



**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ  
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ  
ΙΔΡΥΜΑ  
ΔΥΤΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ**

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

**ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**<<Ανεύρεση και ταυτοποίηση εντομοπαθογόνων μυκήτων από εδάφη του Νομού  
Αχαΐας>>**



**ΠΑΝΑΓΑΚΗ ΜΑΡΙΑ**

**A.M. 11881**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΔΡ ΣΠΥΡΙΔΩΝ ΜΑΝΤΖΟΥΚΑΣ**

**ΑΜΑΛΙΑΔΑ 2019**

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο της Φαρμακευτικής Πατρών. Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που χωρίς τη πολύτιμη βοήθειά τους δε θα ήταν εφικτή η ολοκλήρωση αυτής της μελέτης. Ιδιαίτερος τον καθηγητή μου Σπυρίδων Μαντζούκα για την ανάθεση, διόρθωση της πτυχιακής μου εργασίας, επίσης τον κύριο Κωνσταντίνο Πουλά που μας φιλοξένησε στο εργαστήριό του στο τμήμα της Φαρμακευτικής, τους συμφοιτητές μου Μπαλκάμου Βικτώρια, Κωνσταντοπούλου Μαρία και Παυλή Διονύση και τέλος την οικογένειά μου για την θερμή υποστήριξή τους!

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	2
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ .....	3
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	4
1.1 Η ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ.....	4
1.2 ΕΝΤΟΜΟΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ.....	4
1.2.1 ΓΕΝΙΚΑ .....	4
1.2.2 ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΞΕΝΙΣΤΗ – ΠΟΡΕΙΑ ΤΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ.....	7
1.2.3 ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ ΜΕ ΒΑΣΗ ΜΥΚΗΤΕΣ .....	7
1.2.4 ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΜΥΚΗΤΩΝ– ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ .....	10
1.2.5 Ο ΜΥΚΗΤΑΣ <i>Beauveria bassiana</i> .....	11
1.2.6 Ο ΜΥΚΗΤΑΣ <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	12
1.2.7 Ο ΜΥΚΗΤΑΣ <i>Isaria fumosorosea</i> .....	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 - ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	14
2.1 ΕΝΤΟΜΑ .....	14
2.2 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ-ΠΑΓΙΔΕΥΣΗ ΕΝΤΟΜΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ.....	14
2.3 ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΥΚΗΤΩΝ .....	16
2.4 Απομόνωση εντομοπαθόνων μυκήτων .....	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	18
3.1 Ποσοστά θνησιμότητας και επάνθισης μυκηλίου επί των νεκρών ατόμων .....	18
3.2 Μύκητες που ανιχνεύθηκαν μέσω της τεχνικής παγίδευσής τους με έντομα.....	18
ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	20
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	21

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **1.1 Η ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ**

Γενικά

Ως Βιολογική Αντιμετώπιση ορίζεται ως η δράση των φυσικών εχθρών των επιβλαβών εντόμων (παρασιτοειδή, αρπακτικά, παθογόνα) (Van Driesche και Bellows 1996) Διακρίνεται σε Φυσική Βιολογική Αντιμετώπιση (δράση των φυσικών εχθρών χωρίς παρέμβαση του ανθρώπου) και σε Εφαρμοσμένη Βιολογική Αντιμετώπιση (δράση των φυσικών εχθρών μετά την ενεργό παρέμβαση του ανθρώπου). Η Εφαρμοσμένη Βιολογική Αντιμετώπιση διακρίνεται σε Διαχείριση Πληθυσμών (εκτροφή, πολλαπλασιασμός και εξαπόλυση ιθαγενών φυσικών εχθρών) (Van Driesche και Bellows 1996) και σε Κλασική Βιολογική Αντιμετώπιση.

Οι βιολογικές μέθοδοι προστασίας των καλλιεργειών, στις οποίες συμμετέχουν οι φυσικοί εχθροί (παρασιτοειδή, αρπακτικά, παθογόνα), παρουσιάζουν μεγάλη εξειδίκευση, δεν έχουν καμία υπολειμματική δράση και δρουν με πολλούς τρόπους. Εξάλλου, πολλά από τα βιολογικά μέσα, μετά την πρώτη εφαρμογή τους υπεισέρχονται αυτόματα στο φυτικό περιβάλλον. Οι μέθοδοι αυτές είναι πολλές, άλλες αναφέρονται στη χρησιμοποίηση ωφέλιμων ή ακάρεων που έχουν την ικανότητα να παρασιτούν ή να καταβροχθίζουν τα επιβλαβή έντομα ή ακάρεα, ενώ άλλες αναφέρονται στη χρησιμοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών και ιών που προκαλούν ασθένειες στα έντομα.

### **1.2 ΕΝΤΟΜΟΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ**

#### **1.2.1 ΓΕΝΙΚΑ**

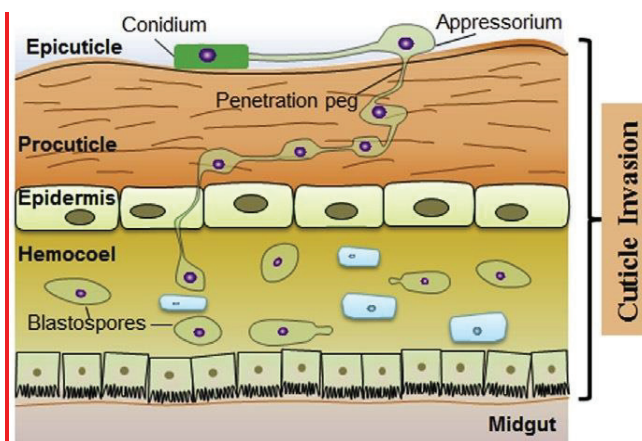
Περισσότερα από 400 είδη παθογόνων μυκήτων έχουν απομονωθεί από έντομα, αλλά μέχρι σήμερα ένας μικρός αριθμός τους έχει αξιοποιηθεί ως βιοεντομοκτόνα, εξαιτίας της εξάρτησής από υψηλή σχετική υγρασία στο περιβάλλον και της έλλειψης γνώσεων σχετικά με τους παράγοντες που

επηρεάζουν την τοξικότητά τους (Cameron 1973, Cantel 1974a, Gillespie και Claydon 1989, Roberts και Hajek 1992, ZZLietal. 2002, Hajeketal, 2007, Zimmermann, 2007).

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 με τεχνητά μέσα (Gillespie και Claydon, 1989, Roberts και Hajek, 1992).

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 (Warui και Kuria, 1983, St.Legeretal,1992, Pingel και Lewis, 1996, Vandenbergetal,1998, Tefera και Pringle 2003, 2004, Ownley, 2004) .

Αντίθετα με τους ιούς, τα βακτήρια και τα μικροσπορίδια, τα οποία πρέπει να καταποθούν και να μολύνουν μέσω του εντέρου το έντομο, οι μύκητες σχεδόν πάντα μολύνουν τον έντομο-στόχο με απευθείας διάτρηση του εξωσκελετού (Roberts 1981, Hajek και Leger, 1994, ZZLietal, 2002,Hajeketal,2007, Zimmermann, 2007). 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 (Cameron, 1973, Cantel, 1974a, Roberts, 1981, Gillespie και Claydon 1989, Roberts και Hajek, 1992, Zimmermann 2007).



**Εικόνα 1:** Μόλυνση από EPF. Ο invivo κύκλος ανάπτυξης του EPF περιλαμβάνει διαδοχικά βήματα. Πρώτα, τα κονίδια προσκολλώνται στην επιδερμίδα του εντόμου, βλαστάνουν και παράγονται τα απρεσσόρια και ο σωλήνας διείσδυσης. Η επιδερμίδα διαπερνάται με συνδυασμό μηχανικής πίεσης και ενζυμικής δράσης. Ο μύκητας αναπτύσσεται αγενώς στο αιμόκοιλο του εντόμου και εξωτερικά κονίδια παράγονται μετά το θάνατο του ξενιστή.

Όταν ένα έντομο προσβληθεί από ένα παθογόνο μύκητα, ο μύκητας αυτός διαπερνά τον εξωσκελετό και αναπτύσσει σιγά-σιγά στο εσωτερικό του εντόμου το μυκήλιο του, κατακλύζοντας έτσι όλους τους ιστούς και με τις τοξίνες που παράγει με τη θανάτωση του ξενιστή. Στη συνέχεια ο μύκητας εμφανίζεται εξωτερικά με μυκήλιο και επανθίσεις και παρατηρούνται στην επιδερμίδα του εντόμου κονιδιοφόροι από τις οποίες γίνεται η διασπορά του παθογόνου (Gillespie και Claydon 1989, Roberts και Hajek 1992, Hajek και St.Leger 1994). Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι μύκητες εντοπίζονται σε συγκεκριμένα όργανα του ξενιστή τους, όπως για παράδειγμα οι μύκητες *Massospora acicadina* και *Strongwellse acastrans* που απαντώνται μόνο στην κοιλιακή χώρα των ενήλικων εντόμων (Poinar, 1977)(Εικ. 1).

Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες μολύνουν τον ξενιστή τους με σπορία αγενούς αναπαραγωγής. Νερό, ευνοϊκές συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας απαιτούνται για την επιτυχή βλάστηση του σπορίου και την ανάπτυξη του. Η βλάστηση του κονιδίου και η συμπεριφορά του βλαστικού σωλήνα φαίνεται να παρουσιάζουν ομοιότητες μεταξύ των Entomophthorales.

Η βλάστηση του κονιδίου οδηγεί είτε στην δημιουργία δευτερογενών κονιδίων είτε στην δημιουργία ενός ή περισσότερων βλαστικών σωλήνων. Ο βλαστικός σωλήνας (germtube) που δημιουργείται διατρύπα απευθείας το δερμάτιο της επιδερμίδας του εντόμου.

Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες είναι μοναδικοί συγκρινόμενοι με άλλους μικροοργανισμούς που προκαλούν ασθένειες σε έντομα – στόχους επειδή οι περισσότεροι εισέρχονται από το επιδερμίδιο και όχι μέσω του πεπτικού σωλήνα (Hajeketal. 2007). Η μόλυνση ενός εντόμου από εντομοπαθογόνο μύκητα αρχίζει με την προσκόλληση των αναπαραγωγικών του δομών στο επιδερμίδιο (Bouciasetal. 1988). Το επιδερμίδιο του εντόμου είναι το πρώτο εμπόδιο που έρχεται σε επαφή είτε με τα βιολογικά είτε με τα χημικά εντομοκτόνα.

### **1.2.2 ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΞΕΝΙΣΤΗ – ΠΟΡΕΙΑ ΤΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ**

Στην περίπτωση των φυτοπαθογόνων μυκήτων έχει μήπως παρατηρηθεί ότι ο μύκητας παράγει ένα ειδικό μόριο (elicitor), το οποίο ανιχνεύεται από μεμβρανοσυνδεδεμένους υποδοχείς του κυττάρου ξενιστή. Αυτή η σύνδεση ενεργοποιεί το σχηματισμό ειδικών προϊόντων τα οποία με τη σειρά τους επάγουν την παραγωγή ενζύμων από το παθογόνο που επιτίθεται στο κυτταρικό τοίχωμα (Butt, 2002). Αντίστοιχο τρόπο δράσης φαίνεται να υιοθετούν και οι εντομοπαθογόνοι μύκητες.

### **1.2.3 ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ ΜΕ ΒΑΣΗ ΜΥΚΗΤΕΣ**

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

Συγκεκριμένα, οι Ferron και Robert (1975), απέδειξαν την ευαισθησία του εντόμου *Acanthoscelidesobtectus* (Say) σε αρκετούς μύκητες, συμπεριλαμβανομένου και τους *B. bassiana*, *B. tenella*, *M. Robertsii* και *P. fumosoroseus*. Εντούτοις, η δυνατότητα αυτών των οργανισμών ως μέσα μικροβιακού ελέγχου δεν προσδιορίστηκε. Οι Davis και 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 *bassiana*, τα παθογόνα εκείνα που έχουν κριθεί ως κατάλληλα για βιολογική καταπολέμηση μέχρι τώρα είναι τα *Lecanicillium (Verticillium) lecanii* και *Metarhizium robertsii* (Bischoff et al. 2009).

Πίνακας 1. Εμπορικά διαθέσιμα σκευάσματα εντομοκτόνων με βάση τους EPF

Εντομοπαθογόνος Μύκητας	Εμπορικό Σκεύασμα	Έντομα – Στόχοι
<i>Beauveria bassiana</i>	BotaniGard, Boverol, Naturalis-L, Proecon Mycotrol, Beauverin Bio-Power	Lepidoptera ( diamondback moth, beet armyworm, cabbage looper, cutworm, etc.), Coleoptera (scarab beetle grubs, weevils, coffee berry borer, cutworms, etc.), Heteroptera (psyllids, stinkbug, plant bugs, leafhoppers, mealybugs, aphids, whitefly, etc.), Thysanoptera (western flower thrips)
<i>Beauveria brongniartii</i>	Betel, Schweizer Beauveria	Lepidoptera (diamondback moth, beet armyworm, cabbage looper, cutworm, etc.)
<i>Lecanicillium lecanii</i>	Mycotal, Bio-Catch Vertalec	Heteroptera (stinkbug, aphids, whitefly, plant and leafhoppers, mealybugs), Thysanoptera (western flower thrips, onion thrips)
<i>Metarhizium manispliae</i>	Bio-Magic	Coleoptera (scarab beetle grubs, weevils), Blattodea (termites), Heteroptera (leafhoppers), Orthoptera (grasshoppers), Lepidoptera (cutworms)
<i>Metarhizium flavoviride</i> <i>var. flavoviride</i>	BioGreen, BioCane	Coleoptera (scarab beetles, weevils), Orthoptera (grasshoppers and locusts), Blattodea (termites)
<i>Isaria fumosorosea</i>	Preferal, Priority, FuturEcoNofly	Heteroptera (whiteflies, aphids, etc.), Lepidoptera (tomato moth), Acari (rust mites, spider mite, etc.)

Κατά τον Γιαμβριά (1991), κυκλοφορούν λίγα παρασκευάσματα που έχουν ως βάση εντομοπαθογόνους μύκητες. Ένα από αυτά έχει το μύκητα *B. bassiana* ως δραστικό παράγοντα. Ο πολλαπλασιασμός του γίνεται με τη μορφή των βλαστοσπορίων.

Το 1976, η Abbott Laboratories ανέπτυξε μέθοδο για την παραγωγή βρέξιμης σκόνης με βάση το μύκητα *Hirsutella thompsoni* με μεγάλη περιεκτικότητα σε κονίδια. Τελευταία έχει κυκλοφορήσει στο εμπόριο από την Ολλανδική εταιρία Koppert ένα μυκητολογικό παρασκεύασμα το MYCOTAL σε μορφή βρέξιμης σκόνης που έχει ως βάση κονιδιοσπόρια του μύκητα *lecanii* και έχει μεγάλη



δραστική ικανότητα, 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 *L. lecanii*. 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 *B. 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 *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 διπτέρων, του *M. anisopliae* (Bischoff et al, 2009) για την αντιμετώπιση κολεοπτέρων, λεπιδοπτέρων και ισοπτέρων, του *M. anisopliae acridium* για την αντιμετώπιση ορθοπτέρων, του *M. anisopliae* για την αντιμετώπιση του κολεοπτέρου *Dermolepida albohirtum* (Scarabeidae), του *M. anisopliae* strain ICIP30 για την αντιμετώπιση ισοπτέρων και θυσανοπτέρων, του *M. flavoviridae flavoviridae* για την αντιμετώπιση του κολεοπτέρου *Adoryphoru scoulonii*

(Scarabeidae) και του *Isaria fumosorosea* για την αντιμετώπιση αφίδων, αλευρωδών, θριπών και αραχνοειδών.

#### 1.2.4 ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΜΥΚΗΤΩΝ– ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ

Οι μυκοτοξίνες είναι φυσικά απαντώμενες φυσικές ουσίες, χημικής σύνθεσης, που παράγονται από μύκητες που προσβάλλουν φυτικούς ή ζωικούς οργανισμούς. Απαντώνται αρκετά συχνά στα ζώα αλλά και στον άνθρωπο και μπορούν να προκαλέσουν τοξικά σύνδρομα. Σε εργαστηριακό επίπεδο έχουν περιγραφεί πάνω από 300 μυκοτοξίνες (Smith et al, 1994).

Σχεδόν όλες οι συνθέσεις που θεωρούνται μυκοτοξίνες και δοκιμάζονται στα έντομα, έχει αποδειχθεί ότι έχουν παρόμοιες επιδράσεις στα περισσότερα είδη, όπως π.χ. τη μείωση του βαθμού ανάπτυξης καθώς και μορφολογικές, ιστολογικές και αναπαραγωγικές αλλαγές.

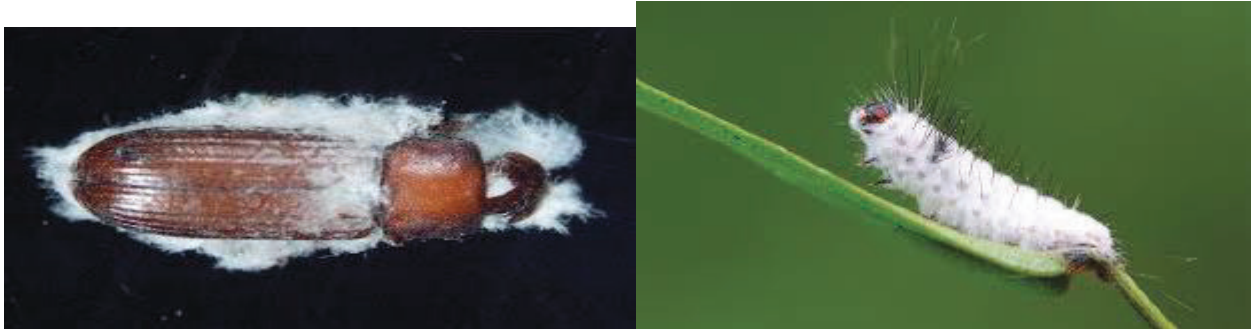
Η σχετική τοξικότητα μιας συγκεκριμένης μυκοτοξίνης ποικίλει σημαντικά από έντομο σε έντομο. Ακόμη, η συνύπαρξη διαφορετικών μυκοτοξινών σε φυτικά υλικά μπορεί να καταλήξει σε αθροιστικές επιδράσεις στα έντομα που τρέφονται από αυτά.

Αν και τα έντομα είναι πιθανόν η μόνη ομάδα οργανισμών η οποία φέρει μια εκτεταμένη αντίσταση στις μυκοτοξίνες, αρκετά πειράματα έχουν δώσει αρκετά καλά αποτελέσματα.

Μίξη από trichothecens και non-trichothecens sesquiterpenes από το *Fusarium graminearum*, σε χαμηλές μάλιστα συγκεντρώσεις, έχει δείξει ότι μπορεί να ενεργήσει εναντίων των *Spodoptera fudgiperda* (Lepidoptera) και των *Heliothis zea* (Lepidoptera) (Smith et al, 1994).

Στα ίδια Λεπιδόπτερα, ο συνδυασμός των deoxynivalend (DON) σε 25 mg/g με dihydroxycalonetrin (DHCAL) σε 10 mg/g έδειξε σε διάστημα 7 ημερών θνησιμότητα 29.3 % στη *Spodoptera fudgiperda* και 61.5 % στο σκουλήκι του καλαμποκιού (Smith et al, 1994)

### 1.2.5 Ο ΜΥΚΗΤΑΣ *Beauveria bassiana*



**Εικόνα2:** Ο Μύκητας *Beauveria bassiana*

Ο μύκητας *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Hypocreales: Cordycipitaceae) συνίσταται για την καταπολέμηση της πυραλίδας του καλαμποκιού (*Ostrinia nubilalis*) των αφίδων, των θριπών, των αλευρωδών, των κολεοπτέρων και ορισμένων ημιπτέρων (Warui και Kuria 1983, Stleger et al, 1992, Pingel και Lewis 1996, Vandenberg et al, 1998; Keller et al, 1997, 1999, Teferai και Pringle 2003, 2004, Ownley 2004, Liu et al, 2006). Είναι μύκητες κοσμοπολίτικοι, ατελείς, απλοειδείς και παραγωγοί βιολογικά ενεργών μεταβολιτών (Ferron et al, 1991). Το όνομα της, το πήρε από τον ιταλό εντομολόγο Agostino Bassi, οποίος και την ανακάλυψε το 1835 ως αίτιο για την άσπρη επίστρωση (μούχλα) που βρέθηκε πάνω στο *Bombyx mori* (Stleger et al, 1992, Robertson et al, 2007, Zimmermann, 2007). Ο πρώτος ταξινομικός χαρακτηρισμός του μύκητα που προκαλούσε την ασθένεια –white muscardina– δόθηκε από τον Balsamo – Crivelli όταν ονόμασε το παθογόνο *Botryti sbassiana*. Μόλις το 1912 χαρακτηρίστηκε τυπικό είδος από τον Vuillemin (Εικ. 2).

### 1.2.6 Ο ΜΥΚΗΤΑΣ *Metarhizium anisopliae*



**Εικόνα 3:** Ο μύκητας *Metarhizium anisopliae*

Ο *Metarhizium anisopliae* (Bischoff et al, 2009) (Metchnikoff) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) γνωστός παλαιότερα ως *Metarhizium anisopliae var anisopliae*, είναι ένας μύκητας που συναντάμε σε ολόκληρο τον κόσμο, αναπτύσσεται φυσικά στο έδαφος και προσβάλλει διάφορα έντομα λειτουργώντας σαν παράσιτο. Απέκτησε το όνομα του όταν το 1879 ο Ι.Ι. 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 (Tefera και Pringle 2004, Robertson et al, 2007). Το κοινό όνομα με το οποίο αποδίδεται η ασθένεια που προκαλούν οι μύκητες του γένους *Metarhizium* είναι –green muscardine- εξαιτίας των πρασίνων κονιδίων που καλύπτουν τα νεκρά έντομα (Εικ. 3).

Έχει αναφερθεί ότι προσβάλλει περίπου 200 είδη εντόμων (Roberts και St. Leger 2004, Tefera και Pringle 2004, Liu et al, 2006, Kabaluk et al. 2007, Robertson et al, 2007) και άλλων αρθροπόδων. Οι μύκητες του είδους *M. Anisopliae* ήταν οι πρώτοι παγκοσμίως που χρησιμοποιήθηκαν μαζικά για τον έλεγχο των εντόμων (Roberts και Humber 1981, McCoy et al, 1988, St. Leger 1992, 1993, Driver et al, 2000). Αν και παρουσιάζει μεγάλα ποσοστά θνησιμότητας στα έντομα δεν αποτελεί κίνδυνο για τα θηλαστικά παρά μόνο μπορεί να προκαλέσει αλλεργικές αντιδράσεις σε ευαίσθητα άτομα. Παράλληλα μπορεί να εφαρμοστεί για τον έλεγχο της Μαλάριας (Roberts και Humber 1981, McNeil 2005, Robertson et al, 2007, Thomas και Read 2007a,b, Fungetal, 2011), τοποθετώντας δίχτυα

κουνουπιών ή φύλλα βαμβακιού βαπτισμένα σε διάλυμα νερού που περιέχει κονίδια του μύκητα, στον τοίχο σαν παγίδες.

Το Bioblast είναι μία εμπορική διαθέσιμη μορφή του εντομοπαθογόνου μύκητα *M. anisopliae* που χρησιμοποιείται 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 εκτεθειμένοι σε άμεση επαφή με τα κονίδια του μύκητα. Παράλληλα με αυτήν την μέθοδο προκαλείται εξάπλωση του παθογόνου μύκητα σε υγιή, μη μολυσμένα άτομα της αποικίας. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο θάνατος επέρχεται σε 4 έως 10 ημέρες ανάλογα με την θερμοκρασία.

### **1.2.7 Ο ΜΥΚΗΤΑΣ *Isaria fumosorosea***

Το *Isaria fumosorosea* (Wize) Brown & Smith (Hypocreales: Clavicipitaceae), θεωρείται πολύ ελπιδοφόρος βιολογικός παράγοντας για τον έλεγχο βλαβερών εντόμων. Το κοινό όνομα με το οποίο αποδίδεται η ασθένεια που προκαλούν οι μύκητες του γένους *Isaria* είναι –pink muscardine- εξαιτίας των ροζ χρώματος κονιδίων που καλύπτουν τα νεκρά έντομα (Εικ. 4,5).

Επίσης από *I. fumosorosea* έχουν απομονωθεί Λευκινιστίνες και Εφαπερτίνες. Αυτοί οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι γραμμικά πεπτίδια και εμφανίζουν ανασταλτική δράση στα μιτοχονδρική ΑΤΡασες καθώς επίσης και αντιμυκητιακές και εντομοκτόνες δράσεις (Shield et al,1981, Jegorov et al,1994). Τα κονίδια του έρχονται σε επαφή με την επιδερμίδα του εντόμου και αφού βλαστήσουν, διαπερνούν την επιδερμίδα και πολλαπλασιάζονται μέσα στο σώμα του εντόμου και εισέρχονται στην αιμολέμφο (Altre 2001) .Διάφορα γεωργικά προϊόντα έχουν εξεταστεί ως συστατικά σκευασμάτων και μερικά υπόσχονται τη διατήρηση της βιωσιμότητας των βλαστοσπορίων στο πέρασμα του χρόνου.



**Εικόνα 4&5:** Αποικίες του εντομοπαθογόνου μύκητα *I. fumosorosea* σε θρεπτικό μέσο SDA και η επάνθησή του .

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 - ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

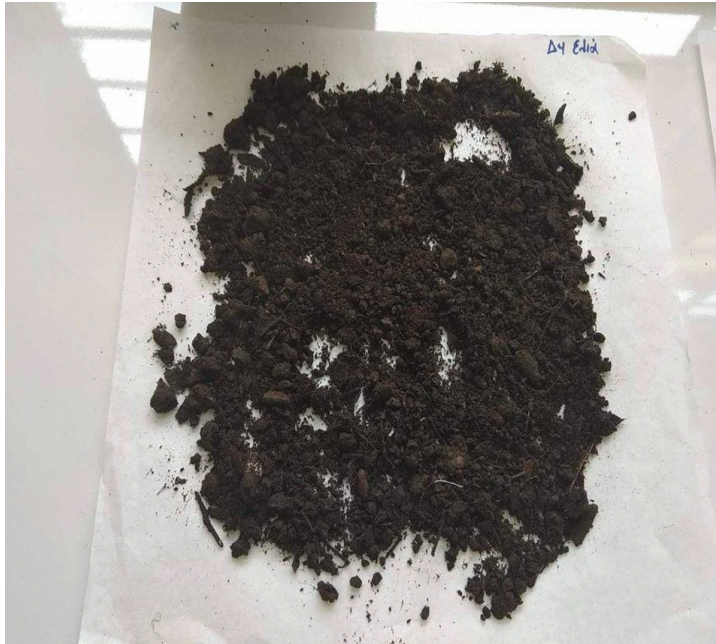
### **2.1 ENTOMA**

Η εκτροφή και των 2 εντόμων έλαβε χώρα στο Πανεπιστήμιο Πατρών και συγκεκριμένα στο Τμήμα της Φαρμακευτικής. Όσο αναφορά την εκτροφή του *Sitophilus oryzae* χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο καλαμπόκι ενώ για το έντομο *Tribolium confusum* αποστειρωμένο αλεύρι αναμειγμένο με μαγιά. Σε όλα τα στάδια ανάπτυξης των εντόμων το δωμάτιο βρισκόταν σε σταθερή θερμοκρασία των 25 βαθμών Κελσίου. Τα έντομα βρίσκονταν και αναπτύσσονταν μέσα σε βάζα και πραγματοποιούνταν αραιώσεις ώστε να αποφευχθεί ο ανταγωνισμός και να μην επηρεαστεί η ανάπτυξη και η πρόσληψη τροφής των προνυμφών. Σε όλα τα στάδια ανάπτυξης των εντόμων τα έντομα βρίσκονταν σε δωμάτιο με σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (25°), υγρασία 60-70% και φωτοπερίοδο 16:8 ώρες.

### **2.2 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ-ΠΑΓΙΔΕΥΣΗ ΕΝΤΟΜΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ**

Συνολικά συλλέχθηκαν 21 δείγματα εδάφους από δύο περιοχές της Πάτρας ημιαστικού περιβάλλοντος. Τα δείγματα συλλέχθηκαν τον μήνα Φεβρουάριο του 2017 και η ποσότητα του

καθενός αντιστοιχούσε σε 300g(Εικ. 6). Έπειτα τοποθετήθηκαν σε πλαστικές σακούλες και αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο έως ότου γίνει την επεξεργασία τους. Τα σημεία της δειγματοληψίας καταγράφηκαν με συσκευή GPS. Το δείγμα που συλλέχθηκε τοποθετήθηκε πάνω σε σκληρό χαρτόνι στον πάγκο του εργαστηρίου για 24h, ώστε να μειωθεί η υγρασία του. Αυτό έγινε διότι σε συνθήκες υπερβολικής υγρασίας, εάν υπάρχουν εντομοπαθογόνοι νηματώδεις επιτίθενται και σκοτώνουν τις προνύμφες των εντόμων «παγίδων» πριν από τους εντομοπαθογόνους μύκητες. Στη συνέχεια, το δείγμα κοσκινίστηκε με ειδικά κόσκινα και τοποθετήθηκε σε τριβλία Petri. Σε αυτό το σημείο εισήχθησαν τα ακμαία. Σε κάθε δείγμα εισάχθηκαν 10 ακμαία, τα οποία και αφέθηκαν σε ειδικούς θαλάμους στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία  $25\pm 1$  °C για 21 ημέρες (Εικ. 7). Κάθε 7 ημέρες πραγματοποιούνταν μετρήσεις για τυχόν θανατωμένα ακμαία. Τα νεκρά ακμαία καθώς και οι νεκρές ή μουμιοποιημένες προνύμφες αφού απομακρύνθηκαν, εμβαπτίστηκαν σε υποχλωριώδες νάτριο 1% για μερικά δευτερόλεπτα, προς αποστείρωσή τους (αποφυγή ανάπτυξης σαπροφυτικών μυκήτων). Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε τριβλία Petri αποστειρωμένα και συγκεκριμένα πάνω σε διηθητικό χαρτί(αποστειρωμένο) εμποτισμένο σε d dH<sub>2</sub>O (moistchamber). Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε εντός θαλάμου νηματικής ροής (laminar flow). Τα δείγματα αυτά φυλάχθηκαν σε ειδικούς θαλάμους στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία  $25\pm 1$  °C όπου γίνονταν καθημερινές παρατηρήσεις στο στερεοσκόπιο για τυχόν σημεία ανάπτυξης εντομοπαθογόνων μυκήτων. Η απομόνωση των μυκήτων έγινε με τη μέθοδο της χρήσης ως δολώματος των εντόμων *S. oryzae* και *T. confusum*. Οι Bedding και Akhurst ανακάλυψαν το 1975 την συγκεκριμένη μέθοδο, η οποία εφαρμόστηκε με επιτυχία σε πάρα πολλές έρευνες. Ειδικότερα, αυτή η τεχνική χρησιμοποιεί προνύμφες του κηρόσκορου (*Galleria mellonella*) ως δόλωμα για τη φυσική παρουσία των εντομοπαθογόνων νηματωδών του εδάφους.



**Εικόνα 6:** Δείγμα εδάφους από την περιοχή του Δασυλλίου



**Εικόνα 7:** Δέκα γραμμάρια χώματος σε κάθε τριβλίο με δέκα έντομα *T. Confusum*

### **2.3 ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΥΚΗΤΩΝ**

Η παρασκευή του θρεπτικού υλικού έγινε ως εξής: σε 1000ml κρύου αποστειρωμένου νερού προστίθενται 65gr λυοφιλιωμένου Sabourose Dextrose Agar. Το μείγμα θερμαίνεται σε *benmari* για να διαλυθεί το μέσο εντελώς. Έπειτα διανέμεται σε κωνικές φιάλες και αποστειρώνεται σε κλίβανο για



15λεπτά. Η τελική αντίδραση του μέσου είναι Ph:6.5. Στη συνέχεια πριν το μέσο σταθεροποιηθεί τοποθετείται σε αποστειρωμένα τριβλία τύπου Petri.

#### **2.4.Απομόνωση εντομοπαθογόνων μυκήτων**

Τα προσβεβλημένα ακμαία ή προνύμφες από εντομοπαθογόνους μύκητες απομονώθηκαν είτε ολόκληρα σε τριβλία Petri έχοντας ως υπόστρωμα το θρεπτικό υλικό SDA είτε έγινε καλλιέργεια των κονιδίων των μυκήτων που είχανεκπτυχθεί από το σώμα των προσβεβλημένων ακμαίων-προנוμφών στο ίδιο υλικό. Τα τριβλία φυλάσσονται σε θερμοκρασία  $25\pm 1$  °C στο σκοτάδι προς επώαση και ανάπτυξη των μυκήτων. Αν κάποιος μύκητας αναπτυχθεί, απομονώνεται εκ νέου προς αποφυγή επιμολύνσεων και ανάπτυξη καθαρών καλλιεργειών και αναγνωρίζεται μέσω της μικροσκοπικής εξέτασης (όπου είναι δυνατό) για να επιβεβαιωθεί το είδος βάσει του σχήματος και του μεγέθους των κονιδίων του.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1 Ποσοστά θνησιμότητας και επάνθισης μυκηλίου επί των νεκρών ατόμων

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα ποσοστά θνησιμότητας των νεαρών ακμαίων των κολεοπτέρων και τα αντίστοιχα ποσοστά τους ως προς την επάνθιση μυκηλίου:

Για το κολεόπτερο *S. Oryzae* (νεαρά ακμαία)

Περιοχές	Ποσοστό θνησιμότητας(%) (%)	Ποσοστό επάνθισης μυκηλίου
A	96.67	59
B	88.33	67

Για το κολεόπτερο *T.confusum* (νεαρά ακμαία)

Περιοχές	Ποσοστό θνησιμότητας(%)	Ποσοστό επάνθισης μυκηλίου (%)
A	32.38	10
B	73.33	36

### 3.2 Μύκητες που ανιχνεύθηκαν μέσω της τεχνικής παγίδευσής τους με έντομα

Στο σύνολο δύο είδη εντομοπαθογόνων μυκήτων βρέθηκαν ως τα παθογόνα στα διαφορετικά αρθρόποδα με την τεχνική της παγίδευσης. Το *B. bassiana* βρέθηκε σε όλα τα δείγματα.

Οι ονομασίες των μυκήτων που αναγνωρίστηκαν κατόπιν μικροσκοπικής εξέτασης και παρατήρησης προκειμένου να επιβεβαιωθεί, με βάση το σχήμα και το μέγεθος των σπορίων, το είδος του εντομοπαθογόνου μύκητα που προκάλεσε τη θνησιμότητα.

Για το κολεόπτερο *S. oryzae* (νεαρά ακμαία)

Περιοχές	Μύκητες που ανιχνεύθηκαν
A	άγνωστο, <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Metarhizium</i> spp., άγνωστο, <i>Metarhizium</i> spp., βακτήριο, <i>Nigrospora</i> <i>asp.</i>
B	<i>Metarhizium</i> spp., άγνωστο, <i>Nigrospora</i> spp., <i>Metarhizium</i> spp., <i>Nigrospora</i> spp., <i>Nigrospora sphaericae</i> , <i>Nigrospora</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., βακτήριο, <i>Trichoderma gamsii</i> , <i>Nigrospora</i> <i>asp.</i> , <i>Chaetomium globosum</i> , <i>Aspergillus</i> spp., <i>Nigrospora</i> p., <i>Apophysomyces ossiformis</i>

Για το κολεόπτερο *T. confusum* (νεαρά ακμαία)

Περιοχές	Μύκητες που ανιχνεύθηκαν
A	<i>Beauveria bassiana</i> , άγνωστο, <i>Beauveria</i> <i>bassiana</i>
B	<i>Chaetomium</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Chaetomium truncatu</i> <i>lum</i> άγνωστο, άγνωστο, βακτήριο, άγνωστο

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η σύγχρονη τάση στο πεδίο της παραγωγής προϊόντων με ολοκληρωμένες μεθόδους παραγωγής και διαχείρισης ευνοεί την ανάπτυξη βιολογικών σκευασμάτων, που τείνουν να αντικαταστήσουν χημικά-συνθετικά σκευάσματα με τα οποία αντιμετώπιζονταν οι ασθένειες, οι προσβολές και η θήρευση των καλλιεργειών. Για το σκοπό αυτό, πολλά είδη εντομοπαθογόνων μυκήτων έχουν χρησιμοποιηθεί εναντίον διαφόρων επιβλαβών για τις καλλιέργειες εντόμων και έχουν επιδείξει ικανοποιητικά επίπεδα ελέγχου. Αρκετά είδη εξ αυτών έχουν αναφερθεί ως σημαντικοί παράγοντες αντιμετώπισης επίσημων εντόμων - εχθρών στις καλλιέργειες.

Η ανεύρεση και η ταυτοποίηση των εντομοπαθογόνων μυκήτων *B. bassiana* και *M. Anisopliae* var *anisopliae* δίνει τη δυνατότητα αξιοποίησης αυτών των μυκήτων, καταρχήν ως φυσικών παραγόντων βιολογικής αντιμετώπισης και εν συνεχεία ως παραγόντων για την ανάπτυξη βιολογικών σκευασμάτων. Λόγω της μικρής διάρκειας της μελέτης, αυτή περιορίστηκε κυρίως σε ημιαστικές περιοχές της Πάτρας όπου και συλλέχθηκαν τα περισσότερα δείγματα μας. Ωστόσο τα αποτελέσματα κρίνονται ικανοποιητικά διότι βρέθηκαν και ταυτόχρονα προσδιορίστηκαν δύο είδη Εντομοπαθογόνων μυκήτων για πρώτη φορά.

Εν κατακλείδι η χρήση των ολοκληρωμένων μέσων και μεθόδων παραγωγής και διαχείρισης, μέσω μελετών (Αποτελεσματικότητας, Μολυσματικότητας, Διεύρυνση καινούργιων ξενιστών, Ενδοφυτικότητα), θα δώσουν την δυνατότητα εφαρμογής σε ευρεία κλίμακα των εντομοπαθογόνων μυκήτων ως μέσα αντιμετώπισης, συνεισφέροντας ουσιαστικά στο σημαντικό και ευαίσθητο τομέα της φυτοπροστασίας. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα προς την κατεύθυνση αυτή από όλους όσους λαμβάνουν μέρος σε αυτό το ευαίσθητο πλην όμως σημαντικό τομέα στη γεωπονικής επιστήμης. Η 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.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abbott, W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18, 265-267.
- Abdel Rahman Khaled M., Barta M., Cagan L., 2010. Effect of combining *Beauveria bassiana* and *Nosema pyrausta* on the mortality of *Ostrinia nubilalis*, *Cent. Eur. J. Biol.* 5: 472-480.
- Altre, J. A., και Vandenberg, J. D., 2001. Factors Influencing the Infectivity of Isolates of *Paecilomyces fumosoroseus* against Diamondback Moth, *Plutella xylostella*. *Journal of Invertebrate Pathology.* 78: 31–36.
- Athanassiou C.G., Kavallieratos N.G., Dimizas C.B., Vayias B.J., Tsakiri J.B., Mikeli N.H., Meletsis C.M., Tomanovic Z., (2008). "Persistence and efficacy of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) and diatomaceous earth against *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) and *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae) on wheat and maize", *Crop Protection* 27: Pages 1303-1311
- Avantaggiato, G., Quaranta, F., Desiderio, E., Visconti, A., 2002. Fumonisin contamination of maize hybrids visible damaged by *Sesamia*. *J. Sci. Food Agric.* 83, 13–18.
- Baldwin R. and Fasoulo T., 2003. Confused flour beetle, *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae). University of Florida, institute of food and agricultural sciences, department of entomology and nematology. [http://creatures.ifas.edu/urban/beetles/red\\_flour\\_beetle](http://creatures.ifas.edu/urban/beetles/red_flour_beetle) (html)
- Bischoff, J.F., Rehner, S.A., Humber, R.A., 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* line age. *Mycologia* 101, 512-530.
- Brownbridge, M., (1991) Native *Bacillus thuringiensis* isolates for the management of lepidopteran cereal pests. *Insect Sci. Appl.* 12, 57-61
- Butron A., Malvar R.A., Cartea E., Ordas A. & Velasco P. 1999: Resistance of maize inbred lines to pink stem borer. *Crop Prot.* 39: 102–107.
- Butron, A., Sandoya, G., Santiago, R., Ordas, A., Rial, A., Malvar, R.A., 2006a. Searching for new sources of pink stem borer resistance in maize. *Genet. Resour. Crop Evol.* 53, 1455–1462.
- Cox, F. E. G., 2001. Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology.* 122: 23–38.
- Driver, F., Milner, R.J., Trueman, W.H.A., 2000 A Taxonomic revision of *Metarhizium* based on sequence analysis of ribosomal DNA. *Mycological Res.* 104: 135-151
- Fargues, J., Delmas, J. C. και Lebrun, R. A., 1997. Leaf consumption by larvae of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) infected with the entomopathogen, *Beauveria bassiana*. *Journal of Economic Ent.* 87: 67–71.
- Ford J., 1937. Research on populations of *Tribolium confusum* and bearing on ecological theory (special review). *The Journal of Animal Ecology* 6, 1937, 1-14. <http://links.jstor.org/sici>

- Furlong MJ, Groden EJ, 2001 Evaluation of synergistic interactions between the Colorado potato beetle (Coleoptera:Chrysomelidae) pathogen *Beauveria bassiana* and the insecticides, imidacloprid and cyromazine. *Econ.Entomol.*, 94(2): 344–356.
- Gillespie, A. T., Bailey A. M., Cobb B., Vilcinskas A. 2000. Fungi as elicitors of insect immune responses. *Arch Insect Biochem Physiol.* 44: 49-68.
- Hajek, A. E., 1989. Food consumption by *Lymantria dispar* (Lepidoptera:Lymantriidae) larvae infected with *Entomophaga maimaiga* (Zygomycetes:Entomophthorales). *Environmental Entom.* 18: 723–727.
- Hajek, A. E., McManus, M. L., Delalibera Jr. I., 2007. A review of introductions of pathogens and nematodes for classical biological control of insects and mites. *Biol. Con.* 41: 1-13.
- Hajek, A. E., McManus, M. L., Delalibera Jr. I., 2007. A review of introductions of pathogens and nematodes for classical biological control of insects and mites. *Biol. Con.* 41: 1-13.
- Hilder, V.A., Boulter, D., 1999. Genetic engineering of crop plants for insect resistance—a critical review. *Crop Prot.* 18, 177–191.
- Howe R.W., 1960. The effects of temperature and humidity on the rate of development and the mortality of *Tribolium confusum* Duval. (Coleoptera:Tenebrionidae). *Ann. appl. Biol.*, 48 (1960), 363-376.
- Jegorov, A., Sedmera, P., Matha, V., Simek, P., Zahradnickova, Landa, Z., Eyal, J., 1994. Beauverolides L and La from *Beauveria tenella* and *Paecilomyces fumosoroseus*. *Phytochemistry.* 37: 1301–1303.
- Leger, R. J., 2006. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:6647-6652.
- Lewis, L.C., Berry, E.C., Obrycki, J.J., Bing, L.A., 1996. Aptness of insecticides (Bacillus thuringiensis and carbofuran) with endophytic *Beauveria bassiana*, in suppressing larval populations of the European corn borer. *Agriculture Ecosystems & Environment* 57, 27–34.
- Malvar, R.A., Buton, A., Ordas, B., Santiago, R., 2008. Causes of natural resistance to stem borers in maize. In: Burton, E.N., Williams, P.V. (Eds.), *Crop Protection Research Advances*. Nova Science Publishers, Inc., pp. 57–100.
- McCoy, C. W., Samson, R. A., Boucias, D. G., 1988. Entomogenous fungi. In: Ignoffo CM (ed) *CRC Handbook of Natural Pesticides vol V. Microbial insecticides, part A. Entomogenous protozoa and fungi*. CRC Press, Bocaaton, FL, pp 151–236
- Mietkiewski, R., Gorski, R., 1995. Growth of selected entomopathogenic fungi species and isolates on media containing insecticides. *Acta Mycol.* 30, 27–33.
- Pevling, R., Weyrich, J., 1992. Effects of neem oil, *B. bassiana* and Dieldrin on non target tenebrionid beetle in desert zone of the Republic of Niger. *Biological control of Locusts and Gras hoppers: Proceedings of the Workshop held at International Institute of Tropical Agriculture: Cotonou, Republic of Nenin, April–May 1991, Wallingford, UK, CABI, pp. 321–336.*

- Shahid, A. A., Rao, Q. A., Baskhsh, A. και Husnain, T., 2012. Entomopathogenic fungi as biological controllers: new insights into their virulence and pathogenicity. *Arch. Biol. Sci.* 64(1): 21-42.
- Thomas, M.B., Watson, E.L., Valverde-Garcia, P., 2003. Mixed infections and insect pathogen interactions. *Ecol. Lett.* 6, 183–188.
- Wraight, S. P., Butt, T. M., Galaini-Wraight, S., Allee, L. L., Soper, R. S., Roberts, D.W., 1990. Germination and infection processes of entomopathogenic fungus *Erynia radicans* on the potato leafhopper *Empoasca fabae*. *J. Invert. Pathol.* 56:157-174.
- Wraight, S. P., Ramos, M. E., 2005. Synergistic interaction between *Beauveria bassiana* and *Bacillus thuringiensis* is tenebrionis-based biopesticides applied against field populations of Colorado potato beetle larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 90: 139–150.
- Zimmermann, G., 1986. The Galleria bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil. *J. Appl. Ent.* 102: 213–215.
- Zimmermann, G., 1993. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pestic. Sci.* 37, 375–379.
- Αθανασίου Χ.Γ., και Μπουχέλος Κ.Θ., (2003) "Κολεόπτερα αποθηκευμένων δημητριακών και συναφών προϊόντων στην Ελλάδα". 8<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο., Χαλκίδα 2-5 Νοεμβρίου 1999., σελ.21

