
Χειρισμοί					
<i>B. bassiana</i>	<i>I. fumosorosea</i>	Παρατηρήθηκε	Αναμενόμενη*		
10 ⁸	10 ⁴	70	65,78	-0,05	Π
10 ⁶	10 ⁶	56	66,22	0.03	Π
10 ⁴	10 ⁸	64	64,22	-0.07	Π
10 ⁶	10 ⁶	57	66,22	0.13	Π
10 ⁸	10 ⁸	93	78,22	-0.4	Π
10 ⁸	10 ⁸	90	78,22	-0.5	Π
10 ⁴	10 ⁴	34	43,78	-0.04	Π
10 ⁸	10 ⁶	58	70,44	-0.12	Π
10 ⁶	10 ⁸	74	82,14	1.11	Π
10 ⁴	10 ⁴	37	43,78	-0.07	Π

Πίνακας 3. Αλληλεπιδράσεις των εντομοπαθολογικών μυκήτων *B. bassiana* (Bb) και *I. fumosorosea* (Mr) επί προνυμφών του ακμαίων των ακμαίων του εντόμου *S. oryzae*, σε διάφορους συνδυασμούς πυκνοτήτων στους 25°C. (A= Ανταγωνιστική, Σ= Συνεργιστική, Π= Προσθετική) (n=30). *Η αναμενόμενη θνησιμότητα υπολογίστηκε σύμφωνα με τους Robertson και Preisler (Mantzoukasetal. 2013)

4. Συζήτηση

Πολλές μελέτες αναφέρουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών παθογόνων στους ίδιους ξενιστές (Lewis et al, 1996, Baueretal, 1998, Thomas et al, 2003, Wright and Ramos, 2005, Raymond et al, 2006, Xiao – MuMa et al, 2008). Οι Pevling και Weyrich (1992), Mietkiewski και Gorski (1995) αναφέρουν ότι οι εντομοπαθογόνοι μύκητες *B. bassiana* και *M. robertsii* όταν χρησιμοποιηθούν ταυτόχρονα με άλλο παθογόνο παράγοντα εμφανίζουν άλλοτε συνέργεια άλλοτε ανταγωνισμό και άλλοτε ουδέτερη αλληλεπίδραση. Ομοίως οι Dutt και Balasubramanian (2002) αναφέρουν ότι με κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες ο εντομοπαθογόνος μύκητας *B. bassiana* συνδυαζόμενος με το εμπορικό σκεύασμα endosulfan καθίσταται σημαντικά πιο αποτελεσματικός στον έλεγχο του λεπιδόπτερου *Plutellaxylostella*. Οι Daykar και συνεργάτες (2000) αναφέρουν ότι ο συνδυασμός των εντομοπαθογόνων μύκητων *B. bassiana* και *M. robertsi* με εμπορικό σκεύασμα αύξησε το ποσοστό θνησιμότητας σε σχέση με την θνησιμότητα που προκαλούν όταν αυτά χρησιμοποιούνται μεμονωμένα. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν οι Quintela και McCoy (1997) όταν χρησιμοποίησαν τους *B. bassiana* και *M. robertsii* σε συνδυασμό με υπό-τοξικές δόσεις του εμπορικού σκευάσματος imidacloprid εναντίον του κολεοπτέρου *Diaprepes abbreviates* καθώς και οι Purwar και Sachan (2004) για το έλεγχο της αφίδας *Lipahis erysimi*. Οι Lewis και Bing (2002) αναφέρουν ότι η χρήση του εντομοπαθογόνου μύκητα *B. bassiana* σε συνδυασμό με το εντομοπαθογόνο βακτήριο *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* μείωσε τον πληθυσμό του λεπιδοπτέρου *Ostrinia nubilalis*. Επίσης οι Lewis και Bing (1991) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η εφαρμογή του *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* σε συνδυασμό με τον εντομοπαθογόνο μύκητα *B. bassiana* εμφανίζουν ανεξάρτητη μεταξύ τους δράση. Στο ίδιο συμπέρασμα οδηγήθηκαν οι Costa και συνεργάτες (2001), οι οποίοι δεν παρατήρησαν κάποιας μορφής συνέργεια μεταξύ του *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* και του *B. bassiana* όταν αυτοί εφαρμόστηκαν σε προνύμφες του κολεοπτέρου *Leptinotarsa decemlineata*. Αντίθετα, πιθανή συνέργεια μεταξύ των δύο παθογόνων παραγόντων αναφέρουν οι Xiao – MuMaetal (2008) όταν τα παθογόνα εφαρμόζονται σε συνδυασμό ακολουθώντας την ίδια μέθοδο.

Στην παρούσα μελέτη, οι συνδυασμοί των εντομοπαθογόνων μύκητων *B. bassiana* και *I. fumosorosea* απέδειξαν αυξημένη θνησιμότητα σε σχέση με την

χρήση των παθογόνων μεμονωμένα. Διαπιστώθηκε θετική αλληλεπίδραση μεταξύ των παθογόνων μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν, με της παρακάτω συγκεκριμένες παρατηρήσεις.

Στις τέλος του πειράματος, οι συνδυασμοί εμφάνισαν προσθετική αλληλεπίδραση σε πέντε συνδυασμούς, η οποία θα μπορούσε θεωρηθεί ως μια θετική σχέση μεταξύ των παθογόνων παραγόντων που χρησιμοποιήθηκαν ενώ πέντε συνδυασμοί εμφάνισαν αρνητική αλληλεπίδραση. Οι Driver and Milner επίσης αναφέρουν ότι η ταυτόχρονη χρήση του μικροσποριδίου *Paranosema locustae* Canning και του μύκητα *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* εναντίον τις ακρίδας της ερήμου *Schistocerca gregaria* Forskål είχε ως αποτέλεσμα οι προνύμφες της ακρίδας να πεθαίνουν νωρίτερα από ότι οι προνύμφες που εφαρμόστηκε μόνο ένας εντομοπαθογόνος μικροοργανισμός (Tounou et al, 2008). Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε ότι οι δυο εντομοπαθογόνοι μικροοργανισμοί εμφάνισαν προσθετική αλληλεπίδραση, ενώ στις υψηλότερες συγκεντρώσεις η αλληλεπίδραση ήταν συνεργιστική (Tounou et al. 2008). Οι Sandner και Cichy (1967) εφάρμοσαν ένα μίγμα *B. thuringiensis* subsp *kurstaki* και *B. bassiana* εναντίον προνυμφών του σκώρου της Μεσογείου και βάση των αποτελεσμάτων αναφέρουν ότι οι δύο εντομοπαθογόνοι μικροοργανισμοί ενήργησαν αυτοτελώς. Οι Wright και Ramos (2005) αναφέρουν συνεργιστική αλληλεπίδραση μεταξύ *B. bassiana* strain GHA και *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* όταν εφαρμόστηκαν σε συνδυασμό εναντίον της προνύμφης του κολεοπτέρου *Leptinotarsa decemlineata*.

Γενική παρατήρηση είναι ότι η θνησιμότητα των εντόμων παρουσιάζει αύξηση του ποσοστού της όταν χρησιμοποιούνται περισσότερα τους ενός παθογόνα (Jacques et al, 1981). Τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο συνδυασμός των εντομοπαθογόνων μύκητων μπορεί να αυξήσει την θνησιμότητα των ακμαίων του κολεοπτέρου *S. oryzae*. Έτσι εφαρμόζοντας δύο μικροοργανισμούς εντομοπαθογόνων ταυτόχρονα προσφέρεται μια αξιόπιστη μέθοδος ελέγχου του που θα μπορούσε να είναι πιο αποτελεσματική από τη χρήση ενός μόνο παθογόνου. Οι πληροφορίες αυτές μπορεί να φανούν ιδιαίτερα χρήσιμες στο μέλλον για τον έλεγχο του εντόμου και εφόσον αξιοποιηθούν κατάλληλα μέσα από ολοκληρωμένα προγράμματα διαχείρισης εντόμων.

5. Βιβλιογραφία

- 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.
- Anagnou-Veroniki, M., Kontodimas, D. C., Chaleplidi, S., Georgiadou, A.G και Menti, H., 2005. Laboratory evaluation of microbial control products on the Mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae). *IOBC/WPRS Bulletin*. 28(3):169-172.
- Anonymous, 1979 Distribution Maps of Pests. Commonwealth Agricultural Bureau, London, UK.
- Bauer, L.S. και Nordin, G.L., 1998. Nutritional physiology of the eastern spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* and interactions with dietary nitrogen. *Oecologia*. 77: 44-50.
- Bidochka, M.J., Khachatourians, G.G., 1990. Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *J. Inv. Pathol*. 56: 362-370.
- Copping, L.G., 2001. *The BioPesticide manual, Second edition*. British crop protection council, U.K., p: XIIV-XIVII, 3-154, 161-3, 494-6. Cornell Extension Service. Retrieved on 2006-12-14.
- Costa, S. D., Barbercheck, M. E., Kennedy, G. G., 2001. Mortality of Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) after sublethal stress with the CRYIIIA deltaendotoxin of *Bacillus thuringiensis* and subsequent exposure to *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol*. 77:173–179.
- Goettel, M.S. και Inglis, G.D., 1997. Fungi: Hyphomycetes. *Manual of Techniques in Insect Pathology* (ed. L.A. Lacey), pp. 213–249. Academic Press, San Diego, CA.

- 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.
- Katsoyannos, P., 1996. *Integrated Insect Pest Management for Citrus in Northern Mediterranean Countries*. Benaki Phytopathological Institute. pp 110.
- Lacey, L.A. και Brooks, W.A. 1997. *Biological techniques series – Manual of techniques in insect pathology*. Academic press, London.
- 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.
- Marannino, P., Santiago-Alvarez, C., De Lillo, E. και Quesada-Moraga, E., 2006. A New Bioassay Method Reveals Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against Early Stages of *Capnodis tenebrionis* (Coleoptera; Buprestidae), *Journal of Invertebrate Pathology*. 93: 210-213.
- Pingel, R.L., Lewis, L.C., 1996. The fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in a corn ecosystem: its effect on the insect predator *Coleomegilla maculata* De Geer. *Biological Control*. 6: 137–141.
- Quintela, E.D., McCoy, C.W., 1997. Pathogenicity enhancement of *M. anisopliae* and *B. bassiana* to first instars of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) with sublethal doses of imidacloprid. *Environ. Entomol.* 26: 1173–1182.
- Rehner, S. A., Buckley, E. P., 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-a sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps teleomorphs*. *Mycologia*. 97: 84–98.

- Tanada, Y., 1993. *Epizootiology of infectious diseases*, In: Insect Pathology, Ed: Steinhaus E, Academic press, Inc, USA. p: 461-468.
- Thomas, M.B., Read, A.F., 2007a. Can fungal biopesticides control malaria? *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 377-383.
- Vasiliauskas, R., Menkis, A., Finlay, R. D., Stenlid, J., 2007. Wood-decay fungi in fine living roots of conifer seedlings. *New Phytologist* 174: 441–446.
- 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.
- Zimmermann, G., 1986. The *Galleria* bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil. *J. Appl. Ent.* 102: 213–215.
- Αθανασιάδης, Χ., 2017. Έντομα αποθηκών και μέθοδοι αντιμετώπισης τους. Πτυχιακή Εργασία, Ανώτατο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Κρήτης, Τμήμα θερμοκηπιακών καλλιεργειών και ανθοκομίας
- Ανδρέου, Σ., 2010. Εργαστηριακή αξιολόγηση απομονώσεων εντομοπαθογόνων μυκήτων για την αντιμετώπιση εντομολογικών εχθρών . Πτυχιακή Εργασία, Ανώτατο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Καλαμάτας
- Καβαλλιεράτου, Ε., 2015. Μελέτη εντομοκτόνου δράσεως του chlorfenapyr κατά των *Tribolium confusum*, *Rhyzopertha dominica* και *Sitophilus oryzae*. Πτυχιακή Εργασία, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Καλαμάτας
- Κατσιαντώνη, Χ., 2010. Αξιολόγηση εντομοπαθογόνων μυκήτων για την αντιμετώπιση της ευδεμίδας της αμπέλου *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). Πτυχιακή Εργασία.
- Κρεμμυδιώτης, Δ, 2011. Εντομοπαθογόνοι μύκητες ως ενδόφυτα για την αντιμετώπιση εντομολογικών εχθρών Πτυχιακή Μελέτη, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Καλαμάτας

- Λυκουρέσης, 1995. *Ολοκληρωμένη αντιμετώπιση εντόμων –εχθρών καλλιεργειών*. Πανεπιστημιακές παραδόσεις. Γεωπονικό πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, σελ. 121.
- Μανεσιώτη, Θ., 2007. Επίδραση διαφορετικών τεχνικών προσθήκης της γης διατομών σε αποθηκευμένα δημητριακά στην αποτελεσματικότητα τους κατά των ακμαίων *Rhyzopertha dominica* (F) . (Coleoptera: Tenebrionidae) και *Sitophilus oryzae*. (L) (Coleoptera: Curculionidae. Πτυχιακή Εργασία, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Καλαμάτας, Τμήμα Θερμοκηπιακών Καλλιεργειών και Ανθοκομίας
- Μαντζούκας Σ., 2013. Βιολογικός έλεγχος του Λεπιδόπτερου *Sesamia nonagrioides* L. σε καλλιέργεια γλυκού σόργου (*Sorghum bicolor* L) . Εργαστηριακή μελέτη της εντομοπαθογόνου δράσης τριων 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 αποτελεσματικότητά τους επί των προνυμφών του εντόμου *Sesamia nonagrioides*. Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών, Πανεπιστήμιο Πατρών.
- Μηράτη, Ε., 2006. Εντομολογικά προβλήματα και τρόποι αντιμετώπισης αυτών σε χώρους αποθήκευσης τροφίμων στην Ελλάδα. Πτυχιακή Εργασία, Ανώτατο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Ηρακλείου, Τμήμα φυτικής παραγωγής.
- Μπουχέλος, Κ.θ., 2005. Έντομα αποθηκευμένων γεωργικών προϊόντων και τροφίμων. Πανεπιστημιακές παραδόσεις, Γ.Π.Α.
- Πετρολέκα, Χ., 2013. Μελέτη εντομοκτόνου δράσεως του chlorantraniliprole κατά των *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae), *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae), *Tribolium confusum* Jasquelin du Val (Coleoptera:

Tenebrionidae). Πτυχιακή Εργασία, Ανώτατο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Καλαμάτας, Τμήμα Βιολογικών Θερμοκηπιακών Καλλιεργειών και Ανθοκομίας Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Μεσολογίου, Τμήμα Θερμοκηπιακών Σπουδών και Ανθοκομίας

