



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ - Τ.Ε.Ι ΗΠΕΙΡΟΥ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΑΓΡΟΧΗΜΕΙΑ & ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ»

**Έρευνα για την ανίχνευση εντομοπαθογόνων μυκήτων
στα εδάφη της Ελλάδος**

**Σπυρίδων Δ. Μαντζούκας
Τεχνολόγος Γεωπόνος
Ιωάννινα 2008**





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ - Τ.Ε.Ι ΗΠΕΙΡΟΥ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΑΓΡΟΧΗΜΕΙΑ & ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ»

**Έρευνα για την ανίχνευση εντομοπαθογόνων μυκήτων
στα εδάφη της Ελλάδος**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Δρ Γεώργιος Πατακιούτας

Ιωάννινα 2008



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	5
Εισαγωγή.....	
1.1. Γενικά	6
1.2. Ιστορική Καταγραφή.....	7
1.3. Η ολοκληρωμένη αντιμετώπιση.....	10
1.4. Η βιολογική αντιμετώπιση.....	12
1.4.1. Φυσιικοί εχθροί των επιβλαβών εντόμων.....	13
1.4.2. Εντομοπαθογόνοι ιοί	14
1.4.3. Εντομοπαθογόνα βακτήρια	17
1.4.4. Εντομοπαθογόνοι νηματώδεις	19
1.4.5 Εντομοπαθογόνα πρωτόζωα	21
1.4.6 Εντομοπαθογόνες ρικέτσιες.....	23
1.5. Οι μύκητες ως εντομοπαθογόνοι μικροοργανισμοί	24
1.5.1. Εμπορικά μικροβιακά σκευάσματα με βάση μύκητες.....	27
1.5.2. Ο μύκητας <i>Verticillium lecanii</i>	29
1.5.3. Ο μύκητας <i>Beauveria bassiana</i>	30
1.5.4. Ο Μύκητας <i>Metarhizium anisopliae</i>	32
1.6. Πειράματα στην Ελλάδα.....	34
2. Υλικά και μέθοδοι.....	
2.1. Απομόνωση Εντομοπαθογόνων Μυκήτων.....	35
2.2 . Το Sabouraud Dextrose Agar (SDA).....	39
3. Αποτελέσματα.....	
3.1 Επισκόπηση στην Πολωνία.....	41
3.2 Επισκόπηση στην Ελλάδα.....	47
3.3 Αποτελέσματα της δολωματικής μεθόδου και της μεθόδου των ημικλεκτικών υποστρωμάτων	52



4.Συζήτηση.....	62
5.Συμπεράσματα.....	63
6. Βιβλιογραφία.....	64



Πρόλογος

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Παθολογίας Εντόμων του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, την επιβλέποντα της μεταπτυχιακής αυτής διατριβής Δρ Πατακιούτα Γεώργιο, Επικουρού Καθηγητή του τμήματος Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τόπιου της Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας του Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Ηπείρου για την σωστή καθοδήγηση της και επίβλεψη της εργασίας αυτής.

Ευχαριστίες απευθύνω στα μέλη της εξεταστικής επιτροπής για την παρουσία τους και την οποιαδήποτε συμβουλή τους.

Ευχαριστώ πολύ για την πολύτιμη βοήθεια τον Ερευνητή Δ του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Παθολογίας Εντόμων Δρ Δημήτρη Κοντοδήμα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Διεύθυνση του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου και όλο το προσωπικό για την διάθεση των χώρων, του εργαστηριακού εξοπλισμού, καθώς και την ανθρώπινη και επιστημονική αντιμετώπιση με την οποία με περιέβαλαν.

Η διατριβή αυτή αφιερώνεται στην γυναίκα μου, την Θεανώ για την υπομονή της και στους γονείς μου για την υποστηρίξή τους



Περίληψη

Η παρούσα εργασία έγινε στο πλαίσιο σχετικού ερευνητικού προγράμματος με τίτλο «Χρήση εντομοπαθογόνων μυκήτων για την αντιμετώπιση αρθροπόδων εχθρών των καλλιεργειών» (Γ.Γ.Ε.Τ Διακρατική συνεργασία Ελλάδος – Πολωνίας).

Σκοπός του προγράμματος, για την Ελληνική πλευρά, ήταν η ανεύρεση εντομοπαθογόνων μυκήτων σε διάφορες περιοχές της χώρας μας και στη συνέχεια η έρευνα για την δυνατότητα της χρήσης τους ως παράγοντες Βιολογικής αντιμετώπισης.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε δυο μεθόδους για τον προσδιορισμό των εντομοπαθογόνων μυκήτων. Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες απομονώθηκαν με την μέθοδο της χρήσης ως δολώματος του εντόμου *Galleria mellonella* (*Galleria Bait Method*) (Zimmermann 1986) και με τη μέθοδο των ημικλεκτικών υποστρωμάτων (Strasser et al. 1996).

Τα αποτελέσματα μας κρίνονται ικανοποιητικά, 8 είδη εντομοπαθογόνων μυκήτων βρέθηκαν ως παθογόνα σε διαφορετικά αρθρόποδα(κυρίως έντομα και ακάρεα). Επίσης βρέθηκαν τρία είδη της τάξης Entomophthorales (το *Erynia conica*, *Pandora neoaphidis* και *Conidiobolus* sp.) τα οποία (εκτός από *Pandora neoaphidis*) καταγράφηκαν για πρώτη φορά στην Ελλάδα. Επιπλέον σύνολικά 5 εντομοπαθογόνα είδη από την τάξη Hyphomycetales βρέθηκαν στα έντομα και τα άκαρεα. Το *B. bassiana* βρέθηκε σε όλους τα οικοσυστήματα.

Ιδιαίτερα σημαντική ήταν η πρώτη καταγραφή στην Ελλάδα του *Hirsutella thompsonii* στο *A. hystrix* και του *Lecanicillium cf. psalliotae* σε Collembola. Επιπροσθέτως Τέσσερα είδη μυκήτων: *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *I. fumosorosea* και *Conidiobolus* sp. απομονώθηκαν από δείγματα εδάφους που προήλθαν από διαφορετικά οικοσυστήματα στην Ελλάδα.



ABSTRACT

The present work became in the frame of relative inquiring program titled "Use of entomopathogenic fungus for the confrontation of arthropods and enemies of cultures" (G.G.E.T Inter-country collaboration Greece of - Poland).

Aim of program, for the Greek side, was the recovery of entomopathogenic fungi in various regions of country our and afterwards research for the possibility of their use as factors of Biological confrontation.

In the present study we used two methods for the determination of entomopathogenic fungi. The entomopathogenic fungi were isolated with the method of use as bait of insect *Galleria mellonella* (Galleria Bait Method) (Zimmermann 1986) and the selective medium method adapted to determine density of entomopathogenic fungi in the soil (Strasser et al. 1996). Our results are judged satisfactorily, 8 species of entomopathogenic fungi were found as pathogenic in different arthropods (mainly insects and mites). Three entomophthoralean species: *Erynia conica*, *Pandora neoaphidis* and *Conidiobolus* sp. were found and except *P. neoaphidis* was recorded first time from Greece. In total 5 fungal species from Hyphomycetales were found on insects and mites. From among entomopathogenic Hyphomycetes *B. bassiana* was found in all investigated habitats.

Especially interesting is the first record in Greece of *Hirsutella thompsonii* on *A. hystrix* and *Lecanicillium cf. psalliotae* on *Collembola*. Four Fungal species: *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *I. fumosorosea* and *Conidiobolus* sp. were isolated from the soil of different habitats in Greece



1.Εισαγωγή

1.1 Γενικά

Τα σημερινά επίπεδα ανταγωνισμού επιβάλλουν την ανάγκη αξιοποίησης κάθε δυνατού συγκριτικού πλεονεκτήματος για τη διατήρηση και αύξηση της ανταγωνιστικότητας των εγχώριων παραγόμενων αγροτικών προϊόντων. Η εντατικοποίηση των καλλιεργειών έχει οδηγήσει στην αύξηση της χρήσης των χημικών φυτοφαρμάκων. Αυτό έχει ως συνέπεια προβλήματα ρύπανσης του περιβάλλοντος αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις και την παρουσία υπολειμμάτων στο τελικό προϊόν. Τόσο η διεθνής όσο και η Ευρωπαϊκή τάση σήμερα είναι να μειωθεί η χρήση φυτοφαρμάκων τόσο για την προστασία του περιβάλλοντος όσο και για την προστασία του καταναλωτή. Ιδιαίτερη βαρύτητα για τη χώρα μας έχει η σημασία που δίνει η Ευρωπαϊκή Ένωση για την επίτευξη του στόχου της μείωσης της χρήσης φυτοφαρμάκων.

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιεί εκτεταμένη έρευνα για την ανεύρεση και καταγραφή εντομοπαθογόνων μικροοργανισμών σε διάφορα οικοσυστήματα. Το κομμάτι αυτό είναι ένα τμήμα μίας γενικότερης μελέτης με στόχο την ανάδειξη της σημασίας των εντομοπαθογόνων οργανισμών ως παράγοντες αντιμετώπισης των εντόμων εχθρών καλλιεργειών. Τελικός στόχος της μελέτης αυτής είναι η ανεύρεση εναλλακτικών προς τη χημική, μέθοδος αντιμετώπισης των εχθρών ώστε να είναι δυνατή η μείωση χρήσης των φυτοφαρμάκων για την προστασία του περιβάλλοντος.

Η ανάδειξη των παραγόντων αυτών ως πιθανά εργαλεία για την αντιμετώπιση των εντόμων θα έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της χρήσης φυτοφαρμάκων και συνεπώς την ελάττωση των δυσμενών επιδράσεων αυτών τόσο στο περιβάλλον όσο και στον άνθρωπο. Επιπλέον, ο περιορισμός της χρήσης των φυτοφαρμάκων ίσως συμβάλει στη διατήρηση ή και αύξηση της βιοποικιλότητας σε αγροτικά οικοσυστήματα.



Διάφορα είδη εντομοπαθογόνων μυκήτων έχουν χρησιμοποιηθεί εναντίον διαφόρων εντόμων σε ποικίλα αγροοικοσυστήματα και έχουν επιδείξει εξαιρετικά επίπεδα ελέγχου. Αρκετά είδη μυκήτων έχουν αναφερθεί ως άριστο παράγοντες αντιμετώπισης επιζήμιων εντόμων εχθρών στη καλλιέργειες, όπως οι *Beauveria bassiana* και *Raecilomyces fumosoroseus*. Αυτά τα δύο είδη μυκήτων πρόσφατα πήραν άδεια χρήσης σε διάφορες χώρες εναντίων διαφόρων ειδών εντόμων που απαντώνται σε θερμοκήπια όπως αφίδες, θρίπες, τετράνυχτοι.

Η όλη προσπάθεια εντάσσεται στο πλαίσιο της **Ολοκληρωμένης Αντιμετώπισης Εχθρών (Integrated pest management IPM)** (Εικόνα 1.3.1.) που είναι η μέθοδος καταπολέμησης εχθρών που χρησιμοποιείται πλέον στη φυτοπροστασία. Τα τελευταία χρόνια αναζητήθηκαν γενικά στη φυτοπροστασία νέες μέθοδοι αντιμετώπισης με έμφαση στη χρήση βιολογικών μέσων (όπως φυσικών εχθρών, μικροβιακών παραγόντων, φυσικών ουσιών) (Αναγνου et al. 2003a,b). Η χρήση φυσικών εχθρών ή μικροβιακών παραγόντων για τον έλεγχο των εχθρών των καλλιεργειών ονομάζεται Βιολογική Αντιμετώπιση (ή Βιολογική Καταπολέμηση).

1.2 Ιστορική Καταγραφή

Η πρώτη αναφορά για αντιμετώπιση εχθρών εμφανίστηκε το 950 π.Χ. στην Αρχαία Ελλάδα όπως αναφέρει ο Όμηρος στο έργο του «Ομηρικοί Ύμνοι», όπου χρησιμοποιούσαν θειούχα σκευάσματα ως μια αποτελεσματική μέθοδο καταπολέμησης των ζωικών εχθρών (DeBach, 1974). Κατόπιν ο Ρωμαίος Cato ο λογοκριτής, το 200 π.Χ. συνέστησε ψεκασμούς με πετρέλαιο για τον έλεγχο των εντόμων εχθρών.

Όμως η πρώτη καταγεγραμμένη εφαρμογή της Βιολογικής Αντιμετώπισης πραγματοποιήθηκε στην Κίνα, το 300 μ.Χ. όπου επιστρατεύτηκαν μυρμήγκια θηρευτές του γένους *Oecophylla smaragdina* για τον έλεγχο των εχθρών των εσπεριδοειδών. Επίσης το 1500 μ.Χ. οι αγρότες

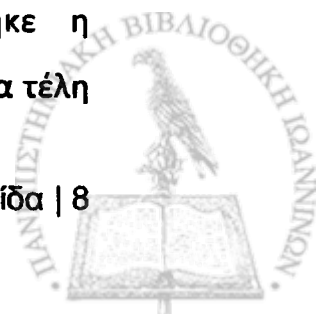


και φυσιολογικές εκείνης της εποχής παρατήρησαν ειδή *Coccinellidae* και ιδιαίτερα το αρπακτικό *Cycloneda munda* L. αλλά και μεγάλα σκαθάρια του εδάφους, του γένους *Carabidae*, να τρέφονται με άλλα εντόμα. (Jahn et al., 2001)

Το 1758, ο Ληναίος ιδρύει το διωνυμικό σύστημα ονοματολογίας και με αυτόν τον τρόπο περιέγραψε πάρα πολλά έντομα θηρευτές και ήταν εκείνος που 1763 χρησιμοποιώντας το ψευδώνυμο C.N. Nelin συνέστησε την συλλογή και εξαπόλυση *Carabidae*, *Coccinellidae*, *Chrysopidae* και *Aphidiidae* ως σημαντικό παράγοντα επιτυχίας για τον ορθό έλεγχο των ζωικών εχθρών των καλλιεργειών. (Jahn et al., 2001)

Στις αρχές του 19ου αιώνα εμφανίστηκαν τα πρώτα συγγράμματα αφιερωμένα εξ ολοκλήρου στην Βιολογική Αντιμετώπιση και τον έλεγχο των εντόμων εχθρών. Το 1874, στην Ζηλανδία, έγινε η πρώτη διεθνής παρουσίαση του αρπακτικού *Coccinella undecimpunctata* L. Η μεγάλη χρησιμότητα της Βιολογικής αντιμετώπισης φάνηκε το 1878 στην Γαλλία όπου καταπολεμήθηκε με επιτυχία την αμερικάνικη αφίδα *Viteus vitifoliae* Fitch με την απελευθέρωση του παρασιτοειδούς *Tyroglyphus phylloxerae* (DeBach, 1971) . Ο Leconte (1884) συνέστησε χρήση παθογόνων ουσιών για τον έλεγχο των εντόμων – εχθρών. Στα τέλη του 19ου αιώνα και συγκεκριμένα το 1888, στην Αμερική, χρησιμοποιήθηκαν το παρασιτοειδές *Cryptochetum iceryae* και αρπακτικό *Rodolia cardinalis*, τα οποία εισήχθηκαν από την Αυστραλία, για επιτευχθεί έτσι ο έλεγχος του κοκοειδούς *Icerya purchase*. (Kogan, M 1998)

Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα χάρις στην επιτυχή εκτέλεση ενός προγράμματος Βιολογικής Αντιμετώπισης του κουνουπιού *Aedes simpsoni* που προκαλεί τον κίτρινο πυρετό και του κουνουπιού *Anopheles gambiae*, όπου το θηλυκό άτομο του που μεταφέρει το παρασιτικό πρωτόζωο *Plasmodium falciparum* που προκαλεί τη Μαλάρια, επιτεύχθηκε η ολοκλήρωση της διώρυγας του Παναμά, η οποία είχε εγκαταλειφτεί στα τέλη



του 18^{ου} αιώνα (Donald et all 2005). Εν συνεχεία τη δεκαετία του 1920 στην Αυστραλία, κατορθώθηκε ο έλεγχος της εξάπλωσης, του κάκτου *Opuntia cactus* με την απελευθέρωση του φυτοφάγου εντόμου *Cactoblastis cactorum* όπου καταγράφηκε σαν μια από τις μεγαλύτερες επιτυχίες της βιολογικής καταπολέμησης του αιώνα μας (Essig, 1931).

Το 1940 ο C. P. Clausen, συνέγραψε ένα κλασσικό βιβλίο για τα εντομοφάγα έντομα συνοψίζοντας την βιβλιογραφία στην βιολογία των παρασιτοειδών και των αρπακτικών. Το 1943 ο W. R. Thompson άρχισε να κατηγοριοποιεί τα παρασιτοειδή και αρπακτικά ανάλογα με τα θηράματα τους και το ξενιστή τους (Steinhaus, 1956). Στις επόμενες δεκαετίες η Βιολογική Αντιμετώπιση εξελίχθηκε και εκτός από την χρησιμοποίηση φυσικών θηρευτών, εφαρμόστηκαν σκευάσματα που η δραστική τους ουσία προέρχονταν από μύκητες, βακίλλους και άλλες φυσικές ουσίες. Την δεκαετία του '70, συγκεκριμένα το 1972 παρουσιάστηκε το πρώτο σκεύασμα βασιζόμενο στο *Bacillus thuringiensis*, που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των λεπιδοπτέρων. Την τάση που επικρατεί σήμερα την περιγράφει ο Barry Commoner στο βιβλίο του το 1971 «Κλείνοντας τον κύκλο» με μία χαρακτηριστική φράση «η φύση δεν είναι ο εχθρός, αλλά ο ουσιαστικός σύμμαχός μας». (Kogan, 1998).

Τα τελευταία 25 - 30 χρόνια ή πρόοδος στην εφαρμοσμένη παθολογία των εντόμων ήταν αρκετά γρήγορη και κατάληξε σε λίγες, αλλά εντυπωσιακές προσπάθειες καταπολεμήσεως εντόμων με παθογόνους γι' αυτά μικροοργανισμούς. Σήμερα η μικροβιακή καταπολέμηση είναι μια αξιόλογη και αναπτυσσόμενη βιολογική μέθοδος, πού εφαρμόζεται στη γεωργική πράξη εναντίον περισσότερων από 100 ειδών επιβλαβών εντόμων. Χρησιμοποιώντας μικροοργανισμούς επιδιώκουμε να προκαλέσουμε επιζωοτία στον πληθυσμό του βλαβερού εντόμου και κατά προτίμηση θανατηφόρο επιζωοτία. (Τζανακάκης, 1995)

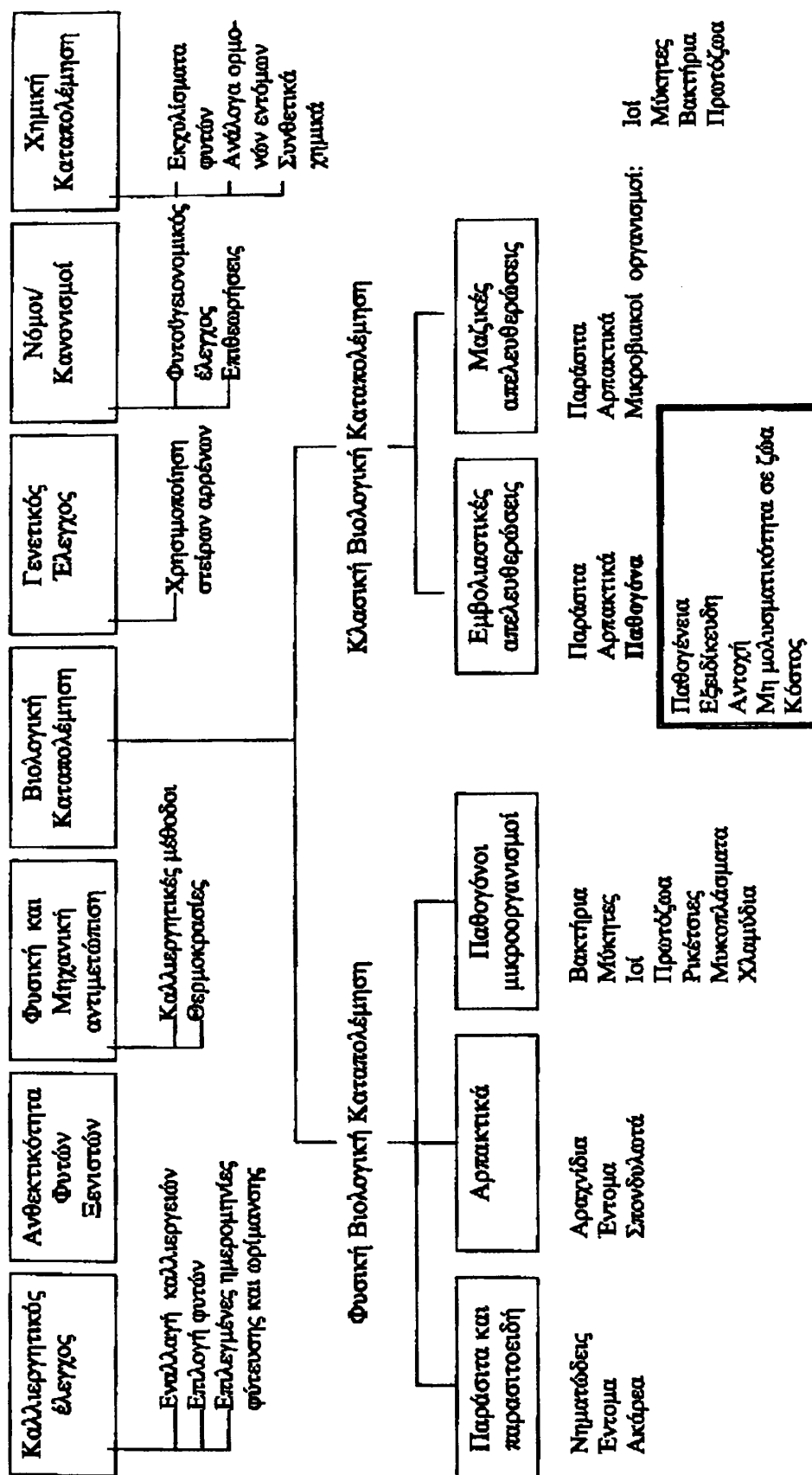


1.3. Η Ολοκληρωμένη Αντιμετώπιση

Η ολοκληρωμένη αντιμετώπιση των εχθρών των καλλιεργειών (Integrated Pest Management – IPM), σύμφωνα με τους Smith and Reynolds (1966), είναι ένα σύστημα αντιμετώπισης εχθρών, στα πλαίσια κάποιων συγκεκριμένων περιβαλλοντολογικών συνθηκών και της δυναμικής πληθυσμών του εχθρού το οποίο χρησιμοποιεί όλες τις κατάλληλες μεθόδους και τεχνικές κατά τον πλέον εναρμονιζόμενο τρόπο και επιτυγχάνει τη διατήρηση του πληθυσμού του εχθρού κάτω από αυτόν που δύναται να προξενήσει οικονομική ζημία στην καλλιέργεια (Λυκουρέσης, 1995).



Ολοκληρωμένη Αντιμετώπιση Εχθρών



Εικόνα 1.3.1. Η Ολοκληρωμένη Αντιμετώπιση Εχθρών

1.4. Η Βιολογική Αντιμετώπιση

Η Βιολογική Αντιμετώπιση (ή Βιολογική Καταπολέμηση) ορίζεται ως η δράση των φυσικών εχθρών των επιβλαβών εντόμων (παρασιτοειδή, αρπακτικά, παθογόνα). Διακρίνεται σε **Φυσική Βιολογική Καταπολέμηση** (δράση των φυσικών εχθρών χωρίς παρέμβαση του ανθρώπου) και σε **Εφαρμοσμένη Βιολογική Καταπολέμηση** (δράση των φυσικών εχθρών μετά την ενεργό παρέμβαση του ανθρώπου). Η Εφαρμοσμένη Βιολογική Καταπολέμηση 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) (Εικόνα 1.3.1.) (Katsoyannos 1996, Κοντοδήμας 2004).



Εικόνα 1.4.1. Η Βιολογική Αντιμετώπιση (ή Βιολογική Καταπολέμηση)

1.4.1. Φυσικοί εχθροί των επιβλαβών εντόμων όπως αναφέρθηκε είναι τα παρασιτοειδή, τα αρπακτικά και τα παθογόνα.

Αρπακτικό είναι «κυρίως ένα έντομο ή και άλλος οργανισμός του ζωικού βασιλείου, το οποίο ζει ελεύθερα καθόλα τη διάρκεια της ζωής του, είναι συνήθως μεγαλύτερο σε μέγεθος από τη λεία του και για να συμπληρώσει την ανάπτυξή του απαιτούνται περισσότερα του ενός άτομα από τη λεία του (πολλές φορές εκατοντάδες ή χιλιάδες)» (Λυκουρέσης 1995).

Παρασιτοειδής θεωρείται «ένα έντομο το οποίο έχει συνήθως, όχι πάντοτε, το ίδιο μέγεθος περίπου με τον ξενιστή του, απαιτεί δε ένα μόνο ξενιστή για τη συμπλήρωση της αναπτύξεως του τον οποίον και τελικά θανατώνει» (Λυκουρέσης 1995)

Παθογόνο: είναι ένας μικροοργανισμός που μπορεί να διεισδύσει στο σώμα-ξενιστή και να προκαλέσει νόσο. Στα παθογόνα των αρthropόδων κατατάσσονται και ορισμένα είδη νηματωδών.

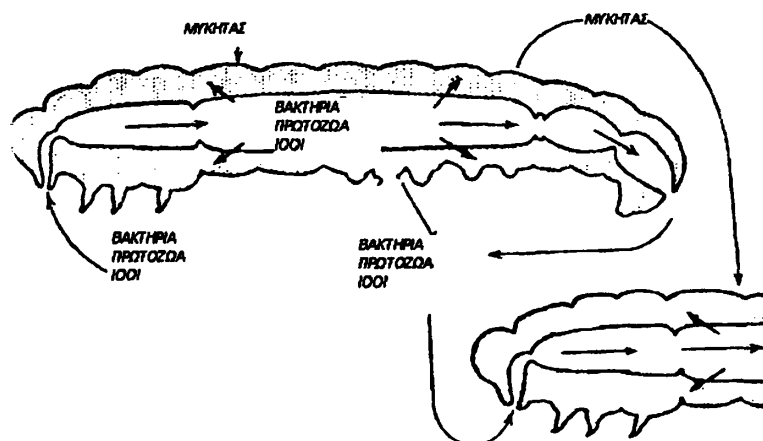
Οι κατηγορίες των φυσικών εχθρών διαφέρουν σημαντικά στην βιολογία και συμπεριφορά τους και ως εκ τούτου στην ικανότητα να ελέγξουν τον πληθυσμό των εχθρών σε κάθε περιβάλλον. Για τη σωστή άλλα και έγκαιρη χρήση των φυσικών εχθρών χρειάζεται καλή γνώση Α) του βιολογικού κύκλου των εχθρών και Β) των ανταγωνιστών των εχθρών (βιολογία, που και πως διαχειμάζουν, κ.α.). Με τις γνώσεις αυτές μπορεί να καταρτιστεί ένα ολοκληρωμένο πρόγραμμα αντιμετώπισης των πιθανών εχθρών.

Η παθογένεια η οποία προκαλείται από τους μικροοργανισμούς δεν είναι ίδια σε όλα τα έντομα και διαφέρει ακόμα και σε κάθε στάδιο του εντόμου. Συνήθως είναι μεγαλύτερη στα νεαρά στάδια του εντόμου, ιδιαίτερα στο στάδιο της προνύμφης (Steinhaus, 1949).

Το σημείο εισόδου ή ανάπτυξης ενός παθογόνου διαφέρει, ανάλογα με το έντομο και το εκάστοτε παθογόνο. Συνήθως η είσοδος των παθογόνων



γίνεται από την στοματική οδό, ενώ οι μύκητες έχουν τη δυνατότητα να εισβάλλουν στον ξενιστή τους από την επιδερμίδα του εντόμου.



Εικόνα 1.4.1.1. Τα σημεία εισόδου του παθογόνου μύκητα στο έντομο.

1.4.2. Εντομοπαθογόνοι ιοί

Μέχρι σήμερα έχουν προσδιορισθεί περισσότερες από 1200 περιπτώσεις ασθενειών των εντόμων που οφείλονται σε ιούς.

Είναι μικρότατα σωματίδια, υποχρεωτικά ενδοκυτταρικού τύπου που το μέγεθος τους συνήθως κυμαίνεται από 0.01 μm μέχρι και 15 μm (Lacey and Brooks, 1997). Αποτελούνται από τμήμα που περιέχει μία ή και περισσότερες έλικες μόνο D.N.A ή μόνο R.N.A και από ένα περίβλημα πρωτεϊνικής φύσεως. Δεν είναι μικροοργανισμοί κυτταρικού τύπου, αλλά χαρακτηρίζονται ως έμβια όντα, αφού μπορούν να αναπαράγονται και να φέρουν μια γενετική πληροφορία, το μηχανισμό αναπαραγωγής του νουκλεϊνικού οξέος.

Πολλές αναφορές παρέχουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την ιολογία των εντόμων, το ενδεχόμενο ανάπτυξης των ιών ως μέσα μικροβιακού ελέγχου και τους περιορισμούς ή τις προφυλάξεις πάνω στη χρήση των οργανισμών αυτών (Cantwell, 1974a, 1974b, Summers et al., 1975, Kurstak, 1982, Granados & Federici, 1986a, Fuxa & Tanada, 1987).

Ιοί παθογόνοι ως προς τα έντομα συναντώνται σε αρκετές διαφορετικές οικογένειες, όπως τους Iridoviridae, Parvoviridae, Poxviridae, Reoviridae και Baculoviridae. Επιδεικνύουν πολύ μεγάλη εκλεκτικότητα, και για ορισμένους ιούς έχει καταγραφεί μόνο ένας έντομο-ξενιστής (Huber, 1990).

Ένα έντομο, μετά την προσβολή του από έναν ιό παρουσιάζει μειωμένη δραστηριότητα για κάποιο χρονικό διάστημα, μέχρι να επέλθει ο θάνατος. Αν και δεν προκαλούν οξεία και άμεση θνησιμότητα, πολλές φορές οι ιοί προκαλούν δραματικές μειώσεις στον πληθυσμό των ξενιστών τους.

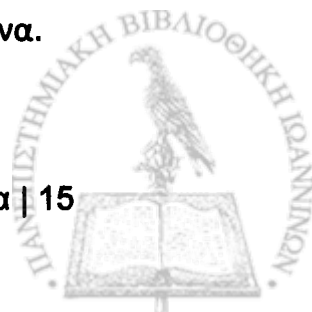
Μεταχρωματισμοί, λύσεις ιστών, δημιουργία κηλίδων, ακόμα και αποσύνθεση ολόκληρου σώματος του εντόμου είναι τα συνήθη σημεία που εμφανίζονται, ανάλογα φυσικά με το είδος του ιού και του εντόμου (Lacey and Brooks, 1997).

Οι ιοί εξαρτώνται από τα κύτταρα του ξενιστή για να αναπαραχθούν. Διακρίνονται σε δυο κατηγορίες ή αθροίσματα:

- ◊ Σε αυτούς που σχηματίζουν μέσα στα κύτταρα του ξενιστή τους σώματα εγκλεισμού πρωτεϊνικής σύστασης που περικλείουν τους ιούς.
- ◊ Στους ιούς χωρίς προστατευτικά εγκλείστηκα σωμάτια δηλαδή τους «ελεύθερους ιούς»

Ανάλογα με τη μορφή των προστατευτικών σωματίων (πολυεδρώσεις) διακρίνονται σε ιούς πρωτοπλασματικής ή πυρηνικής πολυέδρωσης.

Στις πρωτοπλασματικές πολυεδρώσεις οι ιοί είναι σφαιρικοί και προσβάλλουν κυρίως κύτταρα του εντέρου των προνυμφών των Λεπιδοπτέρων. Στις πυρηνικές πολυεδρώσεις οι ιοί που περικλείονται στα κρυσταλλικά σωμάτια έχουν σχήμα επίμηκες βακτηρίου και προσβάλλουν τα κύτταρα της αιμολέμφου, του λιπώδους ιστού και του υποδόριου. Ακόμη μπορούν να προσβάλλουν τον πυρήνα των κυττάρων του πεπτικού σωλήνα.



Εκτός από τα Λεπιδόπτερα μπορούν να προσβληθούν από ιούς πυρηνικών πολυεδρώσεων και είδη των Υμενοπτέρων όπου η προσβολή εμφανίζεται στο επιθήλιο του μεσοεντέρου. Τέλος, στην Οικογένεια Baculoviridae έχουμε τις ιώσεις με τα προστατευτικά εγκλείστηκα σωμάτια που έχουν σχήμα κοκκίου και περικλείουν ένα ή σπανιότερα δύο ιούς σε σχήμα επίμηκες βακτηρίου. Οι ιώσεις αυτές ονομάζονται κοκκιώσεις (Granulosis) και η παθογένεση παρατηρείται στο τμήμα των κυττάρων της αιμολέμφου ή του λιπώδη ιστού των Λεπιδοπτέρων και των Κολεοπτέρων μεταξύ πρωτοπλάσματος και πυρήνα.

Τα κρυσταλλικά σωμάτια των πολυεδρώσεων διακρίνονται εύκολα στο μικροσκόπιο διότι έχουν διάμετρο που κυμαίνεται μεταξύ 0,5μ και 15μ, ενώ εκείνα των κοκκιώσεων μόλις που διακρίνονται, αφού έχουν μέγεθος 0,2-0,5μ. Οι ιοί των πυρηνικών πολυεδρώσεων (NPV) και των κοκκιώσεων (GV) έχουν πυρηνικό οξύ DNA, ενώ αυτοί των κυτταραπλασματικών πολυεδρώσεων RNA.

Οι ιοί έχουν την ιδιότητα να μεταδίδονται μέσω τέλειων μορφών των εντόμων στους απογόνους τους, αν και μερικοί έχουν αναφερθεί ότι μεταδίδονται και μέσω των ωών. Για να εμφανισθούν τα συμπτώματα της ίωσης απαιτείται ένα χρονικό διάστημα μεγαλύτερο από 4 ημέρες, ενώ εκτός από τις προνύμφες είναι δυνατόν εμφανιστούν συμπτώματα και σε ενήλικα έντομα.

Στην Ελλάδα κυκλοφορούν σήμερα μόνο δύο σκευάσματα, το Carponvirusine 2000 SC και το Madex SC, που περιέχουν τον ιό *CpGV* και συνιστώνται για την καταπολέμηση της καρπόκαψας *Cydia (Laspeyresia) pomonella*. Στο εξωτερικό κυκλοφορούν πολλά επιπλέον εμπορικά σκευάσματα ωών (π.χ. *Adoxophyes orana* GV, *Spodoptera exigua* MNPV, *Lymantria dispar* MNPV, *Mamestra brassicae* MNPV κ.α.).



1.4.3. Εντομοπαθογόνα βακτήρια

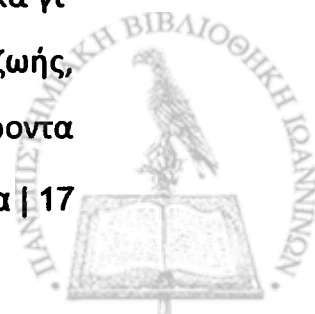
Τα βακτήρια αποτελούν τον πιο πολυπληθή τύπο μικροοργανισμών που έχουν δράση παθογόνο στα έντομα. Δεν από τελεί έκπληξη λοιπόν το γεγονός ότι μεγάλος αριθμός από τους μικροοργανισμούς αυτούς μπορεί να προκαλεί μολύνσεις στα έντομα σε ένα μεγάλο εύρος συνθηκών. Τα βακτήρια είναι μονοκύτταροι φυτοειδείς μικροοργανισμοί οι οποίοι πολλαπλασιάζονται με διαίρεση. Τα εντομοπαθογόνα βακτήρια είναι σε γενικές γραμμές, όμοια με τα υπόλοιπα βακτήρια, όσον αφορά τα γενικά χαρακτηριστικά τους. Από τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς ξεχωρίζουν κυρίως λόγω του πολύ μικρότερου μεγέθους τους (Steinhaus, 1949). Αυτό είναι της τάξης των 0.5 – 50 μm . Το σχήμα τους ποικίλει ανάλογα με το είδος. Συναντώνται μεμονωμένα ή σε αλυσίδες, μπορεί να είναι είτε θετικά είτε αρνητικά κατά Gram και αερόβια ή αναερόβια (Lacey and brooks, 1997).

Τα βακτήρια διακρίνονται σε δυο κατηγορίες:

- Σε εκείνα που είναι παθογόνα για ορισμένα έντομα και κάτω υπό ορισμένες συνθήκες
- Σε εκείνα που είναι υποχρεωτικά παθογόνα

Στα πρώτα υπάγονται ορισμένα είδη του γένους *Pseudomonas*, που όταν εισέλθουν δια της στοματικής οδού στον εντερικό σωλήνα του εντόμου, διαπερνούν στην συνέχεια τα εντερικά τοιχώματα, εισέρχονται στην αιμόλεμφο και προκαλούν σηψαιμία. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν επίσης και τα βακτήρια του γένους *Aerobacter* και *Enterococcus*, τα οποία απαντώνται στο περιεχόμενο του εντερικού σωλήνα των εντόμων και είναι δυνατόν αν προκαλέσουν τοπικές λύσεις του επιθηλίου του εντέρου.

Στην δεύτερη κατηγορία υπάγονται τα βακτήρια εκείνα που σχηματίζουν κατά το στάδιο της σπορογονίας κρυστάλλους τοξίνης, οι οποίοι διασπώμενοι ενζυματικά στον εντερικό σωλήνα του εντόμου δρουν τοξικά γι' αυτό. Οι κρύσταλλοι αυτοί δεν είναι βλαβεροί για άλλες μορφές ζωής, γεγονός που καθιστά τα κρυσταλλογόνα αυτά βακτήρια πολύ ενδιαφέροντα

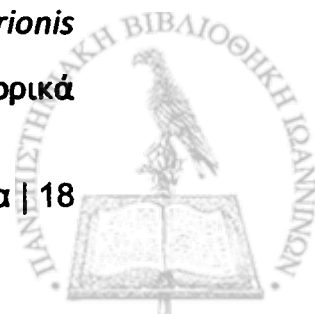


και σημαντικά. Τουλάχιστον 120 είδη εντόμων είναι ευαίσθητα στα κρυσταλλογόνα βακτήρια, αν και παρατηρούνται διαφορές όσον αφορά τις αντιδράσεις στην τοξίνη ανάλογα με το είδος του εντόμου. Ο προσδιορισμός της δράσης του βακτηρίου για κάθε είδος απαιτεί εκτεταμένες έρευνες.

Επίσης τα βακτήρια ανήκουν στη τάξη Schizomycetes, η οποία υποδιαιρείται σε πέντε ή και παραπάνω τάξεις, ανάλογα με το σύστημα ταξινόμησης που ακολουθείται. Ο μεγαλύτερος αριθμός των βακτηρίων που εμφανίζει ως παθογόνος προς τα έντομα ιδιότητες ταξινομείται στις ακόλουθες έξι οικογένειες: *Basillaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacteriaceae*, *Micrococcaceae* και *Pseudomonadaceae* (Steinhaus, 1949).

Γενικά, τα έντομα που είναι προσβεβλημένα από βακτήρια παρουσιάζουν δυσκολίες στην κίνηση, μειωμένη όρεξη, στοματικές και εντερικές εκκρίσεις. Μετά το θάνατο το σώμα (ειδικά των προνυμφών) σκουραίνει γρήγορα παίρνοντας καφέ ή μαύρο χρώμα. Γίνεται εντελώς υδαρές και αλλοιώνεται σε μεγάλο βαθμό το σχήμα του. Τελικά το σώμα του εντόμου ξηραίνεται εντελώς. Σε ένα νεκρό ή ετοιμοθάνατο έντομο εξαιτίας κάποιας βακτηριολογικής ασθένειας, αν εξετάσουμε τους ιστούς του που θα διαπιστώσουμε την έντονη παρουσία των ευθυνόμενων για το θάνατο βακτηρίων (Steinhaus, 1949).

Στην Ελλάδα κυκλοφορούν πολλά εμπορικά σκευάσματα του *B. t. kurstaki* (Bactecin 0,2 DP, Bathurin 0,2 DP, Bathurin 3,2 WP, Bactoil 1,5 SC, Foray 48 2,2 SU, Bactospeine 3,2 WP, Bactucide 3,2 WP, Thuricide 3,2 WP, *B.t.kurstaki* - Wochkhardt 32000 WP, *B.t.kurstaki* - Appliedchem 36000 WG, ARP 6,4 WP, *B.t.kurstaki* - Φάρμα Χημ 6,4 WP, Dipel 32000 6,4 WP, Dipel 16000 3,2 WP, Dipel 8 3,5 L, Cordalene 7,5 O), ένα σκεύασμα ενδοτοξίνης του *B. t. kurstaki* εγκυστωμένης εντός *Pseudomonas fluorescens* (BMP 123 6,4 WP), ένα σκεύασμα του *B. t. aizawai* (Xentari 3 WG), ένα σκεύασμα του *B. t. aizawai* x *B. t. kurstaki* (Agree 3,8 WP) και ένα σκεύασμα του *B. t. tenebrionis* (Novodor 3 SC). Στο εξωτερικό κυκλοφορούν επιπλέον πολλά εμπορικά



σκευάσματα του *B. t. israelensis*, καθώς επίσης σκευάσματα εγκυστωμένης ενδοτοξίνης των *B. t. aizawai* και *B. t. morrisoni* για την αντιμετώπιση λεπιδοπτέρων και κολεοπτέρων αντίστοιχα, σκευάσματα του *B. t. japonensis* strain *buibui* για την αντιμετώπιση κολεοπτέρων εδάφους, του *Bacillus popilliae* για την αντιμετώπιση του κολεοπτέρου *Popilia japonica* (Scarabeidae), του *Bacillus sphaericus* για την αντιμετώπιση κουνουπιών του γένους *Culex* και του *Serratia entomophila* για την αντιμετώπιση του κολεοπτέρου *Costelytra zealandica* (Scarabeidae).

1.4.4. Εντομοπαθογόνοι νηματώδεις

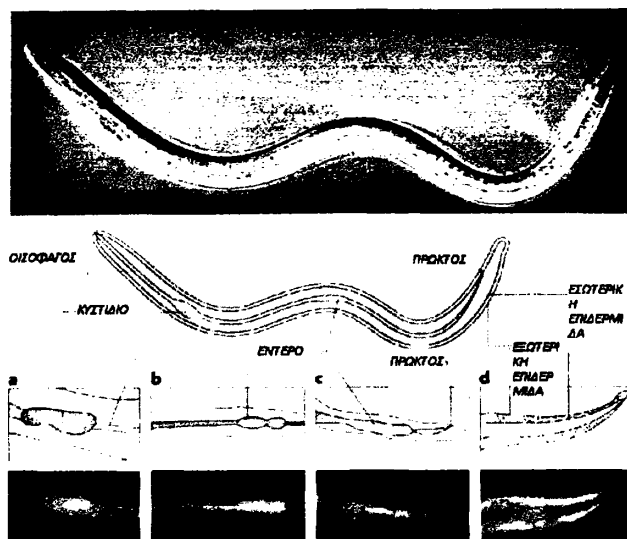
Οι νηματώδεις τυπικά δεν είναι μικροβιακά στοιχεία, αλλά κυλινδρικοί πολυκύτταροι σκώληκες. Όντας σχεδόν μικροσκοπικοί σε μέγεθος χρησιμοποιούνται όπως τα υπόλοιπα μικροβιακά εντομοκτόνα. Η συμβίωση εντόμων και νηματωδών δεν είναι πάντα θανατηφόρος για το έντομο, καθώς σε αρκετές περιπτώσεις οι νηματώδεις τρέφονται δίχως να παρεμποδίζουν τις ζωτικές λειτουργίες του εντόμου (Welch, 1963).

Οι εντομοπαρασιτικοί ή οι εντομοπαθογόνοι νηματώδεις προσβάλλουν έντομα από όλες τις τάξεις, αρκεί σε κάποιο στάδιο του βιολογικού τους κύκλου (κατά προτίμηση ως προνύμφες) να βρίσκονται επί ή εντός του εδάφους (Steinhaus, 1949). Οι νηματώδεις μπορούν να δράσουν ως παράσιτα σε οποιοδήποτε ή και σε όλα τα στάδια του βιολογικού τους κύκλου, ενώ κάποιοι νηματώδεις εμφανίζονται ως παράσιτα για μια γενιά και στις επόμενες γενιές ζουν ελεύθεροι.

Οι εντομοπαθογόνοι ή οι εντομοπαθογόνοι νηματώδεις προσβάλλοντας το εσωτερικό του εντόμου, προκαλούν μωμιοποίηση. Ειδικά έντομα που παρασιτούνται από είδη των *Steinernematidae* και *Heterorhabditidae* αποκτούν κόκκινο, πορτοκαλί ή γαλακτόχρωμο μεταχρωματισμό ο οποίος οφείλεται στην παρουσία και την δράση των συμβιώντων βακτηρίων (*Enterobacteriaceae*). Τα συμβιωτικά βακτήρια των



Steinernematidae είναι το *Xenorhabdus nematophilus* ενώ εκείνα των Heterorhabditidae είναι το *Photorhabdus luminiscens*. Και τα δύο ανήκουν στην οικογένεια Enterobacteriaceae (Lacey and Brooks, 1997).



Εικόνα.1.4.4.1 Εντομοπαθογόνος νηματώδης *Steinernema juvenile*

Τα είδη των πιο πάνω οικογενειών καταφέρνουν, εξαιτίας της συμβίωσης αυτής, ονομάζονται εντομοπαθογόνοι και χαρακτηρίζονται από σημαντικές ιδιότητες:

- μπορούν να σκοτώσουν τα έντομα μέσα σε 24-48 ώρες (πιο γρήγορα από ότι οι εντομοπαρασιτικοί νηματώδεις).
- έχουν ευρεία κλίμακα ξενιστών που περιλαμβάνει την πλειοψηφία των τάξεων & οικογενειών των εντόμων
- μπορούν να καλλιεργηθούν σε μεγάλη κλίμακα πάνω ή μέσα σε τεχνητό στερεό ή υγρό υπόστρωμα
- σχηματίζουν ένα ανθεκτικό μολυσματικό στάδιο το οποίο μπορεί να αποθηκευτεί για μεγάλους χρονικούς περιόδους, να εφαρμοστεί με τους συμβατικούς τρόπους & να παραμείνει στο φυσικό περιβάλλον
- το μολυσματικό στάδιο είναι ανθεκτικό στα περισσότερα αγροχημικά, γεγονός που επιτρέπει την χρήση τους σε πρόγραμμα ολοκληρωμένης διαχείρισης.
- τα έντομα δεν φαίνεται να αναπτύσσουν ανθεκτικότητα

– τα φυτά & τα θηλαστικά δεν επηρεάζονται.

Στη ελληνική και διεθνή αγορά χρησιμοποιούνται εμπορικά σκευάσματα των νηματωδών *Heterorhabditis bacteriophora*, *H. megidis*, *Steinernema carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. glaseri*, *S. riobrave*, *S. scapterisci* για την αντιμετώπιση εντόμων εδάφους, κολεοπτέρων, λεπιδοπτέρων, ορθοπτέρων, διπτέρων και άλλων εντόμων.

1.4.5. Εντομοπαθογόνα πρωτόζωα

Όσα είδη παρουσιάζουν πρακτικό ενδιαφέρον για καταπολέμηση εντόμων έχουν κατά την ζωή τους ένα ανθεκτικό στάδιο, εκείνο της σπορίωσης. Στις πλείστες περιπτώσεις το στάδιο αυτό είναι και το μολυσματικό. Το έντομο μολύνεται κατά κανόνα καταπίνοντας τα πρωτόζωα, ορισμένα όμως είδη πρωτόζωων μπορεί να μεταδοθούν από την μητέρα έντομο στα τέκνα δια του ωαρίου. Λιγότερο συχνή, αλλά όχι σπάνια, είναι η είσοδος του πρωτόζωου από οπές ωοτοκίας παρασιτικών υμενοπτέρων. Οι κυρίως προσβαλλόμενοι ιστοί και όργανα είναι το λιπόσωμα, οι σωλήνες Malpighi και το εντερικό επιθήλιο. Η προσβολή καταλήγει σε κυττόλυση.

Μειονεκτήματα που περιορίζουν την πρακτική χρησιμότητα των πρωτόζωων είναι η ευπάθεια τους στο υπεριώδες φως, αλλά προπαντός η μικρή τους εντομοπαθογόνος δύναμη και η μάλλον αργή δράση τους. Επίσης η αναπαραγωγή τους για εμπορική χρήση είναι εξαιρετικά δύσκολη, μιας και δεν αναπαράγονται σε τεχνητά υποστρώματα (Steinhaus, 1949).

Οι μικροοργανισμοί αυτοί έχουν ένα πολύπλοκο βιολογικό κύκλο. Δημιουργούν ασθένειες, όπως η Νοζεμίαση και έχουν μεγάλη διάρκεια εξέλιξης μέσα στο έντομο. Συνήθως τα πρώτα που αναπαράγονται στα κύτταρα του εντόμου. Πάντως ως αποκλειστικά παράσιτα, τα πρωτόζωα απαιτούν ζωντανούς ξενιστές (έντομα ή κύτταρα) για να αναπαραχθούν.

Μεταδίδονται δια στόματος, αλλά τις περισσότερες φορές μεταφέρονται από γενιά σε γενιά μέσω των ωών ή ανάμεσα στα θηλυκά και



αρσενικά ενήλικα σε φυσικές συνθήκες. Συγκεκριμένα, το πρωτόζωο *Nosema plodiae* μπορεί να μεταδοθεί, εκτός από την φυσική πορεία μόλυνσης και μέσω των ωών και μέσω θηλυκού-αρσενικού εντόμου (Kellen and Lindegren 1971).

Τα συμπτώματα και τα παθολογικά αποτελέσματα που εμφανίζουν οι μολύνσεις των πρωτόζων σε έντομα, ποικίλλουν σημαντικά. Οι Kellen και Lindegren (1973a) για παράδειγμα, απέδειξαν μία φλεγμονή που παρουσίαζαν προνύμφες λεπιδοπτέρων ύστερα από την επίδραση του *Nosema invaders*. Η σοβαρή αυτή φλεγμονή περιλάμβανε έναν εγκλεισμό σε κάψα, των αιμοκυττάρων των μολυσμένων περιοχών με αποτέλεσμα τη διόγκωση του σώματος των προνυμφών.

Οι Schwalbe et al. (1974) και οι Burkholder και Dicke (1964), επιπλέον παρατήρησαν ένα κιτρινοπράσινο φθορίζον υλικό του εντόμου *Trogoderma glabrum* (Herbst) το οποίο είχε μολυνθεί από το πρωτόζωο *Mattesia trogodermae*. Το παθογόνο αυτό φάνηκε κάτω από το υπεριώδες φως. Τέλος, πολλές εργαστηριακές καλλιέργειες πρωτόζων αποδεικνύουν μεγάλη επιβίωση και αναπαραγωγή τους σε πολλά είδη εντόμων.

Εκτός από το γεγονός ότι προκαλούν θνησιμότητα σε διάφορα στάδια των μολυσμένων εντόμων, η μόλυνση από το πρωτόζωο μπορεί να επιμηκύνει το χρόνο ανάπτυξης των εντόμων, να μειώνει την επιβίωση τους στο στάδιο του ενηλίκου, να αυξάνει τις παραμορφώσεις των ακμαίων και να καταστρέφει την αναπαραγωγή.

Στην Ευρωπαϊκή αγορά κυκλοφορούν σκευάσματα από δύο είδη πρωτόζων της κατηγορίας *Microsporidium*. Το ένα περιέχει το *Nosema locustae* και χρησιμοποιείται με επιτυχία κατά της ακρίδας *Locusta migratoria* σε σχετικά μεγάλες λιβαδικές εκτάσεις στη Δ. Αφρική, Ινδία, Β. και Ν. Αμερική, ψεκαζόμενο από αέρος, αλλά και σε δημόσια και ιδιωτικά πάρκα όπου η χρήση συνθετικών εντομοκτόνων είναι ιδιαίτερα ανεπιθύμητη



(Τζανακάκης, 1995). Το δεύτερο περιέχει το *Vairimorpha necatrix* και χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση των λεπιδοπτέρων (Copping, 2001).

Αρκετές έρευνες έχουν διεξαχθεί σχετικά με την διάρκεια ζωής των εντομοπαθογόνων πρωτόζωων μέσα στις αποθήκες. Ο Ashford (1970) απέδειξε ότι τα σπόρια των πρωτόζωων ήταν σταθερά για τρεις μήνες σε θερμοκρασία 15 °C ή ακόμα και 30 °C ενώ από τον τρίτο μήνα μέχρι τον ένατο παρατηρήθηκε μια μείωση στην μολυσματικότητα τους, ιδιαίτερα στην υψηλή θερμοκρασία.

Δύο χρόνια αργότερα, ο Milner ανέφερε ότι τα σπόρια του *Nosema whitei* δεν παρουσίασαν καμία αξιοπρόσεκτη απώλεια στην ζωτικότητα τους ακόμα και ύστερα από δεκαπέντε μήνες στην αποθήκη σε θερμοκρασία 4o C. Η θερμοκρασία κατά την αποθήκευση μελετήθηκε, τέλος και από τους Nara et al (1981), όπου διαπιστώθηκε επιβίωση ακόμα και στους -19 °C.

Στη διεθνή αγορά κυκλοφορούν σκευάσματα από δύο είδη μικροσποριδίων: από το *Nosema locustae* για την αντιμετώπιση των ακρίδων και από το *Vairimorpha necatrix* για την αντιμετώπιση λεπιδοπτέρων (κυρίως των *Ostrinia nubilalis*, *Helicoverpa zea*, *Trichoplusia ni*, *Spodoptera spp.*).

1.4.6. Εντομοπαθογόνες ρικέτσιες

Οι ρικέτσιες, οι οποίες συναντώνται σε ευρύ φάσμα εντόμων, μπορούν σε ορισμένες περιπτώσεις να προκαλέσουν αξιοπρόσεχτες μολύνσεις σε ορισμένους πληθυσμούς. Έχουν πολύ μικρό μέγεθος (0.2-0.6μm) και σχήμα ραβδοειδές, είναι αρνητικές κατά Gram, μοιάζουν με βακτήρια και συμπεριφέρονται σαν ιοί.

Αρκετές μολύνσεις σε έντομα έχουν αποδοθεί κατά καιρούς σε ρικέτσιες. Είδη του γένους *Rickettiella* είναι εντομοπαθογόνα και η παρουσία τους έχει αναφερθεί σε Κολεόπτερα, Δίπτερα, Λεπιδόπτερα, και Ορθόπτερα.



1.5. Οι μύκητες ως εντομοπαθογόνοι μικροοργανισμοί

Οι μύκητες, αυτές οι μικρές μικροβιακές μονάδες φυτικού χαρακτήρα που δεν περιέχουν χλωροφύλλη, υπόσχονται ευρεία χρησιμοποίηση στις βιολογικές καταπολεμήσεις. Περισσότερα από 400 είδη παθογόνων μυκήτων έχουν απομονωθεί από έντομα, αλλά μέχρι σήμερα ένας μικρός αριθμός τους έχει αξιοποιηθεί ως βιοεντομοκτόνα, εξαιτίας της εξάρτησής από υψηλή σχετική υγρασία στο περιβάλλον και της έλλειψης γνώσεων σχετικά με τους παράγοντες που επηρεάζουν την τοξικότητά τους.

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 για τη μαζική παραγωγή τους, ενώ όσοι είναι εύκολο να καλλιεργηθούν, εμφανίζουν εξασθένηση ύστερα από μακροχρόνια παραγωγή σε τεχνητά μέσα.

Οι τάξεις των μυκήτων που προκαλούν ασθένεια στα έντομα, περιλαμβάνονται στον Πίνακα 1. Στους εντομοπαθογόνους αυτούς μύκητες, χαρακτηριστικό είναι ότι τα έντομα προσβάλλονται, όχι μόνο στο στάδιο της προνύμφης ή νύμφης, αλλά και στο στάδιο του ακμαίου.

Συχνά οι μύκητες εξαρτώνται πολύ από το περιβάλλον, κυρίως όσον αφορά τα αρχικά στάδια μόλυνσης. Έτσι, οι πιο σημαντικοί παράγοντες που παίζουν ρόλο 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.

Από τα διάφορα είδη εντόμων, τα πιο ευπαθή σε μυκητολογικές μολύνσεις, είναι τα Λεπιδόπτερα (προνύμφες), από τα Ημίπτερα (και ειδικότερα από τα Homoptera) οι αφίδες, είδη που ανήκουν στις Οικογένειες



Cicadidae και Coccidae, από τα Υμενόπτερα τα Vespoidea, από τα Κολεόπτερα είδη της οικογένειας Scarabeidae και από τα Δίπτερα είδη του γένους Hylemyia και τα κουνούπια.

Όταν ένα έντομο προσβληθεί από ένα μύκητα παθογόνο, ο μύκητας αυτός διαπερνά την επιδερμίδα και αναπτύσσει σιγά-σιγά στο εσωτερικό του εντόμου το μυκήλιό του, κατακλύζοντας έτσι όλους τους ιστούς και με τις τοξίνες που παράγει, έχει σαν αποτέλεσμα τη θανάτωση του ξενιστή. Στη συνέχεια ο μύκητας εμφανίζεται εξωτερικά με μυκήλιο και επανθίσεις 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 *Strongwellsea castrans* που απαντώνται μόνο στην κοιλιακή χώρα των ενήλικων εντόμων (Poinar, 1977).



Πιν 1. Τάξεις και μερικά είδη εντομοπαθογόνων μυκήτων

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΜΥΚΗΤΩΝ	ΤΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΕΙΔΗ ΕΝΤΟΜΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ
A. ΦΥΚΟΜΥΚΗΤΕΣ	Entomophthorales - <i>Entomophthora</i> spp., <i>Zoophthora</i> spp., <i>Erynia</i> spp. - <i>Massospora</i> (<i>M. cicadina</i>), - <i>Conidiobolus</i> spp. Blastocladales - <i>Coelomomyces</i> spp. (<i>C. stegomyiae</i>, <i>C. tasmaniensis</i>, παθογόνα κουνουπιών) Lagenidiales - <i>Lagenidium giganteum</i> (παθογόνο κουνουπιών)
B. ΑΣΚΟΜΥΚΗΤΕΣ	Ascosphaerales - <i>Bettsia</i> sp. - <i>Ascosphaera</i> (παθογόνα μελισσών) (<i>A. apis</i>) Myriangiales - <i>Myriangium</i> spp. (παθογόνα Coccoidae) Sphaeriales - <i>Cordyceps</i> spp. - <i>Torrubiella</i> spp. - <i>Hypocrella</i> spp.
Γ. ΑΤΕΛΕΙΣ ΜΥΚΗΤΕΣ	Moniliales - <i>Beauveria</i> spp. (<i>B. bassiana</i>, παθογόνο πολλών ειδών εντόμων), (<i>B. tenella</i>=<i>B. bronchgiarti</i>) (παθογόνο του <i>Melolontha melolontha</i>) - <i>Metarrhizium</i> (<i>M. anisopliae</i>) [παθογόνο του <i>Anisopliae austiaca</i> (Scarabaeidae)] - <i>Nomuraea</i> (= <i>Spicaria</i>) (<i>N. rileyi</i>) (παθογόνο του <i>Trichoplusia ni</i> κ.α Noctuidae) - <i>Paecilomyces</i> - <i>Hirsutella</i> (<i>H. thompsonii</i>) (παθογόνο του ακάρεως <i>Phyllocoptuta oleivora</i>) - <i>Culicomyces clavosporus</i> - <i>Verticillium lecanii</i> - <i>Tolypocladium cylindrosporum</i> Sphaeropsidales - <i>Aschersonia</i> (<i>A. aleurodis</i>) (παθογόνο των Aleurodidae)



1.5.1. Εμπορικά μικροβιακά σκευάσματα με βάση μύκητες

Ο πιο μελετημένος μύκητας είναι ο *Beauveria bassiana*, ένα παθογόνο πολλών γεωργικών εντόμων. Όμως, ένας μικρός αριθμός ερευνών έχει διεξαχθεί μέχρι σήμερα, σχετικά με τους εντομοπαθογόνους μύκητες που καταπολέμουν διαφορά έντομα.

Συγκεκριμένα, οι Ferron & Robert 1975, απέδειξαν την ευαισθησία του εντόμου *Acanthoscelides obtectus* (Say) σε αρκετούς μύκητες, συμπεριλαμβανομένου και τους *Beauveria bassiana*, *Beauveria tenella*, *Metarhizium anisopliae* και *Paecilomyces fumosoroseus*. Εντούτοις, η δυνατότητα αυτών των οργανισμών ως μέσα μικροβιακού ελέγχου δεν προσδιορίστηκε. Οι Davis & Smith (1977), αντίθετα ασχολήθηκαν με τις συνθήκες κάτω από τις οποίες μπορούν να καλλιεργηθούν ορισμένοι μύκητες, ώστε η παραγωγή των διαφορετικών τοξικών μεταβολιτών τους να συμβάλλει στην ανάπτυξη και το θάνατο των εντόμων στόχων.

Ύστερα από αυτές τις μελέτες, ένα πλήθος ακόμη, μυκήτων έχει απομονωθεί και δοκιμάζονται στα εργαστήρια. Εκτός από το *Beauveria bassiana*, τα παθογόνα εκείνα που έχουν κριθεί ως κατάλληλα για βιολογική καταπολέμηση μέχρι τώρα είναι τα *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* και *Metarhizium anisopliae*.

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 *Nomuraea rileyi*, το *Entomophthora thaxteri* και στη Ρωσία το *Aschersoni aleurodis*. Τελευταία έχει κυκλοφορήσει στο εμπόριο από την Ολλανδική εταιρία Korperit ένα μυκητολογικό παρασκεύασμα το MYCOTAL σε μορφή βρέξιμης σκόνης που έχει ως βάση κονιδιοσπορία του μύκητα *Lecanicillium (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 βοτρύτη 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 καλλιεργειών και η χρησιμοποίησή τους στην πράξη έχει προχωρήσει σε ικανοποιητικό στάδιο.

Στην Ελλάδα κυκλοφορεί μόνο το εμπορικό σκεύασμα του *Beauveria bassiana* (Naturalis SC) για την αντιμετώπιση αφίδων, αλευρωδών και



θριπών, το οποίο έχει δείξει υψηλή αποτελεσματικότητα και επί άλλων εντομολογικών εχθρών. Επίσης κατά το παρελθόν έχουν δοκιμαστεί εμπορικά σκευάσματα του *Verticillium lecanii* (Mycotal, Vertalec) εναντίον αλευρωδών, θριπών, αφίδων και κοκκοειδών με ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Στο εξωτερικό κυκλοφορούν εμπορικά σκευάσματα και άλλων μυκήτων όπως του *Beauveria brongniartii* (= *B. tenella*) για την αντιμετώπιση κολεοπτέρων Scarabeidae, του *Legendium giganteum* για την αντιμετώπιση δυττέρων, του *Metarhizium anisopliae* για την αντιμετώπιση κολεοπτέρων, λεπιδοπτέρων και ισοπτέρων, του *M. anisopliae acridium* για την αντιμετώπιση ορθοπτέρων, του *M. anisopliae anisopliae* για την αντιμετώπιση του κολεοπτέρου *Dermolepida albohirtum* (Scarabeidae), του *M. anisopliae* strain ICIPE30 και ICIPE30 για την αντιμετώπιση ισοπτέρων και θυσανοπτέρων, του *M. flavoviridae flavoviridae* για την αντιμετώπιση του κολεοπτέρου *Adoryphorus coultonii* (Scarabeidae) και του *Paecilomyces fumosoroseus* για την αντιμετώπιση αφίδων, αλευρωδών, θριπών και αραχνοειδών.

1.5.2. Ο Μύκητας *Lecanicillium lecanii*

Ο Μύκητας *Lecanicillium lecanii* (Zimmermann) Gams et Zare [= *Verticillium lecanii* (Zimmermann) Viegas] (Moniliales) εμφανίζεται ευρέως στη φύση. Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των αλευρωδών, θριπών, αφίδων και νηματωδών. Το είδος αυτό πρώτο περιγράφηκε το 1861

Ο εντομοπαθογόνος αυτός μύκητας ασκεί την επίδραση του εισβάλλοντας στο ζωντανό έντομο. Τα σπόρια του μύκητα προσκολλούνται στην επιδερμίδα του εντόμου και, κάτω υπό τις κατάλληλες συνθήκες, βλαστάνουν. Η επίδραση του μύκητα είναι ισχυρότερη υπό υψηλές συνθήκες υγρασίας. Ο μύκητας αυτός είναι ευπαθής σε ορισμένα μυκητοκτόνα, ειδικά στα διθειοκαρβαμιδικά.



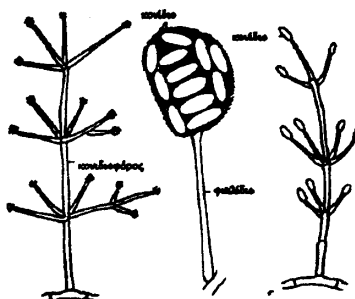
Ο μύκητας αυτός δεν έχει παρουσιάσει τοξικότητα σε θηλαστικά, και δεν είναι σχετικώς εκλεκτικό σε έντομα μη-στόχους. Δεν έχει παρουσιάσει δυσμενείς επιδράσεις στο περιβάλλον (Corring, 2001).



Εικόνα 1.5.2.1. Ο Μύκητας *Lecanicillium lecanii*



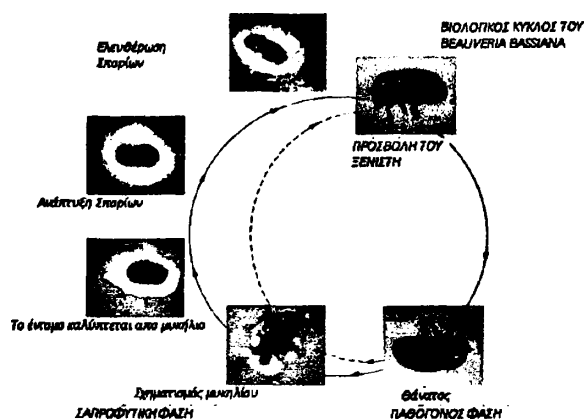
Εικόνα 1.5.2.2. Προσβολή από *Lecanicillium lecanii* σε *Aphis gossypii* (Pinna, 1992).



Εικόνα 1.5.2.3. Ο μύκητας *Lecanicillium lecanii*

1.5.3. Ο Μύκητας *Beauveria bassiana*

Ο μύκητας *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Moniliales) συνίσταται για την καταπολέμηση της πυραλίδας του καλαμποκιού (*Ostrinia nubilalis*) των αφίδων, των θριπών, των αλευρωδών, των κολεοπτέρων και ορισμένων ημιπτέρων. Το όνομα της, το πήρε από τον ιταλό εντομολόγο Agostino Bassi, οποίος και την ανακάλυψε το 1835 ως αίτιο για την άσπρης επίστρωσης (μούχλας) που βρέθηκε πάνω στο *Bombyx mori*.

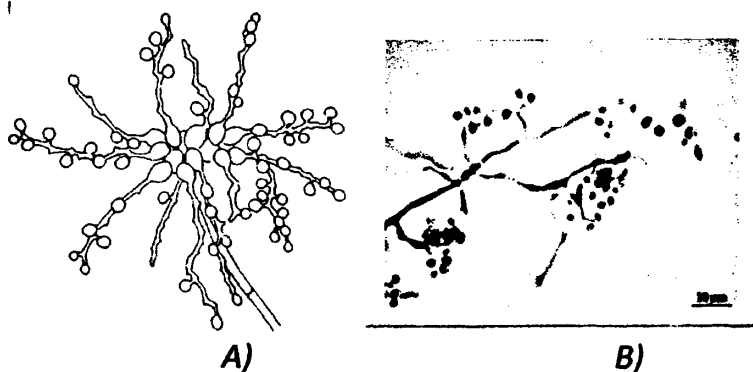


Εικόνα.1.5.3.1 Βιολογικός Κύκλος του *Beauveria Bassiana*

Ο εντομοφάγος 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, S. A., & Buckley, E. 2005). 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.

Το προϊόν αυτό που περιέχει τα κονίδια του μύκητα μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο του ή σε συνδυασμό με άλλα εντομοκτόνα. Δεν πρέπει να χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με μυκητοκτόνα και σε περίπτωση που πρέπει να γίνει εφαρμογή μυκητοκτόνων πρέπει να έχουν περάσει 48 ώρες από την εφαρμογή του προϊόντος.

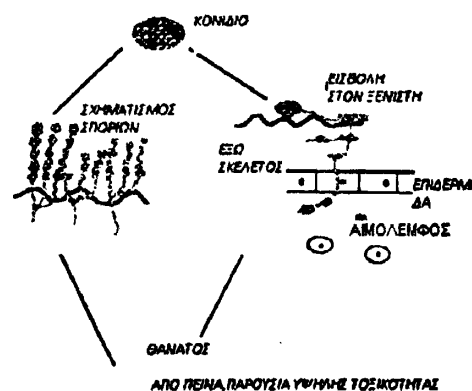
Τα σκευάσματα που κυκλοφορούν είναι τα: Naturalis-L, Bio-power, κ.α. ο μύκητας αυτός δεν παρουσιάζει φυτοτοξικότητα ούτε δημιουργεί τοξικότητες σε πτηνά, ζώα και ψάρια (Copping, 2001)



Εικόνα 1.5.3.2. α,β) Ο μύκητας *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin

1.5.4. Ο Μύκητας *Metarhizium anisopliae*

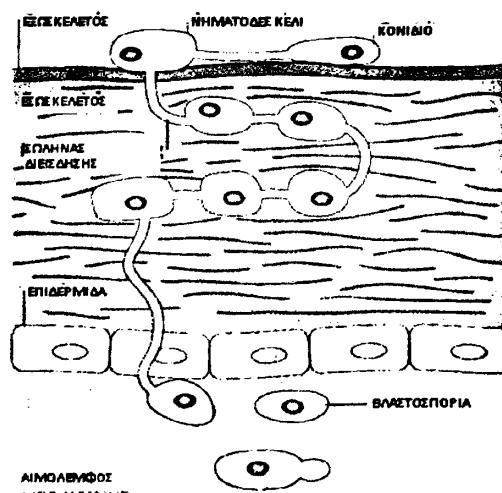
Ο *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes, Moniliales), γνωστός παλαιότερα ως *Entomophthora anisopliae*, είναι ένας μύκητας συναντάμε σε ολόκληρο τον κόσμο, αναπτύσσεται φυσικά στο έδαφος και προσβάλλει διάφορα έντομα λειτουργώντας σαν παράσιτο. Απέκτησε το όνομα του όταν 1879 ο I.I. Mechnikov, τον απομόνωσε από σκαθάρι *Anisoplia austriaca*. Στην συνέχεια τον χρησιμοποίησε για τον έλεγχο του κολεοπτέρου *Cleonus punctiventris* και ο οποίος τελικά το συνέστησε για τη Βιολογική αντιμετώπιση των εντόμων. Έχει αναφερθεί ότι προσβάλλει περίπου 200 είδη εντόμων (McCoy et al., 1988) και άλλων αρθροπόδων. Αν και παρουσιάζει μεγάλα ποσοστά θνησιμότητας στα έντομα δεν αποτελεί κίνδυνο για τα θηλαστικά παρά μόνο μπορεί να προκαλέσει αλλεργικές αντιδράσεις σε ευαίσθητα άτομα. Παράλληλα μπορεί να εφαρμοστεί σαν τεχνική για τον έλεγχο της Μαλάριας, τοποθετώντας δίχτυα κουνουπιών ή φύλλα βαμβακιού βαπτισμένα σε διάλυμα νερού που περιέχει κονίδια του μύκητα, στον τοίχο σαν παγίδες .



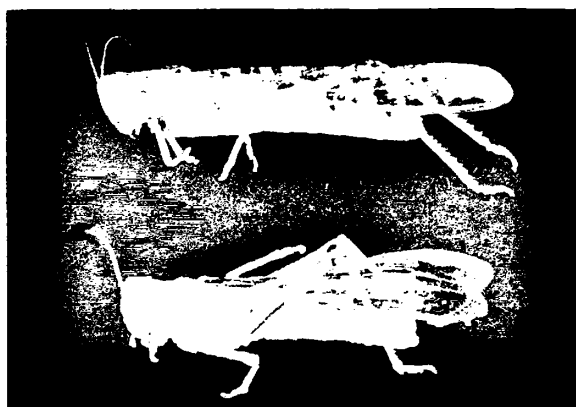
Εικόνα 1.5.4.1. Βιολογικός κύκλος του *Metarhizium anisopliae*

Ο μύκητας εισέρχεται από τους πόρους του τραχειακού συστήματος (Solomon et.al., 2002). Μόλις εισέρθει στο εσωτερικό του εντόμου παράγει κονίδια που σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο φαίνονται σαν μακρές, διακλαδιζόμενες υφές και σχηματίζουν νηματοειδή κελία. Στους μύκητες το μυκήλιο είναι ο κύριος τρόπος ανάπτυξης. Η ραγδαία ανάπτυξη του έχει ως αποτέλεσμα το έντομο να γεμίσει μυκήλια, τα οποία θα καταστρέφουν τα εσωτερικά όργανά του. Ο *M. anisopliae* θρέφεται από τα λιπίδια που αποτελείται η επιδερμίδα του εντόμου. Επίσης είναι ικανός να απελευθερώνει σπόρια υπό χαμηλές συνθήκες υγρασίας (<50%). Επιπλέον μπορεί να παράγει δευτερογενής μεταβολίτες, που είναι ουσίες τοξικές για τα έντομα αλλά και πρωτεϊνολυτικά ένζυμα.

Εάν η υγρασία είναι αρκετά υψηλή, εμφανίζεται μια λευκή μούχλα στο κουφάρι του εντόμου που σιγά – σιγά αυξάνεται και σε σύντομο χρονικό διάστημα μεταχρωματίζεται σε πράσινη (Tanada, et.al., 1993).



Εικόνα 1.5.4.2. Τρόπος διεισδυσης του Εντομοπαθογόνου μύκητα *M. anisopliae*.



Εικόνα.1.5.4.3. Προσβολή του *M. anisopliae* σε ακμαίο *Schistocerca gregaria*

Μερικά έντομα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για να περιοριστούν οι λοιμώξεις που προκαλούνται από τον *M. anisopliae*. Για παράδειγμα το *Schistocerca gregaria* (η ακρίδα της ερήμου) παράγει αντί – μυκητιακές τοξίνες οι οποίες αναστέλλουν την βλάστηση των σπορίων. Επιπλέον ορισμένα είδη εντόμων μπορούν να ξεφύγουν από την προσβολή αναπτύσσοντας ταχύτατα ένα νέο κέλυφος, πριν τα κονίδια του μύκητα διαπεράσουν την επιδερμίδα.

Το Bioblast είναι μία εμπορική διαθέσιμη μορφή του εντομοπαθογόνου μύκητα *M. anisopliae* που χρησιμοποιείτε για το έλεγχο των τερμιτών του γένους *Reticulitermes* spp. Ο μύκητας εφαρμόζεται πάνω στο ξύλο όπου είναι γνωστό ότι οι τερμίτες διατηρούν τις στοές τους. Οι τερμίτες που βρίσκονται μέσα στις στοές είναι εκτεθειμένη σε άμεση επαφή

με τα κονίδια του μύκητα. Παράλληλα με αυτήν την μέθοδο προκαλούμε εξάπλωση του παθογόνου μύκητα σε υγιείς, μη μολυσμένα άτομα της αποικίας. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο θάνατος επέρχεται σε 4 έως 10 ημέρες ανάλογα με την θερμοκρασία.

1.6 Πειράματα στην Ελλάδα

Στην Ελλάδα δεν έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές επισκοπήσεις με σκοπό την καταγραφή των εντομοπαθογόνων, με εξαίρεση αποτελούν οι εργασίες των Roditakis et al. (2001) και Francis et al. (2004).

Η παρούσα εργασία έγινε στο πλαίσιο σχετικού ερευνητικού προγράμματος με τίτλο «Χρήση εντομοπαθογόνων μυκήτων για την αντιμετώπιση αρθοπόδων εχθρών των καλλιεργειών» (Γ.Γ.Ε.Τ Διακρατική συνεργασία Ελλάδος – Πολωνίας).

Σκοπός του προγράμματος, για την Ελληνική πλευρά, ήταν η ανεύρεση εντομοπαθογόνων μυκήτων σε διάφορες περιοχές της χώρας μας και στη συνέχεια η έρευνα για την δυνατότητα της χρήσης τους ως παράγοντες Βιολογικής αντιμετώπισης.

Στην παρούσα μελέτη παρατίθενται τόσο τα αποτελέσματα που αποκτήθηκαν από την προσωπική εργασία του συγγραφέα τόσο τις επισκοπήσεις που αφορούν στην Ελλάδα όσο και αυτές που αποκτήθηκαν στο πλαίσιο του άνωθεν ερευνητικού προγράμματος στην Πολωνία και παραχωρήθηκαν ευγενώς από τον υπεύθυνο του έργου, Δρ Δ. Κοντοδήμα.



2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Απομόνωση Εντομοπαθογόνων Μυκήτων.

Συλλέχθηκαν δείγματα (προσβεβλημένα έντομα ή χώμα) από διάφορες περιοχές από της Αττικής, Πελοποννήσου (Αχαΐα, Αρκαδία), Βοιωτίας, Ρόδου και Κρήτης από Βιοκαλλιέργειες, Συμβατικές καλλιέργειες, Δάση και Αστικό Πράσινο.

Συγκεκριμένα στις περιοχές Τατόι, Αγ. Στέφανος, Ελληνικό, Κηφισιά (Αττική) Όρος Κιθαιρών, Θήβα (Βοιωτία) Γούβες (Κρήτη) έγιναν επισκοπήσεις και συλλέχθηκαν προσβεβλημένα έντομα.

Στις περιοχές Αγ. Στέφανος Μαραθών Καλέντζι Μαρούσι Κηφισιά Ντράφι Πικέρμι (Αττική) Θήβα (Βοιωτία), Πάτρα Αχαΐας, Λαγκάδια, Δημητσάνα και Κάψια Αρκαδίας (Πελοπόννησος), Ρόδος (Δωδ/νησα) και Βάι (Κρήτη) έγιναν δειγματοληψίες χώματος (300γρ/δείγμα) από βάθος 10cm. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πλαστικές σακούλες. Στην συνέχεια μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο για επεξεργασία. Η συγκομιδή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε κατά το τελευταίο τρίμηνο του 2007 και στις αρχές του 2008.

Τα σημεία δειγματοληψίας καταγράφηκαν με χρήση συσκευής GPS (Garmin, Ehtrex) και χρησιμοποιώντας γεωγραφικά πληροφοριακά συστήματα (GIS).

Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες απομονώθηκαν με την μέθοδο της χρήσης ως δολώματος του εντόμου *Galleria mellonella* (*Galleria* Bait Method) (Zimmermann 1986) και με τη μέθοδο των ημικλεκτικών υποστρωμάτων.

Η δολωματική μέθοδος είναι μια απλή τεχνική, η οποία αρχικά χρησιμοποιούνταν επιτυχημένα σε οικολογικές μελέτες για τον προσδιορισμό των παρασιτικών νηματωδών των εντόμων (Mracek 1980,1982; Akhurst and Brooks 1984). Το χώμα που συλλέξαμε τοποθετήθηκε σε μικρά πλαστικά δοχεία. Στην πράξη όμως μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε οποιοδήποτε μέγεθος αλλά και σχήματος δοχείου, ακόμα και τρυβλία τύπου Petri τα οποία



χρησιμοποιήσαμε εμείς. Είναι σημαντικό οι προνύμφες να κινούνται μέσα στο δείγμα μας. Κατόπιν αυτές εμβαπτίστηκαν σε ζεστό νερό θερμοκρασίας 45°C για μερικά δευτερόλεπτα και τοποθετήθηκαν ανάλογα με το μέγεθος τους αλλά και των τεμαχιδίων του εδάφους 5, 10 ή 15 απο αυτές σε δείγματα υψηλή υγρασίας. Τα τρυβλία τύπου Petri αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (25±1 °C) για 18 – 20 ημέρες και για τις πρώτες 4 ημέρες τα τρυβλία αναποδογυρίζονταν κάθε μέρα ώστε οι προνύμφες να μπορούν κινούνται μέσα στα δείγματα (Keller et al 2000). Ο έλεγχος της θνησιμότητας παρακολουθήθηκε για 7, 12, και 14 ημέρες αντίστοιχα (R.T Mietiewski et al 1996). Οι νεκρές ή μουμιοποιημένες προνύμφες απομακρύνθηκαν και εν συνεχεία αποστειρώθηκαν σε 1% χλωριούχο νάτριο για μερικά δευτερόλεπτα.



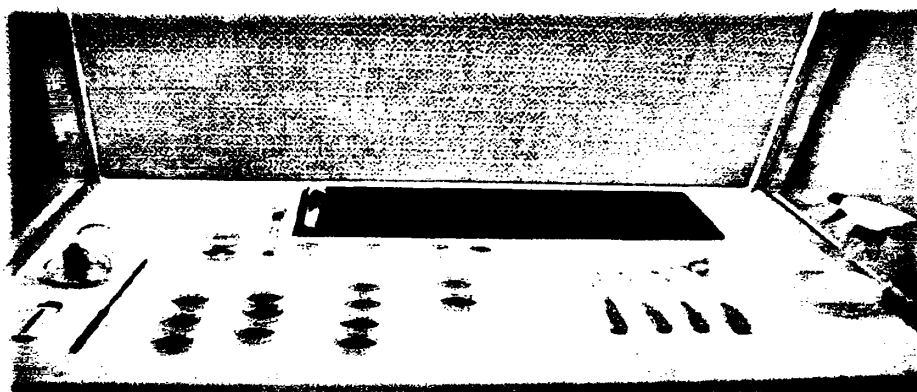
Εικόνα 2.1.1. Η μέθοδο της χρήσης ως δολώματος του εντόμου *Galleria mellonella*

Εν συνέχεια οι προνύμφες που εμφάνισαν τα συμπτώματα του εντομοπαθογόνου μύκητα τοποθετήθηκαν σε πλαστικά τρυβλία τύπου Petri που είχαν υψηλή υγρασία (moist chamber) για να επιταχυνθεί η σπορογένεση. Αυτό επιτεύχθηκε με εναπόθεση ορισμένων σταγόνων νερού πάνω σε χαρτί, κυκλικού σχήματος μέσα στα τρυβλία.

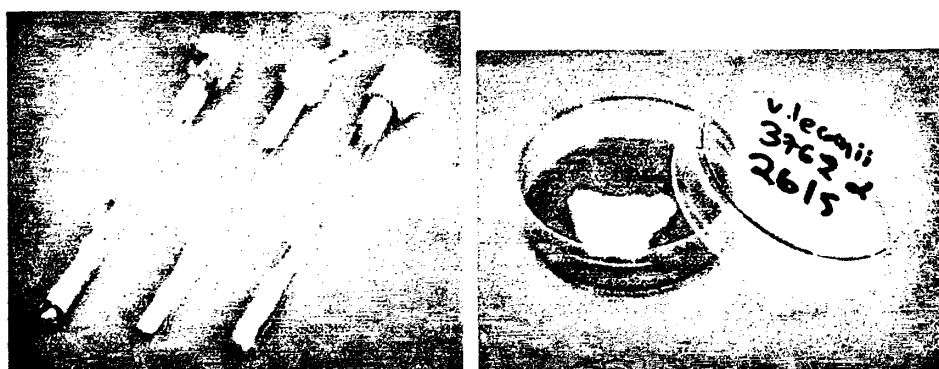


Εικόνα 2.1.2. Προσβεβλημένες προνύμφες *Galleria mellonella*

Στο τέλος, μετά από την πάροδο 48 ωρών σε θερμοκρασία δωματίου, περνούμε δείγματα από τις προσβεβλημένες προνύμφες. Ακολούθως καλλιεργούμε τα κονίδια των μυκήτων, που απομακρύνουμε από τις προνύμφες, σε υπόστρωμα S.D.A ή P.D.A με τη χρήση εστίας νηματικής ροής.-



Εικόνα 2.1.3. Εστία νηματικής ροής



Εικόνα. 2.1.4. Ανάπτυξη του *Verticillium lecanii* επί Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

Η μέθοδο των ημικλεκτικών υποστρωμάτων βασίζεται στη χρήση υποστρωμάτων επί των οποίων αναπτύσσονται μόνο εντομοπαθογόνοι μύκητες (Strasser et al. 1996). Από κάθε δείγμα 1 gr χώματος καταμετρήθηκαν τα CFU (Colony-forming unit) που αναπτύχθηκαν πάνω σε τρυβλία με ημικλεκτικό υπόστρωμα.

Εν κατακλείδι όλοι οι πιθανά εντομοπαθογόνοι μυκητες εξεταστήκαν μικροσκοπικά, για να επιβεβαιώσουμε το είδος βάση του σχήματος και του μεγέθους των σπορίων.

Αντίστοιχα στην Πολωνία έγινε από την ερευνητική ομάδα επισκόπηση και συλλογή προσβεβλημένων αρθροπόδων στις περιοχές Bialowieża, Siedlce και Poznań.

2.2. To Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

Η σύσταση και ο τρόπος παρασκευής του SDA περιγράφεται ακολούθως:

Το Bacto- Sabouraud Dextrose Agar, είναι μια τροποποίηση του άγαρ Dextrose που περιγράφηκε από τον Sabouraud. Συγκριτικά τεστ, έχουν δείξει ότι το Neoptone Difco, είναι η πιο πετυχημένη πηγή του αζώτου για την ανάπτυξη μυκήτων. Το Bacto- Sabouraud Dextrose Agar, προσαρμόστηκε εν μέρει για τη καλλιέργεια και τη ταυτοποίηση μυκήτων. Για την αρχική απομόνωση του μύκητα, από λέπια και επιστρώματα προτείνεται η προσθήκη 0,015/μονάδα tellurite καλίου ή 0,05/μονάδα επιφανειακού χαλκού σ' αυτό το μέσο, για να ενισχύσει την ανάπτυξη των βακτηρίων.

Οι Emmons και Ashburn, χρησιμοποίησαν ένα Sabouraud Dextrose Agar, προετοιμασμένο με Neopeptone για την ανάπτυξη του *Trichophyton gypsum*. Οι Robinson και Kotcher, χρησιμοποίησαν το Sabouraud Dextrose Agar, το οποίο περιείχε 20 μονάδες πενικιλίνη και 40 μονάδες υδροχλωρική διωδροστρεπτομυκίνη / ml του μέσου για την απομόνωση του *Histoplasma* από σκυλιά. Οι Serowy και Jung χρησιμοποίησαν το Bacto-Sabouraud-Dextrose-Agar για καλλιέργεια του *Microspora* κι άλλων παθογόνων μυκήτων. Η προσθήκη αντιβιοτικών για την απομόνωση των παθογόνων



μυκήτων, έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα αποτελεσματική. Γενικά, 20 μονάδες πενικιλίνη και 40 μικρογραμμάρια στρεπτομυκίνη ή διυδροστρεπτομυκίνη/ ml του μέσου, προστίθενται στο αποστειρωμένο και λιωμένο μέσο στους 45 – 50 βαθμούς Κελσίου, 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. Δύο (2) ml αυτού του διαλύματος, προστίθενται σε 1 lt αποστειρωμένου μέσου, στους 45 – 50 βαθμούς Κελσίου, 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 65 gr απ' το Bacto – Sabouraud Dextrose Agar σε 1000 ml 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 βαθμούς Κελσίου). Η τελική αντίδραση του μέσου είναι: PH 5,6.



3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

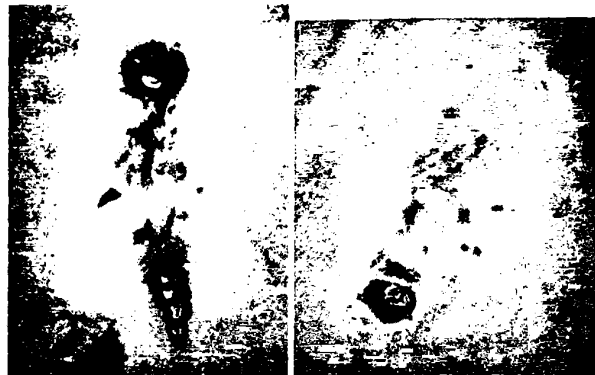
3.1 Επισκόπηση στην Πολωνία

Τα αποτελέσματα της επισκόπησης στην Πολωνία παρουσιάζονται στον Πίνακα 2 και στις Εικόνες 3.1.1 έως 3.1.17

Πιν. 2 Εντομοπαθογόνοι Μύκητες που βρέθηκαν σε διάφορα αρθρόποδα στην Πολωνία

Εντομοπαθογόνος Μύκητας	Ξενιστής	Τοποθεσία
Entomophthorales		
<i>Entomophthora muscae</i>	Diptera	Białowieża
<i>Entomophthora planchoniana</i>	Aphids	Siedlce
<i>Neozygites floridana</i>	<i>Tetranychus urticae</i>	Siedlce
<i>Neozygites parvispora</i>	Thrips	Siedlce
<i>Pandora neoaphidis</i>	Aphids	Siedlce
<i>Zoophthora dipterigena</i>	Diptera	Siedlce
<i>Zoophthora giardii</i>	Orthoptera	Białowieża
<i>Zoophthora occidentalis</i>	Aphids	Białowieża
<i>Zoophthora cf. phalloides</i>	Aphids	Białowieża
<i>Zoophthora cf. phalloides</i>	Aphids	Białowieża
<i>Zoophthora sciarae</i>	Sciarid flies	Siedlce, Poznań
<i>Zoophthora</i> sp	<i>Gastrophysa viridula</i>	Siedlce
Hyphomycetales		
<i>Beauveria bassiana</i>	Curculionidae	Poznań
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Sitona lineatus</i>	Poznań
<i>Gibellula leipous</i>	Spiders	Białowieża
<i>Gibellula pulchra</i>	Spiders	Białowieża
<i>Hirsutella aphidis</i>	Aphids	Białowieża
<i>Hirsutella kirchneri</i>	<i>Abacarus hystrix</i>	Siedlce
<i>Hirsutella rostrata</i>	Coleoptera larvae	Siedlce
<i>Hirsutella thompsonii</i>	<i>Abacarus hystrix</i>	Siedlce
<i>Isaria farinosa</i>	Lepidoptera	Białowieża
<i>Isaria tenuipes</i>	Lepidoptera	Białowieża
<i>Lecanicillium cf. muscarium</i>	Spider	Białowieża
Clavicipitales		
<i>Cordyceps gracilis</i> (<i>Isaria dubia</i>)	Elateridae	Siedlce





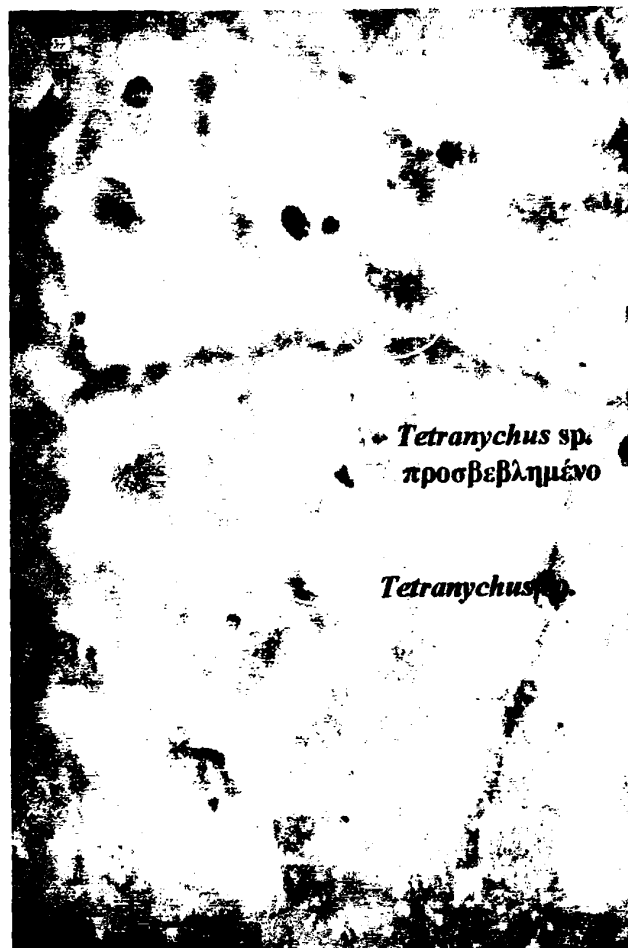
Εικόνα 3.1.1. *Gastrophysa viridula* προσβεβλημένη από *Zoophthora* sp.



Εικόνα 3.1.2. Κονίδια *Zoophthora* sp.



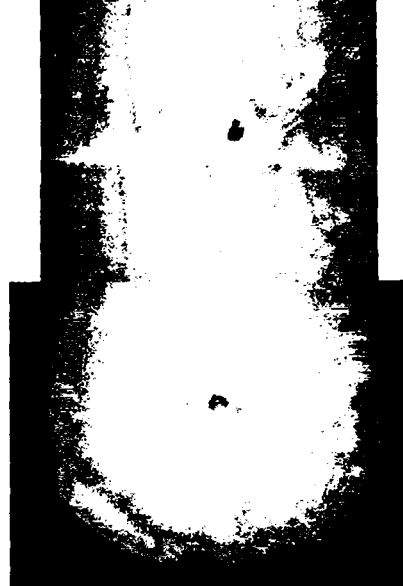
Tetranychus sp. προσβεβλημένο



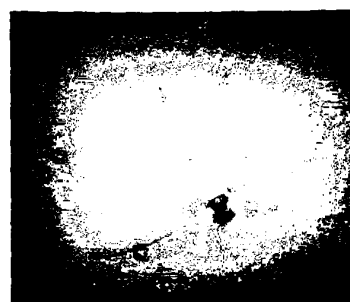
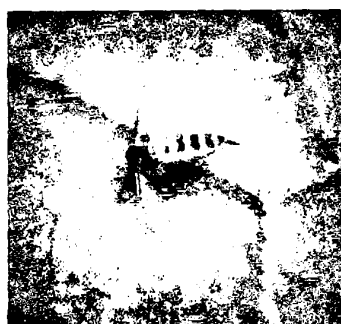
Εικόνα.3.1.3. *Tetranychus* sp. προσβεβλημένο από *Neozygites floridana*



Εικόνα 3.1.4. Ορθόπτερο προσβεβλημένο από *Zoophthora giardii*



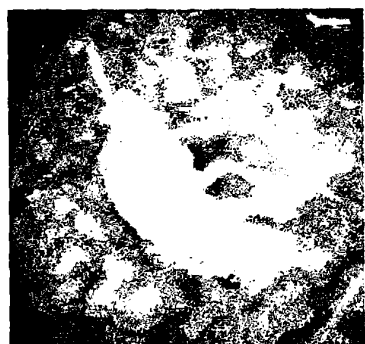
Εικόνα 3.1.5. Δίπτερο προσβεβλημένο απ *Zoophthora sp.*



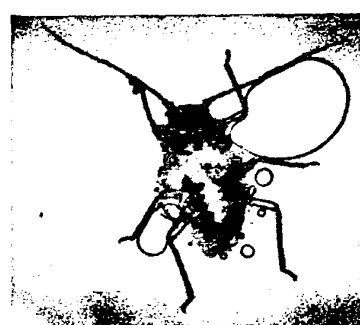
Εικόνα 3.1.6. Sciarid flies προσβεβλημένη από *Zoophthora sciarae*



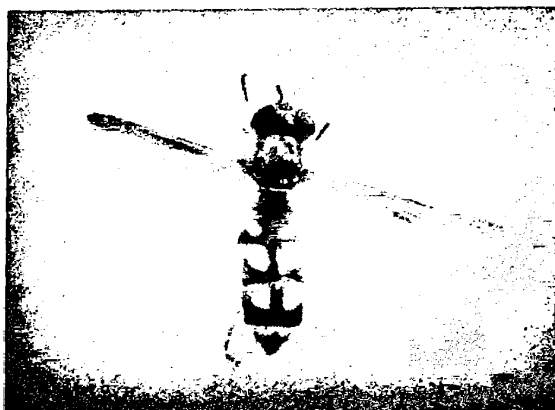
Εικόνα 3.1.7. Capiliconidia σε *Neozygites floridana*



Εικόνα 3.1.8. Αφίδα προσβεβλημένη από *Entomophthora planchoniana*



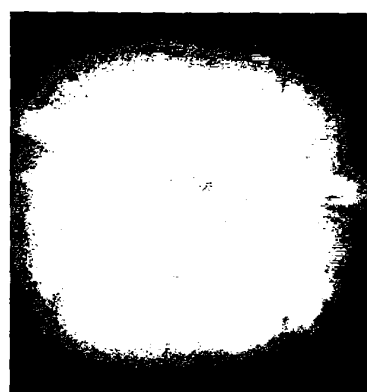
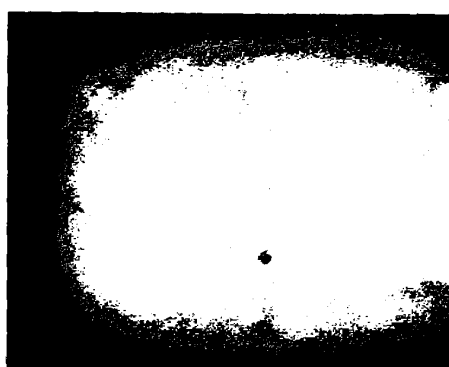
Εικόνα 3.1.8. Θρίπας προσβεβλημένος από *Zoophthora parvispora*



Εικόνα 3.1.9. Δίπτερο προσβεβλημένο από *Entomophthora muscae*



Εικόνα 3.1.10. Αφίδα προσβεβλημένη από *Hirsutella aphidis*



Εικόνα 3.1.11. Αφίδα προσβεβλημένη από *Pandora neoaphidis*



Εικόνα 3.1.12. *Isaria tenuipes* σε προνύμφη λεπιδοπτέρου



Εικόνα 3.1.13. *Gibelulla* σε αράχνη





Εικόνα 3.1.15. Curculionidae προσβεβλημένη από *Beauveria bassiana*



Εικόνα 3.1.16. *Sitona lineatus* προσβεβλημένη από *B. bassiana*



Εικόνα 3.1.17. Elateridae προσβεβλημένη από *Isaria dubia* – teleomorph – *Cordyceps gracilis*

Στο σύνολο 22 είδη εντομοπαθογόνων μυκήτων βρέθηκαν ως παθογόνα σε διαφορετικά αρθρόποδα (έντομα, άκαρεα και αράχνες) στην Πολωνία (πίνακας 2).

Δώδεκα είδη της τάξης Entomorphthorales βρέθηκαν σε διαφορετικά έντομα και ένα είδος σε άκαρεα. Επίσης βρέθηκαν 10 στο σύνολο μύκητες της τάξης Hyphomycetales σε έντομα, αράχνες και ακάρεα. Ο εντομοπαθογόνος μύκητας *B. bassiana* βρέθηκε σε όλα τα υπό έρευνα οικοσυστήματα.

3.2 Επισκόπηση στην Ελλάδα

Τα αποτελέσματα της επισκόπησης στην Ελλάδα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3 και στις Εικόνες 3.2.1 έως 3.2.10

Πιν.3 Εντομοπαθογόνοι μύκητες που βρέθηκαν σε αρθρόποδα στην Ελλάδα

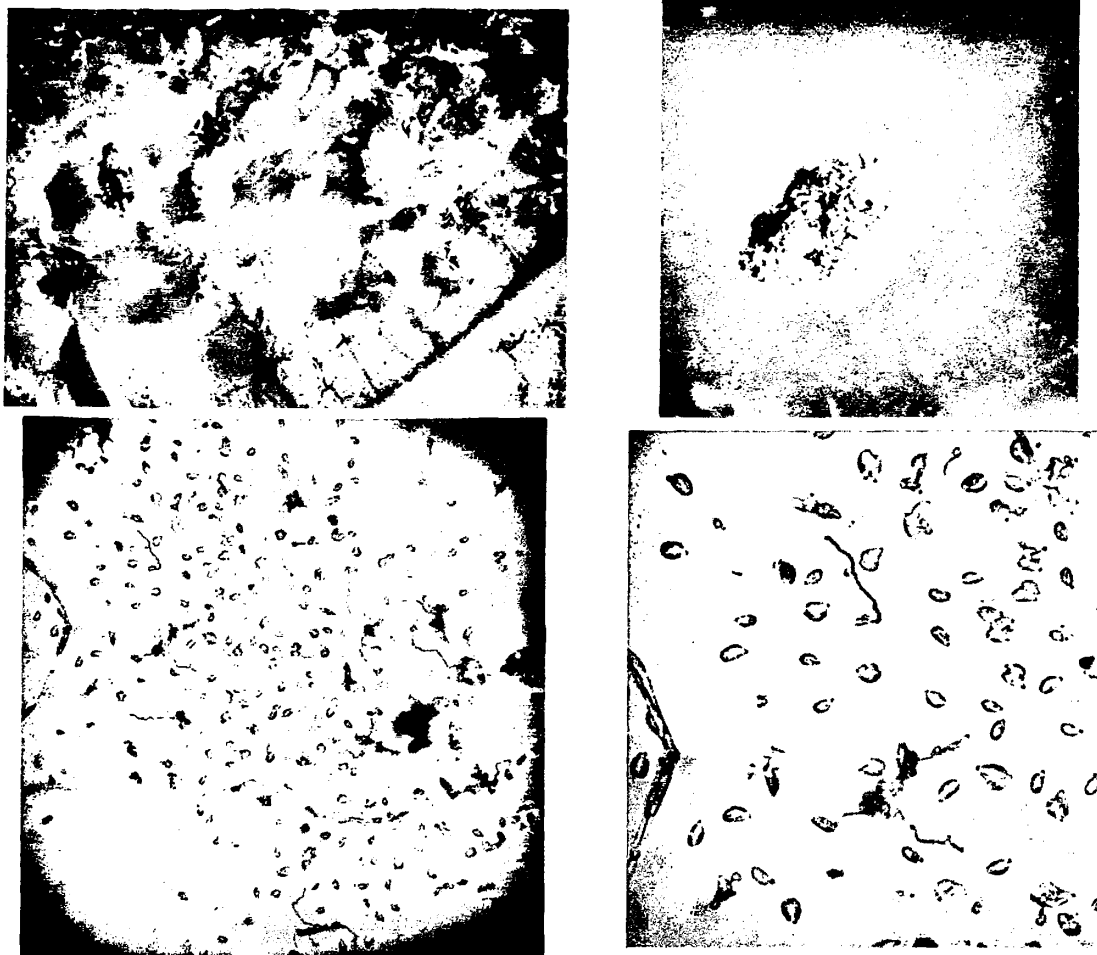
Εντομοπαθογόνος Μύκητας	Ξενιστής	Τοποθεσία	N	E
Entomophthorales				
<i>Erynia conica</i>	Diptera	TATOI	38° 9'44.87"N	23°47'32.09"E
<i>Pandora neoaphidis</i>	<i>Aphis fabae</i>	ΑΓ. ΣΤΕΦΑΝΟΣ	38°10'20.94" N	23°52'9.52"E
Hyphomycetales				
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Malacosoma neustria</i>	TATOI	38° 9'44.87"N	23°47'32.09"E
<i>Beauveria bassiana</i>	Heteroptera	TATOI	38° 9'44.87"N	23°47'32.09"E
<i>Beauveria bassiana</i>	Coleoptera	TATOI	38° 9'44.87"N	23°47'32.09"E
<i>Beauveria bassiana</i>	Dermaptera	TATOI	38° 9'44.87"N	23°47'32.09"E
<i>Beauveria bassiana</i>	Hymenoptera (ant)	TATOI	38° 9'44.87"N	23°47'32.09"E
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Rhynchophorus ferrugineus</i>	ΓΟΥΒΕΣ - ΚΡΗΤΗ	35° 19' 28,7" N	25° 18' 30,9" E
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Rhynchophorus ferrugineus</i>	ΕΛΛΗΝΙΚΟΝ -ΑΤΤΙΚΗ	37° 53'15"N	23°43'42.24"E
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Coccinella septempunctata</i>	Ορ ΚΙΘΑΙΡΩΝ	38° 11'3.12"N	23°14'58.2"E
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Zabrus tenebrioides</i>	ΘΗΒΑ	38°21'6.03"N	23° 9'59.76"E
<i>Hirsutella thompsonii</i>	<i>Abacarus sp.</i> (Eriophyidae)	ΚΗΦΙΣΙΑ	38° 4'52.85"N	23°48'44.98"E
<i>Lecanicillium cf. psalliotae</i>	<i>Collembola</i>	TATOI	38° 9'44.87"N	23°47'32.09"E
<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Rhynchophorus ferrugineus</i>	ΓΟΥΒΕΣ - ΚΡΗΤΗ	35° 19' 28.7" N	25° 18' 30.9" E
<i>Syspastospora parasitica</i>	mycoparasite of <i>B. bassiana</i>	Ορ ΚΙΘΑΙΡΩΝ	38° 11'3.12"N	23°14'58.2"E



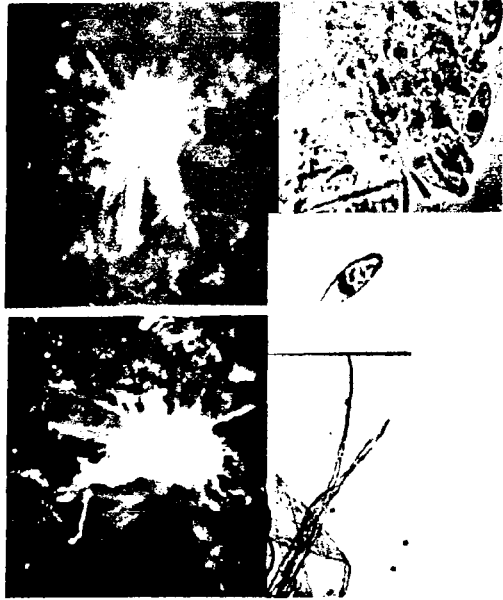
Στο σύνολο 8 είδη εντομοπαθογόνων μυκήτων βρέθηκαν ως παθογόνα σε διαφορετικά αρθρόποδα (κυρίως έντομα και ακάρεα) στην Ελλάδα (πίνακας 3).

Βρέθηκαν τρία είδη της τάξης Entomophthorales (το *Erynia conidia*, *Pandora neoarhidis* και *Conidiobolus* sp.) τα οποία (εκτός από *Pandora neoarhidis*) καταγράφηκαν για πρώτη φορά στην Ελλάδα. Επίσης σύνολο 5 εντομοπαθογόνα είδη από την τάξη Hyphomycetales βρέθηκαν στα έντομα και τα άκαρεα. Το *B. bassiana* βρέθηκε σε όλους τα οικοσυστήματα.

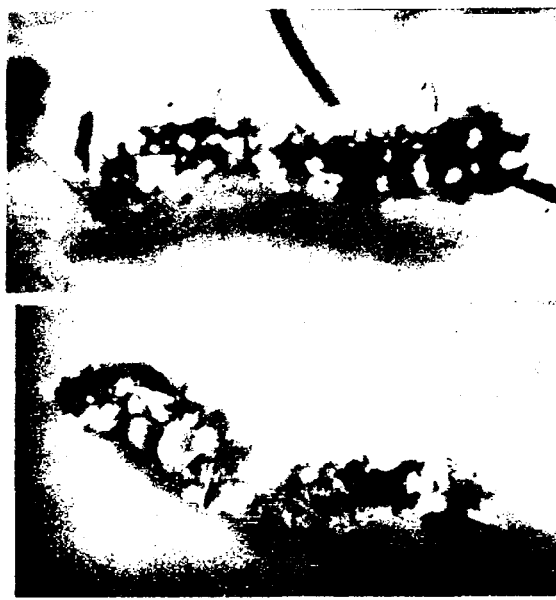
Ιδιαίτερα σημαντική ήταν η πρώτη καταγραφή στην Ελλάδα του *Hirsutella thompsonii* στο *A. hystrix* και του *Lecanicillium* cf. *psalliotae* Collembola.



Εικόνα 3.2.1. *Aphis fabae* προσβεβλημένη από *Pandora neoarhidis*



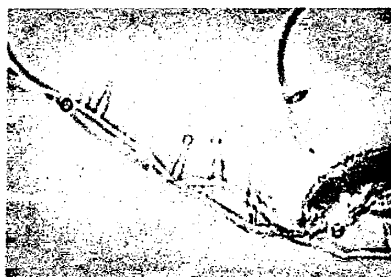
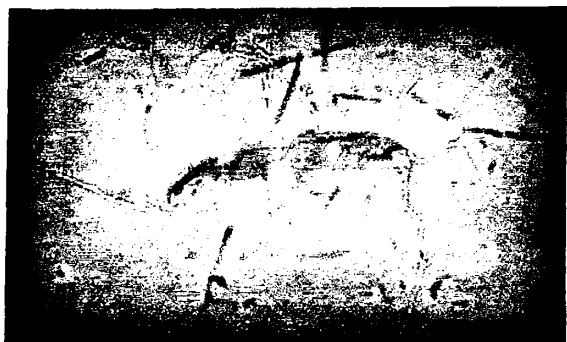
Εικόνα 3.2.2. Δίπτερα προσβεβλημένα από *Erynia conica*



Εικόνα 3.2.3. *Malacosoma neustria* προσβεβλημένο *Beauveria bassiana*



Εικόνα 3.2.4. *Beauveria bassiana* σε Heteroptera, Coleoptera, Dermaptera και Hymenoptera (α)



Εικόνα 3.2.5. *Hirsutella thompsonii* σε eriophyid mite



Εικόνα 3.2.6. *Beauveria bassiana* σε *Rhynchophorus ferrugineus*



Εικόνα 3.2.7. *Beauveria bassiana* σε *Coccinella septempunctata*



Εικόνα 3.2.9. *Syspastospora parasitica* παράσιτο του εντομοπαθογόνου μύκητα *B. bassiana*



Εικόνα 3.2.10. *Beauveria bassiana* σε *Zabrus tenebrioides*

3.3 Αποτελέσματα της δολωματικής μεθόδου και της μεθόδου των ημικλεκτικών υποστρωμάτων.

Τέσσερα είδη μυκήτων: *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *I. fumosorosea* και *Conidiobolus* sp. απομονώθηκαν από δείγματα εδάφους που προήλθαν από διαφορετικά οικοσυστήματα στην Ελλάδα.

Ο εντομοπαθογόνος μύκητας *B. bassiana* βρέθηκε και απομονώθηκε από όλα τα δείγματα και προσέβαλε σε ποσοστό 20% έως 86.2% τις προνύμφες του *Galleria mellonella* και επίσης ανάπτυξε 0.5 έως 6.1 CFU x 10³ / ένα γραμμάριο εδάφους. Η υψηλότερη συγκέντρωση CFU (Colony-forming unit) διαπιστώθηκε σε δείγματα που προέρχονταν από δασικές περιοχές.

Ο εντομοπαθογόνος μύκητας *M. anisopliae* απομονώθηκε από 6 εξεταζόμενα δείγματα εδάφους και μολύνοντας τις προνύμφες της *Galleria mellonella* σε ποσοστό 10.0% έως 71.4% CFU x 10³. Ο μύκητας εμφάνισε την μεγαλύτερη συγκέντρωση (24.2 CFUx10³ g⁻¹) και προκάλεσε την μεγαλύτερη θνησιμότητα των προνυμφών από δείγματα που προήλθαν από καλλιέργεια μπρόκολου, στον Μαραθώνα.

Ο μύκητας *Isaria fumosorosea* που απομονώθηκε κατά την διάρκεια της ερευνάς μας, για πρώτη φορά στην Ελλάδα, εμφανίστηκε μόνο σε 4 δείγματα από τα 9 συνολικά εξεταζόμενα. Το είδος αυτό παρουσιάστηκε μόνο σε 2 δείγματα τα οποία προέρχονταν από εδάφη οργανικής διαχείρισης και σε δασικά δείγματα.



Πιν.4 Θνησιμότητα (%) της προνύμφης της *Galleria mellonella* που προκαλείται απο εντομοπαθογόνους μύκητες σε εδάφη από διαφορετικά οικοσυστήματα στην Ελλάδα.

Παράγοντας Θνησιμότητας		Οικοσστήματα							
		A	B	C	D	E	F	G	H
Εντομοπαθογόνος Μύκητας	<i>B. bassiana</i>	20.0	53.3	35.7	14.2	50.0	23.0	56.7	86,2
	<i>M. anisopliae</i>	30.0	-	17.8	71.4	10.0	-	10.0	-
	<i>I. fumosorosea</i>	3.3	-	-	-	-	-	3.3	-
	Σύνολο	53.3	53.3	53.5	85.6	60.0	23.0	70.0	86.2
Μύκητες ανεξακριβωτη εντοπαθογόνα ικανότητα	<i>Acremonium sp.</i>	-	10.0	-	-	-	-	-	-
	με <i>Aspergillus sp.</i>	6.7	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Fusarium sp.</i>	16.7	23.3	7.1	3.6	3.3	-	-	3,4
	<i>Mucor sp.</i>	3.3	-	3.6	-	-	-	-	-
	Μυκήλιο που δεν παρήγαγε σπόρια	10.0	6.7	3.6	3.6	3.3	1.0	16.7	-
	Νηματώδης	-	-	-	-	10.0	-	-	-
Άλλα Αίτια	Μη αναγνωρισμένα αίτια	10.0	6.7	32.1	7.1	23.4	1.0	13.3	7.0

Πιν.5 Πυκνότητα σε CFU (Colony-forming unit) των εντομοπαθογών μυκήτων στο έδαφος από διαφορετικά οικοσυστήματα.

Οικοσύστημα	N	E	<i>B. bassiana</i> (CFU x 10 ³ g ⁻¹)	<i>M. anisopliae</i> (CFU x 10 ³ g ⁻¹)	<i>I. fumosorosea</i> (CFU x 10 ³ g ⁻¹)	Συνολικά (CFU x 10 ³ g ⁻¹)	Σημειώσεις
	38°10'17.54"	23°52'16.76	1.7	4.1	-	5.8	-
	38° 8'35.55"	23°58'33.46	-	2.8	-	2.8	<i>Conidiobolus</i> sp.
	38° 8'33.65"	23°58'28.64	0.5	11.4	0.2	12.1	-
	38° 8'33.65"	23°58'28.64	0.6	24.2	-	24.8	-
	38° 8'33.65"	23°58'28.64	3.9	8.5	-	12.4	-
	38°10'18.38"	23°52'17.23	6.0	-	0.2	6.2	-
	38°10'18.38"	23°52'17.23	6.1	-	-	6.1	-
	38°10'20.94"	23°52'9.52"	1.1	-	-	1.1	<i>Conidiobolus</i> sp.

*Α – Καλλιέργεια Λάχανου, Αγ. Στέφανος, κοντά σε δάσος; Β – Καλλιέργεια Λάχανου, Μάραθων, Συμβατική καλλιέργεια ; C – Καλλιέργεια Λάχανου, Μάραθων, Οργανική ; D – Καλλιέργεια Μπρόκολου, Μάραθων, οργανική ; Ε – Αγρανάπαυση, Μάραθων, οργανικό F – Αγ. Στέφανος, Δασικό έδαφος ; G – Αγ. Στέφανος, Τμήμα χόρτου σε αποσύνθεση (Δάσους); Η – Καλλιέργεια Λάχανου, Αγ. Στέφανος,



Πιν.6 Τα ποσοστά θνησιμότητα της *G. mellonella* που οφείλονται στην παρουσία εντομοπαθογόνων μυκήτων σε δείγματα εδάφους από διαφορετικά οικοσυστήματα της Ελλάδος.

Νομαρχία	Περιοχή	Δείγμα	Ποσοστό μολυνσης απο <i>B.bassiana</i>	Σημειώσεις	N	E
ΑΤΤΙΚΗ	Αγ.Στέφανος	FRAGMA	30,0%	Δασικό έδαφος	38° 9'31.61"	23°53'41.05"
ΑΤΤΙΚΗ	Καλέντζι	Olives	15,0%	Ελιές	38°10'22.08"	23°54'46.46"
ΑΤΤΙΚΗ	Καλέντζι	Forest	47,5%	Δασικό έδαφος	38°10'18.11"	23°54'44.39"
ΑΤΤΙΚΗ	Μαρούσι	IGE-1	29,2%	Δασικό έδαφος	38° 3'38.69"	23°48'57.54"
ΑΤΤΙΚΗ	Μαρούσι	IGE-2	13,0%	Δασικό έδαφος	38° 3'38.69"	23°48'57.54"
ΑΤΤΙΚΗ	Μαρούσι	IGE-3	57,1%	Πάνω τμήμα χόρτου Δάσους	38° 3'38.69"	23°48'57.54"
ΑΤΤΙΚΗ	Μαρούσι	IGE-4	39,1%	Πάνω τμήμα χόρτου Δάσους	38° 3'38.69"	23°48'57.54"
ΑΤΤΙΚΗ	Μαρούσι	IGE-5	41,7%	Δασικό έδαφος	38° 3'38.69"	23°48'57.54"
ΑΤΤΙΚΗ	Μαρούσι	IGE-6	28,6%	Δασικό έδαφος	38° 3'38.69"	23°48'57.54"
ΑΤΤΙΚΗ	Μαρούσι	IGE-7	64,3%	Δασικό έδαφος	38° 3'38.69"	23°48'57.54"
ΑΤΤΙΚΗ	Κινησία	BPI	12,5%	Μ.Φ.Ι - Κήπος	38° 4'52.85"	23°48'44.98"
ΑΤΤΙΚΗ	Κινησία	Mustang	33,3%	Δασικό έδαφος	38° 4'31.06"	23°50'4.36"
ΑΤΤΙΚΗ	Ντράφι	Drafi	36,4%	Δασικό έδαφος	38° 2'19.75"	23°55'22.14"
ΑΤΤΙΚΗ	Πικέρμι	Pikermi	40,0%	Αμπέλι - Οργανικό	38° 0'22.77"	23°55'41.44"
ΒΟΙΩΤΙΑ	Θήβα	INS	22,5%	Λάχανο-Οργ - Θερμοκήπιο	38°21'6.03"	23° 9'59.76"
ΒΟΙΩΤΙΑ	Θήβα	OUT	37,5%	Κρεμμύδι-Οργ - υπαίρθια	38°21'6.03"	23° 9'59.76"
ΑΧΑΙΑ	Πάτρα	P1	10,0%	Αστικός κήπος	38°15'10.11"	21°45'33.71"
ΑΡΚΑΔΙΑ	Λαγκαδία	L2	52,9%	Δασικό έδαφος	37°41'2.69"	22° 2'15.84"
ΑΡΚΑΔΙΑ	Λαγκαδία	L3	29,4%	Δασικό έδαφος	37°40'38.91"	22° 2'5.06"
ΑΡΚΑΔΙΑ	Δημητσάνα	D1	33,3%	Δασικό έδαφος	37°38'10.11"	22° 5'23.12"
ΑΡΚΑΔΙΑ	Καψία	K1	18,2%	Δασικό έδαφος	37°43'31.02"	22°14'10.80"
ΑΙΓΑΙΟ	Ρόδος	R1	25,0%	Δασικό έδαφος	36° 5'31.50"	28° 1'46.84"
ΚΡΗΤΗ	Βαι	V1	16,7%	Φοινικό δασός	35°15'18.22"	26°15'40.48"
ΚΡΗΤΗ	Βαι	V2	25,0%	Φοινικό δασός	35°15'18.22"	26°15'40.48"





Εικόνα 3.3.1. Περιοχές επισκόπησης στην Ελλάδα





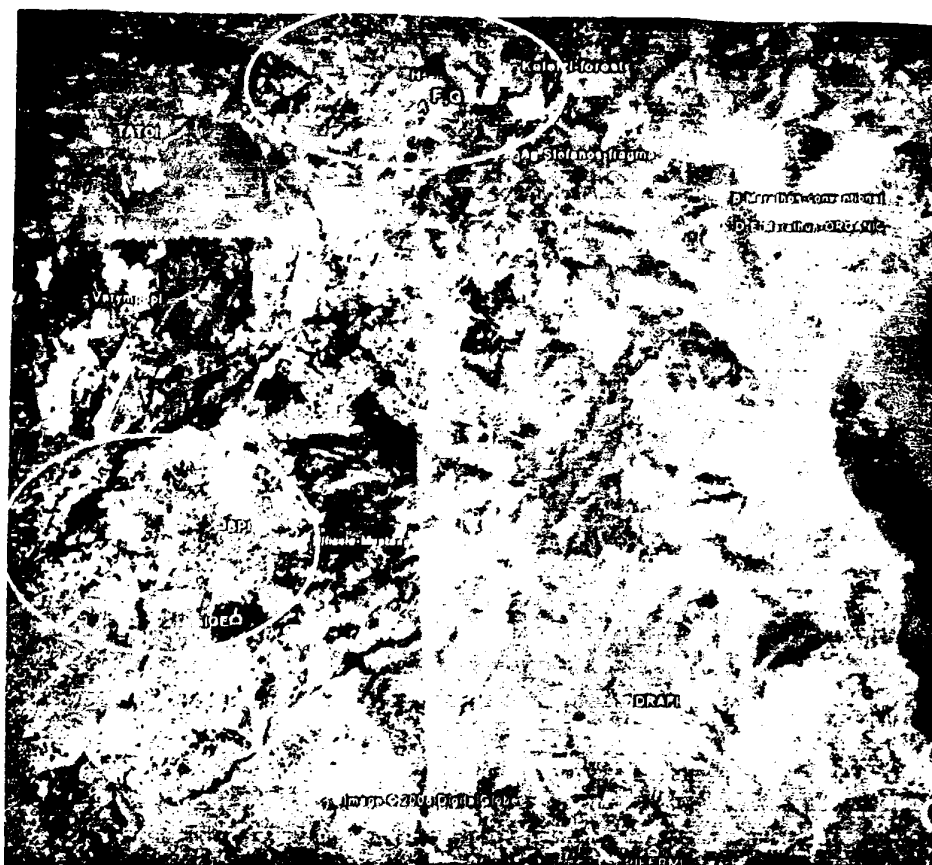
Εικόνα 3.3.3 Περιοχές επισκόπησης στη Πελοπόννησο και στο Νομό Αττικής



Εικόνα 3.3.4 Περιοχές επισκόπησης στην Πελοπόννησο



Εικόνα 3.3.5 Περιοχές επισκόπησης στον Νομό Αττικής



Εικόνα 3.3.6 Περιοχές επισκόπησης στην Κιφισία και στο Αγ. Στέφανο



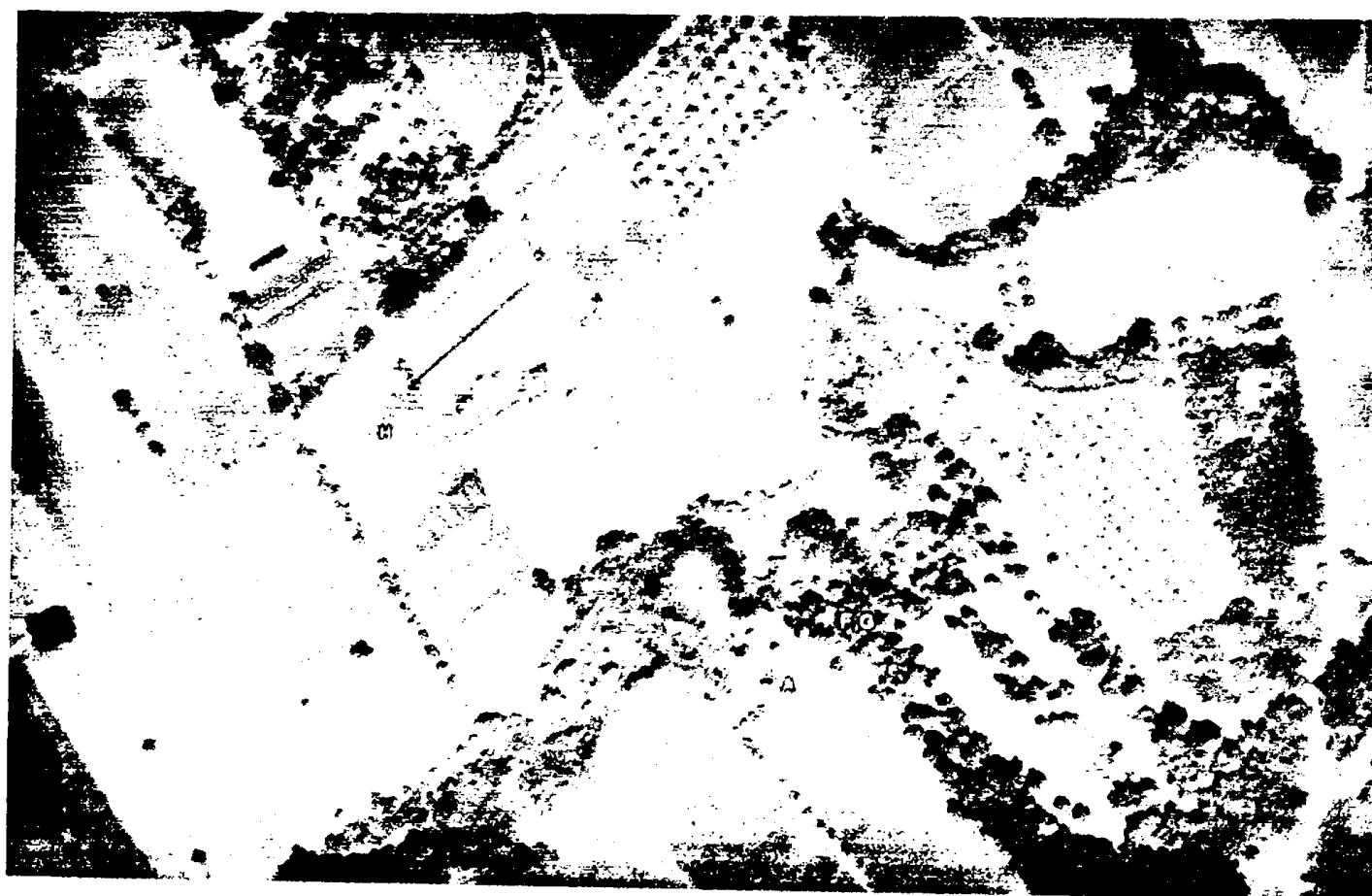
Εικόνα 3.3.7 Περιοχές επισκόπησης στο Λεκανοπέδιο Αττικής



Εικόνα 3.3.8 Περιοχές επισκόπησης κοντά στην Λίμνη του Μαραθώνα



Εικόνα 3.3.9 Περιοχές επισκόπησης στην Λίμνη του Μαραθώνα



Εικόνα 3.3.10 Καλλιέργειες όπου συλλέχτηκαν δείγματα γύμνοστος (Λίμνη Μαραθώνα)



Εικόνα 3.3.11 Περιοχές επισκόπησης στην Κρήτη (Βαι) και στην Ρόδο

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αν και η διάρκεια του πειράματος ήταν μικρή και γεωγραφικά περιορισμένη (κυρίως στις περιοχές τις Αττικής και της Πελοποννήσου), μπορούμε να πούμε ότι τόσο από τα δείγματα που συλλέχθηκαν καθώς και από τη δολωματική μέθοδο (Galleria Bait Method) (Zimmermann 1986) και τη μέθοδο των ημικλεκτικών υποστρωμάτων (Strasser et al. 1996), εξήχθησαν ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Η ανεύρεση και ο προσδιορισμός των εντομοπαθογόνων μυκήτων *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *I. fumosorosea*, *Conidiobolus* sp., *E. conica*, *P. neoarhidis*, *H. thompsonii* και *L. cf. psalliotae* στην Ελλάδα δίνει τη δυνατότητα αξιοποίησης αυτών των εντομοπαθογόνων μυκήτων, κατ' αρχήν ως φυσικών παραγόντων βιολογικής αντιμετώπισης και εν συνεχεία ως παραγόντων για την ανάπτυξη βιολογικών σκευασμάτων.

Σήμερα, που οι τάσεις της επιστήμης στοχεύουν σε μια ολοκληρωμένη παραγωγή προϊόντων με την χρήση ολοκληρωμένων μέσων και μεθόδων παραγωγής και διαχείρισης, θεωρείται σκόπιμο πως περαιτέρω σχετικές μελέτες θα δώσουν την δυνατότητα εφαρμογής σε ευρεία κλίμακα των εντομοπαθογόνων μυκήτων ως μέσα αντιμετώπισης, συνεισφέροντας ουσιαστικά στο σημαντικό και ευαίσθητο τομέα της φυτοπροστασίας.

Η περαιτέρω διερεύνηση της χρήσης των εντομοπαθογόνων μυκήτων ως παραγόντων βιολογικής αντιμετώπισης στόχο έχει τόσο τη διασφάλιση της ποιότητας των γεωργικών προϊόντων που παράγονται στην χώρα μας, όσο και της υγείας του καταναλωτή που είναι και ο τελευταίος αποδέκτης αυτών .-



5.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Ο σκοπός της ανάπτυξης των βιολογικών σκευασμάτων, δεν απαιτεί ταυτόχρονη κατάργηση των συνθετικών σκεύασματων αλλά δημιουργεί ένα καίνουργιο πλαίσιο συνεργασίας με την φύση και το περιβάλλον και εξασφαλίζει προστασία και ποιότητα στον μέσο καταναλωτή.

Η βιολογική αντιμετώπιση των ζωικών εχθρών πραγματοποιείται με την χρήση Φυσικών εχθρών (αρπακτικά, παρασιτοείδη), Εντομοπαθογόνων ιών, Εντομοπαθογόνα βακτήρια, Εντομοπαθογόνους νηματώδεις, Εντομοπαθογόνα πρωτόζωα, Εντομοπαθογόνες ρικέτσιες και με Εντομοπαθογόνους μύκητες.

Η μειωμένη αξιοποίηση των Εντομοπαθογόνων μυκήτων αποτελεί ένα καινούργιο πεδίο έρευνας της γεωπονικής επιστήμης που θα οδηγήσει σε μια φιλική ως προς το περιβάλλον γεωργία έχοντας σαν γνώμονα την προστασία του αγοραστή αυτών των προϊόντων.Υπάρχουν πολλά είδη μυκήτων που χρησιμοποιούμε στη Βιολογική αντιμετώπιση των Ζωικών εχθρών των καλλιεργειών, από του πιο μελετημένους και τους πιο γνωστούς μύκητες είναι ο *Beauveria bassiana*, ο οποίος κατά την διάρκεια αυτής της μελέτης προσδιορίστηκε μαζί με τους εντομοπαθογόνους μύκητες *M. anisopliae*, *I. fumosorosea*, *Conidiobolus* sp., *E. conica*, *P. neoaphidis*, *H. thompsonii* και *L. cf. Psalliotae* στον Ελλαδικό χώρο.

Οι παραπάνω μύκητες συλλεχτήκαν και προσδιορίστηκαν με της μεθόδους με την δολωματική μέθοδο (*Galleria Bait Method*) (Zimmermann 1986) και μέθοδο των ημικλεκτικών υποστρωμάτων (Strasser et al. 1996) από περιοχές της Ελλάδος με ικανοποιητικά αποτελέσματα.



6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ανάγνου-Βερονίκη, Μ. 1992.** Μελέτη ιώσεων του Δάκου της ελιάς, *Bactrocera (Dacus) oleae* (Gmelin), στην Ελλάδα. Διδακτορική Διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, σελ 163.
- Ανάγνου-Βερονίκη, Μ. 1996.,** Παθογένεση τριών τύπων ιών στο έντομο Δάκος της ελιάς (*Bactrocera oleae*) Στο:Ελληνική Ιολογία, 1(1) σελ: 42-45
- ABDEL – RAZEK, A. S. (1998).** “Biological efficacy of some commercial and isolated varieties of *Bacillus thuringiensis* on the development of *Candra cautella* (Walker) and *Tribolium confusum* Jacqueline du Val on stored crushed corn.” *I.O.B.C* bulletin 21(3): 67 – 74.
- Anagnou-Veroniki, M., 1994.** Impact of entomopathogenic agents on the olive fruit fly. In: *IOBC/WPRS Bulletin*, vol 17(3), p: 279-282.
- Anagnou-Veroniki, M. and Kontodimas, D.C., 2003.** Laboratory tests of the effect of *Bacillus thuringiensis* on grape berry moth *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) and on the pseudococcids’ predator *Nephus includens* (Coleoptera: Coccinellidae). *IOBC/WPRS Bulletin*, 26(8): 117-119.
- Anagnou-Veroniki, M., Kontodimas, D.C., Adamopoulos, A.D., Tsimboukis, N.D. and Voulgaropoulou, A., 2003α.** Effects of two fungal based biopesticides on *Bactrocera (Dacus) oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae). *IOBC/WPRS Bulletin*, in press.
- Anagnou-Veroniki, M., Kontodimas, D.C., Chaleplidi, S., Georgiadou, A.G and Menti, H., 2003β.** Laboratory evaluation of microbial control products on the Mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae). *IOBC/WPRS Bulletin*, in press.
- Anagnou-Veroniki, M., Kontodimas, D.C., Chaleplidi, S., Georgiadou, A.G and 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.
- Balazy, S 1993.** Fungi. Vol XXIV P 79, 102, 136, 176, 195
- Barbara, D.J. & Clewes, E. (2003).** Plant pathogenic *Verticillium* species: how many of them are there? *Molecular Plant Pathology* 4(4).297-305. Blackwell Publishing.
- Bateman, R.P., Carey, M., Batt, D., Prior, C., Abraham, Y., Moore, D., Jenkins, N. and Fenlon, J. 1996** Screening for virulent isolates of entomopathogenic fungi against the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forskål). *Biocontrol Science and Technology* 6: 549-560.



- Bourtzis K. and O'Neill S.L. 1998.** *Wolbachia* infections and arthropod reproduction. *Bioscience* 48: 287-293.
- Bourtzis K. and H.R. Braig 1999.** The many faces of *Wolbachia*. In: D. Raoult, T. Hackstadt, eds. *The Biology of Rickettsiales*. Elsevier, Amsterdam.
- Bourtzis K. Dobson S.L., Braig H.R. and O'Neill S.L. 1998.** Rescuing *Wolbachia* have been overlooked. *Nature* 391: 852-853.
- Burges H.D. 1981.** *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*. Academic Press, London, 949 p.
- Burges, H.D. (ed.) 1998** Formulation of Microbial Biopesticides, beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments Publ. Kluwer Academic, Dordrecht, 412 pp.
- Cameron, J. W. M. 1973.** Insect pathology. In History of Entomology. Ann. Rev. Entomol. pp. 285-300.
- Canning, E. U. 1953.** A new microsporidian, *Nosema locustae* n. sp., from the fat body of the African migratory locust *Locusta migratoria migratorioides* R. and F. *Parasitology* 43, 287-290.
- Copping, L.G. 2001.** *The BioPesticide manual, Second edition*. British crop protection council, U.K., p: XLIV-XLVII, 3-154, 161-3, 494-6.
- Cornell Extension Service.** Retrieved on 2006-12-14
- Cloyd, Raymond A.** The Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*, Midwest Biological Control News, Vol VI No 7.
- Γιαμβριάς, Χ. 1991.** Σημειώσεις Γεωργικής εντομολογίας, Β' τεύχος. Εκδ: Γεωργικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, σελ: 1-19.
- Donald G. McNeil Jr.,** Fungus Fatal to Mosquito May Aid Global War on Malaria, *The New York Times*, 10 June 2005
- DeBach, P. 1971.** The use of imparted natural enemies in insect pest management ecology. *Proc. Tall Timbers Conference on Ecol. and Animal Control by Habitat Management* 3:211-33.
- DeBach, P. 1974.** Chaps. 4 and 5 in *Biological control by natural enemies*. Cambridge Univ. Press. pp. 71-154.
- Doutt, R. L. 1958.** Vice, virtue and the Vedalia. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 4:119-23.
- Doutt, R. L. 1964.** The historical development of biological control. ch. 2 in P. DeBach ed. *Biological control of insect pests and weeds*. pp. 21-42.



- Driver, F., Milner, R. J., Trueman, W. H.A. 2000** A Taxonomic revision of *Metarhizium* based on sequence analysis of ribosomal DNA. *Mycological Research* 104: 135-151
- D. L Tucker, C. H. Beresford, and L. Sigler, 2004** Disseminated *Beauveria bassiana* Infection in a Patient with Acute Lymphoblastic Leukemia, *Journal of Clinical Microbiology*, November 2004. 5412 - 5414.
- Essig, E. O. 1931.** A History of Entomology. Macmillan co., NY. 1029 pp.
- EPA Factsheet.** Retrieved on 2006-12-14.
- Fargues, J., P.-H. Robert and O. Reisinger, 1979.** Formulation des productions de masse de l'hyphomycète entomopathogène *Beauveria* en vue des applications phytosanitaires. *Ann. zool. ecol. anim.* 11: 247-257.
- Ferron, P., 1981.** Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. In: H.D. Burges (ed), *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*. Academic Press, London. pp. 465-482.
- Francis C., Anagnou Veroniki M., Rouffaud M.A., Bievre C., & Papierok B., 2004** Morphometric and genetic variation among strains of two related species of *Erynia* (Zygomycota, Entomophthorales) isolated from aphids or dipterans in limited geographical area in Greece. *Journal de Mycologie Medicale* 14(4): 171-180.
- Francisco Posada, Fernando E. Vega, Stephen A. Rehner, Meredith Blackwell, Donald Weber, Sung-Oui Suh, and Richard A. Humber. 2004** *Syspastospora parasitica*, a mycoparasite of the fungus *Beauveria bassiana* attacking the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*: A tritrophic association. *J Insect Sci.* 2004; 4: 24.
- Frei, E. and K. Peyer, 1984.** Böden, Blatt 7a. In: Inst. Kartographie ETHZ (ed), *Atlas der Schweiz*. Bundesamt für Landestopographie, 2. Ausgabe, Bern.
- Freimoser, F. M., Screen, S., Bagga, S., Hu, G and St. Leger, R.J. 2003.** EST analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. *Microbiology* 149: 239-247.
- Granadov , R. A. & Ferecidi B. A. 1986b.** " The Biology of *Baculovirus*." *Vol II Biological Properties and Molecular Biology*. Crc Press, Boca Raton, FL.
- Hagen, K. S. 1973.** A history of biological control. In *History of Entomology*. *Ann. Rev. Entomol.* pp. 433-76.
- Huber, J. 1990.** Viral insecticides: Profits, Problems, and Prospects. In: *Pesticides and alternatives, innovative chemical and biological*



approaches to pest control, Ed: Cassida, J., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Oxford, N.Y., p: 117-121

Index Fungorum record Synonyms of *B. bassiana*.

Interactions. Trends in Ecology and Evolution 18: 344-350

Interactions. Academic Press, London. pp. 239-270.

Jahn, GC, PG Cox., E Rubia-Sanchez, and M Cohen 2001. The quest for connections: developing a research agenda for integrated pest and nutrient management. pp. 413-430, In S. Peng and B. Hardy [eds.] "Rice Research for Food Security and Poverty Alleviation." Proceeding the International Rice Research Conference, 31 March – 3 April 2000, Los Baños, Philippines. Los Baños (Philippines): International Rice Research Institute. 692 p.

Jahn, GC, B. Khiev, C Pol, N. Chhorn and V Preap 2001. Sustainable pest management for rice in Cambodia. In P. Cox and R Chhay [eds.] "The Impact of Agricultural Research for Development in Southeast Asia" Proceedings of an International Conference held at the Cambodian Agricultural Research and Development Institute, Phnom Penh, Cambodia, 24-26 Oct. 2000, Phnom Penh (Cambodia): CARDI.

Jahn, GC, JA Litsinger, Y Chen and A Barrion. 2007. Integrated Pest Management of Rice: Ecological Concepts. In Ecologically Based Integrated Pest Management (eds. O. Koul and G.W. Cuperus). CAB International Pp. 315-366.

James, R. R. (2001). "Effects of exogenous nutrients on conidial germination and virulence against the Silver Whitefly for two *Hyphomycetes*." *J. of Invert. Path.* 77: 99 – 107.

Jeffrey, C L. (2001). "Desiccant dusts synergize the effect of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) on Stored – grain beetles." *J. Econ. Entomol.* 94(20):367 – 372.

Katsoyannos, P., 1996. Integrated Insect Pest Management for Citrus in Northern Mediterranean Countries. Benaki Phytopathological Institute. 110 p.

Keller, S., C. Schweizer, E. Keller and H. Brenner, 1997. Control of white grubs (*Melolontha melolontha* L.) by treating adults with the fungus *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology* 7: 105-116.

Keller, S., C. Schweizer and P. Shah, 1999. Differential susceptibility of two *Melolontha* populations to infections by the fungus *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology* 9: 441-446.

Keller, S., A.-I. David-Henriet and C. Schweizer, 2000. Insect pathogenic soil fungi from *Melolontha melolontha* control sites in the canton Thurgau. *Bull. IOBC/WPRS* 23(8): 73-78.



- Keller, S. and C. Schweizer, 2001.** Ist das Drahtwurm-Problem ein Pilz-Problem? *Agrarforschung* 7(8): 248–251.
- Keller, S., P. Kessler and C. Schweizer, 2003.** Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metharhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology* 48: 307–319
- Keller, S. and G. Zimmermann, 1989.** Mycopathogens of soil insects. In: N. Wilding, N.M. Collins, P.M. Hammond and J.F. Webber (eds), *Insect-Fungus*.
- Kleespies, R. G., Vossbrinck, C. R., Lange, M. & Jehle, J. A. (2003).** Morphological and molecular investigation of a microsporidium infecting the European grapevine moth, *Lobesia botrana* Den. et Schiff., and its taxonomic determination as *Cystosporogenes legeri* nov. comb. J. Invert. Pathol. 83, 240–248.
- Kleespies, R., H. Bathon and G. Zimmermann, 1989.** Untersuchungen zum natürlichen Vorkommen von entomopathogenen Pilzen und Nematoden in verschiedenen Böden in der Umgebung von Darmstadt. *Gesunde Pflanzen* 41(10): 350–355.
- Klingen, I., 2000.** Natural occurrence of insect pathogenic fungi and their pathogenicity on different host species with emphasis on *Delia radicum* and *Delia floralis*. Ph.D. Thesis 2000: 24, Agr. Univ. Norway
- Kogan, M 1998.** INTEGRATED PEST MANAGEMENT: Historical Perspectives and Contemporary Developments, Annual Review of Entomology Vol. 43: 243–270 (Volume publication date January 1998) (doi:10.1146/annurev.ento.43.1.243)
- Kontodimas, D.C., Kavallieratos, N.G., Mantzoukas, S.D., Athanassiou, C.G. & Anagnou-Veroniki, M., 2004.** Effect of *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* and azadirachtin compounds on *Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium confusum* Du Val in stored rye. 37th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, 7th International Conference on *Bacillus thuringiensis*, August 1–6, 2004, Helsinki, Finland.
- Kontodimas, D.C., Anastasopoulou, O., Chaleplidi, S. and Anagnou-Veroniki, M., 2005.** Laboratory evaluation of *Bacillus thuringiensis* compounds on the grape berry moth *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera, Tortricidae) and the mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae). COST 862 Meeting: “Bacterial Toxins for Insect Control”, Nitra, Slovakia, September 14th–18th 2005.



- Kontodimas, D.C., Athanassiou, C.G., Kavallieratos, N.G. and Anagnou-Veroniki, M., 2005.** Insecticidal effect of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin against *Sitophilus oryzae* (L.) after short exposures on treated wheat. 10th European Meeting of the IOBC/WPRS Working Group "Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes": "Invertebrate Pathogens in Biological Control: Present and Future", 10 - 15 June, 2005, Locoronto, Bari, Italy.
- Kontodimas, D.C., Anastasopoulou, O., and Anagnou-Veroniki, M., 2005.** Efficacy of *Bacillus thuringiensis* and azadirachtin compounds against *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera, Tortricidae). *International Symposium on Organic Agriculture in the Mediterranean - Problems and Perspectives. Chania, Crete, Greece, November 9-11, 2005.* 30
- Kucera, M. 1980.** Proteases from the fungus *Metarhizium anisopliae* toxic for *Galleria melonella* larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 35: 304-310.
- Kurstak, E. 1982.** *Microbial and Viral Pesticides.* Markel Dekker, Ink., New York and Basel, 720 pp.
- Κατσόγιαννος, Π., 1992.** Η Βιολογική Καταπολέμηση. Σημειώσεις Εκπαιδεύσεως Γεωπόνων, Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, Κηφισιά, 5 σελ.
- Κοντοδήμας, Δ.Χ. και Ανάγνου-Βερονίκη, Μ., 2003.** Πρόληψη & έλεγχος εχθρών αστικού και περιαστικού πρασίνου. *Εις Πρακτικά Ημερίδας: "Αστικό & Περιαστικό Πράσινο"* - Πάτρα, 10 Μαΐου 2003. Διοργάνωση: ΓΕΩΤ.Ε.Ε., Παράρτημα Πελοποννήσου & Δ. Στερεάς και Σύλλογος Γεωπόνων Αχαΐας, Κεφαλληνίας & Ζακύνθου: 50-59.
- Lacey, L.A. and Brooks, W.A. 1997.** *Biological techniques series - Manual of techniques in insect pathology.* Academic press, London. p:8-11.
- Lomer C.J., Bateman R.P., Johnson D.L., Langwald, J. and Thomas, M. 2001** Biological Control of Locusts and Grasshoppers. *Annual Review of Entomology* 46: 667-702.
- Luz C, Rocha LF, Nery GV, Magalhaes BP, Tigano MS.** Activity of oil-formulated *Beauveria bassiana* against *Triatoma sordida* in peridomestic areas in Central Brazil *Mem Inst Oswaldo Cruz*, March 2004, 99(2):211-8.
- Λυκουρέσης, 1995.** Ολοκληρωμένη αντιμετώπιση εντόμων -εχθρών καλλιεργειών. Πανεπιστημιακές παραδόσεις. Γεωπονικό πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, 121 σελ.



- Manousis, T. and Moore, N.F. 1987.** Cricket Paralysis Virus, a Potential Control Agent for the Olive Fruit Fly, *Dacus oleae* Gmel. In: *Applied and Environmental Microbiology*, January, p: 142-148.
- Menti, H., Wright D.J & Perry R.N., 1997.** Desiccation survival of populations of the entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis megidis* from Greece and the UK. *Journal of Helminthology*, 71(1): 41-46.
- Menti H.; Wright D.J & Perry R.N., 2000.** Infectivity of populations of the entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis megidis* in relation to temperature, age and lipid content. *Nematology*, 2(5): 515-521.
- Menti H., Patel M.N., Wright D.J. & Perry R.N., 2003.** Lipid utilisation during storage of the entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis megidis* from Greece and the UK. *Nematology*, 5(1): 31-37
- Mietkiewski, R.T., J.K. Pell and S.J. Clark, 1997.** Influence of pesticide use on the natural occurrence of entomopathogenic fungi in arable soils in the UK: Field and laboratory comparisons. *Biocontrol Science and Technology* 7: 565-575.
- McNeil, Donald G. Jr.,** Fungus Fatal to Mosquito May Aid Global War on Malaria, The New York Times, 10 June 2005
- Μιχαλάκη, Μ., Αθανασίου Χ. και Μπουχέλος Κ.** Αξιολόγηση της εντομοκτόνου δράσης του μύκητα *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown and Smith (Deuteromycota: Hyphomycetes) και της γης διατόμων κατά του *Tribolium confusum* Du Val (Coleoptera: Tenebrionidae) σε αποθηκευμένο σιτάρι. 11^ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο, Καρδίτσα, 11-14 Οκτωβρίου 2005.
- Μιχαλάκη, Μ. Π., Ν. Γ. Καβαλλιεράτος, Χ. Γ. Αθανασίου, Γ. Ν. Μπαλωτής, Η. Α. Ρηγάτος, Φ. Γ. Πασχαλίδου και Υ. Α. Batta 2004.** Μελέτη της συνδυασμένης δράσεως του εντομοπαθογόνου μύκητα *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) και της γης διατόμων κατά των προνυμφών του κολεοπτέρου των αποθηκευμένων προϊόντων *Tribolium confusum* Jacquelin du Val (Coleoptera: Tenebrionidae). Περίληψεις 12^{ου} Πανελληνίου Φυτοπαθολογικού Συνεδρίου, Καστοριά, 12-15 Οκτωβρίου 2004, σελ. 148.
- Nickle, W.R and Welch H.E, 1984.** Insect Nematodes. In: *Plant and Insect Nematodes*. Ed: W.R. Nickle, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, p: 627-650.



- Phillips, D. H. & Burdekin, D. A. 1992.** Diseases of Forest and Ornamental Trees. Macmillan. ISBN 0-333-49493-8.
- Pinna, M., 1992.,** Impiego di *Verticillium lecanii* (Zimm) per il controllo biologico di *Aphis gossypii* (Glover) su cetriolo in coltura protetta. *Informatore Fitopatologico*, 10/1992: 56-58.
- Poinar, Jr., G.O. and Thomas, G.M., 1978.** *Diagnostic manual for the identification of insect pathogens*. E.d.: Plenum Press, N.Y. and London, p: 1-151
- Prior, C., Jollands, P. and Le Patourel, G. 1988** Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina; Hyphomycetes) to the co coa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 52: 66-72.
- Prior, C., Greathead, D.J., 1989** Biological control of locusts: the potential for the exploitation of pathogens. *FAO Plant Protection Bulletin* 37: 37-48
- Roditakis, E., Couzin, I.D., Balrow, K., Franks, N.R. & Charnley A.K., 2000.** Improving secondary pick up of insect fungal pathogen conidia by manipulating host behaviour. *Annals of Applied Biology*, 137(3): 329-335.
- Roditakis, E., Kollaros, D., & Legakis, A. 2002** Entomopathogens of *Anacridium aegyptium* L. in Crete. *Entomologia Hellinika* 14: 5-10
- 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: 84-98.
- Screen, S.E., Hu, G. and St. Leger, R. J. 2002.** Transformants of *Metarhizium anisopliae* sf. *anisopliae* overexpressing chitinase from *Metarhizium anisopliae* sf. *acridum* show early induction of native chitinase but are not altered in pathogenicity to *Manduca sexta* . *Journal of Invertebrate Pathology* 78: 260-266.
- Simmonds, F. J., J. M. Franz and R. I. Sailer. 1976.** History of Biological Control. Ch. 2 In Huffaker, C. B. and P. S. Messenger (eds). *Theory and Practice of Biological Control*. Academic Press, NY. 788 pp.
- Smith, J.E., Lewis, CW., Anderson, J.G. and Solomons, G.L., 1994.** *Mycotoxins in human nutrition and health*. Ed: EUR 16048 En Directorate – General, p: VIII, 138-139.
- Solomon, Eldra, Linda Berg, Diana Martin. 2002.** *Biology*. Brooks/Cole.
- Steinhaus, E. A. 1949.** *Principles of Insect Pathology*. McGraw-Hill Book Company, Inc., N.Y., U.S.A., p: 166-177, 228-9, 318-9, 417-421, 633-7.



- Steinhaus, E. A. 1956.** Microbial control - the emergence of an idea.
Hilgardia 26(2):107-60.
- Steinhaus, E. A. 1964.** Microbial diseases of insects, In: *Biological Control of Insects Pests and Weeds*, Ed: DeBach, P., London, p: 521-2.
- Steve H. Dreistadt, Mary Louise Flintl 1994** Pests of Landscape Trees and Shrubs: An Integrated Pest Management Guide ANR Publications, University of California, Oakland, California 328pp
- Strasser, H., A. Forer and F. Schinner, 1996.** Development of media for the selective isolation and maintenance of virulence of *Beauveria brongniartii*. In: T.A. Jackson and T.R. Glare(eds), *Proceedings of the 3rd International Workshop on Microbial Control of Soil Dwelling Pests*, February 21-23, 1996. AgResearch Lincoln, New Zealand. pp. 125-130.
- Tanada, Y. 1993.** *Epizootiology of infectious diseases*, In: Insect Pathology, Ed: Steinhaus E, Academic press, Inc, USA., p: 461-468.
- Thomas, M.H., Blanford, S 2003** Thermal biology in insect-parasite
Trends in Ecology and Evolution 18: 344-350
- Τζανακάκης, Μ.Ε. 1995.** *Εντομολογία*. University studio press, Θεσσαλονίκη, 385 σελ.
- University of Connecticut Extension.** Retrieved on 2006-12-14.
- University of Minnesota Extension.** Retrieved on 2006-12-14.
- Van den Bosch, R., P. S. Messenger and A. P. Gutierrez. 1982.** Chapter 3 in Biological Control. Plenum Press, NY and Lond. pp. 21-36.
- Van Driesche, R. G. and T. S. Bellows. 1996.** Chapter 1 in Biological Control. Chapman and Hall, NY. 539 pp.
- Welch, H.E. 1963.** *Nematode Infections*. In: Insect Pathology, An Advanced Treatise, Volume 2, Ed: Steinhaus, E, Academic Press, London, p: 364-365.
- Werren J.H. 1997.** *Biology of Wolbachia*. *Annu. Rev. Entomol.* 42: 587- 609
- Zare,R. and Gams, W. (2001).** A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*.
III. Generic classification. *Nova Hedwigia*. 72. 329-337.
- Zimmermann, G., 1986.** The *Galleria* bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil. *J. Appl. Ent.* 102: 213-215.
- Z. Z. Li, C. R. Li, B. Huang, M. Z. Fan (2001).** Discovery and demonstration of the teleomorph of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., an important entomogenous fungus". *Chinese Science Bulletin* 46: 751-753.

