

Τ.Ε.Ι ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας
Τμήμα Φυτικής Παραγωγής

Η εντομοπαθογόνος δράση του μύκητα *Verticillium lecanii*
(Zimmermann) Viegas (Moniliales)

Ανδριάννα Νικολοπούλου
Καλαμάτα 2005

Τ.Ε.Ι ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας
Τμήμα Φυτικής Παραγωγής

Η εντομοπαθογόνος δράση του μύκητα *Verticillium lecanii*
(Zimmermann) Viegas (Moniliales)

Ανδριάνα Νικολοπούλου
Καλαμάτα 2005

Τ.Ε.Ι ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας
Τμήμα Φυτικής Παραγωγής

Η εντομοπαθογόνος δράση του μύκητα *Verticillium lecanii*
(Zimmermann)Viegas (Moniliales)

Ανδριάνα Νικολοπούλου
Καλαμάτα 2005

**ΠΑΣΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗ
ΧΩΡΙΖΟΜΕΝΗ ΔΙΚΑΙΟΣΥΝΗΣ
ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΛΛΗΣ ΑΡΕΤΗΣ
ΠΑΝΟΥΡΓΙΑ, ΟΥ ΣΟΦΙΑ
ΦΑΙΝΕΤΑΙ
(Μενέξενος Πλάτωνος, 247-Α)**

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η πτυχιακή μελέτη αποτελεί μέρος των υποχρεώσεων των φοιτητών και είναι το επιστέγασμα των σπουδών τους.

Σκοπός της πτυχιακής μου εργασίας είναι η μελέτη της εντομοπαθογόνου δράσης του μύκητα *Verticillium lecanii* εναντίον των κοκκοειδών *Ceroplastes rusci* L. (Hemiptera, Homoptera, Margarodidae) και *Marchalina hellenica* (Gennadius) (Hemiptera, Homoptera, αλλά και των αφίδων *Aphis fabae* Scopoli και *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera, Homoptera: Aphididae)

Γι' αυτό ακριβώς και στο πείραμα αυτό, χρησιμοποιήθηκαν οι φυσικοί πληθυσμοί 3 διαφορετικών φυλών του μύκητα *Verticillium lecanii* (a,b,c), σε SDA (Sabouraud Dextrose Agar) ,που αποτελεί το κατάλληλο και πιο δραστικό άγαρ για την ανάπτυξη αυτού του μύκητα.

Πιστεύεται ότι η συγκεκριμένη εργασία θα δώσει λύσεις και μια νέα άποψη για την καταπολέμηση των συγκεκριμένων εντόμων και θα είναι ένα χρήσιμο βοήθημα για όσους επιθυμούν να ενημερωθούν για το συγκεκριμένο θέμα.

Η εργασία διαχωρίζεται σε δυο μέρη. Το πρώτο αναφέρει όλα τα θεωρητικά στοιχεία, δηλαδή πληροφορίες για τον εντομοπαθογόνο μύκητα *Verticillium lecanii*, αναφορές για την προέλευση άλλων ομόπτερων εντόμων που προσβάλλουν τα πεύκα, τα εσπεριδοειδή, τα κουκιά και τις μελιτζάνες, εμπορικά σκευάσματα με βάση τους μύκητες, στοιχεία για τις ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν και γενικότερα τους τρόπους καταπολέμησης. Στο δεύτερο μέρος παρατίθενται όλα τα στοιχεία των μετρήσεων των ποσοστών ατόμων ,επί των οποίων αναπτύχθηκε ο μύκητας *V.lecanii*.

Η μελέτη αυτή εκπονήθηκε στο εργαστήριο μικροβιολογίας και παθολογίας εντόμων στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο με την βοήθεια των επιστημονικών προϊσταμένων μου. Ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή μου Δρα Γεώργιο Σταθά, για την ανάθεση και εξέταση της πτυχιακής μου μελέτης καθώς και για όσα με δίδαξε κατά τη διάρκεια της φοίτησής μου, στο Τ.Ε.Ι Καλαμάτας. Ευχαριστώ ιδιαίτερος, τον Δρα Δημήτριο Κοντοδήμα, ειδικό Τεχνικό Επιστήμονα, για την πολύτιμη συμβολή του σε όλο το φάσμα της

πτυχιακής μου μελέτης, για την παροχή της βιβλιογραφίας καθώς και του φωτογραφικού υλικού.

Τις θερμές μου ευχαριστίες στην προϊσταμένη του εργαστηρίου Μικροβιολογίας & Παθολογίας Εντόμων, Δρα Μαρία Ανάγνου Βερονίκη, για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε καθ 'όλη τη διάρκεια της μελέτης .

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τον Δρ. Παναγιώτη Μυλωνά, υπεύθυνο του εργαστηρίου Βιολογικής Καταπολέμησης, την παρασκευάστρια – τεχνική βοηθό Σταυρούλα Παπανικολάου, καθώς και όλους τους συναδέλφους μου στο Ινστιτούτο, για την πολύτιμη υποστήριξή τους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου που με ώθησαν προς αυτήν την κατεύθυνση και με βοήθησαν με κάθε τρόπο ώστε να κάνω τα σωστά βήματα μέχρι το τέλος.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
1. Εισαγωγή.....	9
1.1. Γενικά	9
1.2. Η ολοκληρωμένη αντιμετώπιση.....	9
1.3. Η βιολογική αντιμετώπιση.....	11
1.3.1. Φυσικοί εχθροί των επιβλαβών εντόμων.....	12
1.3.2. Παράγωγα μυκήτων-μυκοτοξίνες.....	13
1.3.3. Εντομοπαθογόνοι ιοί.....	14
1.3.4. Εντομοπαθογόνα βακτήρια.....	15
1.3.5. Εντομοπαθογόνοι νηματώδεις.....	16
1.3.6. Εντομοπαθογόνα πρωτόζωα.....	17
1.3.7. Εντομοπαθογόνες ρικέτσιες.....	18
1.4. Οι μύκητες ως εντομοπαθογόνοι μικροοργανισμοί.....	19
1.4.1. Τρόπος δράσης των μυκήτων.....	19
1.4.2. Εμπορικά μικροβιακά σκευάσματα με βάση μύκητες.....	22
1.4.3. Ο μύκητας <i>Verticillium lecanii</i>	23

2. Υλικά και μέθοδοι.....	25
2.1. Προέλευση του μύκητα <i>V.lecanii</i>	25
2.2. Αναπαραγωγή του μύκητα <i>V.lecanii</i>	25
2.3. Το Sabouraud Dextrose Agar (SDA).....	26
2.4. Η προέλευση των ομόπτερων εντόμων.....	28
2.5. Βιοδοκιμή.....	29
3. Αποτελέσματα.....	33
4. Συζήτηση.....	38
5. Βιβλιογραφία.....	39

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελετήθηκε η εντομοπαθογόνος δράση τριών απομονώσεων του μύκητα *Verticillium lecanii* (Zimmermann) Viegas (Moniliales) εναντίον των κοκκοειδών *Ceroplastes rusci* L. (Hemiptera, Homoptera, Coccidae) και *Marchalina hellenica* (Gennadius) (Hemiptera, Homoptera, Margarodidae) και των αφίδων *Aphis fabae* Scopoli και *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera, Homoptera: Aphididae). Δοκιμάστηκαν φυλές του μύκητα που απομονώθηκαν σε τρεις περιοχές της Πολωνίας από δύο κοκκοειδή του γένους *Parthenolecanium* (Coccidae): συγκεκριμένα η φυλή 3734c που απομονώθηκε από το *Parthenolecanium* (=Lecanium) *corni* (Bouché) στην περιοχή Nidzica, η φυλή 3762a που απομονώθηκε από το *Parthenolecanium* (=Lecanium) *fletcheri* (Cockerell) στην περιοχή Piszkowice και η φυλή 3762b που απομονώθηκε επίσης από το *P. fletcheri* στην περιοχή Belzice. Κάθε απομόνωση του μύκητα αναπαράχθηκε σε SDA (Sabouraud Dextrose Agar) και διάλυμα κονιδίων του [(128-172) x 10⁶ κονίδια *V. lecanii* / ml] ψεκάστηκε σε νύμφες και ακμαία των *C. rusci*, *M. hellenica*, *A. fabae* και *M. persicae* σε συνθήκες εργαστηρίου (25°C, σχετική υγρασία >90%, φωτοπερίοδος 16 ωρών). Σε όλες τις δοκιμές παρατηρήθηκε θνησιμότητα στις νύμφες και τα ακμαία των ομοπτέρων. Μόνον όμως κατά την εφαρμογή της απομόνωσης 3762b στις νύμφες και τα ακμαία των κοκκοειδών *C. rusci* και *M. hellenica* προκλήθηκε 100% θνησιμότητα, η οποία ακολουθήθηκε από ανάπτυξη μυκηλίου και παραγωγή κονιδίων του *V. lecanii*. Η περαιτέρω εφαρμογή της απομόνωσης 3762b σε συνθήκες υπαίθρου αντιμετωπίζει το πρόβλημα ότι το *V. lecanii* απαιτεί υψηλή σχετική υγρασία για να αναπτυχθεί. Επί πλέον πριν από οποιαδήποτε εφαρμογή στη φύση πρέπει να αξιολογηθεί η δράση της συγκεκριμένης απομόνωσης του μύκητα *V. lecanii* στα ωφέλιμα έντομα ή τα έντομα μή-στόχους.

Λέξεις κλειδιά: *Verticillium lecanii*, *Aphis fabae*, *Myzus persicae*, *Marchalina hellenica*, *Ceroplastes rusci*, Hemiptera, Homoptera, Margarodidae, Coccidae, Aphididae

ABSTRACT

The entomopathogenic activity of three isolates of the fungi *Verticillium lecanii* was considered against coccoids *Ceroplastes rusci* L. (Homoptera, Homoptera: Margaroidae) and aphids *Aphis fabae* Scopoli and *Myzus persicae* (Homoptera, Homoptera: Aphididae)

Strains of the fungi, were tested, which were isolated in three locations of Poland, from two coccoids of species *Parthenolecanium* (Coccidae): In particular, the strain 3734c, which was isolated from *Parthenolecanium* (= *Lecanium*) *corni* (Bouché) to the area Nidzica, the strain 3762 a, which was isolated from *Parthenolecanium* (= *Lecanium*) *fletcheri* (Cockerell) to the area Piszkowice and the race 3762 b, which was isolated also, from *P. fletcheri* to the area Belzce. Every isolation of the fungi, was reproduced in SDA (Sabouraud Dextrose Agar) and a solution of his conidia [(128 – 172) x 10⁶ conidia of *Verticillium lecanii* / ml] was sprayed to nymphs and adults of *C. rusci*, *M. hellenica*, *A. fabae* and *M. persicae*, in laboratory conditions (25°C, relative humidity > 90%, photoperiod 16 hours). In all measures, the mortality of the nymphs and adults of the homopterous pests was recorded. Only after the application of isolation 3762b to pupas and adults of coccoids *C. rusci* and *M. hellenica*, was recorded 100% mortality, and development of mycelium and production of conidia of *V. lecanii* were observed. The further application of isolation 3762 b in field conditions, is encountering the situation that *V. lecanii* requires high relative humidity to develop further. In addition, before any application in nature, must be tested the activity of the specific isolation of *V. lecanii* to beneficial insects or insects – non targets.

1. Εισαγωγή

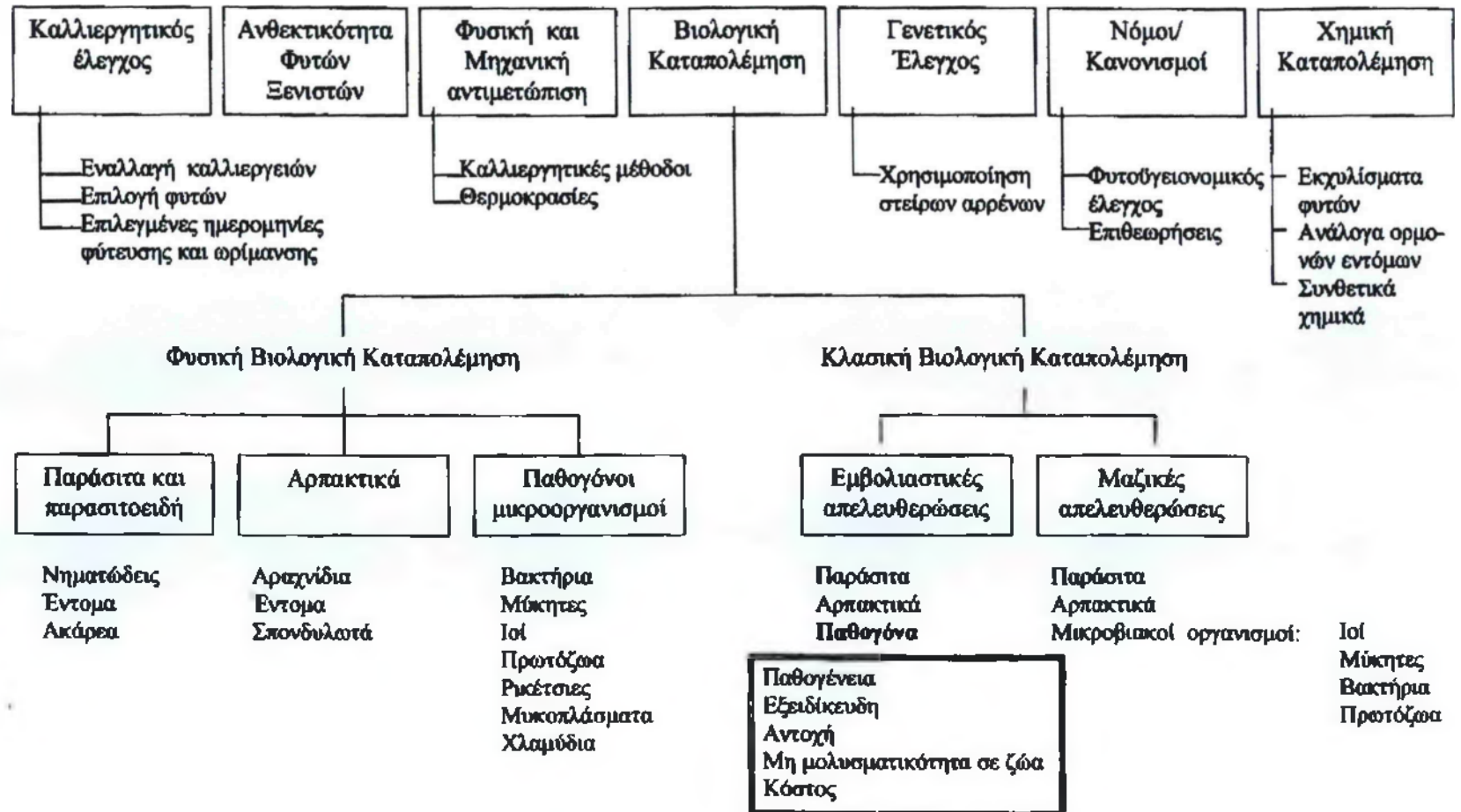
1.1. Γενικά

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 μέθοδος καταπολέμησης εχθρών που χρησιμοποιείται πλέον στη φυτοπροστασία ονομάζεται **Ολοκληρωμένη Αντιμετώπιση Εχθρών (Integrated pest management IPM)** (Εικόνα 1.2.1.) και βασίζεται κυρίως στη Βιολογική Αντιμετώπιση (ή Βιολογική Καταπολέμηση).

1.2. Η Ολοκληρωμένη Αντιμετώπιση

Η ολοκληρωμένη αντιμετώπιση των εχθρών των καλλιεργειών (Integrated Pest Management – IPM), σύμφωνα με τους Smith and Reynolds (1966), είναι ένα σύστημα αντιμετώπισης εχθρών, στα πλαίσια κάποιων συγκεκριμένων περιβαλλοντολογικών συνθηκών και της δυναμικής πληθυσμών του εχθρού το οποίο χρησιμοποιεί όλες τις κατάλληλες μεθόδους και τεχνικές κατά τον πλέον εναρμονιζόμενο τρόπο και επιτυγχάνει τη διατήρηση του πληθυσμού του εχθρού κάτω από αυτόν που δύναται να προξενήσει οικονομική ζημία στην καλλιέργεια (Λυκουρέσης, 1995). Είναι δηλαδή, μια οικολογικά βασισμένη στρατηγική αντιμετώπισης εχθρών των καλλιεργειών που στηρίζεται κυρίως σε φυσικούς παράγοντες θνησιμότητας όπως είναι οι φυσικοί εχθροί και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες και αναζητεί να εφαρμόζει τακτικές οι οποίες να μην διαταράσσουν ή να διαταράσσουν όσο γίνεται λιγότερο αυτούς τους παράγοντες.

Ολοκληρωμένη Αντιμετώπιση Εχθρών



Εικόνα 1.2.1. Η Ολοκληρωμένη Αντιμετώπιση Εχθρών

1.3. Η Βιολογική Αντιμετώπιση

Η Βιολογική Αντιμετώπιση (ή Βιολογική Καταπολέμηση) ορίζεται ως η δράση των φυσικών εχθρών των επιβλαβών εντόμων (**παρασιτοειδή, αρπακτικά, παθογόνα**) (Κατσόγιαννος 1992, Λυκουρέσης 1995). Διακρίνεται σε **Φυσική Βιολογική Καταπολέμηση** (δράση των φυσικών εχθρών χωρίς παρέμβαση του ανθρώπου) και σε **Εφαρμοσμένη Βιολογική Καταπολέμηση** (δράση των φυσικών εχθρών μετά την ενεργό παρέμβαση του ανθρώπου). Η Εφαρμοσμένη Βιολογική Καταπολέμηση διακρίνεται σε **Διαχείριση πληθυσμών** (εκτροφή, πολλαπλασιασμός και εξαπόλυση **ιθαγενών** φυσικών εχθρών) και σε **Κλασική Βιολογική Καταπολέμηση** (εισαγωγή και διαχείριση πληθυσμών **εξωτικών** φυσικών εχθρών και χρήση **μικροβιακών** σκευασμάτων) (Εικόνα 1.3.1.) (Κατσόγιαννος 1992, Katsoyannos 1996, Κοντοδήμας και Ανάγνου 2003).



Εικόνα 1.3.1. Η Βιολογική Αντιμετώπιση (ή Βιολογική Καταπολέμηση)

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

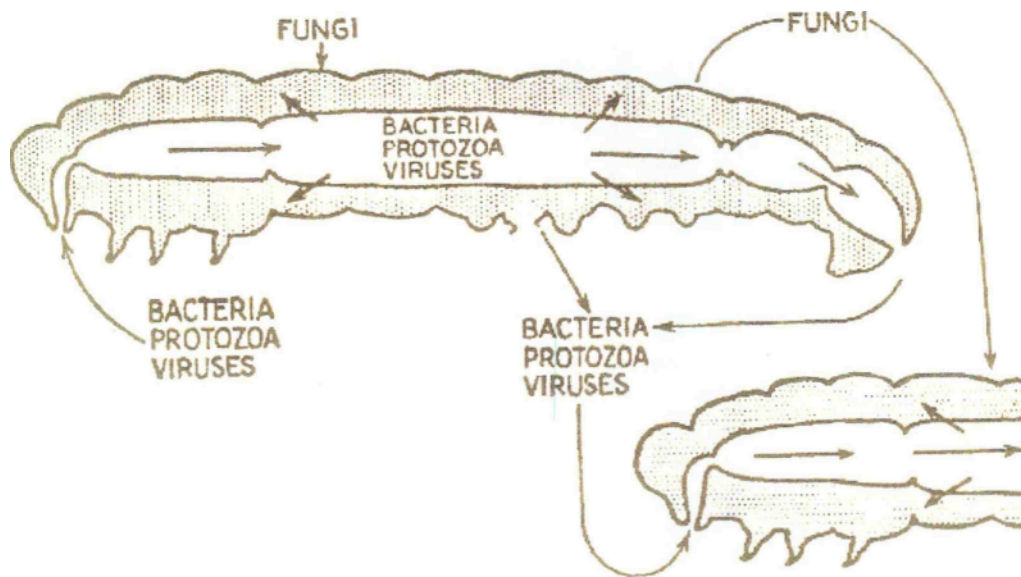
Παρασιτοειδές είναι ένα έντομο που παρασιτεί πάνω ή μέσα σε ένα άλλο έντομο. Είναι συνήθως του ίδιου μεγέθους με τον ξενιστή του, τον οποίο τελικά σκοτώνει.

Αρπακτικό είναι ένας οργανισμός ελεύθερης διαβίωσης, συνήθως μεγαλύτερου μεγέθους από τη λεία του, από την οποία απαιτείται να καταναλώσει περισσότερα του ενός άτομα για να ολοκληρώσει την ανάπτυξή του.

Παθογόνο είναι μικροοργανισμός, που δεν ανήκει στο ζωικό βασίλειο και προκαλεί την εκδήλωση παθολογικών συμπτωμάτων (ασθενειών) στα έντομα – ξενιστές

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, είτε διαπερνώντας, είτε όχι 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. Οι μύκητες απλά μεταφέρονται σε άλλον ξενιστή (Steinhaus, 1949). Στο παρακάτω σχεδιάγραμμα (εικόνα 1.3.1.1.) απεικονίζονται τρόπος εισόδου διαφόρων παθογόνων σε ένα έντομο.



Εικόνα 1.3.1.1. Τρόπος εισόδου διαφόρων παθογόνων σε ένα έντομο.

1.3.2. Παράγωγα μυκήτων – μυκοτοξίνες

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, 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 σε έντομα που τρέφονται από αυτά (Smith et al., 1994).

Αν και τα έντομα είναι πιθανόν η μόνη ομάδα μικροοργανισμών 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).

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).

1.3.3. Εντομοπαθογόνοι ιοί

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

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 πολυέδρα μέσα στα κύτταρα των ιστών που προσβάλλουν. (Steinhaus,1949).

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

Μεταχρωματισμοί, λύσεις ιστών, δημιουργία κηλίδων, ακόμα και αποσύνθεση ολόκληρου σώματος του εντόμου είναι τα συνήθη σημεία που

εμφανίζονται, ανάλογα φυσικά με το είδος του Ιού και του εντόμου (Lacey and Brooks, 1997).

1.3.4. Εντομοπαθογόνα βακτήρια

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

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

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

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 γκριζες, ενώ αυτές που γίνονται σκούρες καφέ. Στις περισσότερες άλλες των βακτηριακών μολύνσεων ο ξενιστής γίνεται καφέ – μαύρος, χρώμα χαρακτηριστικό της βακτηριακής αποσύνθεσης (Poinar and Thomas, 1978).

1.3.5. Εντομοπαθογόνοι νηματώδεις

Οι νηματώδεις τυπικά δεν είναι μικροβιακά στοιχεία, είναι κυλινδρικοί πολύκυτταροι σκώληκες. Όντας σχεδόν μικροσκοπικοί σε μέγεθος χρησιμοποιούνται όπως τα υπόλοιπα μικροβιακά εντομοκτόνα. Οι νηματώδεις είναι η μεγαλύτερη ζωική μονάδα. Τα περισσότερα είδη δεν παρουσιάζουν κανένα απολύτως ενδιαφέρον. Ο βιολογικός κύκλος των εντομοπαθογόνων νηματωδών είναι σε γενικές γραμμές ίδιος με κάθε άλλης ομάδας νηματωδών.

Η συμβίωση εντόμων και νηματωδών δεν είναι πάντα θανατηφόρος 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).

Οι νηματώδεις μπορούν να δράσουν ως παράσιτα σε οποιοδήποτε ή και σε όλα τα στάδια του βιολογικού τους κύκλου, ενώ κάποιοι νηματώδεις εμφανίζονται ως παράσιτα για μια γενιά και στις επόμενες γενιές ζουν ελεύθεροι.

Κατατρώγοντας το εσωτερικό του εντόμου, προκαλούν μουμιοποίηση. Τα έντομα που παρασιτούνται από είδη των *Steinernematidae* και *Heterorhabditidae* αποκτούν κόκκινο, πορτοκαλί ή γαλακτόχρωμο μεταχρωματισμό ο οποίος οφείλεται στην παρουσία και την δράση των συμβιούντων βακτηρίων (*Enterobacteriaceae*) (Lacey and Brooks, 1997). Τα είδη των πιο πάνω οικογενειών καταφέρνουν, εξαιτίας της συμβίωσης αυτής, να θανατώνουν πιο γρήγορα τους ξενιστές τους.

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, 1963).

1.3.6. Εντομοπαθογόνα πρωτόζωα

Όσα είδη παρουσιάζουν πρακτικό ενδιαφέρον για καταπολέμηση εντόμων έχουν κατά την ζωή τους ένα ανθεκτικό στάδιο, εκείνο της σπορίωσης. Στις πλείστες περιπτώσεις το στάδιο αυτό είναι και το μολυσματικό. Το έντομο μολύνεται κατά κανόνα καταλίνοντας τα πρωτόζωα, ορισμένα όμως είδη πρωτόζωων μπορεί να μεταδοθούν από την μητέρα έντομο στα τέκνα δια του ωαρίου. Λιγότερο συχνή, αλλά όχι σπάνια, είναι η είσοδος του πρωτοζώου από σπέρμα οπότε παρασιτικών υμενοπτέρων. Οι κυρίως προσβαλλόμενοι ιστοί και όργανα είναι το λιπόσωμα, οι σωλήνες Malpighi και το εντερικό επιθήλιο. Η προσβολή καταλήγει σε κυττόλυση. Επειδή ορισμένα εντομοπαθογόνα είδη είναι ταξινομικός κοντά σε παθογόνα σπονδυλωτών, χρειάζεται μεγάλη προσοχή πριν ένα είδος διασπαρεί στον αγρό.

Μειονεκτήματα που περιορίζουν την πρακτική χρησιμότητα των πρωτοζώων είναι η ευπάθεια τους στο υπεριώδες φως, αλλά προπαντός η μικρή τους εντομοπαθογόνος δύναμη και η μάλλον αργή δράση τους. Επίσης η

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

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).

1.3.7. Εντομοπαθογόνες ρικέτσιες

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

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

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

1.4. Οι μύκητες ως εντομοπαθογόνοι μικροοργανισμοί

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

Στη μειωμένη αξιοποίησή τους, συμβάλλουν και οι τοξίνες που παράγουν αυτά τα παθογόνα και που μπορεί να είναι επιβλαβείς για τον άνθρωπο και τα ζώα. Επιπλέον, μερικοί μύκητες είναι πολύ απαιτητικοί ως προς την καλλιέργειά τους και παρουσιάζουν δυσκολίες για τη μαζική παραγωγή τους, ενώ όσοι είναι εύκολο να καλλιεργηθούν, εμφανίζουν εξασθένηση ύστερα από μακροχρόνια παραγωγή σε τεχνητά μέσα.

1.4.1. Τρόπος δράσης των μυκήτων

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

Η εισχώρηση του μύκητα στα έντομα δεν γίνεται μόνο δια της στοματικής οδού, αλλά πραγματοποιείται και από την επιδερμίδα σε οποιοδήποτε μέρος του σώματος, αρκεί το σπόριο του μύκητα να βρει την κατάλληλη υγρασία για να βλαστήσει. Συχνά οι μύκητες εξαρτώνται πολύ από το περιβάλλον, κυρίως όσον αφορά τα αρχικά στάδια μόλυνσης. Έτσι, οι πιο σημαντικοί παράγοντες που παίζουν ρόλο στην εκδήλωση ασθένειας από τα παθογόνα αυτά, είναι η θερμοκρασία και η υγρασία. Η σχετική υγρασία περιβάλλοντος στις περισσότερες περιπτώσεις θα πρέπει να είναι πολύ αυξημένη, δηλαδή, μεγαλύτερη από 85-90%, ώστε να επιτυγχάνεται αποτελεσματική δράση των εντομοπαθογόνων μυκήτων.

Από τα διάφορα είδη εντόμων, τα πιο ευπαθή σε μυκητολογικές μολύνσεις, είναι τα Λεπιδόπτερα (προνύμφες), από τα Ημίπτερα (και ειδικότερα από τα Homoptera) οι αφίδες, είδη που ανήκουν στις Οικογένειες Cicadidae και Coccidae, από τα Υμενόπτερα τα Vespoidea, από τα Κολεόπτερα είδη της οικογένειας Scarabeidae και από τα Δίπτερα είδη του γένους Hylemyia και τα κουνούπια.

Όταν ένα έντομο προσβληθεί από ένα μύκητα παθογόνο, ο μύκητας αυτός διαπερνά την επιδερμίδα και αναπτύσσει σιγά-σιγά στο εσωτερικό του εντόμου το μυκήλιό του, κατακλύζοντας έτσι όλους τους ιστούς και με τις τοξίνες που παράγει, έχει σαν αποτέλεσμα τη θανάτωση του ξενιστού του. Στη συνέχεια ο μύκητας εμφανίζεται εξωτερικά με μυκήλιο και επανθήσεις 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 Jr. Thomas, 1977).

Πίνακας 1. Οι τάξεις των μυκήτων που προκαλούν ασθένεια στα έντομα

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΜΥΚΗΤΩΝ	ΤΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΕΙΔΗ ΜΥΚΗΤΩΝ
Α. ΦΥΚΟΜΥΚΗΤΕΣ	<p>Entomophthorales -<i>Entomophthora</i> (<i>E. thaxteriana</i>) (παθογόνο αφίδων) -<i>Massospora</i> (<i>M. Cicadina</i>)</p> <p>Blastocladales -<i>Coelomomyces</i> (<i>C. stegomyidae</i>, <i>C. tasmaniensis</i>)</p>
Β. ΑΣΚΟΜΥΚΗΤΕΣ	<p>Ascosphaerales -<i>Bettisia</i> -<i>Ascophaera</i> (παθογόνα μελισσών) (<i>A. apis</i>)</p> <p>Myriangiales -<i>Myriangium</i> (παθογόνα Coccoidea)</p> <p>Sphaeriales -<i>Cordyceps</i> -<i>Torrubiella</i> (Δεν έχει μελετηθεί επαρκώς) -<i>Hypocrella</i> (Δεν έχει μελετηθεί επαρκώς)</p>
Γ. ΑΤΕΛΕΙΣ ΜΥΚΗΤΕΣ	<p>Moniliales -<i>Beauveria</i> (<i>B. bassiana</i>) (παθογόνω πολλών ειδών εντόμων), (<i>B. tenella</i>) (παθογόνο του <i>Melolontha melolontha</i>) -<i>Metarrhizium</i> (<i>M. anisopliade</i>) (παθογόνο του <i>Anisopliade austriaca</i>, Scarabeidae) -<i>Nomuraea</i> (= <i>Spicaria</i>) (<i>N. rileyi</i>) (παθογόνο του <i>Trichoplusia ni</i>) -<i>Paecilomyces</i> -<i>Hirsutella</i> (<i>H. thompsonii</i>) (παθογόνο του ακάρεως <i>Phyllocoptruta oleivora</i>)</p> <p>Sphaeropsidales -<i>Aschersonia</i> (<i>A. aleurodis</i>) (παθογόνο των Aleurodidae)</p>

1.4.2. Εμπορικά μικροβιακά σκευάσματα με βάση μύκητες

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

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

Πολλά από αυτά τα παρασκευάσματα που περιέχουν μύκητες, έχουν χρησιμοποιηθεί στην πράξη με πολύ καλά αποτελέσματα σε διάφορες καλλιέργειες, ακόμη και για την καταπολέμηση εντόμων υγειονομικής σημασίας. Έτσι, εκτός από το MYCOTAL, αποτελεσματικό εναντίων πολλών αφίδων είναι το VERTALEC με βάση το *V. Lecanii*, ενώ για την καταπολέμηση του βοτρυτή στον φυτοπαθολογικό τομέα υπάρχει το βιολογικό σκεύασμα TRICHODEX που περιέχει σπόρια του μύκητα *Trichoderma harzianum* (φυλή T39). Τα τρία αυτά βιολογικά προϊόντα, κυκλοφορούν σήμερα με ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Αν και η βιομηχανική παραγωγή σκευασμάτων με εντομοπαθογόνους μύκητες είναι φτωχή, η παραγωγή από κρατικούς φορείς και Ερευνητικά

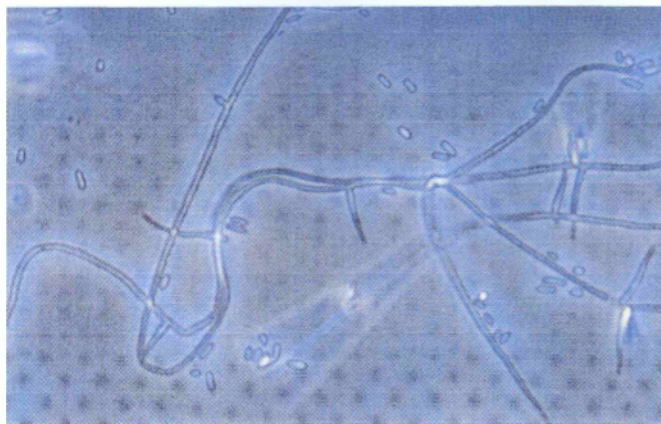
Ιδρύματα, διαφόρων μυκητολογικών σκευασμάτων για χρήση σε περιορισμένη έκταση, είναι αρκετά πιο σημαντική, καθώς οι μύκητες είναι ικανότατα παθογόνα για τη μείωση των πληθυσμών των επιβλαβών εντόμων καλλιεργειών και η χρησιμοποίησή τους στην πράξη έχει προχωρήσει σε ικανοποιητικό στάδιο.

1.4.3. Ο Μύκητας *Verticillium lecanii*

Ο Μύκητας *Verticillium lecanii* (Zimmermann) Viegas (Moniliales) εμφανίζεται ευρέως στη φύση. Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των αλευρωδών, θριπών, αφίδων και νηματωδών.

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

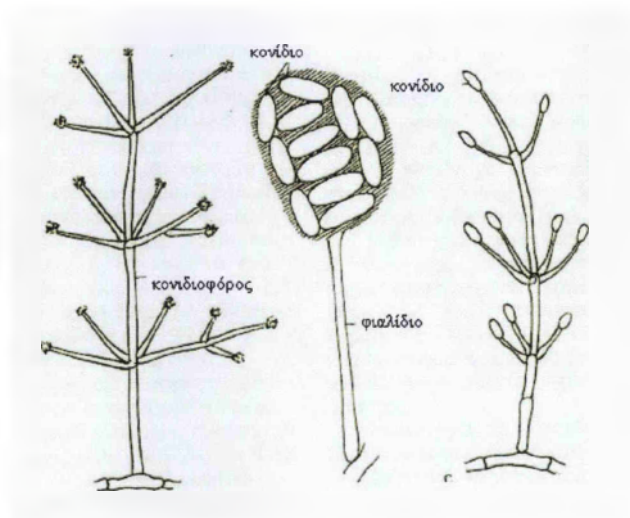
Ο μύκητας αυτός δεν έχει παρουσιάσει τοξικότητα σε θηλαστικά, και δεν είναι παθογόνο στα έντομα μη-στόχους. Δεν έχει παρουσιάσει δυσμενείς επιδράσεις στο περιβάλλον (Copping, 2001) .



Εικόνα 1.4.3.1. Ο Μύκητας *Verticillium lecanii* (Zimmermann) Viegas



Εικόνα 1.4.3.2. Προσβολή από *Verticillium lecanii* σε *Aphis gossypii* (Pinna, 1992).



Εικόνα 1.4.3.3. Ο μύκητας *Verticillium lecanii*

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Προέλευση του μύκητα *Verticillium lecanii*

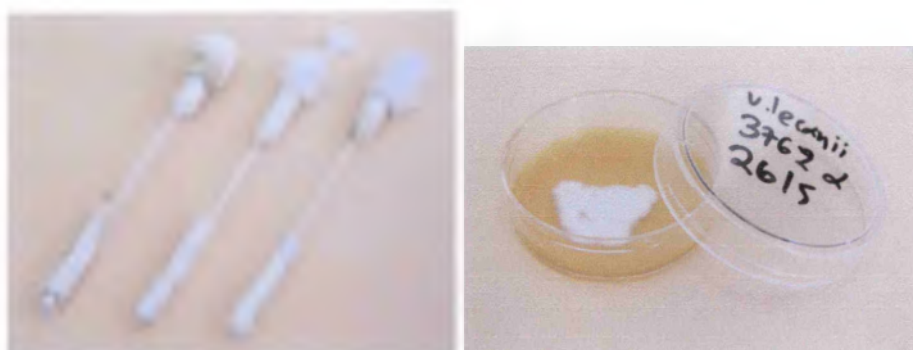
Δοκιμάστηκαν φυλές του μύκητα *Verticillium lecanii* που απομονώθηκαν σε τρεις περιοχές της Πολωνίας από δύο κοκκοειδή του γένους *Parthenolecanium* (Coccidae): συγκεκριμένα η φυλή 3734c που απομονώθηκε από το *Parthenolecanium* (=Lecanium) *corni* (Bouché) στην περιοχή Nidzica, η φυλή 3762a που απομονώθηκε από το *Parthenolecanium* (=Lecanium) *fletcheri* (Cockerell) στην περιοχή Piszkowice και η φυλή 3762b που απομονώθηκε επίσης από το *P. fletcheri* στην περιοχή Belzisce.

2.2. Αναπαραγωγή του μύκητα *Verticillium lecanii*

Κάθε απομόνωση του μύκητα *Verticillium lecanii* αναπαράχθηκε σε SDA (Sabouraud Dextrose Agar) υπό ασηπτικές συνθήκες (Εικ 2.2.1.).



Εικόνα 2.2.1. Η αναπαραγωγή του *Verticillium lecanii* έγινε επί Sabouraud Dextrose Agar (SDA) υπό ασηπτικές συνθήκες σε εστία νηματικής ροής



Εικόνα 2.2.2. Ανάπτυξη του *Verticillium lecanii* επί Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

2.3. Το Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

Η σύσταση και ο τρόπος παρασκευής του SDA περιγράφεται ακολούθως:

Το Bacto- Sabouraud Dextrose Agar, είναι μια τροποποίηση του άγαρ Dextrose που περιγράφηκε απ'τον Sabouraud. Συγκριτικά τεστ, έχουν δείξει ότι το Neoptone Difco, είναι η πιο πετυχημένη πηγή του αζώτου για την ανάπτυξη μυκήτων. Το Bacto- Sabouraud Dextrose Agar, προσαρμόστηκε εν μέρει για τη καλλιέργεια και τη ταυτοποίηση μυκήτων. Για την αρχική απομόνωση του μύκητα, από λέπια και επιστρώματα προτείνεται η προσθήκη 0,015/μονάδα tellurite καλίου ή 0,05/μονάδα επιφανειακού χαλκού σ' αυτό το μέσο, για να ενισχύσει την ανάπτυξη των βακτηρίων. Οι Emmons και Ashburn, χρησιμοποίησαν ένα Sabouraud Dextrose Agar, προετοιμασμένο με Neoptone για την ανάπτυξη του *Trichophyton gypseum*. Οι Robinson και Kotcher, χρησιμοποίησαν το Sabouraud Dextrose Agar, το οποίο περιείχε 20 μονάδες πενικιλίνη και 40 μονάδες υδροχλωρική διυδροστρεπτομυκίνη / ml του μέσου για την απομόνωση του *Histoplasma* από σκυλιά. Οι Serowy και Jung χρησιμοποίησαν το Bacto-Sabouraud-Dextrose-Agar για καλλιέργεια του *Microspora* κι άλλων παθογόνων μυκήτων. Η προσθήκη αντιβιοτικών για την απομόνωση των παθογόνων μυκήτων, έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα

αποτελεσματική. Γενικά, 20 μονάδες πενικιλίνη και 40 μικρογραμμάρια στρεπτομυκίνη ή διυδροστρεπτομυκίνη/ ml του μέσου, προστίθενται στο αποστειρωμένο και λιωμένο μέσο στους 45 – 50 βαθμούς Κελσίου, υπό ασηπτικές συνθήκες. Αυτές οι επιθυμητές συγκεντρώσεις της πενικιλίνης μπορούν εύκολα να παρασκευασθούν διαλύοντας τα περιεχόμενα ενός φιαλιδίου πενικιλίνης που περιέχει 100.000 μονάδες πενικιλίνης σε 10 ml αποστειρωμένου νερού. Δύο (2) ml αυτού του διαλύματος, προστίθενται σε 1 lt αποστειρωμένου μέσου, στους 45 – 50 βαθμούς Κελσίου, υπό ασηπτικές συνθήκες (0,2 ml / 100 ml του μέσου). Για να παρασκευασθούν οι επιθυμητές συγκεντρώσεις στρεπτομυκίνης στο ίδιο μέσο, διαλύονται 1.000.000 μικρογραμμάρια στρεπτομυκίνης σε 10 ml αποστειρωμένου νερού. Ένα (1) ml αυτού του διαλύματος προστίθεται σε 9 ml αποσταγμένου νερού, για να δώσει ένα διάλυμα, τ' οποίο να περιέχει 10.000 micrograms στρεπτομυκίνης / ml. Στο κάθε λίτρο του μέσου, προστίθενται 4 ml αυτού του διαλύματος για να παρατηρηθούν 40 micrograms / ml. (0,4 ml για 100 ml μέσου). Για να ενυδατωθεί ξανά το μέσο, προστίθενται 65 gr απ' το Bacto – Sabouraud Dextrose Agar σε 1000 ml κρύου αποστειρωμένου νερού και θερμαίνονται με βράσιμο για να διαλυθεί το μέσο εντελώς. Έπειτα διανέμεται στα σωληνάκια στα μπουκαλάκια κι αποστειρώνεται στο κλίβανο για 15 λεπτά σε 15% πίεση (121 βαθμούς Κελσίου). Η τελική αντίδραση του μέσου είναι: PH 5,6.

2.4. Η προέλευση των ομοπτέρων εντόμων

Τα ακμαία του *Marcallina hellenica* ελήφθησαν από τη φύση από προσβεβλημένα πεύκα κατά τους μήνες Απρίλιο – Μάιο (Εικόνα 2.4.1.). Οι αφίδες *Aphis fabae* και *Myzus persicae* ελήφθησαν από τις εργαστηριακές εκτροφές του Μπενακειού Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (Εικόνα 2.4.3.). Οι νύμφες και τα ακμαία του *Ceroplastes rusci* ελήφθησαν από τη φύση από προσβεβλημένα εσπεριδοειδή τους μήνες Ιούνιο – Σεπτέμβριο (Εικόνα 2.4.2.).



Εικόνα 2.4.1. Ακμαία του εντόμου *Marchalina hellenica* στα πεύκα.



Εικόνα 2.4.2. Ακμαία του εντόμου *Ceroplastes . rusci L.* σε κλάδους εσπεριδοειδών.

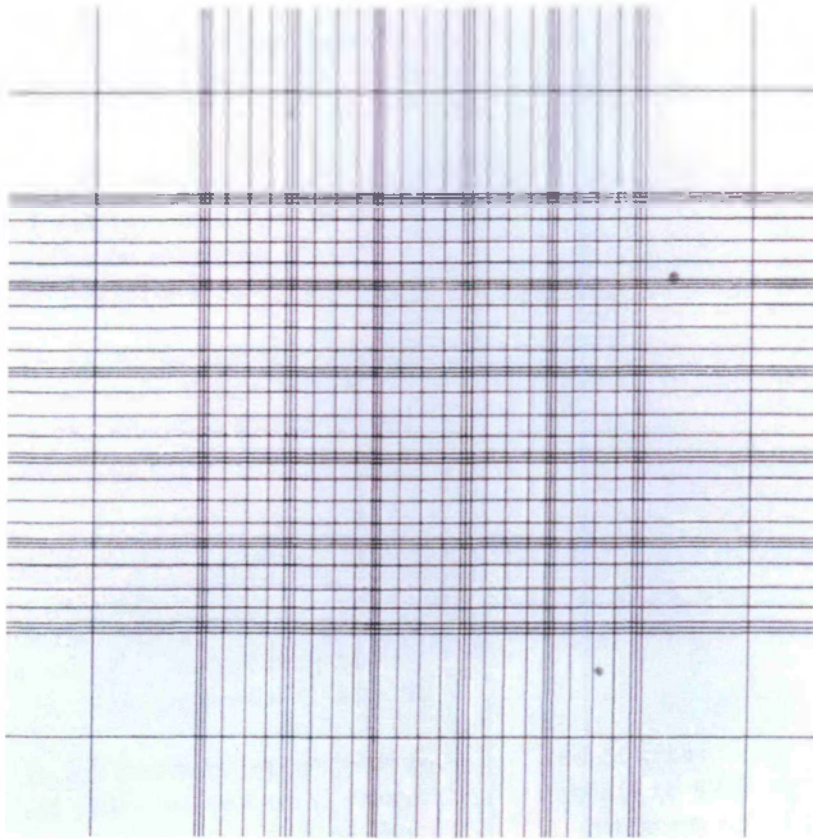


Εικόνα 2.4.3. Ανάπτυξη και εκτροφή των αφίδων *Aphis fabae* και *Myzus persicae*

2.5. Βιοδοκιμή

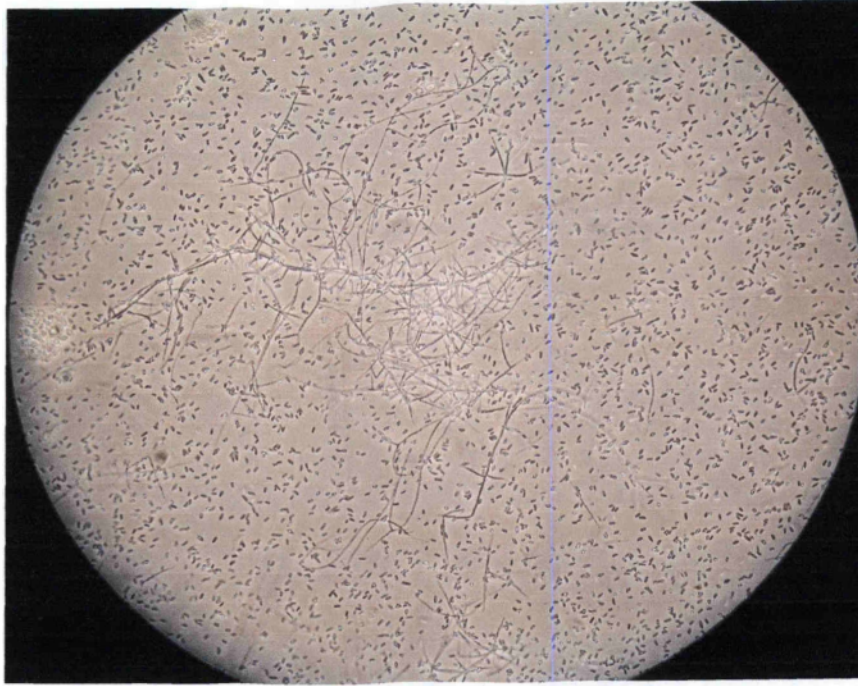
Για την αξιολόγηση της εντομοπαθογόνου δράσεως του μύκητα *Verticillium lecanii*, διάλυμα κονιδίων του [(128-172) x 10⁶ κονίδια *V. lecanii* / ml] ψεκάστηκε σε νύμφες και ακμαία των *C. rusci*, *M. hellenica*, *A. fabae* και *M. persicae* σε συνθήκες εργαστηρίου (25°C, σχετική υγρασία >90%, φωτοπερίοδος 16 ωρών).

Η μέτρηση της πυκνότητας του διαλύματος των κονιδίων του *V. lecanii* έγινε με ένα ειδικό όργανο, το αιματοκυτταρόμετρο, που είναι μια ειδικά σχεδιασμένη αντικειμενοφόρος. Στην αντικειμενοφόρο αυτή τοποθετήθηκε μια σταγόνα του διαλύματος, η οποία καλύφθηκε με καλυπτρίδα με τρόπο ώστε να αποφευχθούν φυσαλίδες του αέρα. Ο ειδικά σχεδιασμένος χώρος μέτρησης του αιματοκυτταρομέτρου είναι ένα τετράγωνο επιφάνειας 1mm², το οποίο περιέχει 25 μικρότερα τετράγωνα. Κάθε μικρό τετράγωνο περιέχει 16 μικρά τετραγωνίδια ή κελιά. Δηλ. το τετράγωνο επιφάνειας 1mm² περιέχει 400 τετραγωνίδια ή κελιά (Εικόνα 2.5.1.). Στη συνέχεια το αιματοκυτταρόμετρο τοποθετήθηκε στο μικροσκόπιο και καταμετρήθηκαν τα κονίδια του διαλύματος του *V. lecanii* που περιέχονταν σε μια τυχαία σειρά 10 κάθετων κελιών.

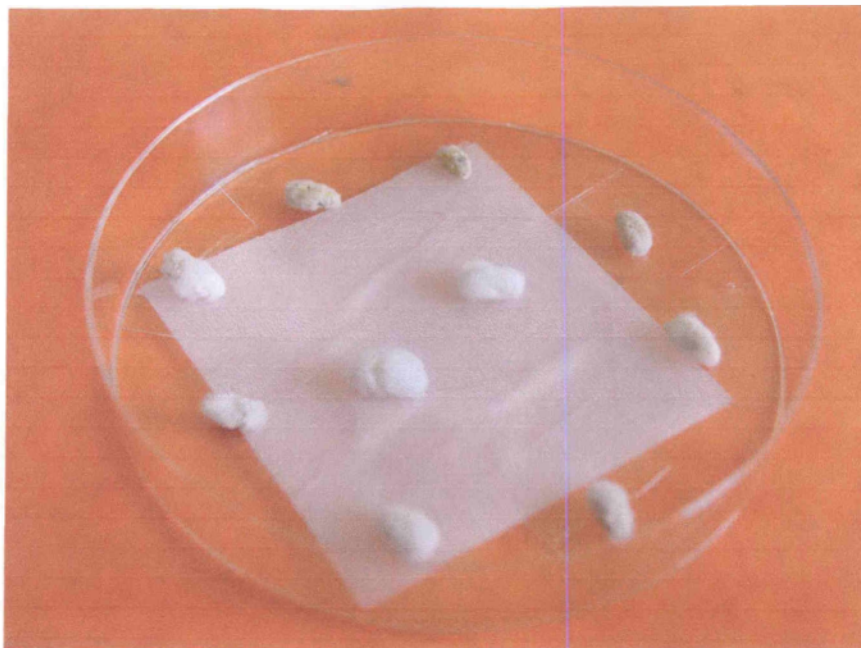


Εικόνα 2.5.1. Ο ειδικά σχεδιασμένος χώρος μέτρησης του αιματοκυτταρομέτρου, επιφάνειας 1mm^2 .

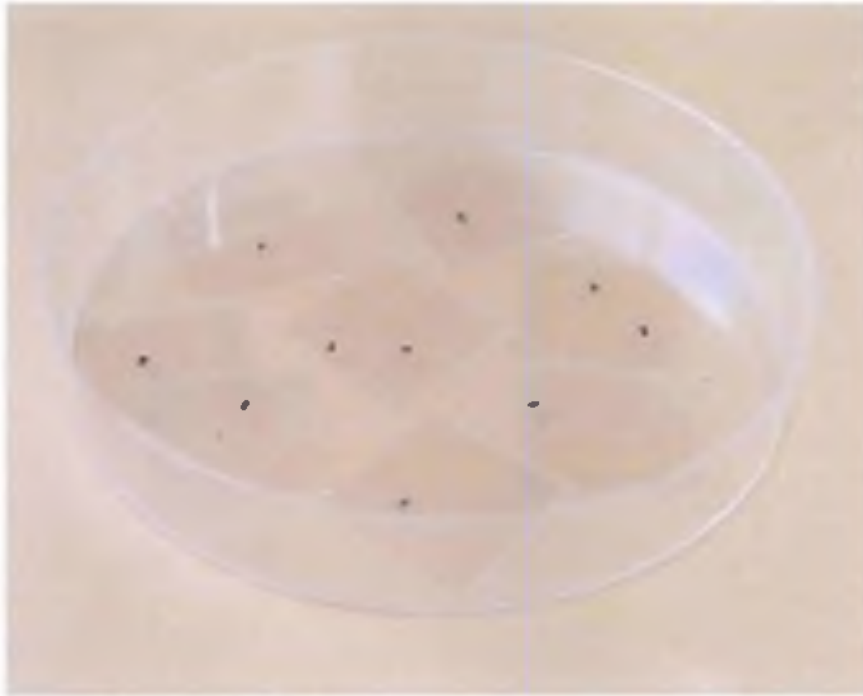
Εν συνεχεία εντός τρυβλίων Petri ψεκάστηκαν, με διάλυμα κονιδίων κάθε απομόνωσης του *V. lecanii*, 6 x 10 ακμαία *M. hellenica*, *A. fabae* και *M. persicae* (Εικόνα 2.5.4.). Ομοίως με διάλυμα κονιδίων κάθε απομόνωσης του *V. lecanii* ψεκάστηκαν 3 x 5 βλαστοί εσπεριδοειδών που έφεραν προσβολή (5-30 νύμφες και ακμαία *C. rusci*) (Εικόνα 2.5.5.). Αντίστοιχος αριθμός από τα παραπάνω ομόπτερα χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Έπειτα από επτά ημέρες από την επέμβαση εξετάστηκαν τα άτομα των εντόμων επί των οποίων είχε αναπτυχθεί μύκητας.



Εικόνα 2.5.2. Κονίδια και υφές του μύκητα *Verticillium lecanii*



Εικόνα 2.5.3. Ακμαία *Marchalina hellenica* σε τρυβλίο, όπου έγινε ψεκασμός με διάλυμα κονιδίων του μύκητα *V. lecanii*.



Εικόνα 2.5.4. Ακμαία της αφίδας *Aphis fabae* σε τρυβλίο.



Εικόνα 2.5.5. Ακμαία του εντόμου *Ceroplastis ruscii* L. σε κλωβό.

3. Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών παρουσιάζονται στον Πίνακα που ακολουθεί. Σε όλες τις δοκιμές παρατηρήθηκε θνησιμότητα στις νύμφες και τα ακμαία των ομοπτέρων. Αυτή κυμάνθηκε από 37-100% για το *C. rusci*, 43-100% για το *M. hellenica*, 23-45% για το *A. fabae* και 20-35% για το *M. persicae*. Επίσης σε όλες τις δοκιμές παρατηρήθηκε ανάπτυξη μυκηλίου έστω και σε λίγα άτομα των υπό δοκιμή ομοπτέρων. Ειδικά όμως κατά την εφαρμογή της απομόνωσης 3762b στις νύμφες και τα ακμαία των κοκκοειδών *C. rusci* και *M. hellenica* προκλήθηκε 100% θνησιμότητα, η οποία ακολουθήθηκε από ανάπτυξη μυκηλίου και παραγωγή κονιδίων του *V. lecanii*, σε όλα τα νεκρά άτομα.

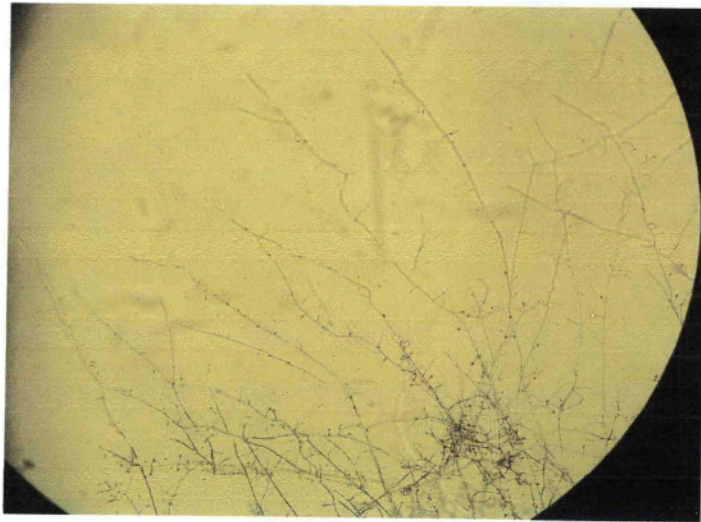
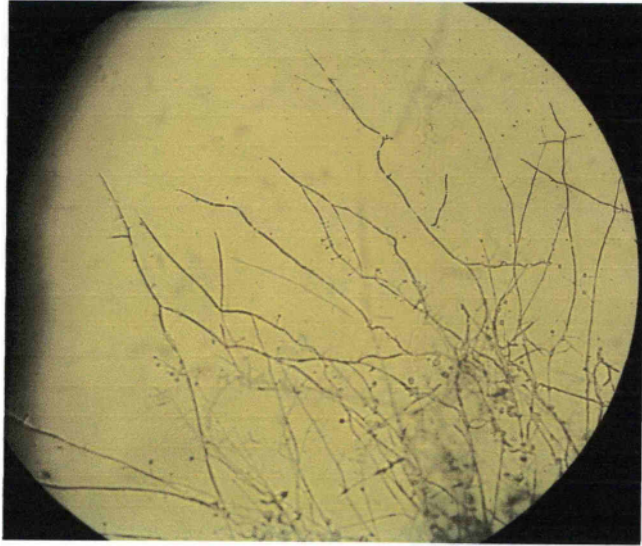
Ποσοστό ατόμων επί των οποίων αναπτύχθηκε ο μύκητας *Verticillium lecanii*

Απομόνωση <i>V. lecanii</i>	<i>C. rusci</i>		<i>M. hellenica</i>		<i>A. fabae</i>		<i>M. persicae</i>	
	Αριθμός κονιδίων <i>V. lecanii</i> (x10 ⁶ /ml)	% ανάπτυξη <i>V. lecanii</i>	Αριθμός κονιδίων <i>V. lecanii</i> (x10 ⁶ /ml)	% ανάπτυξη <i>V. lecanii</i>	Αριθμός κονιδίων <i>V. lecanii</i> (x10 ⁶ /ml)	% ανάπτυξη <i>V. lecanii</i>	Αριθμός κονιδίων <i>V. lecanii</i> (x10 ⁶ /ml)	% ανάπτυξη <i>V. lecanii</i>
3734c	136	36,7	156	43,3	128	45,0	160	31,7
3762a	144	55,0	172	60,0	144	38,3	152	35,0
3762b	128	100	168	100	160	23,3	148	20,0

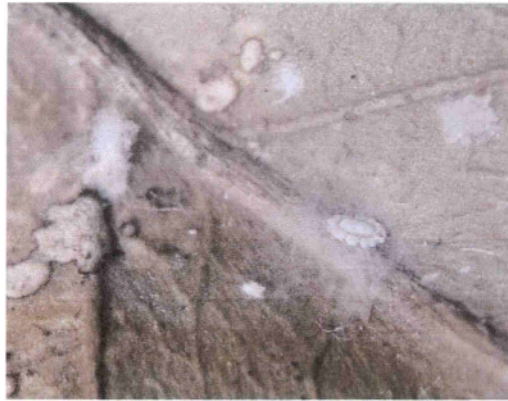
Στις εικόνες που ακολουθούν φαίνεται η ανάπτυξη του *V. lecanii* επί των *C. Rusci*, *M. hellenica* και *A. fabae*.



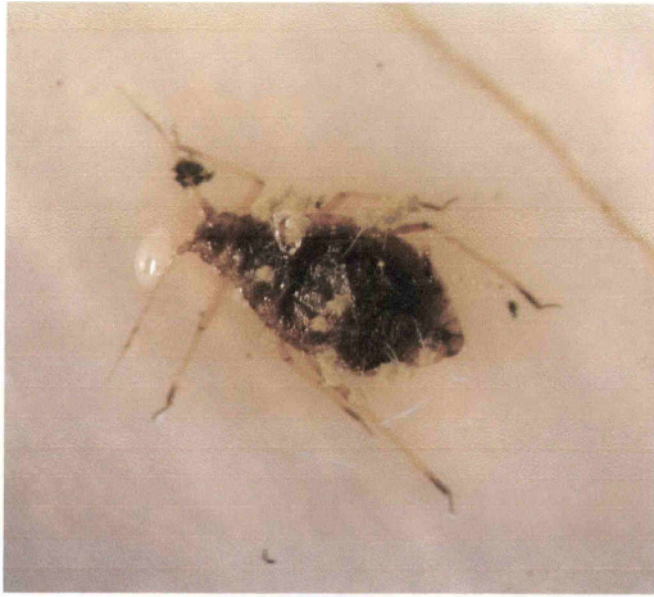
Εικόνα 3.1. Ανάπτυξη του μύκητα *V. lecanii* επί του εντόμου *Marchalina hellenica*.



Εικόνα 3.2. Υφές του μύκητα *V.lecanii* επί του εντόμου *Ceroplastes rusci* L.



Εικόνα 3.3. Ανάπτυξη του μύκητα *V.lecanii* επί του εντόμου *Ceroplastes rusci*
L.



Εικόνα 3.4. Ανάπτυξη του μύκητα *V.lecanii* επί της αφίδας *Aphis fabae*.

4. Συζήτηση

Σε όλες τις δοκιμές παρατηρήθηκε θνησιμότητα στις νύμφες και τα ακμαία των ομοπτέρων. Μόνον όμως κατά την εφαρμογή της απομόνωσης 3762b στις νύμφες και τα ακμαία των κοκκοειδών *C. rusci* και *M. hellenica* προκλήθηκε 100% θνησιμότητα, η οποία ακολουθήθηκε από ανάπτυξη μυκηλίου και παραγωγή κονιδίων του *V. lecanii*.

Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι οι απομονώσεις του *V. lecanii*, που δοκιμάστηκαν κατά την παρούσα μελέτη, προέρχονται από κοκκοειδές έντομο ως εκ τούτου αναμένεται να δρουν αποτελεσματικότερα επί ειδών της συγκεκριμένης υπερικογένειας.

Η περαιτέρω έρευνα επί της εντομοπαθογόνου δράσεως του *V. lecanii* επί των *C. rusci* και *M. hellenica*, *A. fabae* και *M. persicae*, θα πρέπει να βασιστεί στις απομονώσεις των κονιδίων που προέρχονται από μυκήλιο που αναπτύχθηκε πάνω στα συγκεκριμένα είδη, και της περαιτέρω ξεχωριστής καλλιέργειας αυτών σε SDA.

Η περαιτέρω εφαρμογή της απομόνωσης 3762b σε συνθήκες υπαίθρου αντιμετωπίζει το πρόβλημα ότι το *V. lecanii* απαιτεί υψηλή σχετική υγρασία για να αναπτυχθεί. Προς το σκοπό αυτό απαιτείται έρευνα για την ανάπτυξη ειδικών διαλυμάτων ή στερεών υποστρωμάτων που θα διευκολύνουν τη δράση του *V. lecanii* στις συνθήκες της χώρας μας.

Επί πλέον πριν από οποιαδήποτε εφαρμογή στη φύση πρέπει να αξιολογηθεί η δράση της συγκεκριμένης απομόνωσης του μύκητα *V. lecanii* στα ωφέλιμα έντομα ή τα έντομα μή-στόχους, καθώς στελέχη του συγκεκριμένου μύκητα έχουν βρεθεί να αναπτύσσονται και εναντίον ωφελίμων εντόμων (Balazy, προσωπική επικοινωνία).

Σκοπός της ανάπτυξης βιολογικών μεθόδων φυτοπροστασίας και γενικότερα ανάπτυξης συστημάτων βιολογικής και ολοκληρωμένης αντιμετώπισης εχθρών, είναι ο περιορισμός της χρήσης συνθετικών φυτοφαρμάκων, ώστε να εξασφαλίζεται η προστασία της υγείας του καταναλωτή. Η χρήση του εντομοπαθογόνου μύκητα *V. lecanii* (αλλά και άλλων εντομοπαθογόνων μυκήτων όπως οι *Beauveria bassiana*, *Metarrhizium anisopliade* κ.α) για την αντιμετώπιση εντομολογικών εχθρών συμβάλλει προς αυτή την κατεύθυνση. Η επιστημονική έρευνα καλείται να αποσαφηνίσει τις δυνατότητες, το φάσμα δράσεως και τις ιδιαιτερότητες που μπορεί να προκύψουν στις συνθήκες της χώρας μας.

5. Βιβλιογραφία

- Anagnou-Veroniki, M., Kontodimas, D.C., Adamopoulos, A.D., Tsimboukis, N.D. and Voulgaropoulou, A., 2003α.** Effects of two fungal based biopesticides on *Bactrocera (Dacus) oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae). *IOBC/WPRS Bulletin*, in press.
- Anagnou-Veroniki, M., Kontodimas, D.C., Chaleplidi, S., Georgiadou, A.G and Menti, H., 2003β.** Laboratory evaluation of microbial control products on the Mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae). *IOBC/WPRS Bulletin*, in press.
- Balazy, S 1993.** Fungi. Vol XXIV P 79, 102, 136, 176, 195
- Γιαμβριάς , Χ. 1991.** Σημειώσεις Γεωργικής εντομολογίας, Β' τεύχος. Εκδ: Γεωργικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, σελ: 1-19.
- Copping, L.G. 2001.** The biopesticide manual, Second edition. British crop protection council, U.K., p: XIIV-XIVII, 3-154, 161-163, 494-496.
- 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.
- Κατσόγιαννος, Π., 1992.** Η Βιολογική Καταπολέμηση. Σημειώσεις Εκπαιδευσεως Γεωπόνων, Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, Κηφισιά, 5 σελ.
- Katsoyannos, P., 1996.** Itegrated Insect Pest Management for Citrus in Nothern 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.
- Λυκουρέσης, 1995.** *Ολοκληρωμένη αντιμετώπιση εντόμων –εχθρών καλλιιεργειών.* Πανεπιστημιακές παραδόσεις. Γεωπονικό πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, 121 σελ.

- 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.
- Pinna, M., 1992.,** Impiego di *Verticillium lecanii* (Zimm) per il controllo biologico di *Aphis gossypii* (Glover) su cetriolo in coltura protetta. *Informatore Fitopatologico*, 10/1992: 56-58.
- Poinar Jr., G.O. and Thomas, G.M., 1978.** *Diagnostic manual for the identification of insect pathogens*. E.d.: Plenum Press, N.Y. and London, p: 1-151
- Smith, J.E., Lewis, CW., Anderson, J.G. and Solomons, G.L., 1994.** *Mycotoxins in human nutrition and health*. Ed: EUR 16048 En Directorate – General, p: VIII, 138-139.
- Steinhaus, E.A. 1949** *Principles of Insect Pathology*. Mc Graw-Hill Book Company, Inc., N.Y., U.S.A., p:166-177, 228-229, 318-319, 417-421, 633-637.
- Tanada, Y. 1993.** *Epizootiology of infectious diseases*, In: *Insect Pathology*, Ed: Steinhaus E, Academic press, Inc, USA., p: 461-468.
- Τζανακάκης, Μ.Ε. 1995.** *Εντομολογία*. University studio press, Θεσσαλονίκη, 385 σελ.
- Welch, H.E. 1963.** *Nematode Infections*. In: *Insect Pathology, An Advanced Treatise*, Volume 2, Ed: Steinhaus, E, Academic Press, London, p: 364-365.

Ηλεκτρονικές διευθύνσεις:

www.coogle.com

www.agrotypos.gr