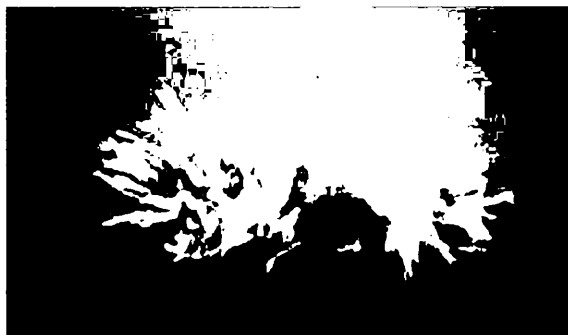


Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Ηπείρου
Διατμηματικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών
«Αγροχημεία και Βιολογικές Καλλιέργειες»

***"ΕΡΕΥΝΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΕΥΡΕΣΗ ΕΝΤΟΜΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΣΕ
ΕΛΑΦΗ ΤΗΣ ΔΥΤΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ"***



Μαρία Τσούτσα

Ιωάννινα 2016

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Ηπείρου
Διατμηματικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών
«Αγροχημεία και Βιολογικές Καλλιέργειες»

***"ΕΡΕΥΝΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΕΥΡΕΣΗ ΕΝΤΟΜΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ
ΣΕ ΕΛΑΦΗ ΤΗΣ ΔΥΤΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ"***

Επιβλέπων Καθηγητής: Δρ. Γεώργιος Πατακιούτας

Μαρία Τσούτσα

Ιωάννινα 2016

Η απόδειξη ότι ο άνθρωπος είναι το ευγενέστερο από
όλα τα πλάσματα, είναι το γεγονός ότι κανένα άλλο
πλάσμα δεν το αρνήθηκε.

Γκέοργκ Κρίστοφ Λίχτενμπεργκ (1742 - 1799)

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Γεωργικής Εντομολογίας του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου και έχει ως αντικείμενο την έρευνα για την ανεύρεση εντομοπαθογόνων μυκήτων σε εδάφη της Δυτικής Ελλάδας.

Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του διατμηματικού μεταπτυχιακού προγράμματος «Αγροχημεία & Βιολογικές Καλλιέργειες» του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και του Τεχνολογικού Ιδρύματος Ηπείρου.

Για την επιτυχή πραγματοποίηση αυτής της μελέτης θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους συνέβαλαν και με βοήθησαν με οποιοδήποτε τρόπο, πιο συγκεκριμένα:

Τον εισηγητή της πτυχιακής εργασίας Δρ. Πατακιούτα Γεώργιο, Αναπληρωτή Καθηγητή Ανθοκομίας & Αρχιτεκτονικής Τοπίου, για την ανάθεση και σωστή καθοδήγηση της μελέτης μου.

Τον Δρ. Κοντοδόμα Χ. Δημήτρη, Αναπληρωτή Ερευνητή του Μπενακείου και Προϊστάμενου του Εργαστηρίου Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας, για το αμέριστο ενδιαφέρον, την καθοδήγηση και επίβλεψη της πτυχιακής μου μελέτης.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Καβαλλιεράτο Γ. Νικόλαο, Λέκτορα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την παροχή βιβλιογραφίας και πληθυσμού του εντόμου *Sitophilus oryzae* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα έρευνα.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Διεύθυνση του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου και όλο το προσωπικό για τη διάθεση του χώρου και του εργαστηριακού εξοπλισμού.

Απώτερος σκοπός της εργασίας είναι να αναδειχθεί με επιστημονική βάση η πιθανή παρουσία εντομοπαθογόνων μυκήτων, στην περιοχή της Δυτικής Ελλάδας, για τη χρήση τους με στόχο τη βέλτιστη καταπολέμηση των εντόμων – εχθρών των καλλιεργειών, ώστε να αντικατασταθεί ή έστω να μειωθεί η περαιτέρω χρησιμοποίηση των χημικών εντομοπαθογόνων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1. Γενικό Μέρος	
1.1 Η βιολογική αντιμετώπιση	11
1.2. Φυσικοί Εχθροί των εντόμων.....	13
1.2.1 Παρασιτοειδή.....	13
1.2.2 Αρπακτικά.....	14
1.2.3 Παθογόνα.....	15
1.3. . Εντομοπαθογόνοι Οργανισμοί	18
1.3.1 Γενικά – Το αξίωμα του Koch.....	19
1.3.2. Πλεονεκτήματα – Μειονεκτήματα από τη χρήση Εντομοπαθογόνων Μικροοργανισμών.....	19
1.3.3 Εντομοπαθογόνα βακτήρια	20
1.3.4 Εντομοπαθογόνοι ιοί.....	22
1.3.5. Εντομοπαθογόνα πρωτόζωα.....	22
1.3.6. Εντομοπαθογόνοι νηματώδεις.....	23
1.3.7. Εντομοπαθογόνες ρικέτσιες.....	24
1.3.8. Εντομοπαθογόνοι μύκητες.....	25
1.4 Οι μύκητες ως εντομοπαθόγονοι οργανισμοί.....	28
1.4.1. Ο Μύκητας <i>Verticillium lecanii</i>	28
1.4.2.Ο Μύκητας <i>Beauveria bassiana</i>	28
1.4.3. Ο Μύκητας <i>Metarhizium anisopliae</i>	31
1.4.4. Ο Μύκητας <i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	32
2 Ειδικό Μέρος	
2.1 Υλικά και μέθοδοι.....	33
2.1.1 Απομόνωση εντομοπ/νων μυκήτων με τη χρήση προνυμφών ως δόλωμα.....	33

2.1.2 ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ Sabouraud Dextrose Agar (SDA).....	39
2.2 Βιοδοκιμές	40
2.3. Αποτελέσματα & Συζήτηση.....	42
2.3.1. Απομόνωση εντομοπαθογόνων μυκήτων.....	42
2.3.2 Αποτελέσματα Βιοδοκιμών	46
Βιβλιογραφία	55

Πίνακες-Σχήματα –Εικόνες

Εικόνα 1: Η βιολογική αντιμετώπιση (ή βιολογική καταπολέμηση)	11
Εικόνα 2.: Η ολοκληρωμένη αντιμετώπιση εχθρών	12
Εικόνα 2.: Τρόπος εισόδου παθογόνου σε ένα έντομο	17
Εικόνα 4.: Ο μύκητας <i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo) Vuillemin	29
Εικόνα 5.: Βιολογικός Κύκλος του <i>Beauveria bassiana</i>	30
Εικόνα 6.: Βιολογικός κύκλος του <i>M. anisopliae</i>	31
Εικόνα 7.: Τρόπος διείσδυσης του <i>M. anisopliae</i> στο εσωτερικό του εντόμου.....	32
Εικόνα 8.: Πάγκος εργασίας με δείγματα εδάφους.....	34
Εικόνα 9.: Τεχνητή εκτροφή του κηρόσκορου <i>Galleria mellonella</i> σε θαλάμους Μ.Φ.Ι.....	35
Εικόνα 10: Τεχνητή εκτροφή του <i>Tenebrio molitor</i> σε ειδικούς χώρους του Μ.Φ.Ι.....	35
Εικόνα 11: Φωλεά πιτυοκάμπης (<i>Thaumetopoea pityocampa</i>) που διατηρούνταν σε ειδικό χώρο στο Μ.Φ.Ι.....	36
Εικόνα 12: Επάνθιση μυκηλίου <i>M. anisopliae</i> και <i>B. bassiana</i> σε προνύμφες <i>G. mellonella</i>	37
Εικόνα 13: Επάνθιση μυκηλίου <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> σε προνύμφη <i>G. mellonella</i> . (φωτόγραφία εξωφύλλου)	37
Εικόνα 14: Επάνθιση μυκηλίου των εντομοπαθογόνων μυκήτων επί προνυμφών, νυμφών και ακμαίων του <i>Tenebrio molitor</i>	37
Εικόνα 15: Επάνθιση μυκηλίου του <i>M. anisopliae</i> (αριστερά) και <i>P. fumosoroseus</i> (δεξιά) σε νεκρή προνύμφη πιτυοκάμπης <i>Thaumetopoea pityocampa</i>	38
Εικόνα 16: Διαδικασία για την απομόνωση των εντομοπαθογόνων μυκήτων από τις νεκρές προνύμφες του <i>Galleria mellonella</i>	38
Εικόνα 17: Εστία νηματικής ροής.....	38
Εικόνα 18: Καλλιέργεια <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> και <i>Metarhizium anisopliae</i> σε θρεπτικό μέσο SDA (Sabouraud Dextrose Agar).....	39
Εικόνα 19: Εναιωρήματα <i>Metarhizium anisopliae</i> , <i>Beauveria bassiana</i> και <i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	40
Εικόνα 20 : Παρασκευή των διαλυμάτων των εντομοπαθογόνων μυκήτων.....	40

Εικόνα 21: Εναιωρήματα κονιδίων των εντομοπαθογόνων μυκήτων όπως φαίνονται από το αιματοκυτταρόμετρο.....	41
Εικόνα 22: Βιοδοκιμή επί του <i>Sitophilus oryzae</i>	41
Εικόνα 23: Περιοχές επισκόπησης στο νομό Θεσπρωτίας όπου βρέθηκαν μύκητες.....	42
Εικόνα 24: Περιοχές επισκόπησης στο Νομό Ιωαννίνων όπου βρέθηκαν μύκητες.....	43
Εικόνα 25: Περιοχές επισκόπησης στο Νομό Πρέβεζας όπου βρέθηκαν μύκητες.....	44
Εικόνα 26: Περιοχές επισκόπησης στο Νομό Άρτας όπου βρέθηκαν μύκητες.....	45
Εικόνα 27: Επάνθιση μυκηλίου του <i>M. anisopliae</i> σε νεκρές προνύμφες ευδεμίδας.....	46
Εικόνα 28: Επάνθιση μυκηλίου του <i>P. fumosoroseus</i> (αριστερά) και <i>B. bassiana</i> (δεξιά) σε νεκρές προνύμφες ευδεμίδας (<i>Lobesia botrana</i>).....	47
Εικόνα 29: Επάνθιση μυκηλίου του <i>B. bassiana</i> σε νεκρές προνύμφες πιτυοκάμπης (<i>Thaumatorpoea pityocampa</i>).....	48
Εικόνα 30: Επάνθιση μυκηλίου του <i>M. anisopliae</i> (αριστερά) και <i>P. fumosoroseus</i> (δεξιά) σε νεκρή προνύμφη πιτυοκάμπης.....	48
Εικόνα 31: Επάνθιση μυκηλίου των εντομοπαθογόνων μυκήτων που αξιολογήθηκαν επί προνυμφών του <i>R. ferrugineus</i> . Αριστερά <i>Beauveria bassiana</i> , μέση <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> και δεξιά <i>Metarhizium anisopliae</i>	49
Εικόνα 32: Επάνθιση μυκηλίου του <i>Beauveria bassiana</i> (αριστερά) και <i>Metarhizium anisopliae</i> (δεξιά) σε ακμαία <i>R. ferrugineus</i>	49
Εικόνα 33: <i>Metarhisium anisopliae</i> επί ακμαίων <i>Scyphophorus acupunctatus</i>	50
Εικόνα 34: <i>Beauveria bassiana</i> επί ακμαίων <i>Scyphophorus acupunctatus</i>	50
Εικόνα 35: <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> επί προνύμφης <i>Scyphophorus acupunctatus</i>	50
Εικόνα 36: Επάνθιση μυκηλίου του <i>B. bassiana</i> επί <i>Sitophilus oryzae</i>	51
Εικόνα 37 : Επάνθιση μυκηλίου του <i>P. fumosoroseus</i> επί <i>Sitophilus oryzae</i>	52
Εικόνα 38 : Επάνθιση μυκηλίου του <i>M. anisopliae</i> επί <i>Sitophilus oryzae</i>	52
Εικόνα 39: Επάνθιση μυκηλίου του εντομοπαθογόνων μύκητα <i>Metarhizium anisopliae</i> επί προνύμφης <i>Paysandisia archon</i>	53
Εικόνα 40 : Ο εντομοπαθογόνος μύκητας <i>Metarhizium anisopliae</i> επί του εντόμου <i>Bactrocera oleae</i>	53

Πίνακας 1: Οι κύριες οικογένειες παρασιτικών εντόμων και οι ξενιστές τους.....	14
Πίνακας 2: Τα κύρια αθροίσματα αρπακτικών εντόμων και η βορά τους.....	15
Πίνακας 3: Οι κύριες ομάδες εντομοπαθογόνων μικροοργανισμών με παραδείγματα.....	17
Πίνακας 4: Τάξεις και μερικά είδη εντομοπαθογόνων μυκήτων	27
Πίνακας 5: Νομοί και καλλιέργειες που επιλέχθηκαν για δειγματοληψία.....	33
Πίνακας 6: Απομόνωση εντομοπαθογόνων μυκήτων από εδάφη του Νομού Θεσπρωτίας με τη χρήση ως δολώματος των εντόμων <i>Galleria mellonella</i> , <i>Thaumetopoea pityocampa</i> , <i>Tenebrio molitor</i>	42
Πίνακας 7: Απομόνωση εντομοπαθογόνων μυκήτων από εδάφη του Νομού Ιωαννίνων με τη χρήση ως δολώματος των εντόμων <i>Galleria mellonella</i> , <i>Thaumetopoea pityocampa</i> , <i>Tenebrio molitor</i>	43
Πίνακας 8: Απομόνωση εντομοπαθογόνων μυκήτων από εδάφη του Νομού Πρέβεζας με τη χρήση ως δολώματος των εντόμων <i>Galleria mellonella</i> , <i>Thaumetopoea pityocampa</i> , <i>Tenebrio molitor</i>	44
Πίνακας 9: Απομόνωση εντομοπαθογόνων μυκήτων από εδάφη του Νομού Άρτας με τη χρήση ως δολώματος των εντόμων <i>Galleria mellonella</i> , <i>Thaumetopoea pityocampa</i> , <i>Tenebrio molitor</i>	45

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανεύρεση εντομοπαθογόνων μυκήτων σε εδάφη της Δυτικής Ελλάδας και στη συνέχεια η έρευνα για τη δυνατότητα χρήσης τους ως παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης.

Η εργασία χωρίζεται σε δύο μέρη: Στο πρώτο μέρος, το γενικό μέρος, παρατίθενται γενικές πληροφορίες σχετικά με τη μέθοδο της βιολογικής καταπολέμησης και πιο συγκεκριμένα για τους εντομοπαθογόνους οργανισμούς.

Στο δεύτερο μέρος, το ειδικό μέρος, περιγράφονται οι πειραματικές εργασίες που διεξήχθησαν στο Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο και καταλήγει στα αποτελέσματα του πειράματος και τη συζήτηση του.

Σχετικά με το πείραμα, αρχικώς συλλέχθηκαν δείγματα χώματος από διάφορα αγροτεμάχια της Δυτικής Ελλάδας, από τα οποία απομονώθηκαν εντομοπαθογόνοι μύκητες με τη μέθοδο της χρήσης ως δολώματος των εντόμων *Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor* και *Thaumetopoea pityocampa*. Οι μύκητες που απομονώθηκαν αναγνωρίστηκαν με μικροσκοπική εξέταση των κονιδίων τους και είναι τα παρακάτω είδη: *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* και *Metarhizium anisopliae*. Κατόπιν οι μύκητες καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα Sabouraud Dextrose Agar (SDA) από όπου ελήφθησαν κονίδια και παρασκευάστηκαν εναιωρήματα κονιδίων συγκέντρωσης 10^6 κονίδια / ml. Με αυτή τη συγκέντρωση πραγματοποιήθηκαν βιοδοκιμές με σκοπό να δούμε την αποτελεσματικότητα των μυκήτων ως παραγόντων βιολογικής αντιμετώπισης εντόμων εχθρών των καλλιεργειών. Συγκεκριμένα έγιναν βιοδοκιμές επί ευδεμίδας (*Lobesia botrana*), πιτυοκάμπης (*Thaumetopoea pityocampa*), *Rhynchophorus ferrugineus*, *Scyphophorus acupunctatus*, *Sitophilus oryzae*, *Paysandisia archon*, και επί του δάκου της ελιάς *Bactrocera oleae*. Τα αποτελέσματα έδειξαν 100% αποτελεσματικότητα στη συγκέντρωση 10^6 κονίδια / ml.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η εντατικοποίηση των καλλιεργειών είναι ένα φαινόμενο που αδιαμφισβήτητα έχει προκαλέσει την αυξημένη χρήση χημικών φυτοφαρμάκων. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συνεχώς αυξανόμενη ρύπανση του περιβάλλοντος καθώς επίσης και την παρουσία υπολειμμάτων στο παραγόμενο προϊόν. Οπότε, η διεθνής τάση που επικρατεί στις μέρες μας, είναι να μειωθεί η χρήση φυτοφαρμάκων τόσο για την προστασία του περιβάλλοντος όσο και για την προστασία του καταναλωτή.

Η παρούσα εργασία έχει ως στόχο την ανεύρεση εναλλακτικών προς τη χημική, μεθόδων καταπολέμησης των εχθρών ώστε να είναι εφικτή η μείωση των φυτοφαρμάκων και η αποφυγή των αρνητικών συνεπειών αυτών. Ως εκ τούτου μελετάτε η δυνατότητα χρήσης εντομοπαθογόνων μυκήτων ως παράγοντες αντιμετώπισης των εντόμων – εχθρών των καλλιεργειών.

Διάφορα είδη μυκήτων έχουν χρησιμοποιηθεί εναντίον διαφόρων εντόμων σε ποικίλα αγρο-οικοσυστήματα και έχουν επιδείξει εξαιρετικά επίπεδα ελέγχου. Αρκετά είδη μυκήτων έχουν αναφερθεί ως άριστοι παράγοντες αντιμετώπισης επιζήμιων εντόμων – εχθρών των καλλιεργειών, όπως οι μύκητες *Beauveria bassiana* και *Paecilomyces fumosoroseus*. Αυτά τα είδη μυκήτων έχουν πάρει σε αρκετές χώρες άδεια χρήσης εναντίων διαφόρων ειδών εντόμων που απαντώνται σε καλλιέργειες όπως αφίδες, θρίπες, τετράνυχτοι κ.λ.π.

Τα τελευταία χρόνια αναζητήθηκαν γενικά στη φυτοπροστασία νέες μέθοδοι αντιμετώπισης με έμφαση στη χρήση βιολογικών μέσων (όπως φυσικών εχθρών, μικροβιακών παραγόντων, φυσικών ουσιών) (Anagnou et al. 2003a,b).

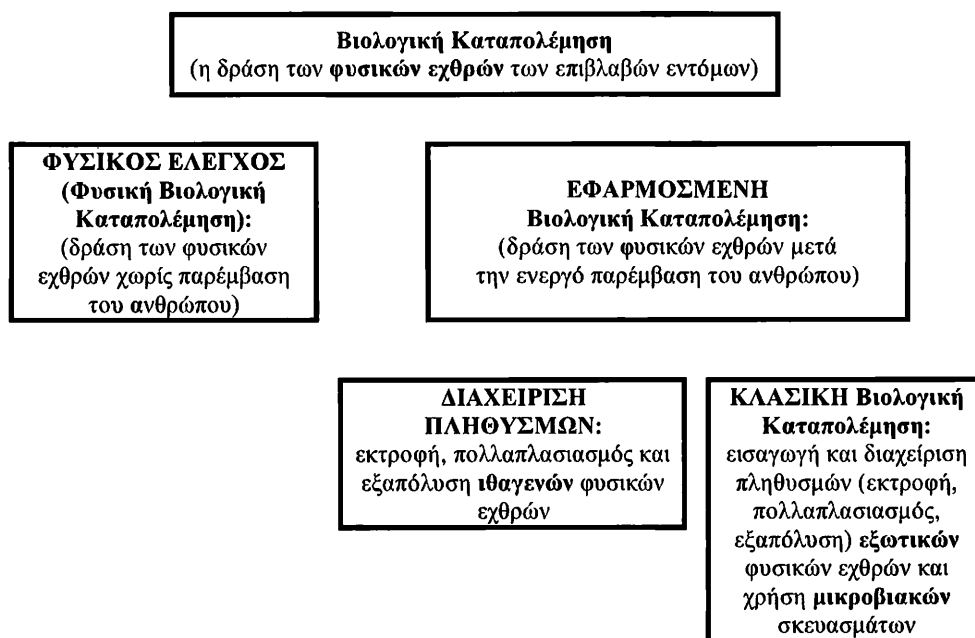
Η χρήση φυσικών εχθρών ή μικροβιακών παραγόντων για τον έλεγχο των εχθρών των καλλιεργειών ονομάζεται Βιολογική Αντιμετώπιση ή Βιολογική Καταπολέμηση.

1. Γενικό Μέρος

1.1 Η Βιολογική αντιμετώπιση

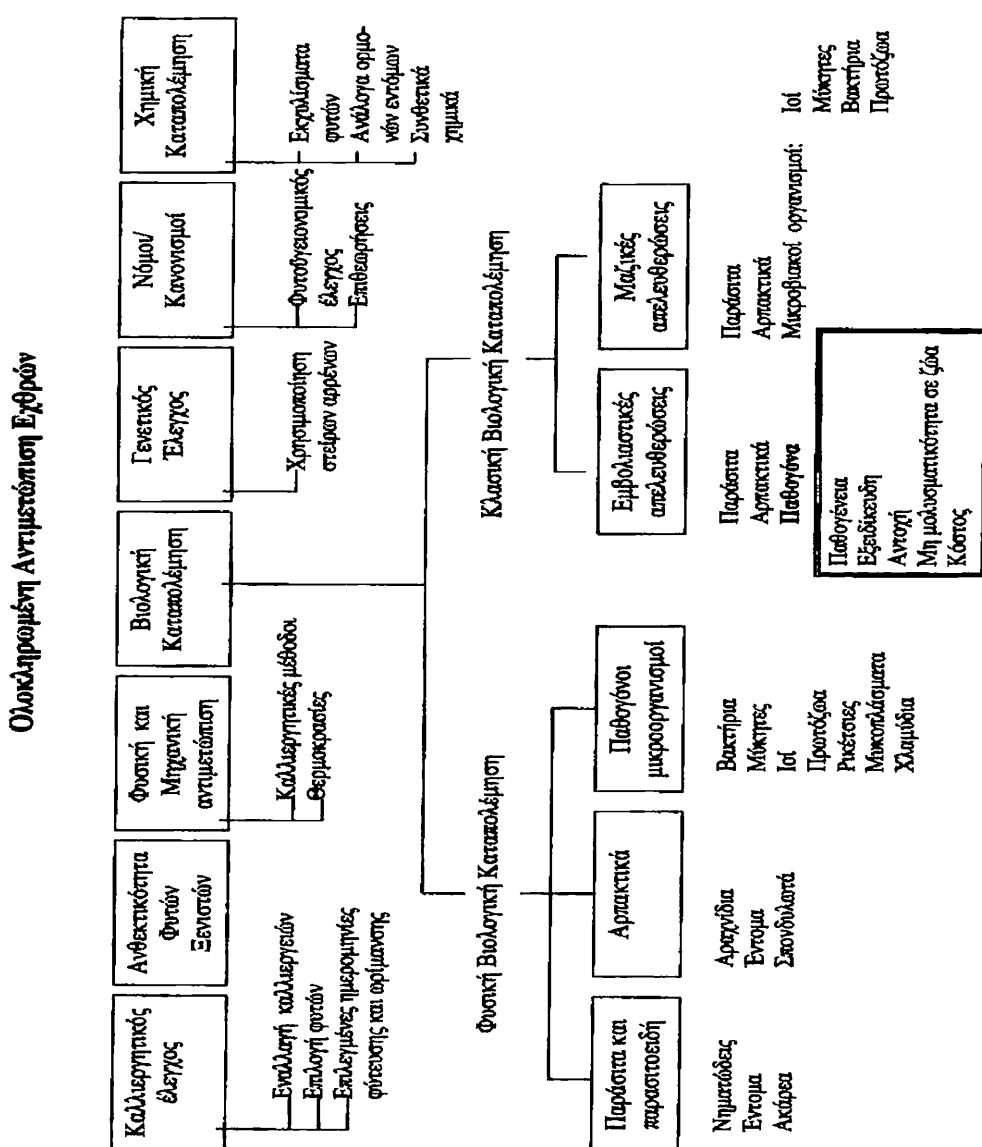
Ως Βιολογική Αντιμετώπιση εννοούμε τη δράση ζωντανών οργανισμών για τον περιορισμό του πληθυσμού των επιβλαβών εντόμων.

Διακρίνεται σε **Φυσική Βιολογική Καταπολέμηση**, δηλαδή η δράση των φυσικών εχθρών χωρίς παρέμβαση του ανθρώπου, και σε **Εφαρμοσμένη Βιολογική Καταπολέμηση**, που είναι η 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) (Κοντοδήμας και Ανάγνου 2003).



Εικόνα 1.: Η βιολογική αντιμετώπιση (Κοντοδήμας και Ανάγνου 2003).

Η βιολογική αντιμετώπιση αποτελεί ισχυρό «όπλο» και για την ολοκληρωμένη αντιμετώπιση. Η ολοκληρωμένη αντιμετώπιση ουσιαστικά είναι ο συνδυασμός καλλιεργητικών, βιολογικών, βιοτεχνολογικών και χημικών (εκλεκτικών) φυτοπροστατευτικών μέσων κατά το καλύτερο δυνατό τρόπο με σκοπό τον έλεγχο των Εχθρών και Ασθενειών των καλλιεργούμενων φυτών. Λαμβάνει υπόψη την παραγωγικότητα, την ποιότητα, την οικονομικότητα και την ασφάλεια του χρήστη, του καταναλωτή και του περιβάλλοντος. Στοχεύει στην προστασία της δημόσιας υγείας, στην προστασία του περιβάλλοντος, στην μείωση του κόστους παραγωγής και στην παραγωγή προϊόντων ανώτερης ποιότητας.



Εικόνα 2: Η ολοκληρωμένη αντιμετώπιση εχθρών

1.2 Φυσικοί Εχθροί των εντόμων

Το δυναμικό για υψηλούς ρυθμούς αναπαραγωγής στα έντομα αντισταθμίζεται κυρίως από την υψηλή θνησιμότητα. Υπάρχουν δύο ευρύτερες ομάδες παραγόντων θνησιμότητας, η πρώτη ομάδα συνδέεται με φυσικά αίτια του περιβάλλοντος και η δεύτερη ομάδα με τη δραστηριότητα άλλων ζωντανών οργανισμών, δηλαδή των φυσικών εχθρών.

Οι φυσικοί εχθροί των εντόμων είναι τα παρασιτοειδή, τα αρπακτικά και τα παθογόνα.

1.2.1 Παρασιτοειδή

Τα έντομα παράσιτα (άλλων εντόμων) είναι εκείνα των οποίων τα νεαρά στάδια τρέφονται εσωτερικά ή εξωτερικά πάνω στο σώμα άλλων εντόμων. Το έντομο που προσβάλλεται λέγεται ξενιστής και συντηρεί την παρασιτική προνύμφη σε όλη την ανάπτυξη της. Τα έντομα παράσιτα είναι πάντα μικρότερα από τους ξενιστές τους. Όταν ένα μόνο παράσιτο αναπτύσσεται μέσα σε κάθε ξενιστή τότε είναι ελαφρά μικρότερο, και όταν αναπτύσσονται πολλές προνύμφες του παρασίτου μέσα σε ένα ξενιστή τότε είναι αρκετά μικρότερο, πράγμα αρκετά κοινό. Το γεγονός αυτό έρχεται σε αντίθεση με την περίπτωση των αρπακτικών που είναι σχεδόν πάντοτε μεγαλύτερα από τα θύματα τους. Ένα άλλο σημείο διαφοράς ανάμεσα στα παράσιτα και τα αρπακτικά είναι ότι χρειάζεται ένας μόνο ξενιστής για να αναπτυχθεί ένα παράσιτο, ενώ το κάθε αρπακτικό καταναλώνει αρκετά έως πολλά έντομα στη διάρκεια του βιολογικού του κύκλου. Τα παράσιτα εντόμων πάντα θανατώνουν τους ξενιστές τους μέχρι τη συμπλήρωση της ανάπτυξης τους, πράγμα που βρίσκεται σε αντίθεση με τα έντομα και άλλα παράσιτα ανώτερων ζώων, όπως οι ψύλλοι και οι φθείρες. Εξ αιτίας της αντίθεσης αυτής μερικοί εντομολόγοι αποκαλούν τα έντομα παράσιτα άλλων εντόμων, παρασιτοειδή. Ο παρασιτισμός των εντόμων είναι πολύ συνηθισμένος. Τα περισσότερα έντομα έχουν τουλάχιστον ένα, και συνήθως περισσότερα είδη παρασίτων. Πάντως το ποσοστό παρασιτισμού σε ένα πληθυσμό ενός εντόμου ποικίλει ανάλογα με τις συνθήκες.

Πίνακας 1.: Οι κύριες οικογένειες παρασιτικών εντόμων και οι ξενιστές τους (Τσαπικούνης Φ. 1999).

Τάξη	Οικογένεια	Κύριοι ξενιστές
HYMENOPTERA	Ichneumonidae	Προνύμφες Ολομετάβολων εντόμων, ιδιαίτερα Λεπιδόπτερων και Υμενόπτερων (στη δεύτερη περίπτωση σαν υπερπαράσιτα).
	Braconidae	Προνύμφες Ολομετάβολων εντόμων, ιδιαίτερα Λεπιδόπτερων και Διπτέρων. Επίσης αφίδες.
	Encyrtidae	Κάμπιες και χρυσαλίδες Λεπιδόπτερων
	Eulophidae	Κοκκοειδή
	Aphelinidae	Αφίδες, κοκκοειδή
	Pteromalidae	Κάμπιες και χρυσαλίδες Λεπιδόπτερων Κολεόπτερα
	Trichogrammatidae	Ωά εντόμων, διάφορων Τάξεων
DIPTERA	Tachinidae	Κάμπιες Λεπιδόπτερων Κολεόπτερα. Μερικά Ημίπτερα

1.2.2 Αρπακτικά

Είναι ζώα που συλλαμβάνουν τα έντομα και τα καταναλώνουν σαν πηγή τροφής. Πολλά από αυτά είναι άλλα έντομα (ή από άλλες ομάδες αρθρόποδων) ή και μεγαλύτερα άλλα ζώα που είτε τρέφονται αποκλειστικά με έντομα ή απλά τα περιλαμβάνουν στο μικτό διαιτολόγιο τους. Ανώτερα ζώα αρπακτικά εντόμων είναι μερικά Σπονδυλωτά, όπως πουλιά και μικρά θηλαστικά.

Πίνακας 2.: Τα κύρια αθροίσματα αρπακτικών εντόμων και η βορά τους (Τσαπικούνης Φ. 1999).

Αθροίσμα	Στάδια που είναι αρπακτικά	Κύρια βορά
INSECTA		
<i>Coleoptera</i>		
Coccinellidae	Προνύμφες και ακμαία	Αφίδες, κοκκοειδή, ακάρεα
Carabidae	Προνύμφες και ακμαία	Διάφορα έντομα εδάφους
Staphylinidae	Προνύμφες και ακμαία	Διάφορα έντομα εδάφους
Cicindelidae	Προνύμφες και ακμαία	Διάφορα έντομα στην επιφάνεια του εδάφους
<i>Neuroptera</i>		
	Προνύμφες και ακμαία	Διάφορα έντομα
<i>Diptera</i>		
Syrphidae	Μόνο προνύμφες	Αφίδες
Asilidae	Ακμαία, επίσης προνύμφες σε μερικές περιπτώσεις	Διάφορα έντομα
<i>Hymenoptera</i>		
Πολλά είδη σφηκών και μερμηγκιών	Ακμαία. Η βορά όμως δίδεται στις προνύμφες.	Διάφορα μαλακόσωμα έντομα
<i>Hemiptera</i>		
Από διάφορες οικογένειες	Νύμφες και ακμαία	
ARACHNIDA		
Araneae (Αράχνες)	Νεαρά και ακμαία	Διάφορα έντομα, κυρίως ιπτάμενα ακμαία
Acarina (Αρπακτικά ακάρεα)	Νεαρά και ακμαία	Φυτοφάγα ακάρεα
VERTEBRATA		
Πουλιά		Διάφορα έντομα, κυρίως εδάφους

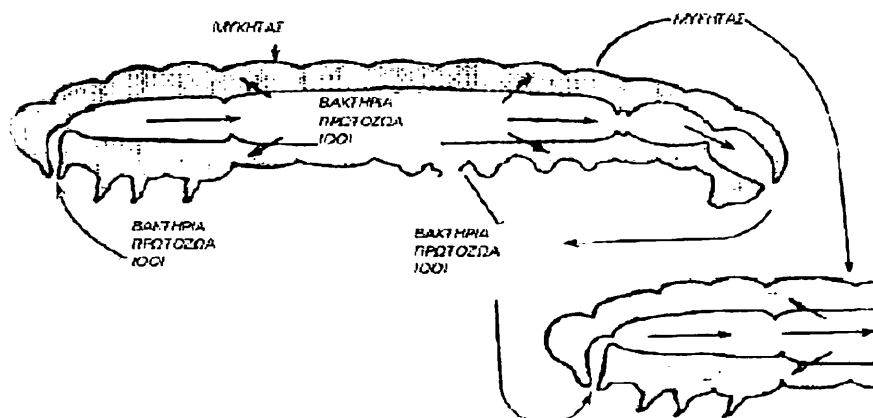
1.2.3 Παθογόνα

Τα έντομα πάσχουν από ασθένειες που προκαλούνται από μικροοργανισμούς με τρόπο παρόμοιο με τα ανώτερα ζώα. Τέτοιες ασθένειες συχνά προκαλούν υψηλά ποσοστά θνησιμότητας στους πληθυσμούς των εντόμων. Τα αίτια των ασθενειών αυτών αναφέρονται σαν παθογόνα. Αυτά που προκαλούν ασθένειες στα έντομα προέρχονται από τα ίδια ταξινομικά αθροίσματα οργανισμών που είναι υπεύθυνα για ασθένειες ανώτερων ζώων

συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Είναι λοιπόν, βακτήρια, μύκητες, ιοί και πρωτόζωα. Πάντως τα είδη των μικροοργανισμών είναι συνήθως διαφορετικά στις δύο περιπτώσεις και έτσι υπάρχει πολύ μικρός ή καθόλου κίνδυνος μόλυνσης ανώτερων ζώων από ασθένειες εντόμων. Εκτός από τους μικροοργανισμούς που αναφέρθηκαν παραπάνω, οι νηματώδεις που προσβάλλουν έντομα έχουν συχνά ιδιαίτερη σημασία. Δεν είναι βέβαια αληθινοί μικροοργανισμοί εφ' όσον έχουν σημαντικό μήκος, αλλά συμπεριφέρονται σαν τους μικροοργανισμούς και για αυτό συνήθως εξετάζονται με αυτούς. Οι ασθένειες των εντόμων έχουν μελετηθεί εκτεταμένα τα τελευταία χρόνια με αποτέλεσμα τη δημιουργία νέου κλάδου, της επιστήμης γνωστής σαν Παθολογίας των Εντόμων. Εκτός από το προφανές ενδιαφέρον για την κατανόηση του ρόλου των ασθενειών σε σχέση με το φυσικό έλεγχο των πληθυσμών των εντόμων, η μελέτη της παθολογίας των εντόμων έχει συντελέσει στην πρόοδο του χειρισμού εντομοπαθογόνων μικροοργανισμών για την καταπολέμηση φυτοφάγων εντόμων. Η μελέτη των ασθενειών των εντόμων έχει ιδιαίτερη σημασία και για τα «κατοικίδια» έντομα, δηλαδή το μεταξοσκώληκα και τη μέλισσα. Στην πραγματικότητα η σημασία των ασθενειών των εντόμων έγινε κατανοητή εξ' αιτίας της διατήρησης αποικιών των δύο αυτών εντόμων. Στην περίπτωση αυτή το παθογόνο είναι ο εχθρός και πρέπει να καταπολεμηθεί.

Η παθογένεια η οποία προκαλείται από τους μικροοργανισμούς αυτούς 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 συνήθως εγκαθίστανται πάνω στο έντομο, διαπερνώντας το εξωτερικό του περίβλημα. Τα παθογόνα εξέρχονται από το έντομο-ξενιστή, το κάνουν είτε μέσω της απεκκριτικής οδού, είτε με διάρρηξη της επιδερμίδας του εντόμου (Steinhaus, 1949). Στο παρακάτω σχεδιάγραμμα (εικόνα 3.) απεικονίζονται τρόπος εισόδου διαφόρων παθογόνων σε ένα έντομο.



Εικόνα 3.: Τρόπος εισόδου παθογόνου σε ένα έντομο

Πίνακας 3.: Οι κύριες ομάδες εντομοπαθογόνων μικροοργανισμών & παραδείγματα από κάθε ομάδα (Τσαπικούνης Φ. 1999)

Ομάδα	Παραδείγματα	Συμπτώματα
Βακτήρια	<i>Bacillus popilliae</i> σε <i>Urocerus</i> sp. (Siricidae), Hymenoptera.	Οι προνύμφες σταδιακά αποκτούν μια γαλακτώχρομη εμφάνιση, γίνονται αργοκίνητες και τελικά πεθαίνουν, αλλά η δράση του μικροοργανισμού είναι αργή.
Μύκητες	<i>Entomophthora</i> spp. σε αφίδες	Οι αφίδες είναι κολλημένες στη φυλλική επιφάνεια και περικλείονται από άλω σπορίων του μύκητα.
Ιοί	Ιός της κοκκίωσης (granulosis) σε <i>Pieris</i> sp., Pieridae, Lepidoptera	Οι προνύμφες έχουν βρεγμένη, σκούρα εμφάνιση. Μετά το θάνατο το σώμα αποδιοργανώνεται απελευθερώνοντας υγρά με μεγάλη συγκέντρωση σωματιίων ιού.
Πρωτόζωα	<i>Nosema</i> spp σε <i>Costelytra zealandia</i> , Scarabaeidae, Coleoptera, έντομο εδάφους σε αγρωστώδη.	Η αύξηση της προνύμφης επιβραδύνεται. Το σώμα αργότερα παίρνει ασυνήθεο γκριζο χρώμα με σκούρες κηλίδες που οφείλονται σε ανάπτυξη παθογόνου στο λιπώδη ιστό.
Νηματώδεις	<i>Deladenus siricidicola</i> σε <i>Urocerus</i> sp., Siricidae, Hymenoptera.	Τα ακμαία θήλεα της σφήκας αυτής στεριώνονται από συγκέντρωση νηματωδών στις αναπτυσσόμενες ωοθήκες. Τα άρρενα επίσης μολύνονται αλλά δεν στεριώνονται.

1.3. Εντομοπαθογόνοι οργανισμοί

1.3.1. Γενικά / Το αξίωμα του Koch

Η απλή σύνδεση ενός μικροοργανισμού με ένα έντομο που πεθαίνει ή είναι ήδη νεκρό δεν είναι αρκετή απόδειξη ότι το μικρόβιο αυτό είναι το αίτιο του θανάτου. Θα μπορούσε να έχει συνδεθεί με το έντομο αφού αυτό αποδυναμώθηκε ή θανατώθηκε από δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες. Για να αποδειχθεί λοιπόν ότι ένας μικροοργανισμός είναι πράγματι το αίτιο της ασθένειας θα πρέπει να πληρούται το αξίωμα του Koch, που έχει εφαρμογή στη φυτοπαθολογία:

- Ο ύποπτος μικροοργανισμός πρέπει να απομονωθεί από το έντομο με τα συμπτώματα της ασθένειας. Οι μικροοργανισμοί πρέπει να μπορούν να αναπτυχθούν σε καθαρή (τεχνητή) καλλιέργεια.

- Η μόλυνση υγιών ατόμων πρέπει σταθερά να δίδει συμπτώματα τυπικά της ασθένειας, και ο μικροοργανισμός πρέπει να μπορεί να απομονωθεί από τα μολυσμένα αυτά έντομα.

Στην πράξη δεν είναι πάντα δυνατό να ακολουθηθεί όλη αυτή η σειρά των ενεργειών απόλυτα επειδή πολλοί εντομοπαθογόνοι μικροοργανισμοί είναι δύσκολο ή αδύνατο να καλλιεργηθούν σε τεχνητά υποστρώματα, τουλάχιστον με την παρούσα γνώση των πραγμάτων. Σε τέτοιες περιπτώσεις ο εντομοπαθολόγος πρέπει να είναι ικανοποιημένος με την ακόλουθη συνοπτική διαδικασία:

- Απομόνωση του μικροοργανισμού από ασθενή έντομα.
- Άμεση μόλυνση υγιών ατόμων.
- Παρατήρηση των συμπτωμάτων της μόλυνσης.

1.3.2. Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα από τη Χρήση Εντομοπαθογόνων Μικροοργανισμών

Πλεονεκτήματα

1. Ο μεγάλος αριθμός των εντομοπαθογόνων και ως εκ τούτου η διευρυμένη γενετική βάση, δίνουν τη δυνατότητα στη Γενετική Μηχανική να δημιουργήσει αποτελεσματικά παθογόνα στελέχη αφενός και αφετέρου να παράγει δευτερογενείς μεταβολίτες χρήσιμους σαν εντομοκτόνα αλλά και στη βιομηχανία και ιατρική.
2. Η πλειονότητα τους είναι αβλαβή για το περιβάλλον, τον άνθρωπο και τα θηλαστικά. Όταν εγκατασταθούν σε μια περιοχή μπορούν να γίνουν μέρος του γενικότερου συστήματος προσπαθώντας και επιβάλλοντας την ισορροπία.
3. Δεν αφήνουν υπολείμματα και δεν καταλήγουν στην τροφική αλυσίδα. Επιβιώνουν στο περιβάλλον αποδίδοντας μακροπρόθεσμο έλεγχο. Συνδυάζονται με άλλα βιολογικά προϊόντα, καλλιεργητικές τεχνικές και χημικά στην Ολοκληρωμένη Καταπολέμηση.
4. Είναι εξειδικευμένα προς ένα άτομο – στόχο ή ένα περιορισμένο αριθμό. Οι πιθανότητες ανάπτυξης ανθεκτικότητας είναι μικρές περιορίζοντας έτσι την πιθανότητα πληθυσμιακού ξεσπάσματος του εντόμου και δημιουργώντας τις συνθήκες για μακροπρόθεσμο έλεγχο.
5. Η μαζική παραγωγή (μη υποχρεωτικά παθογόνα) είναι δυνατή καθώς και η εφαρμογή με συμβατικά μέσα.

Μειονεκτήματα

1. Ένα σημαντικό μειονέκτημα κατά τη χρήση εντομοπαθογόνων είναι η ανάγκη για υψηλή σχετική υγρασία. Φυσικά δεν ισχύει για όλους αλλά για την πλειοψηφία.
2. Σε θερμοκρασίες $>32^{\circ}\text{C}$ λίγοι μύκητες είναι δραστικοί ενώ πάνω από τους 30°C περιορίζεται η παραγωγή κονιδίων.
3. Η UV ακτινοβολία είναι ένα σοβαρό πρόβλημα και η χρήση προστατευτικών από UV στα σκευάσματα είναι μια ορατή λύση
4. Υπάρχουν σοβαρά κενά όσον αφορά τους μηχανισμούς στις επιζωοτίες και τον τρόπο δράσης των παθογόνων. Η συνεχής έρευνα, η ανάπτυξη της Μοριακής Βιολογίας και οι γενετικοί χειρισμοί δύναται να οδηγήσουν στην ανάπτυξη αποτελεσματικών παθογόνων, περιορίζοντας τα χημικά εκεί όπου είναι πραγματικά απαραίτητα.

5. Απαιτούν μακροπρόθεσμη μελέτη, δεν έχουν γενετική σταθερότητα, δεν μπορούν να πατενταριστούν, απαιτούν ειδικές συνθήκες αποθήκευσης και έχουν σχετικά γρήγορη ημερομηνία λήξης.
6. Η αποτελεσματικότητα τους είναι συνάρτηση των περιβαλλοντικών συνθηκών, ενώ η απώλεια παθογένειας δεν είναι τόσο άγνωστο φαινόμενο.
7. Η εξειδίκευση σε ένα έντομο – στόχο συχνά συνιστά μειονέκτημα ενώ έχει παρατηρηθεί κάποια από αυτά να είναι επιβλαβή σε έντομα μη στόχους.
8. Ο περιορισμένος χρόνος για την εφαρμογή, η καλή κάλυψη που πρέπει να γίνει, η πιθανότητα να επιδράσει αρνητικά το περιβάλλον.

1.3.3. Εντομοπαθογόνα βακτήρια

Οι πρώτες πληροφορίες για εντομοπαθογόνα βακτήρια προέρχονται από τον Pasteur. Ύστερα από εργασίες πέντε ετών πάνω στις ασθένειες του μεταξοσκώληκα, δημοσιεύει σε βιβλίο τα ευρήματά του το 1870. Τα βακτήρια ανήκουν στη κλάση Schizomycetes και τα εντομοπαθογόνα στην τάξη Eubacteriales. Τα περισσότερα δε από αυτά ανήκουν στις οικογένειες Basillaceae, Enterobacteriaceae, Lactobacteriaceae, Micrococcaceae και Pseudomonadaceae (Steinhaus, 1949). Κατά τον Bucher (1960), τα εντομοπαθογόνα βακτήρια διακρίνονται σε τέσσερις κατηγορίες: υποχρεωτικά παθογόνα, σποριογόνα – κρυσταλλοφόρα, προαιρετικά παθογόνα και δυνητικά παθογόνα.

Τα περισσότερα εντομοπαθογόνα μολύνουν το ξενιστή τους μέσω του πεπτικού σωλήνα μετά από κατανάλωση με την τροφή. Σε πολύ μικρή έκταση η μόλυνση μπορεί να γίνει μέσω των αυγών, του δερματίου και των αναπνευστικών στιγμάτων ενώ σε κάποιες περιπτώσεις είναι δυνατή με την βοήθεια παρασιτοειδών καθώς αυτά ωτοκοούν στο σώμα της προνύμφης με την βοήθεια του ωοθέτη. Η παραγωγή τοξινών και ενζύμων βοηθά τα βακτήρια να εισέλθουν στην αιμόκοιλο από τον πεπτικό σωλήνα στον οποίο βρίσκονται. Μόνο λίγες περιπτώσεις μόλυνσης μέσω των αναπνευστικών στιγμάτων και του δερματίου είναι γνωστές, (Tanada and Kanaya 1993), ενώ πολλά βακτήρια εισέρχονται από πληγές και λύσεις της συνέχειας του δερματίου.

Τα συμπτώματα που συνοδεύουν την πρόοδο μίας βακτηριακής προσβολής στις προνύμφες ενός είδους, ποικίλουν ανάλογα με το είδος του βακτηρίου καθώς η παθογένεση μπορεί να είναι διαφορετική ανάλογα με το είδος. Γενικά μπορούμε να πούμε ότι είναι εξωκυτταρικά

παθογόνα και οι ζημιές που προκαλούν οφείλονται στην παραγωγή και δράση ενζύμων και τοξινών ενώ τα ίδια χρησιμοποιούν τα θρεπτικά για την ανάπτυξη τους.

Σε γενικές γραμμές υπάρχουν κάποια κοινά συμπτώματα, ενώ ένας γενικευμένος τύπος μόλυνσης μπορεί να έχει ως εξής: Συνήθως προσβάλλεται το προνυμφικό στάδιο και το έντομο χάνει την όρεξη του ενώ μπορεί να γίνει ανήσυχο και νευρικό. Αποβάλλει νερουλά περιττώματα, παθαίνει διάρροια και υπάρχει πιθανότητα έμετου. Το σώμα είναι συχνά πολύ μαλακό ενώ το χρώμα γίνεται γρήγορα σκούρο. Τα όργανα και οι ιστοί, στο εσωτερικό, καταστρέφονται ταχύτατα και δίνουν την εντύπωση μία κολλώδους συνέχειας συνοδευμένης πολλές φορές από άσχημη μυρωδιά. Το έντομο πεθαίνει και στην συνέχεια συρρικνώνεται ξηραίνεται και σκληραίνει.

Τα βακτήρια αποτελούν τον πιο πολυπληθή τύπο μικροοργανισμών που έχουν δράση παθογόνο στα έντομα. 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).

Πολλά από τα εντομοπαθογόνα βακτήρια δεν είναι αρχικά θανατηφόρα για τα έντομα-ξενιστές και μπορούμε να εντοπίσουμε σημεία και συμπτώματα σε ζώντα έντομα. Τέτοια παραδείγματα είναι η προσβολή εντόμων της οικογένειας Scarabaeidae (Coleoptera) από *Bacillus popilliae* (milky disease) και από *Serratia entomophila* (Honey disease) (Lacey and brooks, 1997).

Η διάκριση πολλές φορές μιας βακτηριολογικής προσβολής σε έντομα γίνεται από το χρώμα το οποίο αποκτά το νεκρωμένο σώμα τους. Κόκκινος χρωματισμός είναι ενδεικτικός της παρουσίας του *Serratia marcescens*. Οι προνύμφες των μελισσών που είναι προσβεβλημένες από *Bacillus alvei* γίνονται κίτρινες ή γκρίζες, ενώ στις περισσότερες άλλες των βακτηριακών μολύνσεων ο ξενιστής γίνεται καφέ – μαύρος, χρώμα χαρακτηριστικό της βακτηριακής αποσύνθεσης (Poinar and Thomas, 1978).

1.3.4. Εντομοπαθογόνοι ιοί

Οι ιοί παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς επιδεικνύουν πολύ μεγάλη εκλεκτικότητα. Από τις διάφορες οικογένειες εντομοπαθογόνων ιών (Baculoviridae, Reoviridae, Poxviridae, Iridoviridae, Parvoviridae κ.α.) αξιοποιούνται εμπορικά μόνον είδη της πρώτης οικογένειας. Η ονομασία κάθε ιού καθορίζεται από το έντομο-ξενιστή του και από τον τύπο των κρυσταλλικών σωμάτων που σχηματίζει.

Οι ιοί είναι μικροοργανισμοί οι οποίοι καταγράφονται σε κάθε τάξη εντόμων και είναι οι μικρότεροι των εντομοπαθογόνων μικροοργανισμών. Το μέγεθος τους κυμαίνεται από 0.01 μm μέχρι και 15 μm (Lacey and Brooks, 1997). Οι ιοί οι οποίοι προκαλούν ασθένειες στα έντομα είναι γενικά όμοιοι με τους υπόλοιπους Ιούς στις βασικές ιδιότητες. Οι περισσότεροι εξ αυτών όμως έχουν ορισμένες ιδιότητες που τους ξεχωρίζουν από τους Ιούς που προκαλούν ασθένειες στα ανώτερα θηλαστικά ή τα φυτά. Μία από αυτές είναι η ιδιότητα τους να παράγουν περίεργα κρυσταλλόμορφα σώματα, τα οποία ονομάζονται πολύεδρα μέσα στα κύτταρα των ιστών που προσβάλλουν. (Steinhaus, 1949).

Η εισαγωγή τους στο έντομο γίνεται μέσω της τροφής. Η δράση του εκδηλώνεται μέσω των ώριμων σωματιδίων τα οποία περνούν το επιθήλιο και εγκαθίστανται στην αιμολémie όπου και πολλαπλασιάζονται. Προσβάλλουν όλα τα στάδια εξέλιξης.

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).

1.3.5. Εντομοπαθογόνα πρωτόζωα

Είναι μονοκύτταροι κατώτεροι μικροοργανισμοί που έχουν βρεθεί να προσβάλλουν ένα μεγάλο αριθμό εντόμων σε όλες τις σχεδόν γνωστές τάξεις. Πολλοί χρειάζονται εναλλακτικούς ξενιστές για να ολοκληρώσουν το βιολογικό τους κύκλο, ενώ κάποιοι βρέθηκαν να προκαλούν θεαματικές επιζωοτίες. Εισάγονται με την τροφή και δρουν στα επιθηλιακά κύτταρα του μεσεντέρου και πιθανόν και στη γενική κοιλότητα. Μεταδίδονται κάθετα και οριζόντια.

Λόγω του ότι τα πρωτόζωα είναι ευπαθή στο υπεριώδες φως, έχουν μικρή εντομοπαθογόνο δύναμη και μάλλον αργή δράση, περιορίζεται η πρακτική χρησιμότητα τους. Επίσης η

αναπαραγωγή τους για εμπορική χρήση είναι εξαιρετικά δύσκολη, μιας και δεν αναπαράγονται σε τεχνητά υποστρώματα (Steinhaus, 1949).

Στην Ευρωπαϊκή αγορά κυκλοφορούν σκευάσματα από δύο είδη πρωτοζώων 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).

1.3.6. Εντομοπαθογόνοι νηματώδεις

Οι νηματώδεις είναι ανομοιογενείς οργανισμοί και οι κατοικίες τους ποικίλουν περισσότερο από κάθε άλλη ομάδα ζώων. Τους συναντάμε από την άγονη έρημο έως την παγωμένη τούνδρα, στο φρέσκο και αλατούχο νερό και από την ζεστή άνοιξη έως την παγωμένη Αρκτική. Υπάρχουν σαν ελεύθεροι οργανισμοί και σαν προαιρετικά ή υποχρεωτικά παθογόνα φυτών και ζώων. Καθώς τα έντομα είναι η μεγαλύτερη ομάδα ζώων, δεν αποτελεί έκπληξη ότι οι νηματώδεις συνδέονται ευρέως με αυτά.

Τους εντομοπαθογόνους νηματώδεις τους συναντάμε στο εμπόριο και παίζουν παράγοντα βιολογικού ελέγχου με τη χρήση τους απέναντι σε έντομα που παρασιτούν, τα οποία δημιουργούν προβλήματα σε κάθε καλλιέργεια. Οι νηματώδεις εισχωρούν στο έντομο ξενιστή μέσα από την τροφή ή διαπερνώντας το δερμάτιο του και στην συνέχεια παρασιτούν σε αυτό ως αυγά ή ως ενήλικα θηλυκά.

Έχουν την ιδιότητα κάποια είδη να θανατώνουν τον ξενιστή τους μέσω των τοξικών ουσιών που εκκρίνουν με τα συμβιωτικά βακτήρια που φέρουν. Πλεονέκτημα τους είναι η εξολόθρευση των ξενιστών τους μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα. Η παραγωγή είναι εύκολη είτε *in vivo* ή *in vitro* και χρησιμοποιούνται και ως βιολογικά ψεκαστικά. Στα θετικά επιπλέον είναι ότι δεν προκαλούν δυσάρεστες επιπτώσεις σε άλλους οργανισμούς και στο περιβάλλον (Τζανακάκης, 1995, Hazir et al, 2004).

Η συμβίωση εντόμων και νηματωδών δεν είναι πάντα θανατηφόρα για το έντομο, καθότι σε αρκετές περιπτώσεις οι νηματώδεις τρέφονται δίχως να παρεμποδίζουν τις ζωτικές λειτουργίες του εντόμου (Welch, 1963).

Οι 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).

Έντομα εδάφους και νερού τα οποία θανατώνονται από νηματώδεις αποσυντίθεται γρήγορα ενώ συχνά οι νηματώδεις απομακρύνονται από το νεκρό έντομο καθιστώντας δύσκολη την παρατήρηση για προσβολές νηματωδών. (Nickle and Welch, 1984).

Για να πούμε με σιγουριά ότι υπάρχει προσβολή από νηματώδεις πρέπει να τους δούμε στο εσωτερικό του ξενιστή ή να εξέρχονται από αυτόν. (Tanada, 1993).

1.3.7. Εντομοπαθογόνες ρικέτσιες

Οι ρικέτσιες, έχουν πολύ μικρό μέγεθος (0.2-0.6μm), σχήμα ραβδοειδές και είναι αρνητικές κατά Gram. Μοιάζουν εξωτερικά με βακτήρια αλλά συμπεριφέρονται όπως οι ιοί.

Συναντώνται σε αρκετά έντομα και σε ορισμένες περιπτώσεις δύναται να προκαλέσουν αξιοπρόσεχτες μολύνσεις σε ορισμένους πληθυσμούς.

Είδη του γένους *Rickettiella* είναι εντομοπαθογόνα και η παρουσία τους έχει αναφερθεί σε Κολεόπτερα, Δίπτερα, Λεπιδόπτερα, και Ορθόπτερα. Ακόμα και κάποια είδη του γένους *Wolbachia* προκαλούν μη εμφανείς μολύνσεις σε έντομα.

Εξαιτίας της ύπαρξης πολλών αμφιβολιών σχετικά με την αποτελεσματικότητα τους καθώς και για την πιθανότητα πρόκλησης κινδύνων στους ανθρώπους, οι ρικέτσιες δεν χρησιμοποιούνται (σε εμπορική κλίμακα) ως μέσο μικροβιακής καταπολέμησης των εντόμων (Lacey and Brooks, 1997).

1.3.8. Εντομοπαθογόνοι μύκητες

Οι μυκητολογικές ασθένειες είναι κοινές και ευρέως διαδεδομένες μεταξύ των εντόμων. Συχνά εντομολογικοί πληθυσμοί αποδεκατίζονται από θεαματικές επιζωοτίες. Ουσιαστικά όλες οι τάξεις των εντόμων είναι ευαίσθητες σε μυκητολογικές ασθένειες. Είναι τα σημαντικότερα παθογόνα μεταξύ των μυζητικών εντόμων επειδή αυτά δεν μπορούν να εισάγουν παθογόνα βακτήρια, τα οποία δρουν μέσω των εντερικών τοιχωμάτων, λόγω του τρόπου λήψης της τροφής. Αντίθετα οι προνύμφες λεπιδοπτέρων, λόγω του τρόπου λήψης της τροφής, μπορούν να εισάγουν παθογόνα βακτήρια τα οποία θα δράσουν στο στομάχι.

Οι μύκητες είναι πολύ σημαντικοί όσον αφορά τα Κολεόπτερα. Ιολογικές και βακτηριολογικές ασθένειες είναι σπάνιες μεταξύ των ειδών αυτής της τάξης. 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. Εντομοπαθογόνοι μύκητες συναντιούνται σε έντομα ζώντα σε διαφορετικές κατοικίες όπως φρέσκο νερό, έδαφος, επιφάνεια εδάφους και εναέριες τοποθεσίες. Σήμερα είναι γνωστά πάνω από 700 είδη μυκήτων να προκαλούν ασθένειες σε έντομα, όμως μόνο 10 είδη χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο κάποιων από αυτών. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της εξάρτησής από υψηλή σχετική υγρασία στο περιβάλλον, της έλλειψης γνώσεων σχετικά με τους παράγοντες που επηρεάζουν την τοξικότητά τους και λόγω του ότι παράγουν τοξίνες 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 4. Στους εντομοπαθογόνους αυτούς μύκητες, χαρακτηριστικό είναι ότι τα έντομα προσβάλλονται, όχι μόνο στο στάδιο της προνύμφης ή νύμφης, αλλά και στο στάδιο του ακμαίου.

Εντομοπαθογόνους μύκητες συναντούμε σε όλα τα ταξινομικά γκρουπ εκτός από τους ανώτερους Βασιδιομύκητες και ορισμένους Hyphomycetes (denatiaceous Hyphomycetes).

Μεταξύ τους υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση στο βαθμό μολυσματικότητας και κυμαίνονται από υποχρεωτικά παθογόνα, ευκαιριακά παθογόνα που προσβάλλουν εξασθενημένους ξενιστές, έως συμβιωτικοί μικροοργανισμοί. Η πλειονότητα τους βρίσκεται στους Entomophthorales (τάξη Zygomycetes) και στην τάξη Hyphomycetes. Οι Entomophthorales χαρακτηρίζονται από υψηλή εξειδίκευση προς τον ξενιστή και μεγάλες πιθανότητες επιζωοτολογίας. Οι δε Hyphomycetes έχουν μεγαλύτερα φάσμα ξενιστών και αναπτύσσονται ευκολότερα in vitro.

Η εξειδίκευση ως προς τον ξενιστή ποικίλει σημαντικά μεταξύ των εντομοπαθογόνων μυκήτων, μπορεί να σχετίζεται με την φυσιολογική κατάσταση του ξενιστή (έντομο + φυτό), τις ιδιότητες του δερματίου, τις θρεπτικές απαιτήσεις του μύκητα καθώς και την άμυνα του ξενιστή (Tanada and Kaya 1993). Μερικοί μύκητες μολύνουν ένα μεγάλο φάσμα ξενιστών ενώ άλλοι περιορίζουν σε λίγα ή και ένα μόνο είδος εντόμου (McCoy et al 1988).

Η εισχώρηση του μύκητα στα έντομα γίνεται δια της στοματικής οδού και από την επιδερμίδα σε οποιοδήποτε μέρος του σώματος, αρκεί το σπόριο του μύκητα να βρει την κατάλληλη υγρασία για να βλαστήσει. 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.

Όταν ένα έντομο προσβληθεί από ένα μύκητα παθογόνο, ο μύκητας αυτός διαπερνά την επιδερμίδα και αναπτύσσει σιγά-σιγά στο εσωτερικό του εντόμου το μυκήλιο 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).

Συνοπτικά η διαδικασία μόλυνσης των εντομοπαθογόνων μυκήτων έχει ως εξής:

1. Προσκόλληση των κονιδίων στον εξωσκελετό του εντόμου

2. Βλάστηση των κονιδίων στο έντομο
3. Διείσδυση αυτών από τον εξωσκελετό
4. Ανάπτυξη του μύκητα στην αιμολέμφο
5. Παραγωγή τοξινών
6. Θάνατος του εντόμου
7. Παραγωγή κονιδίων εξωτερικά του εντόμου

Πίνακας 4. Τάξεις και μερικά είδη εντομοπαθογόνων μυκήτων

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

1.4. Οι μύκητες ως εντομοπαθογόνοι Οργανισμοί

Πάνω από 700 είδη εντομοπαθογόνων μυκήτων έχουν αναφερθεί στα έντομα. Μόνο 10 όμως έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί ως βιολογικοί παράγοντες (Hajel and St.Leger, 1994) . Μεταξύ αυτών, 4 από τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους είναι οι μύκητας *Verticillium Lecanii*, *Beauveria Bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, και *Paecilomyces fumosoroseus*.

1.4.1 Ο μύκητας *Verticillium lecanii* (*Lecaniicillium lecanii*)

Η πρώτη περιγραφή έγινε το 1861 και έκτοτε έχει αναφερθεί σε πολυάριθμα είδη εντόμων, αραχνοειδών και ακάρεων (Rombach and Gillespie 1988). Το 1988 περνάει στην KOPPERT και κατόπιν βελτίωσης παίρνει άδεια κυκλοφορίας στη Μ. Βρετανία το 1989.

Σύμφωνα με τους Helyer et al (1992) μπορεί να ελέγξει διάφορα είδη αφίδων, τον Θρίπα της Καλιφόρνια και τον αλευρώδη σε ένα φάσμα καλλιεργειών. Ωστόσο το παθογόνο έχει σαφής – αυστηρές περιβαλλοντικές απαιτήσεις, 15-25°C θερμοκρασία και σχετική υγρασία (RH)> 95%. Σύμφωνα με τον ίδιο τον ερευνητή, ο μύκητας έχει την ικανότητα να παρασιτεί ένα φάσμα φυτοπαθογόνων μυκήτων συμπεριλαμβανομένου του *Puccinia horiana* Henn ο οποίος σε συνθήκες αυξημένης υγρασίας εξελίσσεται σε σημαντική ασθένεια. Έτσι λοιπόν ο μύκητας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την συνδυασμένη αντιμετώπιση εχθρών και ασθενειών κάτω από καθεστώς αυξημένης σχετικής υγρασίας. (Helyer et al 1992). Παράλληλα όμως μπορεί να υπάρχει σαπροφυτικά σε οργανικό υλικό στο έδαφος.

1.4.2. Ο Μύκητας *Beauveria bassiana*

Ο μύκητας *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Moniliales) είναι ευρέως διαδεδομένος στη φύση και έχει την ικανότητα να αντιμετωπίζει πάνω από 200 είδη εντόμων όπως θρίπες, αλευρώδεις, αφίδες, ακάρεα, τερμίτες, οικιακές μύγες, Κολεόπτερα κ.α.

Η προέλευση του βιολογικού ελέγχου χρονολογείται τον 19^ο αιώνα, όταν ο Ιταλός επιστήμονας Agostino Bassi αφιέρωσε περισσότερα από 30 έτη μελετώντας την ασθένεια «white muscardine» στο *Bombyx mori* (L) και τελικά απέδειξε ότι ο μύκητας *B. bassiana* είναι το αίτιο της ασθένειας.

Ο μύκητας παράγει τρεις τύπους σπορίων: τα λεπτά, μονοκύτταρα σπόρια, γνωστά ως βλαστοσπόρια τα οποία παράγονται σε υγρή καλλιέργειας (Bidochka et al, 1987), τα κονίδια

τα οποία παράγονται σε στερεό υλικό και τα κονίδια τα οποία παράγονται σε υγρή καλλιέργεια.

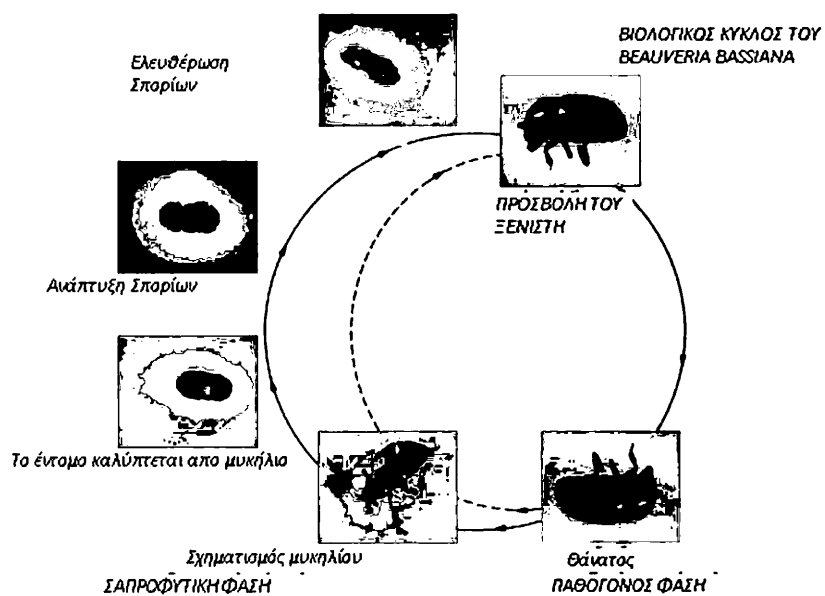
Όσον αφορά τη βιωσιμότητα και των τριών τύπων του *B. bassiana* οι Hedegus et al (1991) απέδειξαν ότι η θερμοκρασία -70°C είναι η καλύτερη για αποθήκευση για μεγάλη χρονική περίοδο. Αντίθετα τα κονίδια του *B. bassiana* και άλλων εντομοπαθογόνων μυκήτων χάνουν τη βιωσιμότητά τους όταν αποθηκευτούν σε υψηλές θερμοκρασίες. Η υψηλή υγρασία είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό των κονιδίων και η μόλυνση ολοκληρώνεται μέσα σε 24-48 ώρες αναλόγως της θερμοκρασίας. Το έντομο μπορεί να επιζήσει μέχρι και 3-5 μέρες αφού μολυνθεί.



Εικόνα 4.: Ο μύκητας *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin

Ο εντομοπαθογόνος αυτός μύκητας εισβάλλει στο σώμα του εντόμου. Τα κονίδια του έρχονται σε επαφή με την επιδερμίδα του εντόμου και αφού βλαστήσουν, διαπερνούν την επιδερμίδα και πολλαπλασιάζονται μέσα στο σώμα του εντόμου. Τα κονίδια του μύκητα είναι μονοκύτταρα, απλοειδή και υδρόφοβα (Rehner & Buckley, 2005).

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



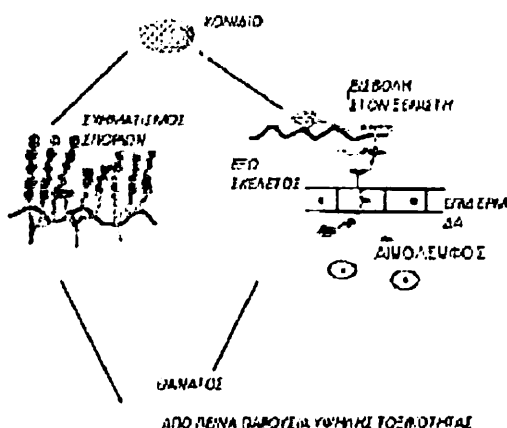
Εικόνα 5.: Βιολογικός Κύκλος του *Beauveria bassiana*

1.4.3. Ο Μύκητας *Metarhizium anisopliae*

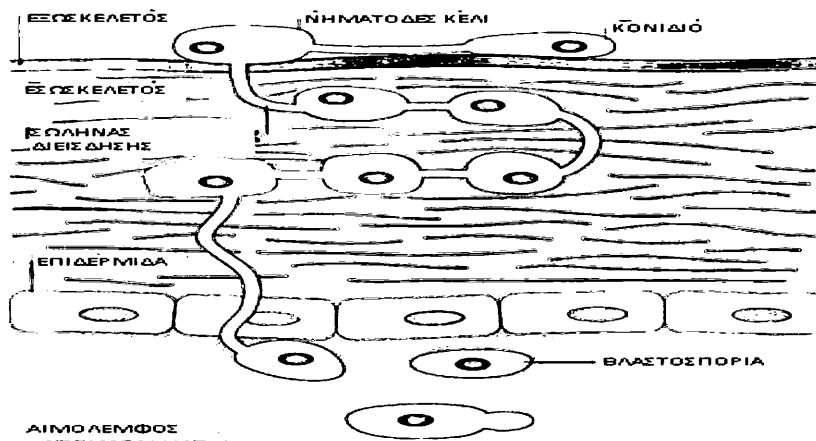
Ο μύκητας μπορεί να παραχθεί εύκολα σε ζυμωτήρες, όμως το μυκήλιο δεν έχει εντομοκτόνο δράση. Αντίθετα τα βλαστοσπόρια και κονίδια είναι βιολογικώς δραστικά και έχουν την ικανότητα να μολύνουν και να σκοτώσουν τον ξενιστή τους. Ο μύκητας παράγει βλαστοσπόρια μόνο σε υγρές καλλιέργειες και εφόσον ικανοποιηθούν κάποιες συνθήκες.

Έχει βρεθεί να προσβάλλει 300 διαφορετικά είδη εντόμων και συνιστά έναν από τους καλύτερα μελετημένους εντομοπαθογόνους μύκητες.

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 and Kaya, 1993).



Εικόνα 6.: Βιολογικός κύκλος του *M. anisopliae*



Εικόνα 7.: Τρόπος διείσδυσης του *M. anisopliae* στο εσωτερικό του εντόμου

Το Bioblast είναι μία εμπορική διαθέσιμη μορφή του εντομοπαθογόνου μύκητα *M. anisopliae* που χρησιμοποιείται για τον 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 εκτεθειμένοι 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.

1.4.4. Ο Μύκητας *Paecilomyces fumosoroseus* (*Isaria fumosorosea*)

Ο *Paecilomyces fumosoroseus*, θεωρείται πολύ ελπιδοφόρος βιολογικός παράγοντας για τον έλεγχο βλαβερών εντόμων. Στην Ευρώπη κυκλοφορεί το εμπορικό σκεύασμα PrePeRal με ένδειξη εναντίον του *Trialeurodes vaporariorum* σε τομάτα και αγγούρι.

Ο *P. fumosoroseus*, ακριβώς όπως το *B. bassiana*, παράγει κονίδια σε στερεό υπόστρωμα και βλαστοσπόρια σε υγρό υπόστρωμα. Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην ερευνητική μονάδα USDA-ARS (Illinois) διαπιστώθηκε ότι τα βλαστοσπόρια βλαστάνουν ταχύτερα και σε μεγαλύτερο ποσοστό στην επιδερμίδα του αλευρώδη σε σχέση με τα κονίδια. Η διαπίστωση αυτή δείχνει ότι η χρήση των βλαστοσπορίων για την ανάπτυξη των εμπορικών σκευασμάτων θα ήταν συμφέρουσα συγκριτικά με τη χρήση των κονιδίων. Διάφορα γεωργικά προϊόντα έχουν εξεταστεί ως συστατικά σκευασμάτων και μερικά υπόσχονται τη διατήρηση της βιωσιμότητας των βλαστοσπορίων στο πέρασμα του χρόνου.

2 Ειδικό Μέρος

2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1.1 Απομόνωση εντομοπαθογόνων μυκήτων με τη χρήση προνυμφών ως δόλωμα.

Συλλέχθηκαν 40 δείγματα χώματος από διάφορες περιοχές της Δυτικής Ελλάδας, συγκεκριμένα 10 δείγματα/νομό, από τους νομούς Ιωαννίνων, Θεσπρωτίας, Άρτας και Πρέβεζας. Οι δειγματοληψίες χώματος (300 gr/δείγμα) έγιναν από βάθος 10cm. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πλαστικές σακούλες και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο για επεξεργασία. Η συγκομιδή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε το τελευταίο τρίμηνο του 2015. Τα σημεία της δειγματοληψίας καταγράφηκαν με συσκευή GPS Garmin Ehtrex. Αναλυτικότερα οι περιοχές και οι καλλιέργειες που επιλέχθηκαν, φαίνονται παρακάτω (πίνακας 5):

Πίνακας 5: Νομοί και καλλιέργειες που επιλέχθηκαν για δειγματοληψία

ΑΡΤΑ	ΙΩΑΝΝΙΝΑ	ΠΡΕΒΕΖΑ	ΘΕΣΠΡΩΤΙΑ
ΕΛΙΑ ΕΛΑΙΟΠΟΙΗΣΙΜΗ	ΑΜΠΕΛΙ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΙΜΟ	ΕΛΙΑ ΕΛΑΙΟΠΟΙΗΣΙΜΗ	ΕΛΙΑ ΕΛΑΙΟΠΟΙΗΣΙΜΗ
ΜΑΝΤΑΡΙΝΙΑ	ΑΡΩΝΙΑ	ΜΑΝΤΑΡΙΝΙΑ	ΕΛΙΑ ΒΡΩΣΙΜΗ
ΠΟΡΤΟΚΑΛΙΑ	ΓΩΛΙ BERRY	ΚΗΠΕΥΤΙΚΑ	ΜΗΔΙΚΗ
ΑΚΤΙΝΙΔΙΑ	ΙΠΠΟΦΑΕΣ	ΠΟΡΤΟΚΑΛΙΑ	-
ΚΗΠΕΥΤΙΚΑ	ΜΗΔΙΚΗ	-	-

Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες απομονώθηκαν με τη μέθοδο της χρήσης ως δολώματος των εντόμων *Galleria mellonella*, *Thaumetopoea pityocampa* και *Tenebrio molitor*.

Η μέθοδος αυτή ανακαλύφθηκε το 1975 από τους Bedding και Akhurst και πραγματοποιήθηκε με επιτυχία σε πολλές έρευνες. Ειδικότερα, αυτή η τεχνική χρησιμοποιεί

προνύμφες του κηρόσκορου (*Galleria mellonella*) ως δόλωμα για τη φυσική εμφάνιση των εντομοπαθογόνων νηματώδων του εδάφους.

Το χώμα που συλλέξαμε τοποθετήθηκε σε μικρά πλαστικά δοχεία και μεταφέρθηκε στο εργαστήριο. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε για δύο ώρες πάνω σε εφημερίδα ώστε να μειωθεί η υγρασία του. Αυτό γίνεται διότι σε συνθήκες υπερβολικής υγρασίας οι εντομοπαρσιτικοί νηματώδεις του εδάφους επιτίθενται και σκοτώνουν τις προνύμφες των εντόμων «παγίδων» πριν από τους εντομοπαθογόνους μύκητες. Στο σημείο αυτό πρέπει να προσεχτεί να μη στεγνώσει υπερβολικά το δείγμα. Στη συνέχεια το χώμα τοποθετείται ξανά στα μικρά πλαστικά δοχεία ή σε πλαστικά τρυβλία τύπου Petri μαζί με προνύμφες *Galleria mellonella*, *Thaumetopoea pityocampa* και *Tenebrio molitor*.

Είναι σημαντικό οι προνύμφες να κινούνται μέσα στο δείγμα του χώματος. Πριν την τοποθέτησή τους στα δοχεία με το χώμα, οι προνύμφες του *Galleria mellonella*, *Thaumetopoea pityocampa* και *Tenebrio molitor* εμβαπτίστηκαν σε ζεστό νερό θερμοκρασίας 45°C για μερικά δευτερόλεπτα. Είναι σημαντικό η υγρασία του δείγματος να διατηρείται υψηλή, αλλά όχι υπερβολική.



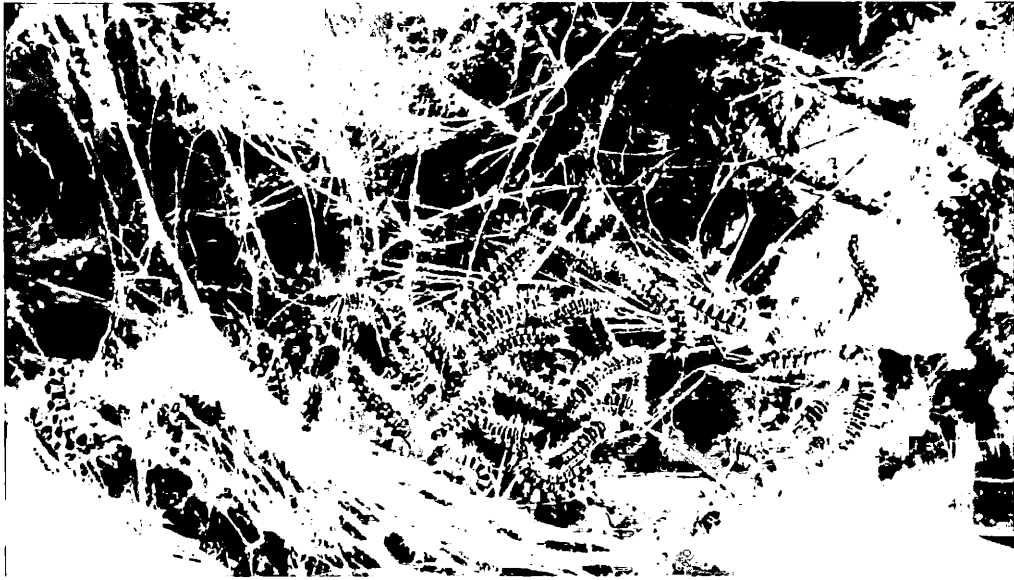
Εικόνα 8: Πάγκκος εργασίας με δείγματα εδάφους



Εικόνα 9.: Τεχνητή εκτροφή του κηρόσκορου *Galleria mellonella* σε θαλάμους του Μ.Φ.Ι.



Εικόνα 10: Τεχνητή εκτροφή του αλευροσκούληκα *Tenebrio molitor* σε ειδικούς χώρους του Μ.Φ.Ι.



Εικόνα 11: Φωλεά πιτυοκάμπης (*Thaumetopoea pityocampa*) που διατηρούνταν σε ειδικό χώρο στο Μ.Φ.Ι.

Τα τρυβλία αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (25 ± 1 °C) για 14 – 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 (Mietiewski et al. 1996). Οι νεκρές ή μουμιοποιημένες προνύμφες απομακρύνθηκαν και εν συνεχεία αποστειρώθηκαν σε 1% υποχλωριώδες νάτριο για μερικά δευτερόλεπτα.

Εν συνέχεια οι προνύμφες που εμφάνισαν τα συμπτώματα του εντομοπαθογόνου μύκητα τοποθετήθηκαν για 48 ώρες σε πλαστικά τρυβλία τύπου Petri που είχαν υψηλή υγρασία (moist chamber). Αυτό επιτεύχθηκε με εναπόθεση ορισμένων σταγόνων νερού πάνω σε χαρτί, κυκλικού σχήματος μέσα στα τρυβλία.

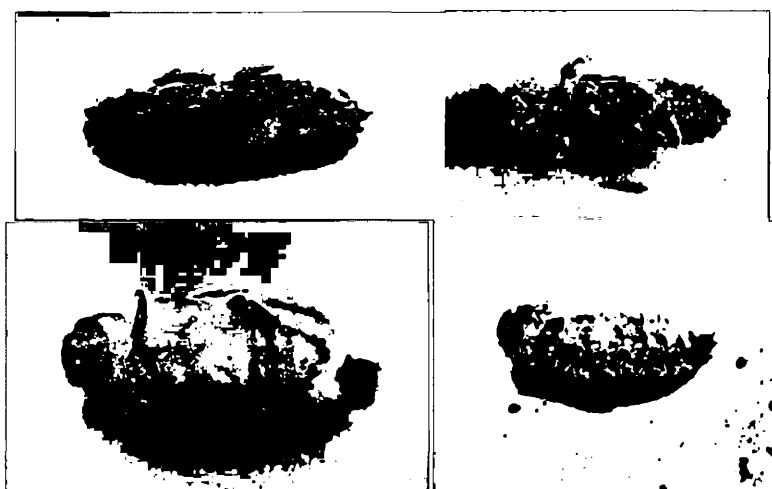
Στο τέλος, μετά από την πάροδο 48 ωρών σε θερμοκρασία δωματίου, παίρνουμε δείγματα από τις προσβεβλημένες προνύμφες. Ακολούθως καλλιεργούμε τα κονίδια των μυκήτων, που απομακρύνουμε από τις προνύμφες, σε υπόστρωμα S.D.A ή P.D.A. οι εργασίες αυτές διεξάγονται αυστηρά εντός εστίας νηματικής ροής, ώστε να αποφευχθεί τυχόν επιμόλυνση. Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες εξετάστηκαν μικροσκοπικά, για να επιβεβαιωθεί το είδος βάσει του σχήματος και του μεγέθους των σπορίων.



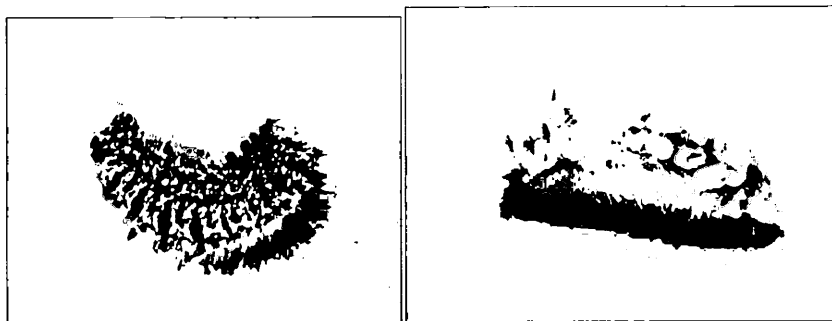
Εικόνα 12: Επάνθιση μυκηλίου *M. anisopliae* (με πράσινο ή λευκό-πράσινο χρώμα) και *B. bassiana* (ρόδινο χρώμα) σε προνύμφες *G. mellonella*.



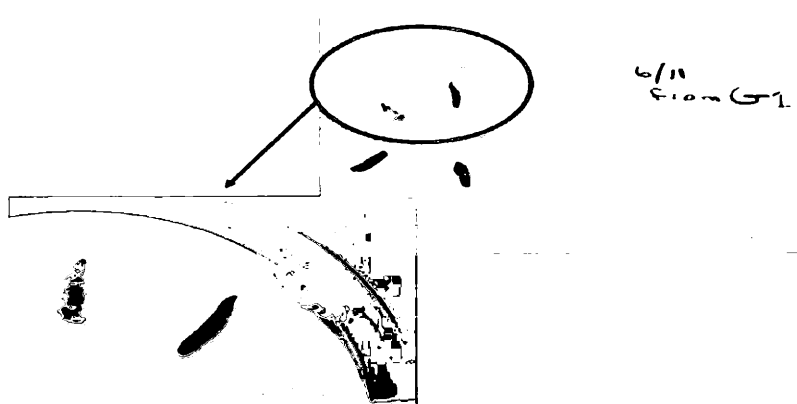
Εικόνα 13: Επάνθιση μυκηλίου *Paecilomyces fumosoroseus* σε προνύμφη *G. mellonella*.
(φωτόγραφία εξωφύλλου)



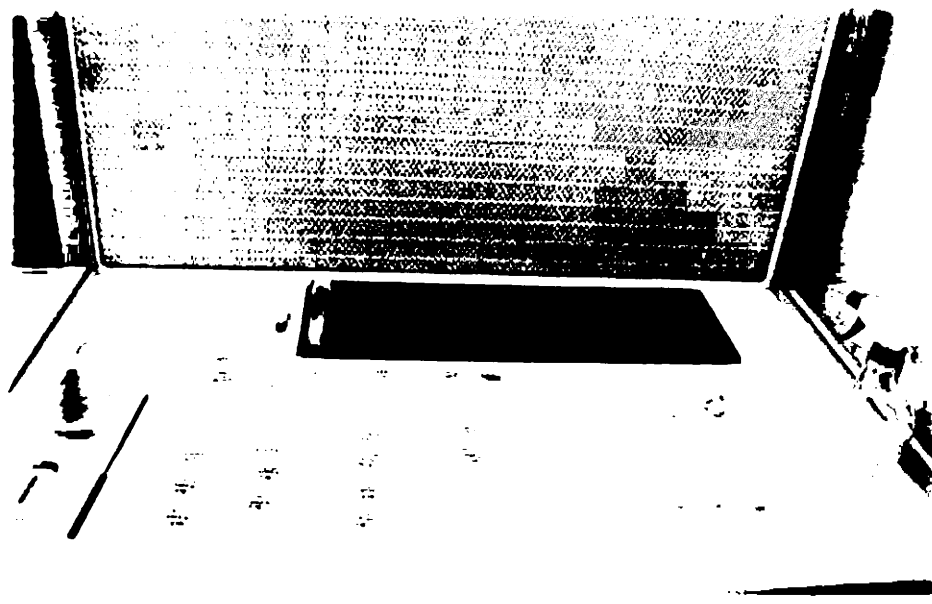
Εικόνα 14: Επάνθιση μυκηλίου των εντομοπαθογόνων μυκήτων επί προνυμφών, νυμφών και ακμαίων του *Tenebrio molitor*



Εικόνα 15: Επάνθιση μυκηλίου του *M. anisopliae* (αριστερά) και *P. fumosoroseus* (δεξιά) σε νεκρή προνύμφη πιτυοκάμπης *Thaumetopoea pityocampa*



Εικόνα 16: Διαδικασία για την απομόνωση των εντομοπαθογόνων μυκήτων από τις νεκρές προνύμφες του *Galleria mellonella*.



Εικόνα 17: Εστία νηματικής ροής

2.1.2 Το υπόστρωμα Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

Το Sabouraud Dextrose Agar δημιουργήθηκε για πρώτη φορά το 1800 από τον γαλλικής καταγωγή δερματολόγο Raymond J. A. Sabouraud, για να υποστηρίξει την ανάπτυξη των μυκήτων που προκαλούν λοιμώξεις στο δέρμα, τα μαλλιά ή τα νύχια (Sabouraud, R. 1896).

Η παρασκευή του μέσου γίνεται ως εξής:

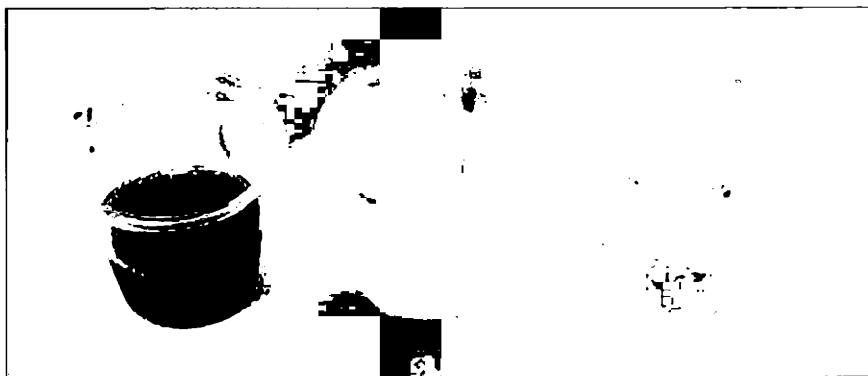
Σε 1000 ml κρύου αποστειρωμένου νερού προστίθενται 65 gr λυοφιλιωμένου Sabouraud Dextrose Agar του εμπορίου. Το μίγμα θερμαίνεται σε Ben-Mari για να διαλυθεί το μέσο εντελώς. Έπειτα διανέμεται σε κωνικές φιάλες και αποστειρώνεται σε κλίβανο για 15 λεπτά στους 121 °C. Η τελική αντίδραση του μέσου είναι: PH 5,6. Στη συνέχεια πριν το μέσο στερεοποιηθεί τοποθετείται σε αποστειρωμένα τρυβλία και δοκιμαστικούς σωλήνες.



Εικόνα 18: Καλλιέργεια *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* και *Metarhizium anisopliae* σε θρεπτικό μέσο SDA (Sabouraud Dextrose Agar).

2.2 Βιοδοκιμές

Προκειμένου να αξιολογηθούν οι εντομοπαθογόνοι μύκητες που απομονώθηκαν, έγιναν βιοδοκιμές με εναιωρήματα κονιδίων σε συγκεντρώση 10^6 κονιδίων/ml επί προνυμφών ευδεμίδας (*Lobesia botrana*), *Paysandisia archon*, προνυμφών και ακμαίων *Rhynehophorus ferrugineus*, *Scyphophorus acupunctatus*, και *Sitophilus oryzae*, και επί νυμφών του δάκου της ελιάς *Bactrocera oleae*.



Εικόνα 19: Εναιωρήματα *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* και *Paecilomyces fumosoroseus*



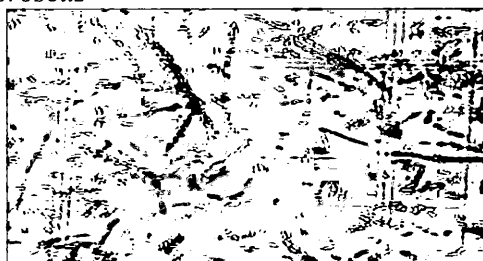
Εικόνα 20 : Παρασκευή των διαλυμάτων των εντομοπαθογόνων μυκήτων



Beauveria bassiana

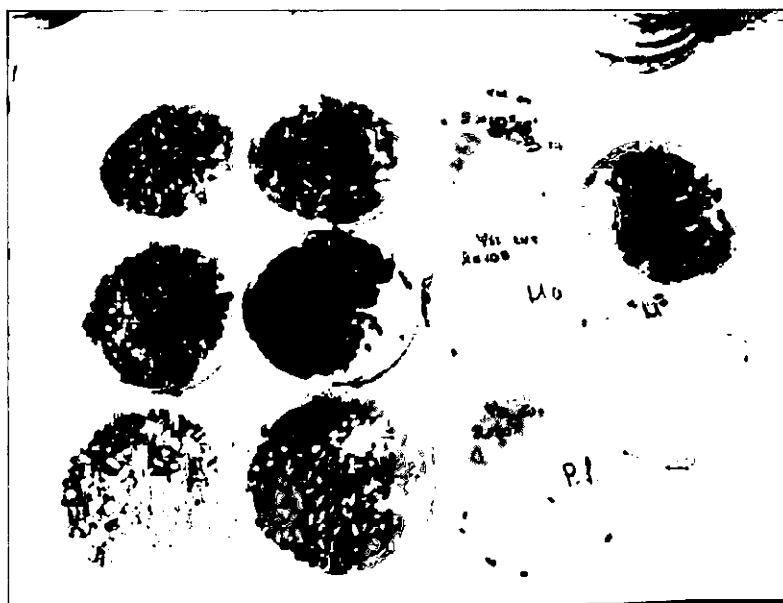


Paecilomyces fumosoroseus



Metarhizium anisopliae

Εικόνα 21: Εναωρήματα κονιδίων των εντομοπαθογόνων μυκήτων όπως φαίνονται από το αιματοκυτταρόμετρο.



Εικόνα 22: Βιοδοκιμή επί του *Sitophilus oryzae*

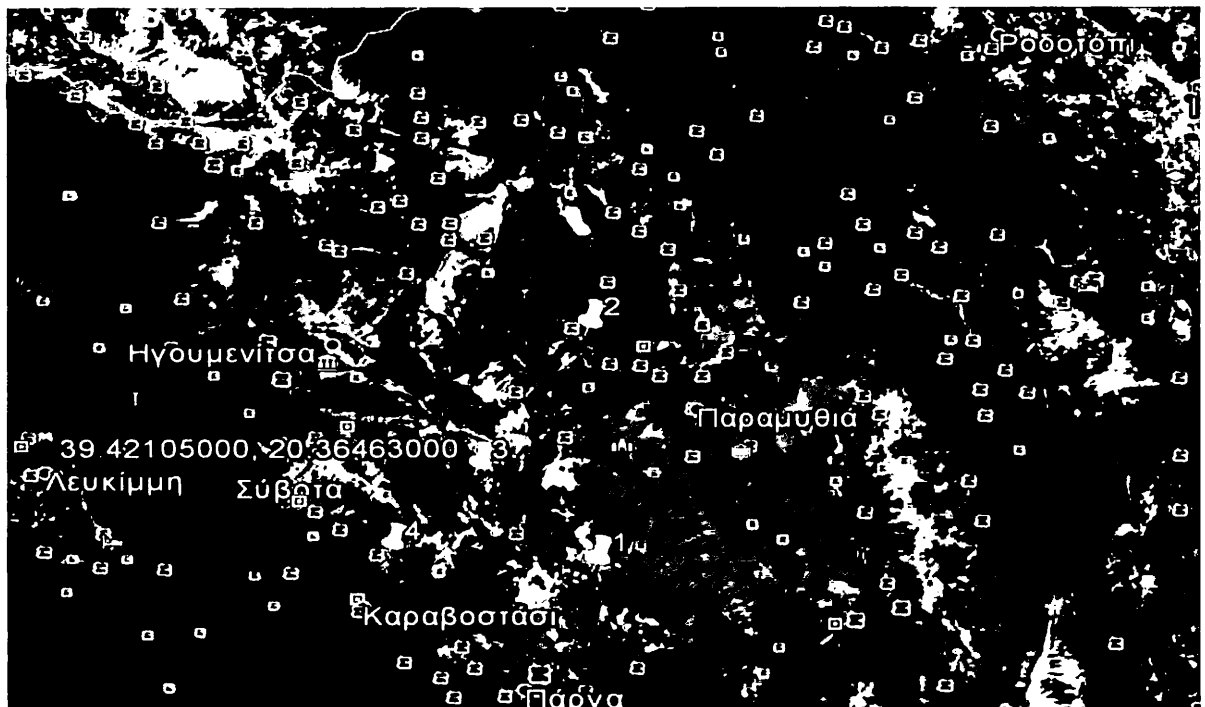
2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

2.3.1. Απομόνωση εντομοπαθογόνων μυκήτων

Τα αποτελέσματα της επισκόπησης για την απομόνωση εντομοπαθογόνων μυκήτων παρουσιάζονται στους πίνακες και τις εικόνες που ακολουθούν:

Πίνακας 6: Απομόνωση εντομοπαθογόνων μυκήτων από εδάφη του Νομού Θεσπρωτίας με τη χρήση ως δολώματος των εντόμων *Galleria mellonella* , *Thaumetopoea pityocampa*, *Tenebrio molitor*

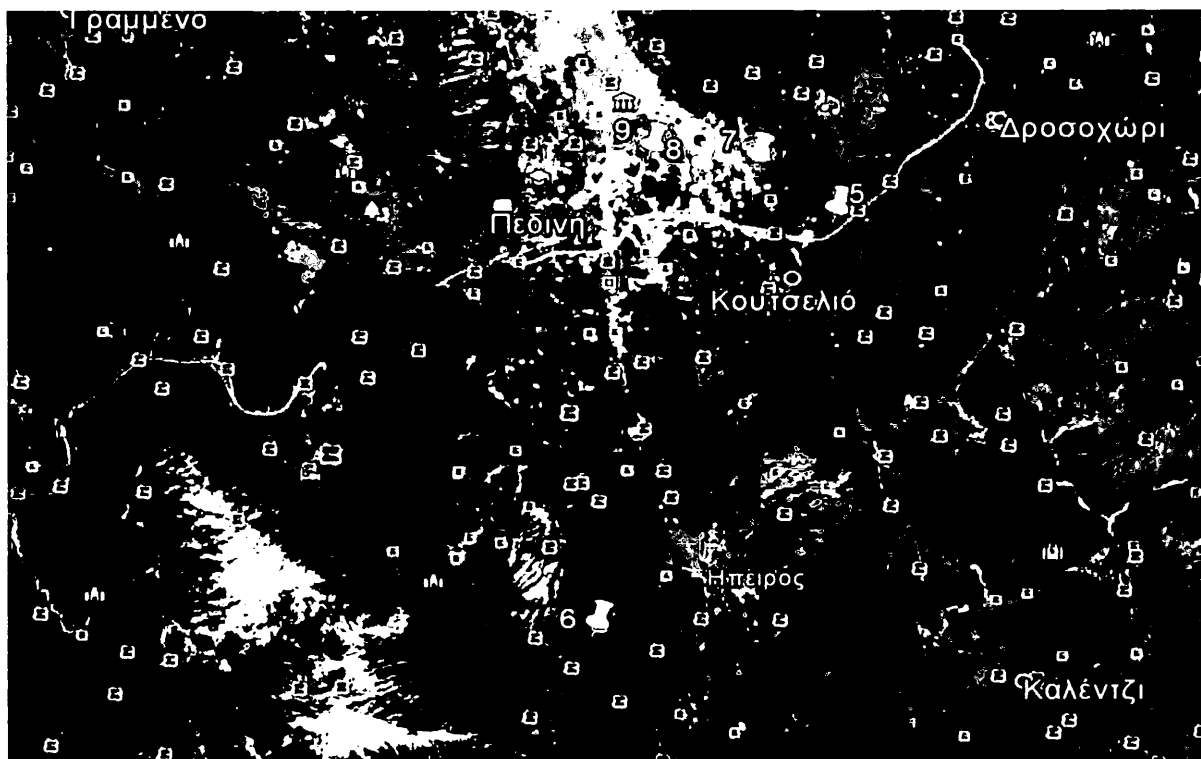
α/α	Νομός	Καλλιέργεια	Συντεταγμένες (γεωγρ. πλάτος/μήκος)	Μύκητας που ανευρέθη
1	ΘΕΣΠΡΩΤΙΑΣ	ΕΛΙΑ ΕΛ	39.358759073, 20.443832448	<i>Beauveria bassiana</i> / <i>Paecilomyces fumosoroseus</i>
2	ΘΕΣΠΡΩΤΙΑΣ	ΕΛΙΑ ΒΡ.	39.51032833, 20.43787000	<i>Beauveria bassiana</i>
3	ΘΕΣΠΡΩΤΙΑΣ	ΕΛΙΑ ΒΡ.	39.42105000, 20.36463000	<i>Beauveria bassiana</i> / <i>Metarhizium anisopliae</i>
4	ΘΕΣΠΡΩΤΙΑΣ	ΕΛΙΑ ΕΛ	39.36161833, 20.30043833	<i>Beauveria bassiana</i>



Εικόνα 23: Περιοχές επισκόπησης στο νομό Θεσπρωτίας όπου βρέθηκαν μύκητες

Πίνακας 7 Απομόνωση εντομοπαθογόνων μυκήτων από εδάφη του Νομού Ιωαννίνων με τη χρήση ως δολώματος των εντόμων *Galleria mellonella* , *Thaumetopoea pityocampa*, *Tenebrio molitor*

α/α	Νομός	Καλλιέργεια	Συντεταγμένες (γεωγρ. πλάτος/μήκος)	Μύκητας που ανευρέθη
5	ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ	ΑΡΩΝΙΑ	39.60149167, 20.92417167	<i>Beauveria bassiana</i> / <i>Metarhizium</i> <i>anisopliae</i>
6	ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ	GOJI BERRY	39.50111167, 20.85725833	<i>Beauveria bassiana</i>
7	ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ	ΙΠΠΟΦΑΕΣ	39.61475333, 20.90247500	<i>Beauveria bassiana</i>
8	ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ	ΜΗΔΙΚΗ	39.61253167, 20.88659333	<i>Beauveria bassiana</i>
9	ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ	ΚΗΠΕΥΤΙΚΑ	39.61718833, 20.87235667	<i>Beauveria bassiana</i>



Εικόνα 24: Περιοχές επισκόπησης στο Νομό Ιωαννίνων όπου βρέθηκαν μύκητες

Πίνακας 8. Απομόνωση εντομοπαθογόνων μυκήτων από εδάφη του Νομού Πρέβεζας με τη χρήση ως δολώματος των εντόμων *Galleria mellonella* , *Thaumetopoea pityocampa*, *Tenebrio molitor*

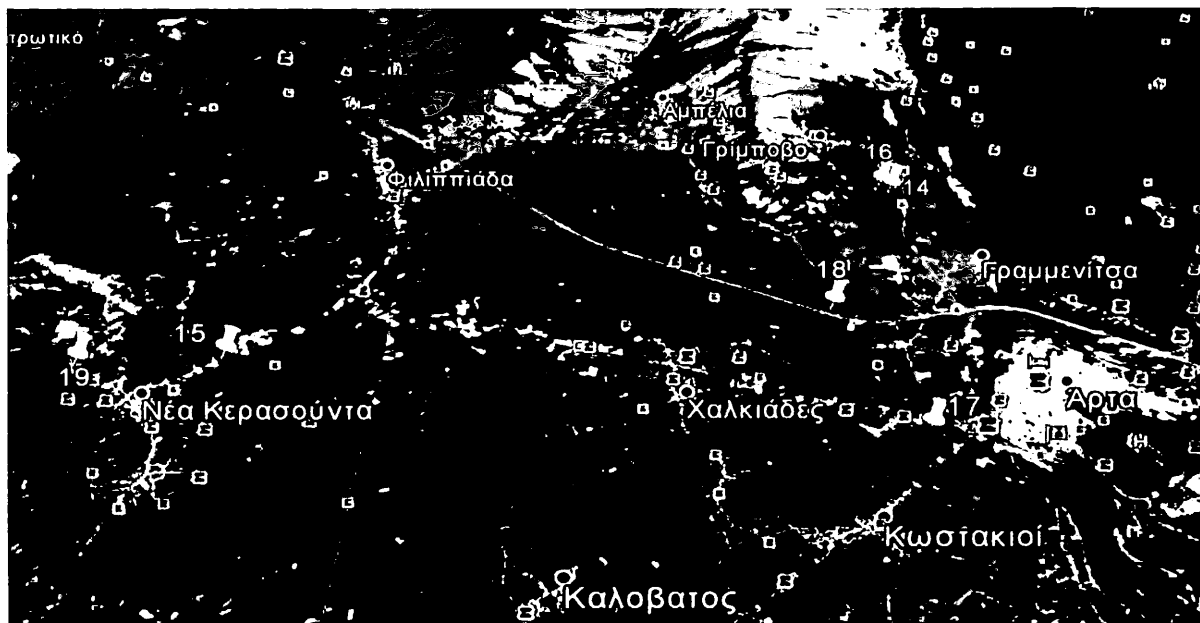
α/α	Νομός	Καλλιέργεια	Συντεταγμένες (γεωγρ. πλάτος/μήκος)	Μύκητας που ανευρέθη
10	ΠΡΕΒΕΖΑΣ	ΚΗΠΕΥΤΙΚΑ	219187.307, 4332153.699	<i>Beauveria bassiana</i>
11	ΠΡΕΒΕΖΑΣ	ΜΑΝΤΑΡΙΝΙΑ	219157.347, 4328296.875	<i>Beauveria bassiana</i>
12	ΠΡΕΒΕΖΑΣ	ΕΛΙΑ ΕΛ.	218940.132, 4328882.440	<i>Beauveria bassiana</i>



Εικόνα 25: Περιοχές επισκόπησης στο Νομό Πρέβεζας όπου βρέθηκαν μύκητες

Πίνακας 9 Απομόνωση εντομοπαθογόνων μυκήτων από εδάφη του Νομού **Αρτας** με τη χρήση ως δολώματος των εντόμων *Galleria mellonella* , *Thaumetopoea pityocampa*, *Tenebrio molitor*

α/α	Νομός	Καλλιέργεια	Συντεταγμένες (γεωγρ. πλάτος/μήκος)	Μύκητας που ανευρέθη
14	ΑΡΤΑΣ	ΕΛΙΑ ΕΛ.	39.20051000, 20.96738833	<i>Beauveria bassiana</i> / <i>Metarhizium anisopliae</i>
15	ΑΡΤΑΣ	ΜΑΝΤΑΡΙΝΙΑ	39.16407833, 20.86643333	<i>Beauveria bassiana</i>
16	ΑΡΤΑΣ	ΕΛΙΑ ΒΡ.	39.20156333, 20.96575833	<i>Beauveria bassiana</i>
17	ΑΡΤΑΣ	ΠΟΡΤΟΚΑΛΙΑ	39.15089000, 20.96715833	<i>Beauveria bassiana</i> / <i>Paecilomyces fumosoroseus</i>
18	ΑΡΤΑΣ	ΠΟΡΤΟΚΑΛΙΑ	39.17420431, 20.95572070	<i>Beauveria bassiana</i>
19	ΑΡΤΑΣ	ΑΚΤΙΝΙΔΙΑ	39.16283167, 20.84553833	<i>Beauveria bassiana</i>



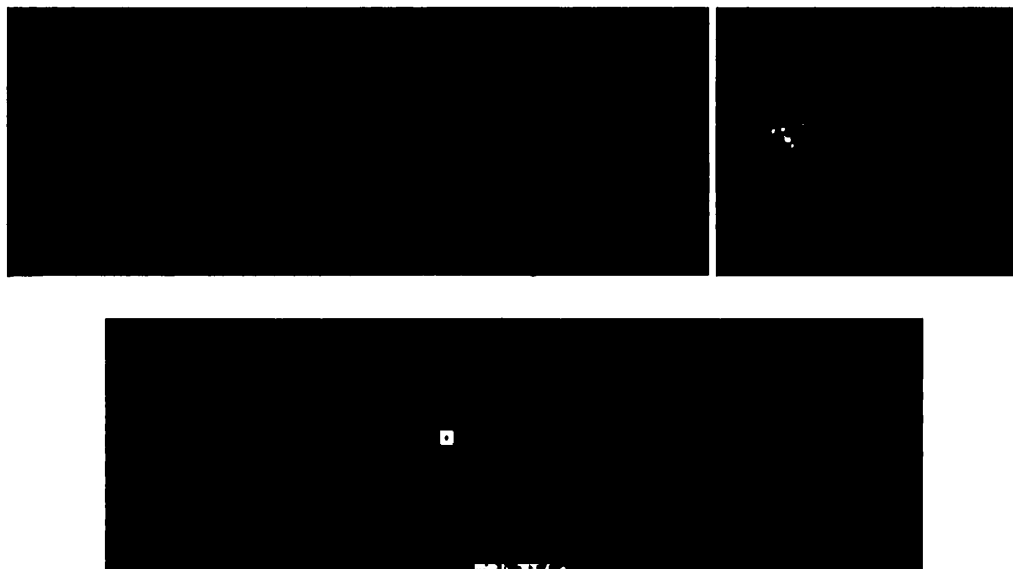
Εικόνα 26: Περιοχές επισκόπησης στο Νομό Άρτας όπου βρέθηκαν μύκητες

2.3.2 Αποτελέσματα Βιοδοκιμών

Από τα αποτελέσματα που αποκτήθηκαν από την παρούσα μελέτη διαπιστώνουμε ότι οι εντομοπαθογόνοι μύκητες *B. bassiana*, *M. anisopliae* και *P. fumosoroseus* μπορούν να αποτελέσουν παράγοντες αντιμετώπισης των εντόμων *Lobesia botrana*, *Thaumatopea pityocampa*, *Rhynchophorus ferrugineus*, *Scyphophorus acupunctatus*, *Sitophilus oryzae*, *Paysandisia archon*, και *Bactrocera oleae*.

Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε 100% θνησιμότητα επί των εντόμων στα οποία έγιναν οι εφαρμογές. Επισημαίνεται ότι τα νεκρά έντομα εξεταστήκαν μικροσκοπικά, προκειμένου να επιβεβαιωθεί, με βάση το σχήμα και το μέγεθος των σπορίων, το είδος του εντομοπαθογόνου μύκητα που προκάλεσε τη θνησιμότητα. Ακολουθεί φωτογραφικό υλικό από τη διαδικασία των βιοδοκιμών.

ΕΥΔΕΜΙΔΑ (*Lobesia botrana*)



Εικόνα 27: Επάνθιση μυκηλίου του *M. anisopliae* σε νεκρές προνύμφες ευδεμίδας

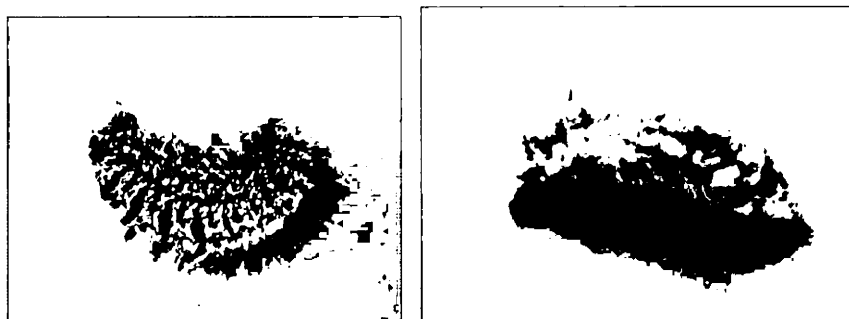


Εικόνα 28: Επάνθιση μυκηλίου του *P. fumosoroseus* (αριστερά) και *B. bassiana* (δεξιά) σε νεκρές προνύμφες ευδεμίδας (*Lobesia botrana*).

ΠΙΤΥΟΚΑΜΠΗ (*Thaumatoroea pityocampa*)



Εικόνα 29: Επάνθιση μυκηλίου του *B. bassiana* σε νεκρές προνύμφες πιτυοκάμπης (*Thaumatoroea pityocampa*)

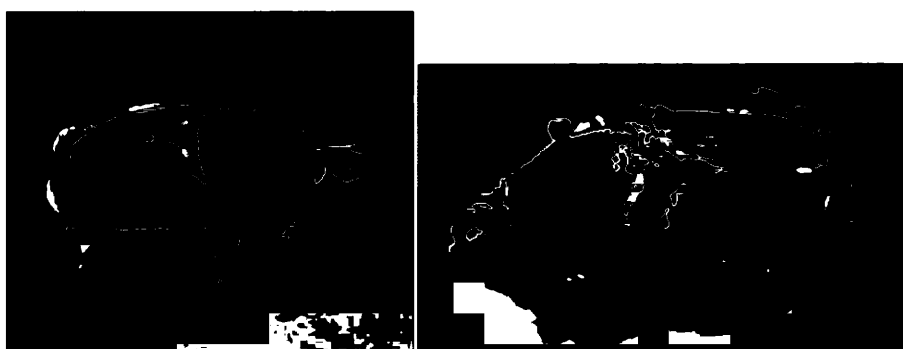


Εικόνα 30: Επάνθιση μυκηλίου του *M. anisopliae* (αριστερά) και *P. fumosoroseus* (δεξιά) σε νεκρή προνύμφη πιτυοκάμπης

ΚΟΚΚΙΝΟ ΡΥΓΧΩΤΟ ΣΚΑΘΑΡΙ ΤΩΝ ΦΟΙΝΙΚΙΩΝ (*Rhynchophorus ferrugineus*)

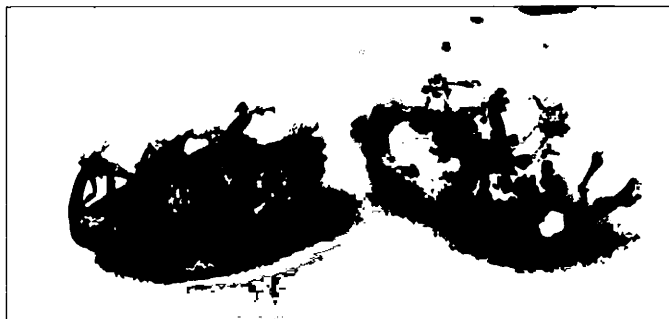


Εικόνα 31: Επάνθιση μυκηλίου των εντομοπαθογόνων μυκήτων που αξιολογήθηκαν επί προνυμφών του *R. ferrugineus*. Αριστερά *Beauveria bassiana*, μέση *Paecilomyces fumosoroseus* και δεξιά *Metarhizium anisopliae*.

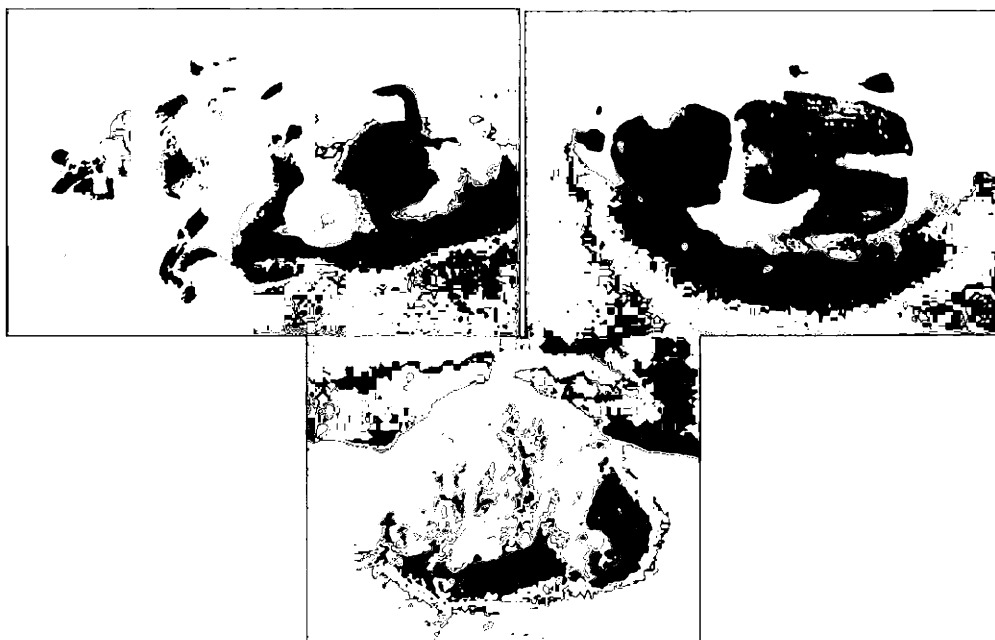


Εικόνα 32: Επάνθιση μυκηλίου του *Beauveria bassiana* (αριστερά) και *Metarhizium anisopliae* (δεξιά) σε ακμιαί *R. ferrugineus*

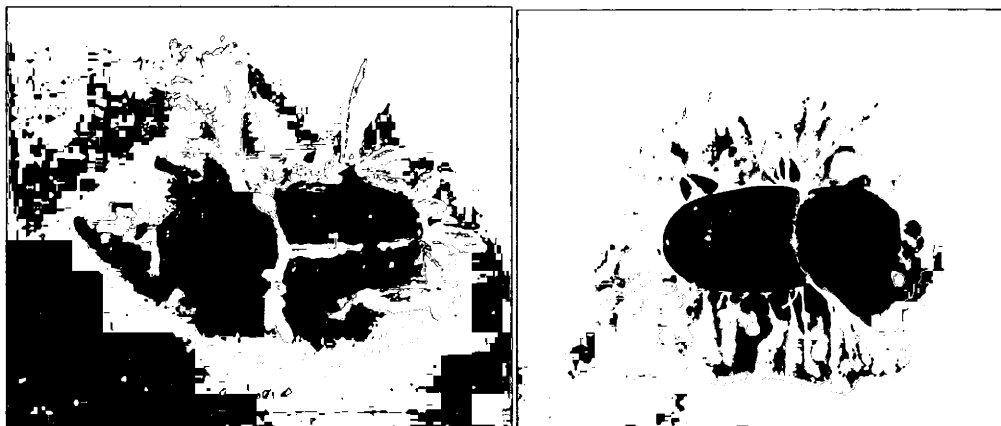
SCYPHOPHORUS ACUPUNCTATUS



Εικόνα 33: *Metarhizium anisopliae* επί ακμαίων *Scyphophorus acupunctatus*

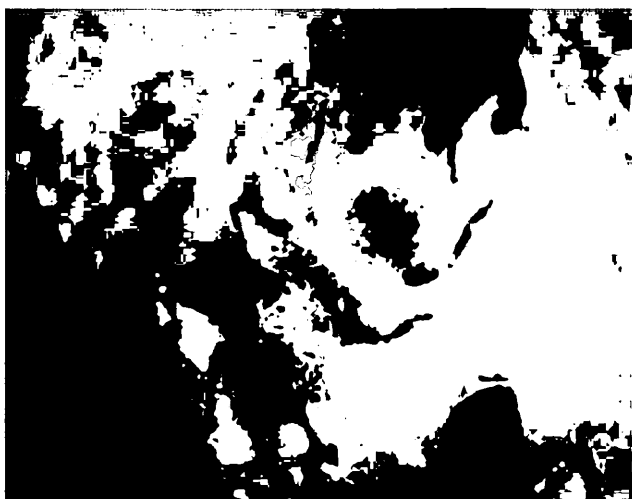
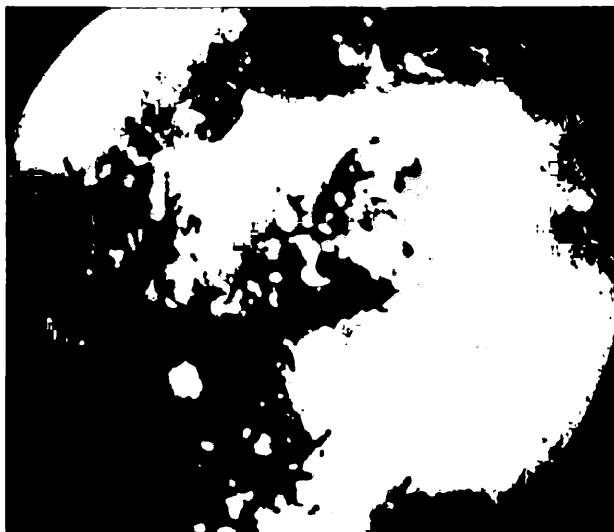


Εικόνα 34: *Beauveria bassiana* επί ακμαίων *Scyphophorus acupunctatus*

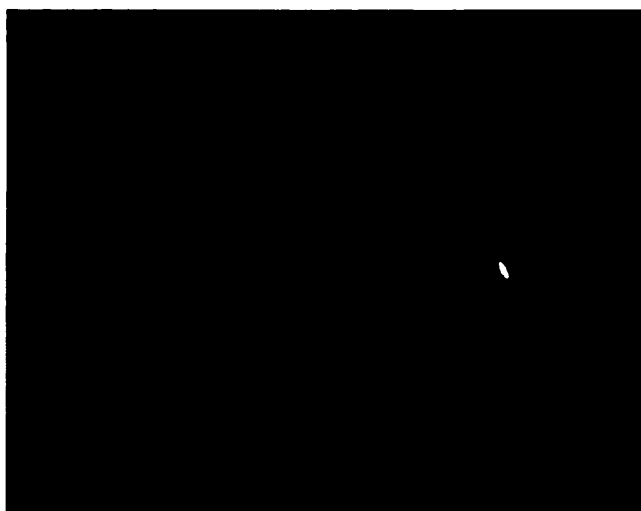


Εικόνα 35: *Paecilomyces fumosoroseus* επί ακμαίων *Scyphophorus acupunctatus*

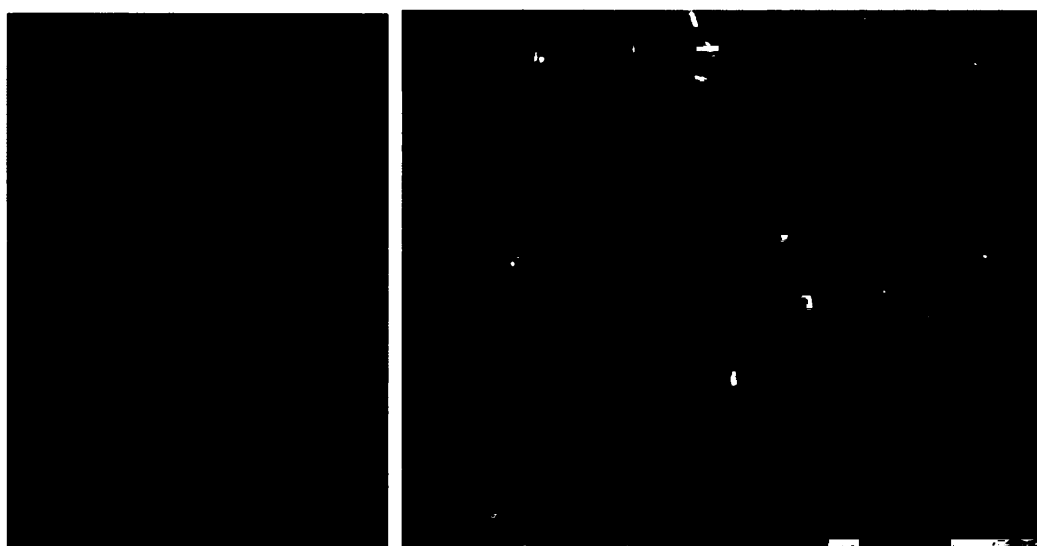
ΣΚΑΘΑΡΙ ΤΟΥ ΡΥΖΙΟΥ (*sitophilus oryzae*)



Εικόνα 36: Επάνθιση μυκηλίου του *B. bassiana* επί *Sitophilus oryzae*.



Εικόνα 37 : Επάνθιση μυκηλίου του *P. fumosoroseus* επί *Sitophilus oryzae*.



Εικόνα 38 : Επάνθιση μυκηλίου του *M. anisopliae* επί *Sitophilus oryzae*.

PAYSANDISIA ARCHON



Εικόνα 39: Επάνθιση μυκηλίου του εντομοπαθογόνων μύκητα *Metarhizium anisopliae* επί προνύμφης *Paysandisia archon*.

ΔΑΚΟΣ *Bactrocera oleae*



Εικόνα 40 : Ο εντομοπαθογόνος μύκητας *Metarhizium anisopliae* επι νόμφης *Bactrocera oleae*.

Η παθογένεια στο εντόμου ξεκινάει με την βλάστηση των εντομοπαθογόνων μυκήτων να εισέρχονται και να προκαλούν το θάνατο του ξενιστή. Εκτός από τη βλάστηση και τη διείσδυση, η αύξηση του μυκηλίου οφείλεται και στην παραγωγή τοξινών που είναι απαραίτητες στην παθογένεια. Έτσι, η βλάστηση των κονιδίων μπορεί να επηρεάζεται:

1. από περιβαλλοντικές κλιματικές συνθήκες (θερμοκρασία και υγρασία) (Keller and Zimmermann 1989, Fuxa 1997),
2. από την παρουσία αμινοξέων και πηγών άνθρακα στην επιδερμίδα (Smith and Grula 1982), και
3. από την ηλικία του ξενιστή και την παρουσία ανασταλτικών ουσιών στην επιδερμίδα του εντόμου (Hajek and St.Leger 1994).

Σύμφωνα με Hallsworth και Magan (1999), οι εντομοπαθογόνοι μύκητες, μπορούν να μολύνουν τα έντομα κάτω από συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας και υγρασίας, εφόσον υπάρχει επαρκής διαθέσιμη υγρασία στην επιδερμίδα του ξενιστή. Αν η σχετική υγρασία δεν βρίσκεται σε επίπεδα που να επιταχύνει τη σποροπαραγωγή, τότε ο μύκητας παραμένει στο εσωτερικό του ξενιστή, επιβιώνοντας για αρκετούς μήνες και τελικά παράγοντας σπόρια κυρίως όταν οι συνθήκες επανέλθουν στο βέλτιστο επίπεδο (Gupta et al. 1994).

Γενικά, η ευρεία αξιοποίηση των εντομοπαθογόνων μυκήτων αποτελεί ένα καινούργιο πεδίο έρευνας που θα οδηγήσει σε μια φιλική ως προς το περιβάλλον γεωργία έχοντας σαν γνώμονα την προστασία του αγοραστή. Σήμερα, που οι τάσεις της επιστήμης στοχεύουν σε μια ολοκληρωμένη παραγωγή προϊόντων με την χρήση ολοκληρωμένων μέσων και μεθόδων παραγωγής και διαχείρισης, θεωρείται σκόπιμη η εκπόνηση περαιτέρω σχετικών μελετών που θα δώσουν την δυνατότητα εφαρμογής σε ευρεία κλίμακα των εντομοπαθογόνων μυκήτων ως μέσων αντιμετώπισης, συνεισφέροντας ουσιαστικά στο σημαντικό και ευαίσθητο τομέα της φυτοπροστασίας.

Ανακεφαλαιώνοντας, όσα προαναφέραμε στην παρούσα διατριβή, αποδεικνύουν ότι οι εντομοπαθογόνοι μύκητες που αξιολογήθηκαν (*Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* και *Metarhizium anisopliae*), μας είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι στη βιολογική αντιμετώπιση βλαβερών εντόμων με μηδενική ή ελάχιστη τοξικότητα απέναντι στο περιβάλλον και τους άλλους ζωντανούς οργανισμούς αφού δεν υπάρχει πρόβλημα υπολειμματικότητας τους στα τρόφιμα ή στο περιβάλλον.

Βιβλιογραφία

- Ανάγνου-Βερονίκη, Μ. 1992. Μελέτη ιώσεων του Δάκου της ελιάς, *Bactrocera (Dacus) oleae* (Gmelin), στην Ελλάδα. Διδακτορική Διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, 163 σελ.
- Ανάγνου-Βερονίκη, Μ. 1996., Παθογένεση τριών τύπων ιών στο έντομο Δάκος της ελιάς (*Bactrocera oleae*) Στο: *Ελληνική Ιολογία*, 1(1) σελ: 42-45
- Abdel – Razeq, A. S. (1998). “Biological efficacy of some commercial and isolated varieties of *Bacillus thuringiensis* on the development of *Candara cautella* (Walker) and *Tribolium confusum* Jacqueline du Val on stored crushed corn.” *I.O.B.C bulletin* 21(3): 67 – 74.
- Anagnou-Veroniki, M., Kontodimas, D.C., Adamopoulos, A.D., Tsimboulis, N.D. and Voulgaropoulou, A., 2005. Effects of two fungal based biopesticides on *Bactrocera (Dacus) oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae). *IOBC/WPRS Bulletin* 28(9): 49-51.
- 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., 1994. Impact of entomopathogenic agents on the olive fruit fly. In: *IOBC/WPRS Bulletin*, vol 17(3), p: 279-282.
- 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
- Burges H.D. 1981. *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*. Academic Press, London, 949 p.
- Copping, L.G. 2001. *The BioPesticide manual, Second edition*. British crop protection council, U.K., p: XIIV-XIVII, 3-154, 161-3, 494-6.
- 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.
- DeBach, P. 1974. Chaps. 4 and 5 in Biological control by natural enemies. Cambridge Univ. Press. pp. 71-154.
- 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.
- 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

- 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.
- 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.
- Gupta, S.C., Leathers, T.D., El-Sayed, G.N., Ignoffo, C.M., 1994. Relationships among enzyme activities and virulence parameters in *Beauveria bassiana* infections of *Galleria mellonella* and *Trichoplusia ni*. *J. Inv. Pathol.* 64: 13–17.
- Hajek, A.E., St. Leger, R.J., 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology.* 39:293–322.
- Hallsworth JE, Magan N., 1999. Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Invertebrate Pathology.* 74: 261–266.
- 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.
- 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.
- 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. , P. Kessler and C.Schweizer, 2003. Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology* 48: 307–319
- Keller, S. and C. Schweizer, 2001. Ist das Drahtwurm-Problem ein Pilz-Problem? *Agrarforschung* 7(8): 248–251.
- 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. and G. Zimmermann, 1989. Mycopathogens of soil insects. In: N. Wilding, N.M. Collins, P.M. Hammond and J.F. Webber (eds), *Insect-Fungus*
- Kontodimas, D.C., Anastasopoulou, O., and Anagnou-Veroniki, M., 2005. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* and azadirachtin compounds against *Lobesia botrana* (Denis & Schifferrmüller)

(Lepidoptera, Tortricidae). *International Symposium on Organic Agriculture in the Mediterranean – Problems and Perspectives*. Chania, Crete, Greece, November 9-11, 2005. 30

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 & Schifferrmüller) (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., Kavallieratos, N.G., Mantzoukas, S.D., Athanassiou, C.G. & Anagnou-Veroniki, M., 2004. Effect of *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* and azadiractin 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.

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.

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

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.

Li Z. Z., 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.

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., 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., 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.

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.

Μιχαλάκη Μ., Αθανασίου Χ. και Μπουχέλος Κ. Αξιολόγηση της εντομοκτόνου δράσης του μύκητα *Paeilomyces 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.

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

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.

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 R.J. και Grula E.A. 1982. Toxic components on the larval surface of corn earworm (*Heliothis zea*) and their effects on germination and growth of *Beauveria bassiana*. *J. Inver Pathol.* 39: 15-22.

Smith, J.E., Lewis, C.W., 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.
- Suzuki, A., S. Kuyama, Y. Kodair, and S. Tamura. 1966. Structural elucidation of destruxin A. *Agric. Biol. Chem. (Tokyo)* 30: 517-518.
- Suzuki, A., H. Taguchi, and S. Tamura. 1970. Isolation and structure elucidation of three new insecticidal cyclodepsipeptides, destruxins C and D and desmethyldestruxin B, produced by *Metarrhizium anisopliae*. *Agric. Biol. Chem. (Tokyo)* 34: 813-816.
- Suzuki, A., K. Kawakami, and S. Tamura. 1971. Detection of destruxins in silkworm larvae infected with *Metarrhizium anisopliae*. *Agric. Biol. Chem. (Tokyo)* 35: 1641-1643.
- 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 interactions. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 344-350
- Τζανακάκης, Μ.Ε. 1995. Εντομολογία. University studio press, Θεσσαλονίκη, 385 σελ.
- Τσαπικούνης Φ. 1999, Παθολογία των εντόμων 104-111
- 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

