

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ

Εντομοπαθογόνοι μύκητες ως ενδόφυτα για την αντιμετώπιση
εντομολογικών εχθρών

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
Κρεμμυδιώτης Δημήτριος

Αθήνα 2011

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ

Εντομοπαθογόνοι μύκητες ως ενδόφυτα για την αντιμετώπιση
εντομολογικών εχθρών

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
Κρεμμυδιώτης Δημήτριος

ΕΞΕΤΑΣΤΗΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ:

ΜΕΛΗ:

Αθήνα 2011

**Χαρά στην Πολιτεία που θα κυβερνηθεί απο ένα μυαλομένο,
γραμματισμένο και με καλές ιδέες τύραννο, συντροφεμένο
απο έναν άξιο και καλό νομοθέτη.**

(Πλάτωνος, Νόμοι)

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

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

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γεωργικής Εντομολογίας του τμήματος Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου.

Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που χωρίς την βοήθεια τους δεν θα ήταν εφικτή η ολοκλήρωση αυτής της μελέτης.

Ευχαριστώ ιδιαίτερος τον Δρ. Δημήτριο Κοντοδήμα, Εντομολόγο-Ερευνητή, για την συμβολή του σε όλο το φάσμα της μελέτης, την παροχή βιβλιογραφίας και φωτογραφικού υλικού καθώς και για την αγάπη που μου μετέδωσε για τα έντομα και την φυτοπροστασία με χρήση βιολογικών μεθόδων αντιμετώπισης όπως επίσης και για το παράδειγμα ήθους και εργασίας που αποτελεί για εμένα.

Ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή μου Δρ. Γεώργιο Σταθά και και τον Δρ. Αντώνιο Μιχαηλάκη για την ανάθεση , διόρθωση και εξέταση της πτυχιακής μου εργασίας καθώς και για όσα με δίδαξαν κατά την διάρκεια της φοίτησης μου στο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Καλαμάτας.

Επίσης την Περιβαλλοντολόγο-Εντομολόγο, φίλη μου, Δρ Μαρτίνο Αγγελική για τις συμβουλές της όσον αφορά την συγγραφή αυτής της μελέτης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 Γενικά - Ιστορική καταγραφή.....	8
1.2 Η ολοκληρωμένη παραγωγή - Ολοκληρωμένη Αντιμετώπιση - Βιολογική αντιμετώπιση.....	11
1.3 Φυσικοί εχθροί των επιβλαβών εντόμων.....	15
1.4 Οι μύκητες ως Εντομοπαθογόνοι μικροοργανισμοί.....	20
1.5 Η χρήση Εντομοπαθογόνων μυκήτων ως ενδόφυτα.....	23
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	24
2.1 Απομόνωση Εντομοπαθογόνων μυκήτων.....	24
2.2 Δημιουργία Ενδοφυτικής σθμβίωσης.....	29
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	34
3.1 Απομόνωση Εντομοπαθογόνων μυκήτων.....	34
3.2 Δημιουργία Ενδοφυτικής συμβίωσης.....	44
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	47

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο πλαίσιο σχετικού ερευνητικού προγράμματος διακρατικής συνεργασίας Ελλάδος – Πολωνίας (2007-2008), που χρηματοδοτήθηκε από τη ΓΓΕΤ, έγινε επισκόπηση για την ανεύρεση εντομοπαθογόνων μυκήτων σε διάφορα περιβάλλοντα στην Ελλάδα. Πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες νεκρών αρθροπόδων και δειγματοληψίες χώματος χρησιμοποιώντας γεωγραφικά πληροφοριακά συστήματα (GIS) και παγκόσμια συστήματα θέσης (GPS) ώστε να είναι δυνατός ο εντοπισμός του κάθε σημείου δειγματοληψίας και στο μέλλον.

Τα νεκρά αρθρόποδα που ανευρέθησαν τοποθετήθηκαν σε τρυβλία σε συνθήκες απόλυτης υγρασίας, ώστε να αναπτυχθούν τα μυκήλια των εντομοπαθογόνων μυκήτων. Στα δείγματα χώματος, για την εξακρίβωση της παρουσίας και την απομόνωση των εντομοπαθογόνων μυκήτων, εφαρμόστηκαν η δολωματική μέθοδος με χρήση του *Galleria mellonella* (*Galleria* bait method) και η χρησιμοποίηση ημικλεκτικών υποστρωμάτων ανάπτυξης. Από τις δειγματοληψίες νεκρών αρθροπόδων συνολικά απομονώθηκαν έξι είδη εντομοπαθογόνων μυκήτων και ένας υπερπαρασιτικός μύκητας. Βρέθηκαν δύο είδη της τάξης Entomophthorales (*Erynia conica* και *Pandora neoaphidis*) και τέσσερα είδη από την τάξη Hyphomycetales σε έντομα και άκαρεα. Το *Beauveria bassiana* βρέθηκε σε όλα τα οικοσυστήματα. Οι καταγραφές των *Erynia conica* σε Διπτερα, *Hirsutella thompsonii* στο *Abacarus hystrix* (Acari: Eriophyidae) και του *Lecanicillium* cf. *psalliotae* σε Collembola είναι νέες για την Ελλάδα.

Με την δολωματική μέθοδο και τη μέθοδο των ημικλεκτικών υποστρωμάτων ανάπτυξης διαπιστώθηκε η παρουσία στα υπό εξέταση εδάφη, των εντομοπαθογόνων μυκήτων *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces fumosoroseus* και *Conidiobolus* sp. Ο εντομοπαθογόνος μύκητας *B. bassiana* βρέθηκε και απομονώθηκε από όλα τα δείγματα και προσέβαλε σε ποσοστό 20% έως 86.2% τις προνύμφες του *Galleria mellonella* και επίσης ανάπτυξε 0.5 έως 6.1 CFUx 10³ / γραμμάριο εδάφους. Η υψηλότερη συγκέντρωση CFU (colony forming units) διαπιστώθηκε σε δείγματα που προέρχονταν από δασικές περιοχές. Ο εντομοπαθογόνος μύκητας *M. anisopliae* απομονώθηκε από 6 εξεταζόμενα δείγματα εδάφους και μόλυνε τις προνύμφες της *Galleria mellonella* σε ποσοστό

10.0% έως 71.4%. Η απομόνωση του μύκητα *M. anisopliae*, που εμφάνισε την μεγαλύτερη συγκέντρωση ($24.2 \text{ CFU} \times 10^3 \text{ g}^{-1}$) και προκάλεσε την μεγαλύτερη θνησιμότητα των προνυμφών αποκτήθηκε από δείγματα που προήλθαν από καλλιέργεια μπρόκολου, στον Μαραθώνα. Ο μύκητας *P. fumosoroseus* που απομονώθηκε κατά την διάρκεια της ερευνάς μας, για πρώτη φορά στην Ελλάδα, εμφανίστηκε μόνο σε 2 δείγματα τα οποία προέρχονταν από εδάφη βιολογικής καλλιέργειας και δασικού οικοσυστήματος.

Ακολούθως καλλιεργήσαμε τα κονίδια των μυκήτων *B. bassiana*, *M. anisopliae* και *P. fumosoroseus*, που απομακρύναμε από τις προνύμφες, σε υπόστρωμα S.D.A ή P.D.A με τη χρήση εστίας νηματικής ροής με σκοπό την παρασκευή ψεκαστικού διαλύματος του οποίου εφαρμογή έγινε σε φυτά σόργου. Στα ψεκασμένα φυτά σόργου διαπιστώθηκε σημαντική μείωση του μέσου μήκους των στοών αλλά και της επιβίωσης των προνυμφών της σεζάμιας εντός των στοών.

Προγραμματίζονται περαιτέρω παρατηρήσεις επί των φυτών αυτών ούτως ώστε να διαπιστωθεί ο αποικισμός από τους εντομοπαθογόνους μύκητες και τυχόν μεταβολή στο χρωματισμό των φύλλων και στη φωτοσυνθετική ικανότητα.

Από τα ευρήματα της παρούσας μελέτης αλλά και από την αντίστοιχη εμπειρία που καταγράφεται στη διεθνή βιβλιογραφία φαίνεται ότι οι εντομοπαθογόνοι μύκητες έχουν την ικανότητα να συνεισφέρουν στην αντιμετώπιση εχθρών, στο πλαίσιο της ολοκληρωμένης παραγωγής, και με την ιδιότητά τους ως ενδόφυτα.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Γενικά-Ιστορική καταγραφή

Σήμερα, η οικονομική κρίση επιβάλλει την ανάγκη αξιοποίησης κάθε δυνατού συγκριτικού πλεονεκτήματος για τη διατήρηση και αύξηση της ανταγωνιστικότητας των παραγόμενων στη χώρα μας αγροτικών προϊόντων. Η εντατικοποίηση των καλλιεργειών έχει οδηγήσει στην αύξηση της χρήσης των γεωργικών φαρμάκων. Αυτό έχει ως συνέπεια προβλήματα ρύπανσης του περιβάλλοντος αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις και την παρουσία υπολειμμάτων στο τελικό προϊόν. Τόσο η διεθνής όσο και η ευρωπαϊκή τάση σήμερα είναι να μειωθεί η χρήση γεωργικών φαρμάκων τόσο για την προστασία του περιβάλλοντος όσο και για την προστασία του καταναλωτή. Ιδιαίτερη βαρύτητα για τη χώρα μας έχει η σημασία που δίνει η Ευρωπαϊκή Ένωση για την επίτευξη του στόχου της μείωσης της χρήσης γεωργικών φαρμάκων.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μέρος εκτεταμένης έρευνας για την ανεύρεση και καταγραφή εντομοπαθογόνων μυκήτων σε διάφορα οικοσυστήματα στην Ελλάδα και την Πολωνία, στο πλαίσιο σχετικού ερευνητικού διακρατικού προγράμματος. Το πρόγραμμα αυτό είναι ένα τμήμα μίας γενικότερης μελέτης με στόχο την ανάδειξη της σημασίας των εντομοπαθογόνων οργανισμών ως παράγοντες αντιμετώπισης των εντόμων εχθρών καλλιεργειών. Τελικός στόχος της μελέτης αυτής είναι η ανεύρεση εναλλακτικών προς τη χημική, μέθοδος αντιμετώπισης των εχθρών ώστε να είναι δυνατή η μείωση χρήσης των γεωργικών φαρμάκων για την προστασία του περιβάλλοντος.

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

Διάφορα είδη εντομοπαθογόνων μυκήτων έχουν χρησιμοποιηθεί εναντίον διαφόρων εντόμων σε ποικίλα αγροοικοσυστήματα και έχουν επιδείξει εξαιρετικά

επίπεδα ελέγχου. Αρκετά είδη μυκήτων έχουν αναφερθεί ως άριστο παράγοντες αντιμετώπισης επιζήμιων εντόμων εχθρών στη καλλιέργειες.

Η όλη προσπάθεια εντάσσεται στο πλαίσιο της Ολοκληρωμένης Αντιμετώπισης Εχθρών (Integrated pest management IPM) (Εικόνα 1). 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)

Η παρούσα εργασία έγινε στο πλαίσιο σχετικού ερευνητικού προγράμματος με τίτλο «Χρήση εντομοπαθογόνων μυκήτων για την αντιμετώπιση αρθοπόδων εχθρών των καλλιεργειών» (Γ.Γ.Ε.Τ Διακρατική συνεργασία Ελλάδος – Πολωνίας). Στην Ελλάδα δεν έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές επισκοπήσεις με σκοπό την καταγραφή των εντομοπαθογόνων, με εξαίρεση αποτελούν οι εργασίες των Roidakis et al. (2001) και Francis et al. (2004). Σκοπός του προγράμματος, για την Ελληνική πλευρά, ήταν η ανεύρεση εντομοπαθογόνων μυκήτων σε διάφορες περιοχές της χώρας μας και στη συνέχεια η έρευνα για τη δυνατότητα της χρήσης τους ως παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης.

Η πρώτη αναφορά για αντιμετώπιση εχθρών εμφανίστηκε το 950 π.Χ. στην Αρχαία Ελλάδα όπως αναφέρει ο Όμηρος στο έργο του «Ομηρικοί Ύμνοι», όπου χρησιμοποιούσαν θειούχα σκευάσματα ως μια αποτελεσματική μέθοδο καταπολέμηση των ζωικών εχθρών (DeBach, 1974). Κατόπιν ο Ρωμαίος Cato ο λογοκριτής, το 200 π.Χ. συνέστησε ψεκασμούς με πετρέλαιο για τον έλεγχο των εντόμων εχθρών. Όμως η πρώτη καταγεγραμμένη εφαρμογή της Βιολογικής Αντιμετώπισης πραγματοποιήθηκε στην Κίνα, το 300 μ.Χ. όπου επιστρατεύτηκαν μυρμήγκια θηρευτές του γένους *Oecophylla smaragdina* για τον έλεγχο των εχθρών των εσπεριδοειδών. Επίσης το 1500 μ.Χ. οι αγρότες και φυσιδίφες εκείνης της εποχής παρατήρησαν ειδή Coccinellidae και ιδιαίτερα το αρπακτικό *Cycloneda munda* L. αλλά και μεγάλα σκαθάρια του εδάφους, της οικογένειας Carabidae, να τρέφονται με άλλα έντομα. (Jahn et al.,2001)

Το 1758, ο Ληναίος ιδρύει το διωνυμικό σύστημα ονοματολογίας και με αυτόν τον τρόπο περιέγραψε πάρα πολλά έντομα θηρευτές και ήταν εκείνος που 1763

χρησιμοποιώντας το ψευδώνυμο C.N. Nelin συνέστησε την συλλογή και εξαπόλυση Carabidae, Coccinellidae, Chrysopidae και Aphididae ως σημαντικό παράγοντα επιτυχίας για τον ορθό έλεγχο των ζωικών εχθρών των καλλιεργειών. (Jahn et al., 2001)

Στις αρχές του 19ου αιώνα εμφανίστηκαν τα πρώτα συγγράμματα αφιερωμένα εξ ολοκλήρου στη Βιολογική Αντιμετώπιση και τον έλεγχο των εντόμων εχθρών. Το 1874, στην Ζηλανδία, έγινε η πρώτη διεθνής παρουσίαση του αρπακτικού *Coccinella undecimpunctata* L. Η μεγάλη χρησιμότητα της βιολογικής αντιμετώπισης φάνηκε το 1878 στη Γαλλία όπου καταπολεμήθηκε με επιτυχία την αμερικάνικη αφίδα *Viteus vitifoliae* Fitch με τη χρησιμοποίηση του παρασιτοειδούς *Tyroglyphus phylloxerae* (DeBach, 1971). Ο Leconte (1884) συνέστησε χρήση παθογόνων ουσιών για τον έλεγχο των εντόμων – εχθρών. Στα τέλη του 19ου αιώνα και συγκεκριμένα το 1888, στην Αμερική, χρησιμοποιήθηκαν το παρασιτοειδές *Cryptochetum iceryae* και το αρπακτικό *Rodolia cardinalis*, τα οποία εισήχθηκαν από την Αυστραλία, για να επιτευχθεί έτσι ο έλεγχος του κοκοειδούς *Icerya purchasi*. (Dreistadt et al., 1994)

Στις αρχές του 20ου αιώνα χάρις στην επιτυχή εκτέλεση ενός προγράμματος Βιολογικής Αντιμετώπισης του κουνουπιού *Aedes simpsoni* που προκαλεί τον κίτρινο πυρετό και του κουνουπιού *Anopheles gambiae*, όπου το θηλυκό άτομο που μεταφέρει το παρασιτικό πρωτόζωο *Plasmodium falciparum* το οποίο προκαλεί την ελονοσία, επιτεύχθηκε η ολοκλήρωση της διώρυγας του Παναμά, η οποία είχε εγκαταλειφτεί στα τέλη του 18ου αιώνα (Donald G. McNeil Jr 2005). Εν συνεχεία τη δεκαετία του 1920 στην Αυστραλία, κατορθώθηκε ο έλεγχος της εξάπλωσης, του κάκτου *Opuntia cactus* με την απελευθέρωση του φυτοφάγου εντόμου *Cactoblastis cactorum* όπου καταγράφηκε σαν μια από τις μεγαλύτερες επιτυχίες της βιολογικής καταπολέμησης του πεπερασμένου αιώνα (Essig, 1931).

Το 1940 ο C.P. Clausen, συνέγραψε ένα κλασικό βιβλίο για τα εντομοφάγα έντομα συνοψίζοντας τη βιβλιογραφία στην βιολογία των παρασιτοειδών και των αρπακτικών. Το 1943 ο W. R. Thompson άρχισε να κατηγοριοποιεί τα παρασιτοειδή και αρπακτικά ανάλογα με τα θηράματα τους και το ξενιστή τους (Steinhaus, 1956). Στις επόμενες δεκαετίες η Βιολογική Αντιμετώπιση εξελίχθηκε και εκτός από την χρησιμοποίηση φυσικών θηρευτών, εφαρμόστηκαν σκευάσματα που η δραστική τους ουσία προέρχονταν από μύκητες, βακίλλους και άλλες φυσικές ουσίες. Τη δεκαετία του '70, συγκεκριμένα το 1972 παρουσιάστηκε το πρώτο σκευάσμα βασιζόμενο στο *Bacillus thuringiensis*, που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των λεπιδοπτέρων. Την

τάση που επικρατεί σήμερα την περιγράφει ο Barry Commoner στο βιβλίο του το 1971 «Κλείνοντας τον κύκλο» με μία χαρακτηριστική φράση «η φύση δεν είναι ο εχθρός, αλλά ο ουσιαστικός σύμμαχός μας». (Kogan, 1998).

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

1.2. Η Ολοκληρωμένη Παραγωγή - Ολοκληρωμένη Αντιμετώπιση - Βιολογική Αντιμετώπιση

Η γεωργία και η κτηνοτροφία οι πιο παλιές δραστηριότητες του ανθρώπου, που επηρεάζουν το περιβάλλον και επηρεάζονται από αυτό και σε χώρες όπως η Ελλάδα, διαμόρφωσαν το χώρο και τη ζωή μέσα σε αυτόν. Η διάταξη των χωραφιών και των καλλιεργειών γύρω από τα χωριά, οι αναβαθμίδες για να καλλιεργηθούν οι πλαγιές, οι φυτοφράκτες για να προστατευτούν τα χωράφια, τα βοσκοτόπια και οι στάνες, διαμόρφωσαν το χώρο γύρω από τα χωριά και αποτελούν την ύπαιθρο όπως την αντιλαμβανόμαστε. Η ύπαιθρος σε κάθε τόπο έχει διαφορετική μορφή ανάλογα με τις καλλιέργειες που ασκούνται στην κάθε περιοχή, τον τρόπο που είναι χωρισμένα τα χωράφια, τον τρόπο που είναι κλαδεμένα τα δέντρα, τα είδη και τις ποικιλίες που καλλιεργούνται, την κλίση του εδάφους, την ύπαρξη νερού ή όχι κλπ. Αυτές τις μορφές, που διαμορφώνονται από τη γεωργία και την κτηνοτροφία, τις ονομάζουμε αγροτικά τοπία για να τα ξεχωρίσουμε από άλλα τοπία μιας περιοχής, όπως τα δασικά.

Η γεωργία και η κτηνοτροφία έχουν αλλάξει σημαντικά με την πάροδο του χρόνου, λύνοντας πολλά προβλήματα και δημιουργώντας όμως άλλα. Οι αλλαγές που έφερε η μαζική χρήση των λιπασμάτων, των γεωργικών μηχανημάτων, των νέων αρδευτικών συστημάτων καθώς και η εγκατάλειψη παραδοσιακών τρόπων καλλιέργειας και εκτροφής των ζώων, έδωσαν νέα ώθηση στη γεωργία, η οποία αύξησε μεν το γεωργικό εισόδημα, αλλά παράλληλα δημιούργησε προβλήματα τόσο στην αγροτική εκμετάλλευση, όσο και στο ευρύτερο περιβάλλον της και επομένως

στο κοινωνικό σύνολο.

Ο ρόλος του αγρότη, ο οποίος αναγνωρίζεται σε όλο του το εύρος, δεν περιορίζεται μόνο στην παραγωγή αλλά επεκτείνεται και στην προστασία του περιβάλλοντος, της πολιτιστικής κληρονομιάς και του χώρου της υπαίθρου. Ο αγρότης θα πρέπει με τις δράσεις του να στοχεύει στη μείωση των προβλημάτων που δημιουργούν η γεωργία και η κτηνοτροφία, αλλά και στη διατήρηση των καλών υπηρεσιών της γεωργίας προς το κοινωνικό σύνολο.

Για την αντιμετώπιση των προβλημάτων που έχει δημιουργήσει η γεωργική δραστηριότητα και τη συνέχιση των θετικών λειτουργιών της, οι αγρότες θα πρέπει να εφαρμόζουν ορισμένες πρακτικές, οι οποίες ονομάστηκαν Κώδικες Ορθής Γεωργικής Πρακτικής. (Κ.Ο.Γ.Π.)

Οι πρακτικές αυτές, σχεδόν όλες παλιές, που η έρευνα έδειξε, ότι ήταν αποτελεσματικές εμπλουτίστηκαν, όπου χρειάστηκε με νέες και αποσκοπούν:

- Στην αειφορική διαχείριση των γεωργικών γαιών και των φυσικών πόρων
- Στην προστασία και διαφύλαξη του αγροτικού τοπίου και των χαρακτηριστικών του
- Στην προστασία της υγείας των αγροτών και των καταναλωτών

Για την επίτευξη των παραπάνω στόχων οι Κώδικες παρεμβαίνουν στις ακόλουθες γεωργικές δραστηριότητες:

1. Κατεργασία του εδάφους
2. Αμειψισπορά
3. Λίπανση
4. Διαχείριση υδάτινων πόρων
5. Φυτοπροστασία
6. Διαχείριση αυτοφυούς χλωρίδας
7. Συγκομηδή
8. Διαχείριση υπολειμάτων καλλιέργειας
9. Διαχείριση απορριμμάτων

Η πρακτική της αμειψισποράς αφορά μόνο τις ετήσιες καλλιέργειες, αροτραίες και κτηνυκτικά. Όλες οι άλλες δραστηριότητες αφορούν όλους τους τύπους των καλλιεργειών.

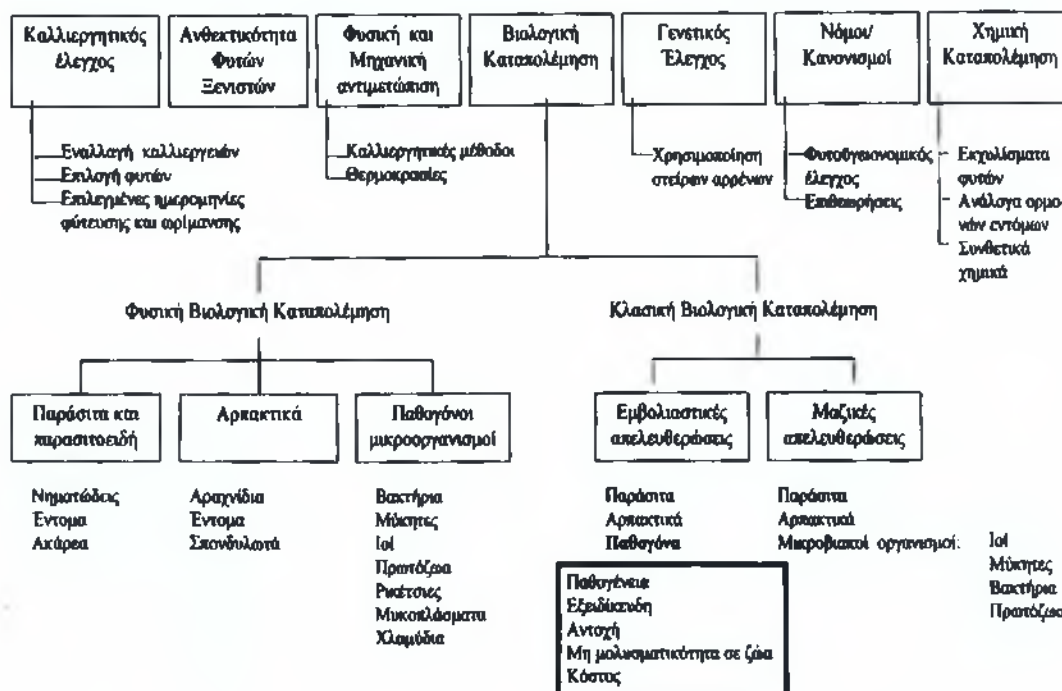
Οι Κώδικες Ορθής Πρακτικής αφορούν, επίσης, στις παρακάτω κτηνοτροφικές δραστηριότητες:

1. Την διαχείριση των βοσκοτόπων
2. Την υγιεινή και καλή διαβίωση των ζώων
3. Τη διαχείριση αποβλήτων της κτηνοτροφικής εκμετάλλευσης

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.

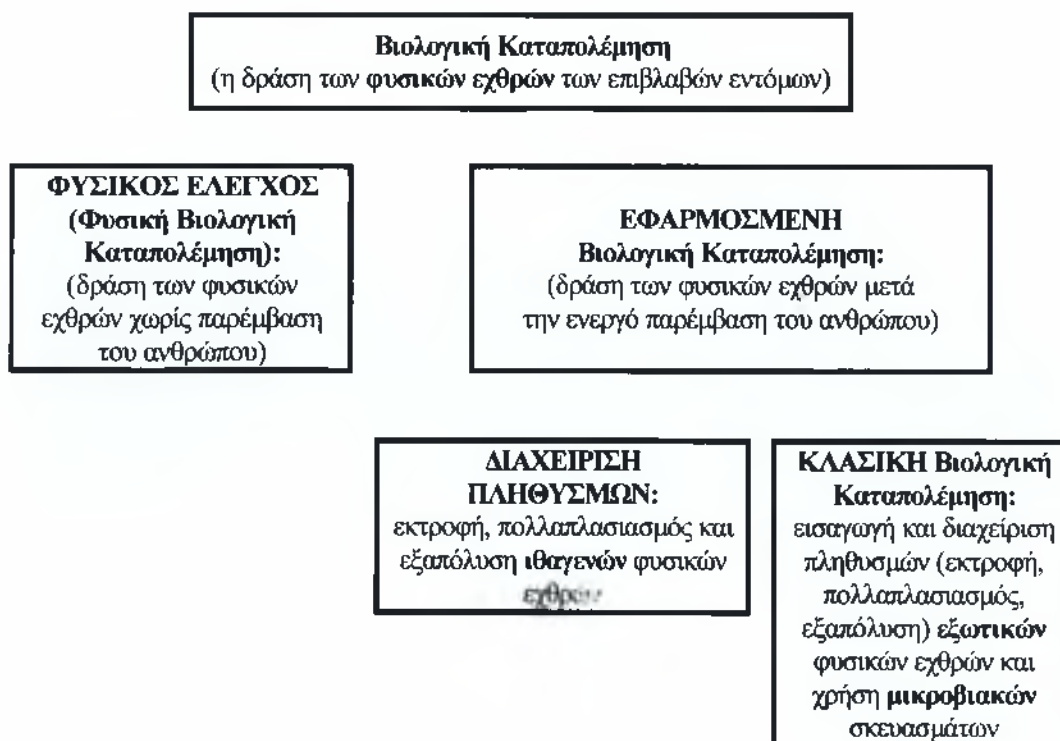
Ολοκληρωμένη Αντιμετώπιση Εχθρών



Εικόνα 1: Ολοκληρωμένη Αντιμετώπιση Εχθρών

Η Βιολογική Αντιμετώπιση (ή Βιολογική Καταπολέμηση) ορίζεται ως η

δράση των φυσικών εχθρών των επιβλαβών εντόμων (παρασιτοειδή, αρπακτικά, παθογόνα). Διακρίνεται σε Φυσική Βιολογική Καταπολέμηση (δράση των φυσικών εχθρών χωρίς παρέμβαση του ανθρώπου) και σε Εφαρμοσμένη Βιολογική Καταπολέμηση (δράση των φυσικών εχθρών μετά την ενεργό παρέμβαση του ανθρώπου). Η Εφαρμοσμένη Βιολογική Καταπολέμηση διακρίνεται σε Διαχείριση Πληθυσμών (εκτροφή, πολλαπλασιασμός και εξαπόλυση ιθαγενών φυσικών εχθρών) και σε Κλασική Βιολογική Καταπολέμηση (εισαγωγή και διαχείριση πληθυσμών εξωτικών φυσικών εχθρών και χρήση μικροβιακών σκευασμάτων) (Εικόνα 2) (Katsoyannos 1996, Κοντοδήμας 2004).



Εικόνα 2: Βιολογική Καταπολέμηση (Katsoyannos, 1996).

1.3. Φυσικοί εχθροί των επιβλαβών εντόμων

Όπως αναφέρθηκε είναι τα παρασιτοειδή, τα αρπακτικά και τα παθογόνα.

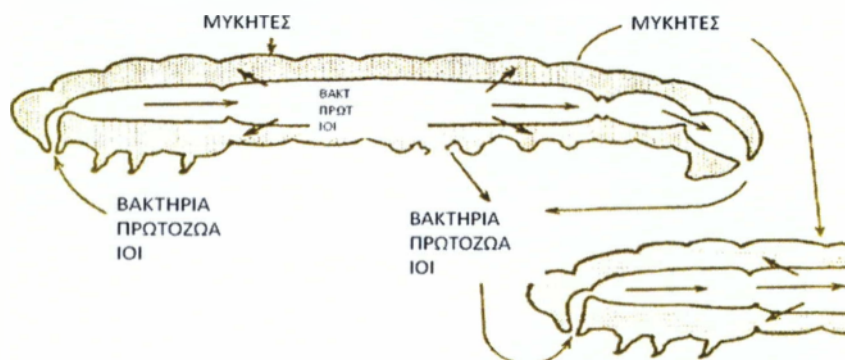
Αρπακτικό είναι κυρίως ένα έντομο ή και άλλος οργανισμός του ζωικού βασιλείου, το οποίο ζει ελεύθερα καθόλη τη διάρκεια της ζωής του, είναι συνήθως μεγαλύτερο σε μέγεθος από τη λεία του και για να συμπληρώσει την ανάπτυξή του απαιτούνται περισσότερα του ενός άτομα από τη λεία του (Λυκουρέσης 1995).

Παρασιτοειδές θεωρείται ένα έντομο το οποίο έχει συνήθως, όχι πάντοτε, το ίδιο μέγεθος περίπου με τον ξενιστή του, απαιτεί δε ένα μόνο ξενιστή για τη συμπλήρωση της αναπτυξής του τον οποίον και τελικά θανατώνει.

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

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

Η παθογένεια η οποία προκαλείται από τους μικροοργανισμούς δεν είναι ίδια σε όλα τα έντομα και διαφέρει ακόμα και σε κάθε στάδιο του εντόμου. Συνήθως είναι μεγαλύτερη στα νεαρά στάδια του εντόμου, ιδιαίτερα στο στάδιο της προνύμφης (Steinhaus, 1949). Το σημείο εισόδου ή ανάπτυξης ενός παθογόνου διαφέρει, ανάλογα με το έντομο και το εκάστοτε παθογόνο. Συνήθως η είσοδος των παθογόνων γίνεται από την στοματική οδό, ενώ οι μύκητες έχουν τη δυνατότητα να εισβάλλουν στον ξενιστή τους από το επιδερμάτιο του εντόμου.



Εικόνα 3: Τα σημεία εισόδου του παθογόνου μύκητα στο έντομο

Εντομοπαθογόνοι ιοί

Οι ιοί είναι μικρότατα σωματίδια, υποχρεωτικά ενδοκυτταρικού τύπου που το μεγεθός τους συνήθως κυμαίνεται από 0.01 μm μέχρι και 15 μm (Lacey and Brooks, 1997). Αποτελούνται από τμήμα που περιέχει μία ή και περισσότερες έλικες μόνο D.N.A ή μόνο R.N.A και από ένα περίβλημα πρωτεϊνικής φύσεως. Δεν είναι μικροοργανισμοί κυτταρικού τύπου, αλλά χαρακτηρίζονται ως έμβια όντα, αφού μπορούν να αναπαράγονται και να φέρουν μια γενετική πληροφορία, το μηχανισμό αναπαραγωγής του νουκλεϊνικού οξέος. Ένα έντομο, μετά την προσβολή του από έναν ιό παρουσιάζει μειωμένη δραστηριότητα για κάποιο χρονικό διάστημα, μέχρι να επέλθει ο θάνατος. Αν και δεν προκαλούν οξεία και άμεση θνησιμότητα, πολλές φορές οι ιοί προκαλούν δραματικές μειώσεις στον πληθυσμό των ξενιστών τους. Μεταχρωματισμοί, λύσεις ιστών, δημιουργία κηλίδων, ακόμα και αποσύνθεση ολόκληρου σώματος του εντόμου είναι τα συνήθη σημεία που εμφανίζονται, ανάλογα φυσικά με το είδος του ιού και του εντόμου (Lacey and Brooks, 1997).

Οι ιοί έχουν την ιδιότητα να μεταδίδονται μέσω ενήλικων μορφών των εντόμων στους απογόνους τους, αν και μερικοί έχουν αναφερθεί ότι μεταδίδονται και μέσω των ωών. Για να εμφανισθούν τα συμπτώματα της ίωσης απαιτείται ένα χρονικό διάστημα μεγαλύτερο από 4 ημέρες, ενώ εκτός από τις προνύμφες είναι δυνατόν να εμφανιστούν συμπτώματα και σε ενήλικα έντομα. Στην Ελλάδα κυκλοφορούν σήμερα μόνο δύο σκευάσματα, το Carponivirusine 2000 SC και το Madex SC, που περιέχουν τον ιό CpGV και συνιστώνται για την καταπολέμηση της καρπόκαψας *Cydia (Laspeyresia) pomonella*. Στο εξωτερικό κυκλοφορούν πολλά επιπλέον εμπορικά σκευάσματα ωών (π.χ. *Adoxophyes orana* GV, *Spodoptera exigua* MNPV, *Lymantria dispar* MNPV, *Mamestra brassicae* MNPV κ.α.).

Εντομοπαθογόνα βακτήρια

Τα βακτήρια αποτελούν τον πιο πολυπληθή τύπο μικροοργανισμών που έχουν δράση παθογόνο στα έντομα. Δεν από τελεί έκκληξη λοιπόν το γεγονός ότι μεγάλος αριθμός από τους μικροοργανισμούς αυτούς μπορεί να προκαλεί μολύνσεις στα έντομα σε ένα μεγάλο εύρος συνθηκών. Τα βακτήρια είναι μονοκύτταροι φυτοειδείς μικροοργανισμοί οι οποίοι πολλαπλασιάζονται με διαίρεση. Τα εντομοπαθογόνα βακτήρια είναι σε γενικές γραμμές, όμοια με τα υπόλοιπα βακτήρια, όσον αφορά τα γενικά χαρακτηριστικά τους. Από τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς

ξεχωρίζουν κυρίως λόγω του πολύ μικρότερου μεγέθους τους (Steinhaus, 1949). Αυτό είναι της τάξης των 0.5 – 50 μm. Το σχήμα τους ποικίλει ανάλογα με το είδος. Συναντώνται μεμονωμένα ή σε αλυσίδες, μπορεί να είναι είτε θετικά είτε αρνητικά κατά Gram και αερόβια ή αναερόβια (Lacey and brooks, 1997).

Τα βακτήρια διακρίνονται σε δυο κατηγορίες:

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

Στα πρώτα υπάγονται ορισμένα είδη του γένους *Pseudomonas*, που όταν εισέλθουν δια της στοματικής οδού στον εντερικό σωλήνα του εντόμου, διαπερνούν στην συνέχεια τα εντερικά τοιχώματα, εισέρχονται στην αιμολέμφο και προκαλούν σηψαιμία. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν επίσης και τα βακτήρια του γένους *Aerobacter* και *Enterococcus*, τα οποία απαντώνται στο περιεχόμενο του εντερικού σωλήνα των εντόμων και είναι δυνατόν αν προκαλέσουν τοπικές λύσεις του επιθηλίου του εντέρου. Στην δεύτερη κατηγορία υπάγονται τα βακτήρια εκείνα που σχηματίζουν κατά το στάδιο της σπορογονίας κρυστάλλους τοξίνης, οι οποίοι διασπώμενοι ενζυματικά στον εντερικό σωλήνα του εντόμου δρουν τοξικά γι' αυτό. Οι κρύσταλλοι αυτοί δεν είναι βλαβεροί για άλλες μορφές ζωής, γεγονός που καθιστά τα κρυσταλλογόνα αυτά βακτήρια πολύ ενδιαφέροντα και σημαντικά. Τουλάχιστον 120 είδη εντόμων είναι ευαίσθητα στα κρυσταλλογόνα βακτήρια, αν και παρατηρούνται διαφορές όσον αφορά τις αντιδράσεις στην τοξίνη ανάλογα με το είδος του εντόμου. Ο προσδιορισμός της δράσης του βακτηρίου για κάθε είδος απαιτεί εκτεταμένες έρευνες.

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.

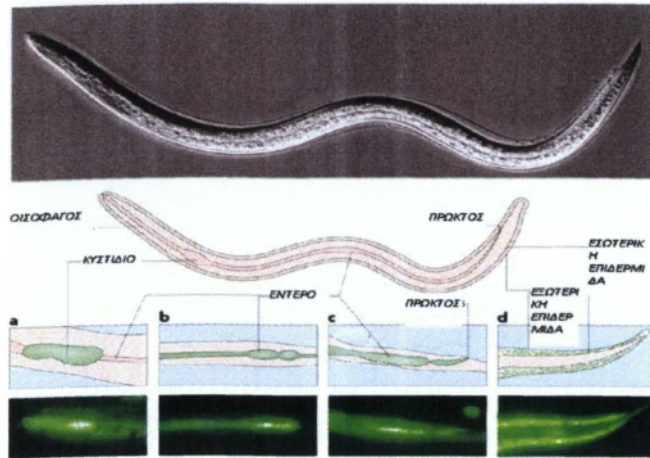
Μια κατηγορία βακτηρίων οι ρικέτσιες, οι οποίες συναντώνται σε ευρύ φάσμα εντόμων, μπορούν σε ορισμένες περιπτώσεις να προκαλέσουν αξιοπρόσεχτες μολύνσεις σε ορισμένους πληθυσμούς. Έχουν πολύ μικρό μέγεθος (0.2-0.6μm) και σχήμα ραβδοειδές, είναι αρνητικές κατά Gram, μοιάζουν με βακτήρια και συμπεριφέρονται ως ιοί. Είδη του γένους *Rickettsiella* και *Wolbachia* είναι εντομοπαθογόνα και η παρουσία τους έχει αναφερθεί σε Κολεόπτερα, Δίπτερα, Λεπιδόπτερα, Ορθόπτερα και άλλες τάξεις εντόμων.

Εντομοπαθογόνοι νηματώδεις

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

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



Εικόνα 4: Νηματώδης *Steinernema* sp.

Ιδιότητες εντομοπαθογόνων νηματωδών:

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

Εντομοπαθογόνα πρωτόζωα

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

Μεταδίδονται δια στόματος, αλλά τις περισσότερες φορές μεταφέρονται από

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

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

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

Στην Ευρωπαϊκή αγορά κυκλοφορούν σκευάσματα από δύο είδη πρωτόζωων της κατηγορίας των μικροσποριδίων (*Microsporidia*). 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).

1.4. 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.

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 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).

Πίνακας 1: Τάξεις και μερικά είδη εντομοπαθογόνων μυκήτων

Πίνακας 1. Τάξεις και μερικά είδη εντομοπαθογόνων μυκήτων

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΜΥΚΗΤΩΝ	ΤΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΕΙΔΗ ΕΝΤΟΜΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ
A. ΦΥΚΟΜΥΚΗΤΕΣ	<p>Entomophthorales</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Entomophthora</i> spp., <i>Zoophthora</i> spp., <i>Erynia</i> spp. - <i>Massospora</i> (<i>M. cicadina</i>), - <i>Conidiobolus</i> spp. <p>Blastocladales</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Coelomomyces</i> spp. (<i>C. stegomyiae</i>, <i>C. tasmaniensis</i>, παθογόνα κουνουπιών) <p>Lagenidiiales</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Lagenidium giganteum</i> (παθογόνο κουνουπιών)
B. ΑΣΚΟΜΥΚΗΤΕΣ	<p>Ascosphaerales</p> <ul style="list-style-type: none"> <i>Bettsia</i> sp. <i>Ascosphaera</i> (παθογόνα μελισσών) (<i>A. apis</i>) <p>Myriangiales</p> <ul style="list-style-type: none"> <i>Myriangium</i> spp. (παθογόνα Coccoidea) <p>Sphaeriales</p> <ul style="list-style-type: none"> <i>Cordyceps</i> spp. <i>Torrubiella</i> spp. <i>Hypocrella</i> spp.
Γ. ΑΤΕΛΕΙΣ ΜΥΚΗΤΕΣ	<p>Moniliales</p> <ul style="list-style-type: none"> <i>Beauveria</i> spp. (<i>B. bassiana</i>, παθογόνο πολλών ειδών εντόμων), (<i>B. tenella</i>=<i>B. brongniarti</i>) (παθογόνο του <i>Melolontha melolontha</i>) <i>Metarrhizium</i> (<i>M. anisopliae</i>) [παθογόνο του <i>Anisopliae austriaca</i> (Scarabaeidae)] <i>Nomuraea</i> (= <i>Spicaria</i>) (<i>N. rileyi</i>) (παθογόνο του <i>Trichoplusia ni</i> κ.α Noctuidae) <i>Paecilomyces</i> spp. <i>Hirsutella</i> (<i>H. thompsonii</i>) (παθογόνο του ακάρεως <i>Phyllocoptuta oleivora</i>) <i>Culicomycetes clavosporus</i> <i>Lecanicillium lecanii</i> <i>Tolypocladium cylindrosporum</i> <p>Sphaeropsidales</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Aschersonia</i> (<i>A. aleurodis</i>) (παθογόνο των Aleurodidae)

1.5. Η χρήση εντομοπαθογόνων μυκήτων ως ενδόφυτα

Ο όρος ενδόφυτο εισήχθη από τον γερμανό επιστήμονα Heinrich Anton De Bary (1884) και χρησιμοποιείται για να καθορίσει τους μύκητες ή τα βακτήρια που βρίσκονται μέσα στους ιστούς των φυτών, χωρίς να προκαλούν έκδηλα συμπτώματα στον ξενιστή (Wilson, 1995). Τα ενδόφυτα μυκήτων έχουν εντοπιστεί σε εκατοντάδες φυτά, που περιλαμβάνουν και πολύ σημαντικά αγροτικά είδη, όπως το σιτάρι (Larran et al., 2002a), τις μπανάνες (Pocasangre et al., 2000; Cao et al., 2002), τα φασόλια σόγιας (Larran et al., 2002b) και τις τομάτες (Larran et al., 2001). Στα ενδόφυτα μυκήτων έχουν αποδοθεί αρκετές λειτουργίες, όπως η παροχή προστασίας ενάντια στα φυτοφάγα έντομα (Breen, 1994; Clement et al., 1994), στα νηματώδη παράσιτα των φυτών (West et al., 1988; Elmi et al., 2000) και στα παθογόνα των φυτών (White and Cole, 1986, Dingle and McGee, 2003, Wicklow et al., 2005).

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να απομονωθούν εντομοπαθογόνοι μύκητες από το έδαφος ή από αρθρόποδα (στο πλαίσιο σχετικού διακρατικού ερευνητικού προγράμματος) και να εξεταστεί η δυνατότητα της χρήσης τους ως ενδόφυτα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Απομόνωση Εντομοπαθογόνων Μυκήτων

Το πρώτο στάδιο της έρευνας ήταν η συλλογή δειγμάτων (προσβεβλημένα έντομα ή χώμα) από διάφορες περιοχές της Αττικής, Πελοποννήσου (Αχαΐα, Αρκαδία), Βοιωτίας, Ρόδου και Κρήτης. Όπως και από Βιοκαλλιέργειες, Συμβατικές καλλιέργειες, Δάση και Αστικό Πράσινο. Συγκεκριμένα στις περιοχές Τατόι, Αγ. Στέφανος, Ελληνικό, Κηφισιά (Αττική), Κιθαιρώνας, Θήβα (Βοιωτία), Γούβες (Κρήτη) έγιναν επισκοπήσεις και συλλέχθηκαν προσβεβλημένα έντομα.

Από τις περιοχές Αγ. Στέφανος, Μαραθών, Καλέντζι, Μαρούσι, Κηφισιά, Ντράφι, Πικέρμι (Αττική), Θήβα (Βοιωτία), Πάτρα Αχαΐας, Λαγκάδια, Δημητσάνα και Κάψια Αρκαδίας (Πελοπόννησος), Ρόδος (Δωδ/νησα) και Βάι (Κρήτη) έγιναν δειγματοληψίες χώματος (300gr/δείγμα) από βάθος 10cm. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πλαστικές σακούλες. Στην συνέχεια μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο για επεξεργασία. Οι δειγματοληψίες έγιναν χρησιμοποιώντας γεωγραφικά πληροφοριακά συστήματα (GIS) και παγκόσμια συστήματα θέσης (GPS) ώστε να είναι δυνατός ο εντοπισμός του κάθε σημείου δειγματοληψίας και στο μέλλον. Η συγκομιδή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε κατά το τελευταίο τρίμηνο του 2007.



Εικόνα 5: Πάγκκος εργασίας με δείγματα εδάφους

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



Εικόνα 6: Η μέθοδος της χρήσης ως δολώματος του εντόμου *Galleria mellonella*

Το 1975 οι Bedding και Akhurst βρίσκουν πως οι προνύμφες του μεγάλου κηρόσκορου, *Galleria mellonella* L., μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δόλωμα για εντομοπαρασιτικούς νηματώδεις όταν τοποθετηθούν μέσα στο έδαφος. Η απλή τεχνική χρησιμοποιούταν επιτυχώς σε οικολογικές έρευνες για την παγίδευση των εντομοπαθογόνων νηματωδών. Κατά την διεξαγωγή τέτοιων μελετών βρέθηκε πως η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τον εντοπισμό εντομοπαθογόνων μυκήτων από το έδαφος.

Για αυτή τη μέθοδο μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε οποιοδήποτε μέγεθος αλλά και σχήματος δοχείου, ακόμα και τρυβλία τύπου Petri (Zimmerman, 1986) τα οποία ήταν και η επιλογή μας. Η ποσότητα του εδαφικού δείγματος ήταν τόση ώστε οι προνύμφες να μπορούν να κινούνται μέσα σε αυτό χωρίς όμως να υπάρχουν μεγάλα κενά αέρος. Πριν γίνει η τοποθέτηση των προνυμφών, εμβαπτίστηκαν σε ζεστό νερό θερμοκρασίας 45°C για μερικά δευτερόλεπτα και τοποθετηθήκαν ανάλογα με το μέγεθος τους και των τεμαχιδίων του εδάφους 5, 10 ή 15 από αυτές σε δείγματα υψηλή υγρασίας. Λόγο της μεγάλης κινητικότητας των προνυμφών, το κλείσιμο των τρυβλίων σφραγίστηκε με parafilm και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (25±1°C) για 18 – 20 ημέρες και για τις πρώτες 4 ημέρες τα τρυβλία αναποδογυρίζονταν κάθε μέρα ώστε οι προνύμφες να μπορούν κινούνται μέσα στα

δείγματα (Keller et al 2000). Ο έλεγχος της θνησιμότητας παρακολουθήθηκε για 7, 12, και 14 ημέρες αντίστοιχα (Mietiewski et all 1996). Οι νεκρές ή μουμιοποιημένες προνύμφες απομακρύνθηκαν και εν συνεχεία αποστειρώθηκαν σε 1% χλωριούχο νάτριο για μερικά δευτερόλεπτα.



Εικόνα 7: Απομάκρυνση μουμιοποιημένων προνυμφών του κηρόσκορου *Galleria mellonella*.

Εν συνεχεία οι νεκρές προνύμφες τοποθετήθηκαν 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.



Εικόνα 8: Προσβεβλημένες προνύμφες *Galleria mellonella* σε τρυβλία τύπου Petri 48 ώρες μετά την τοποθέτησή του.



Εικόνα 9: Μουμιοποιημένες προνύμφες *G. mellonella* λόγω της δράσης του *B. bassiana* (ρόδινο χρώμα) και επάνθηση μυκηλίου *B. bassiana* (λευκό μυκήλιο).

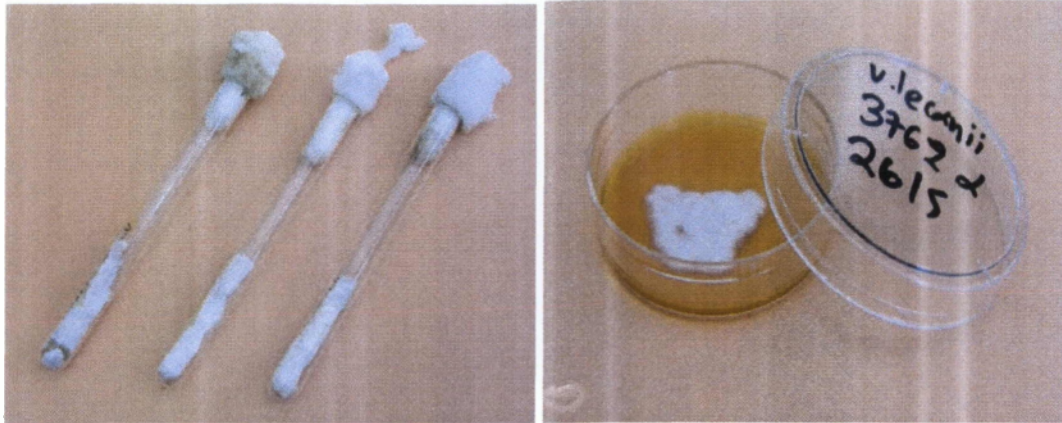


Εικόνα 10: Επάνθηση μυκηλίου *Metarhizium anisopliae* (με πράσινο ή λευκό-πράσινο χρώμα) σε προνύμφες *Galleria mellonella* και μουμιοποιημένες προνύμφες *G. mellonella* λόγω δράσης του *B. bassiana* (ρόδινο χρώμα)

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



Εικόνα 11: Εστία νηματικής ροής.



Εικόνα 12: Ανάπτυξη του *Verticillium lecanii* επί Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

Επίσης κατά τη διαδικασία συλλογής χώματος για τη δολωματική μέθοδο συλλέχθηκαν και νεκρά αρθρόποδα που εμφάνιζαν συμπτώματα προσβολής από εντομοπαθογόνους μύκητες.

2.2. Δημιουργία ενδοφυτικής συμβίωσης

Σε συνέχεια των απομονώσεων, έγινε στο εργαστήριο καλλιέργεια των μυκήτων *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* και *Metarhizium anisopliae* σε θρεπτικό μέσο SDA (Sabouraud Dextrose Agar) και θερμοκρασία $22,5\pm 1^{\circ}\text{C}$.



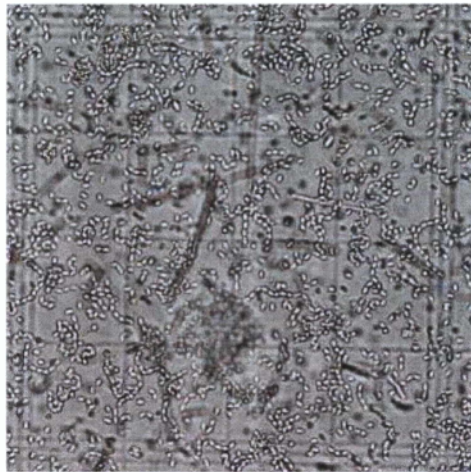
Εικόνα 13: Καλλιέργεια *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* και *Metarhizium anisopliae* σε θρεπτικό μέσο SDA (Sabouraud Dextrose Agar).

Χρησιμοποιήθηκαν οι απομονώσεις *Beauveria bassiana* από Αμαρούσιον Αττικής, *Paecilomyces fumosoroseus* από Άγιο Στέφανο Αττικής και *Metarhizium anisopliae* από Μαραθώνα Αττικής. Από καλλιέργειες 14 ημερών των εντομοπαθογόνων μυκήτων λήφθηκαν κονίδια και παρασκευάστηκαν διαλύματα με αποστειρωμένο νερό και 0,05% γαλακτοματοποιητή (Tergitol). Τα διαλύματα στην συνέχεια φιλτραρίστηκαν και ομογενοποιήθηκαν με ανάδευση για 3 λεπτά. Η συγκέντρωση που επιλέχθηκε ήταν 10^8 κονίδια/ml, η οποία υπολογίστηκε και ρυθμίστηκε με το αιματοκυττόμετρο.

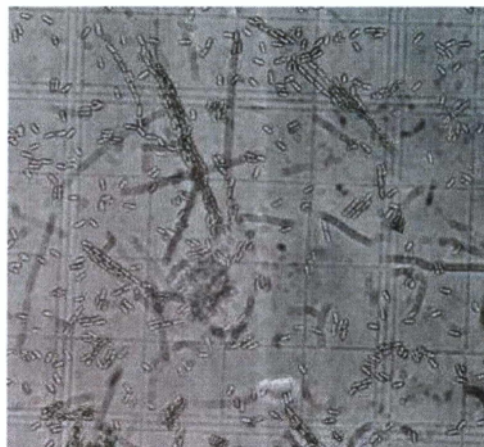
Ο φυτικός οργανισμός που επιλέχθηκε ήταν το γλυκό σόργο [*Sorghum bicolor* (L.) Moench.]. Φυτά σόργου ηλικίας 7 πραγματικών φύλλων ψεκάστηκαν με τα ως άνω αναφερόμενα διαλύματα κονιδίων εντομοπαθογόνων μυκήτων. Τις επόμενες εβδομάδες έπειτα από τεχνητή προσβολή των φυτών με σεζάμια [*Sesamia nonagrioides* (Lefebvre) (Lepidoptera: Noctuidae)] στα φυτά αυτά παρατηρήθηκε η εξέλιξη της προσβολής με καταμέτρηση του μήκους της στοάς της προνύμφης.



Beauveria bassiana



Paecilomyces fumosoroseus



Metarhizium anisopliae

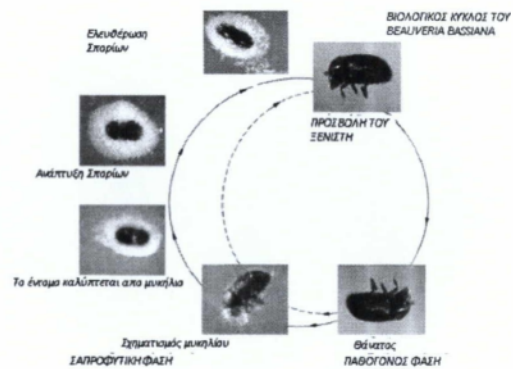
Εικ.14. Διαλύματα κονιδίων των εντομοπαθογόνων μυκήτων *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* και *Metarhizium anisopliae*.

Ο Μύκητας *Beauveria bassiana*

Ο μύκητας *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Moniliales) συνίσταται για την αντιμετώπιση πολλών εχθρών όπως λεπιδοπτέρων, αφίδων, θριπών, αλευρωδών, κολεοπτέρων και ημιπτέρων. Το όνομα του, το πήρε από τον ιταλό εντομολόγο Agostino Bassi, οποίος και τον ανακάλυψε το 1835 ως αίτιο για την άσπρη μούχλας που βρέθηκε πάνω σε μεταξοσκώληκα (*Bombyx mori*). Ο μύκητας αυτός 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). 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.



Εικ. 15: Ο μύκητας *Beauveria bassiana*
(<http://www.mold.ph/beauve12.jpg>)



Εικ.16: Ο Βιολογικός Κύκλος του *B.bassiana*

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

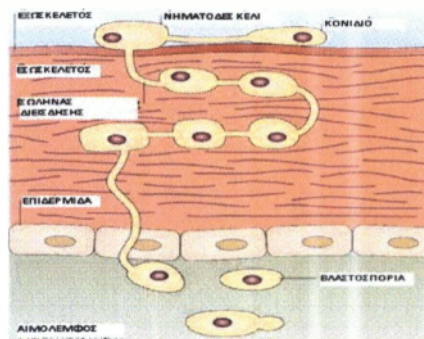
Στην Ευρώπη κυκλοφορούν εμπορικά σκευάσματα όπως τα Naturalis-L, Bio-power, Botanigard κ.α. Ο μύκητας αυτός δεν παρουσιάζει φυτοτοξικότητα ούτε δημιουργεί τοξικότητες σε πτηνά, ζώα και ψάρια (Copping, 2001)

Ο Μύκητας *Metarhizium anisopliae*

Ο μύκητας *Metarhizium anisopliae* γνωστός παλαιότερα ως *Entomophthora anisopliae*, είναι ένας μύκητας συναντάμε σε ολόκληρο τον κόσμο. Έχει αναφερθεί ότι προσβάλλει περίπου 200 είδη εντόμων και άλλων αρθροπόδων (McCoy et al., 1988).

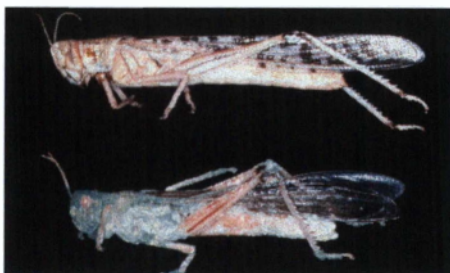


Εικ. 17: Βιολογικός κύκλος του μύκητα *M. anisopliae* (<http://www.bath.ac.uk/bio-sci/research/profiles/charnley.html>)



Εικ. 18: Τρόπος διεσόδου του μύκητα *M. anisopliae* (<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v5/n5/full/nrmicro1638.html>)

Ο μύκητας εισέρχεται από τους πόρους του τραχειακού συστήματος (Solomon et al., 2002). Μόλις εισέρθει στο εσωτερικό του εντόμου αναπτύσσεται ραγδαία και το έντομο να γεμίζει εσωτερικά με μυκήλιο που καταστρέφει τα όργανά του. Το *M. anisopliae* θρέφεται από τα λιπίδια που αποτελείται η επιδερμίδα του εντόμου. Είναι ικανός να απελευθερώνει σπόρια υπό χαμηλές συνθήκες υγρασίας (μικρότερη από 50%). Επιπλέον μπορεί να παράγει δευτερογενής μεταβολίτες, που είναι ουσίες τοξικές για τα έντομα αλλά και πρωτεϊνολυτικά ένζυμα (Suzuki et al., 1966, 1970, 1971). 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). Μερικά έντομα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για να περιοριστούν οι λοιμώξεις που προκαλούνται από τον *M. anisopliae*. Για παράδειγμα το *Schistocerca gregaria* (η ακρίδα της ερήμου) παράγει αντι-μυκητιακές τοξίνες οι οποίες αναστέλλουν την βλάστηση των σπορίων.



Εικόνα 19: Προσβολή του *M. anisopliae* σε ακμαίο *Schistocerca gregaria* (<http://www.bath.ac.uk/bio-sci/research/profiles/charnley.html>)

Το Bioblast είναι μία εμπορική διαθέσιμη μορφή του εντομοπαθογόνου μύκητα *M. anisopliae* και χρησιμοποιείται για το έλεγχο των τερμιτών του γένους *Reticulitermes* spp. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο θάνατος επέρχεται σε 4 έως 10 ημέρες ανάλογα με την θερμοκρασία.

Ο Μύκητας *Paecilomyces fumosoroseus*

Το *Paecilomyces fumosoroseus* (*Isaria fumosorosea*), θεωρείται πολύ ελπιδοφόρος βιολογικός παράγοντας για τον έλεγχο βλαβερών εντόμων. Στην Ευρώπη κυκλοφορεί το εμπορικό σκεύασμα PreFeRal με ένδειξη εναντίον του *Trialeurodes vaporariorum* σε τομάτα και αγγούρι. Το *P. fumosoroseus* παράγει κονίδια σε στερεό υπόστρωμα και βλαστοσπόρια σε υγρό υπόστρωμα. Διαπιστώθηκε ότι τα βλαστοσπόρια βλαστάνουν ταχύτερα και σε μεγαλύτερο ποσοστό στην επιδερμίδα του αλευρώδη σε σχέση με τα κονίδια. Η διαπίστωση αυτή δείχνει ότι η χρήση των βλαστοσπορίων για την ανάπτυξη των εμπορικών σκευασμάτων θα ήταν συμφέρουσα συγκριτικά με τη χρήση των κονιδίων. Διάφορα γεωργικά προϊόντα έχουν εξεταστεί ως συστατικά σκευασμάτων και μερικά υπόσχονται τη διατήρηση της βιωσιμότητας των βλαστοσπορίων στο πέρασμα του χρόνου.



Εικόνα 20: Προσβολή κολοπτερού από *Paecilomyces fumosoroseus*
(<http://www.hortalizas.com/biocontrol/?storyid=1421>)

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. Απομόνωση Εντομοπαθογόνων Μυκήτων

Πίνακας 2: Ποσοστά θνησιμότητας της *Galleria mellonella* που οφείλονται στην παρουσία του εντομοπαθογόνου μύκητα *B.bassiana* σε δείγματα εδάφους από διάφορα οικοσυστήματα της Ελλάδος

Νομός	Περιοχή	Σημείο	% προν. <i>Galleria</i> με <i>B.bassiana</i>	Παρατηρήσεις	N	E
Αττική	Αγ. Στέφανος	A	33,3%	Λάχανο -Βιολ. -υπαίθριο	38°10'17.54"	23°52'16.76"
Αττική	Μαραθών	B	28,6%	Λάχανο - υπαίθριο	38° 8'35.55"	23°58'33.46"
Αττική	Μαραθών	C	34,8%	Λάχανο -Βιολ. -υπαίθριο	38° 8'33.65"	23°58'28.64"
Αττική	Μαραθών	D	36,4%	Μπρόκολο-Βιολ.-υπαίθριο	38° 8'33.65"	23°58'28.64"
Αττική	Μαραθών	E	40,0%	Αγραναπ. -Βιολ. -υπαίθριο	38° 8'33.65"	23°58'28.64"
Αττική	Αγ. Στέφανος	F	37,5%	Δασικό έδαφος	38°10'18.38"	23°52'17.23"
Αττική	Αγ. Στέφανος	G	48,0%	Δασικό έδαφος - χούμος	38°10'18.38"	23°52'17.23"
Αττική	Αγ. Στέφανος	H	42,9%	Λάχανο -Βιολ. -υπαίθριο	38°10'20.94"	23°52'9.52"
Αττική	Αγ. Στέφανος	FRAGMA	30,0%	Δασικό έδαφος	38° 9'31.61"	23°53'41.05"
Αττική	Καλέντζι	Olives	15,0%	Ελιά	38°10'22.08"	23°54'46.46"
Αττική	Καλέντζι	Forest	47,5%	Δασικό έδαφος	38°10'18.11"	23°54'44.39"
Αττική	Αμαρούσιον	IGE-1	29,2%	Δασικό έδαφος	38° 3'38.69"	23°48'57.54"
Αττική	Αμαρούσιον	IGE-2	13,0%	Δασικό έδαφος	38° 3'38.69"	23°48'57.54"
Αττική	Αμαρούσιον	IGE-3	57,1%	Δασικό έδαφος - χούμος	38° 3'38.69"	23°48'57.54"
Αττική	Αμαρούσιον	IGE-4	39,1%	Δασικό έδαφος - χούμος	38° 3'38.69"	23°48'57.54"
Αττική	Αμαρούσιον	IGE-5	41,7%	Δασικό έδαφος	38° 3'38.69"	23°48'57.54"
Αττική	Αμαρούσιον	IGE-6	28,6%	Δασικό έδαφος	38° 3'38.69"	23°48'57.54"
Αττική	Αμαρούσιον	IGE-7	64,3%	Δασικό έδαφος	38° 3'38.69"	23°48'57.54"
Αττική	Κηφισιά	BPI	12,5%	Μ.Φ.1 - Κήπος	38° 4'52.85"	23°48'44.98"
Αττική	Κηφισιά	Mustang	33,3%	Δασικό έδαφος	38° 4'31.06"	23°50'4.36"
Αττική	Ντράφι	Drafi	36,4%	Δασικό έδαφος	38° 2'19.75"	23°55'22.14"
Αττική	Πικερμι	Pikermi	40,0%	Αμπέλι - Οργανικό	38° 0'22.77"	23°55'41.44"
Βοιωτία	Θήβα	INS	22,5%	Λάχ. -Βιολ. -Θερμοκήπ.	38°21'6.03"	23° 9'59.76"
Βοιωτία	Θήβα	OUT	37,5%	Κρεμμύδι -Βιολ. -υπαίθριο	38°21'6.03"	23° 9'59.76"
Αχαΐα	Πάτρα	PI	10,0%	Αστικός κήπος	38°15'10.11"	21°45'33.71"
Αρκαδία	Λαγκάδια	L2	52,9%	Δασικό έδαφος	37°41'2.69"	22° 2'15.84"
Αρκαδία	Λαγκάδια	L3	29,4%	Δασικό έδαφος	37°40'38.91"	22° 2'5.06"
Αρκαδία	Δημητσάνα	D1	33,3%	Δασικό έδαφος	37°38'10.11"	22° 5'23.12"
Αρκαδία	Κάψια	K1	18,2%	Δασικό έδαφος	37°43'31.02"	22°14'10.80"
Δωδ/νησα	Ρόδος	R1	25,0%	Δασικό έδαφος	36° 5'31.50"	28° 1'46.84"
Λασιθί	Βαϊ	V1	16,7%	Φοινικόδασος	35°15'18.22"	26°15'40.48"
Λασιθί	Βαϊ	V2	25,0%	Φοινικόδασος	35°15'18.22"	26°15'40.48"

Πίνακας 3: Ποσοστά θνησιμότητας της *Galleria mellonella* που οφείλονται στην παρουσία του εντομοπαθογόνων μυκήτων σε δείγματα εδάφους από διάφορα οικοσυστήματα της Ελλάδος (αποτελέσματα από το Εργαστήριο στην Πολωνία)

Παράγοντας Θνησιμότητας		Περιοχή							
		A	B	C	D	E	F	G	H
Εντομο- παθογόνος Μύκητας	<i>B. bassiana</i>	20.0	53.3	35.7	14.2	50.0	23.0	56.7	86.2
	<i>M. anisopliae</i>	30.0	-	17.8	71.4	10.0	-	10.0	-
	<i>I. fumosorosea</i>	3.3	-	-	-	-	-	3.3	-
	Σύνολο	53.3	53.3	53.5	85.6	60.0	23.0	70.0	86.2
Μύκητες με ανεξακριβωτη εντομο- παθογόνο ικανότητα	<i>Acremonium</i> sp.	-	10.0	-	-	-	-	-	-
	<i>Aspergillus</i> sp.	6.7	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Fusarium</i> sp.	16.7	23.3	7.1	3.6	3.3	-	-	3.4
	<i>Mucor</i> sp.	3.3	-	3.6	-	-	-	-	-
	Μυκήλιο που δεν παρήγαγε σπόρια	10.0	6.7	3.6	3.6	3.3	1.0	16.7	-
	Νηματώδης	-	-	-	-	10.0	-	-	-
Άλλα Αίτια	Μη αναγνωρισμένα αίτια	10.0	6.7	32.1	7.1	23.4	1.0	13.3	7.0

*A – Λάχανο, Αγ. Στέφανος, Βιολογική καλλιέργεια, κοντά σε δάσος; B – Λάχανο, Μαραθών, Συμβατική καλλιέργεια ; C – Λάχανο, Μαραθών, Βιολογική καλλιέργεια; D – Μπρόκολο, Μαραθών, Βιολογική καλλιέργεια; E – Αγρανάπαιση, Μαραθών, Βιολογική καλλιέργεια F – Αγ. Στέφανος, δασικό έδαφος ; G – Αγ. Στέφανος, Πάνω τμήμα χόρτου Δάσους; H – Λάχανο, Αγ. Στέφανος,

Με τη παραπάνω δολωματική μέθοδο στα υπό εξέταση εδάφη εντοπίστηκε η παρουσία των εντομοπαθογόνων μυκήτων *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* και *I. fumosorosea*.

Ο εντομοπαθογόνος μύκητας *Beauveria bassiana* βρέθηκε και απομονώθηκε από όλα τα δείγματα και προσέβαλε σε ποσοστό 20.0% έως 86.2% τις προνύμφες του *Galleria mellonella*. Ο εντομοπαθογόνος μύκητας *Metarhizium anisopliae* απομονώθηκε από 6 εξεταζόμενα δείγματα εδάφους και μολύνοντας τις προνύμφες της *Galleria mellonella* σε ποσοστό 10.0% έως 71.4% CFU x 10³ Ο μύκητας *I. fumosorosea* που απομονώθηκε κατά την διάρκεια της έρευνας , για πρώτη φορά στην Ελλάδα εμφανίστηκε μόνο σε 2 δείγματα τα οποία προέρχονταν από εδάφη οργανικής διαχείρισης και σε δασικά δειγματα.

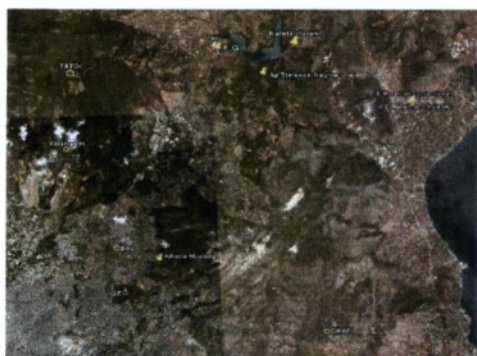
Πιο κάτω παρατίθενται οι χάρτες των περιοχών όπου έγιναν δειγματοληψίες.



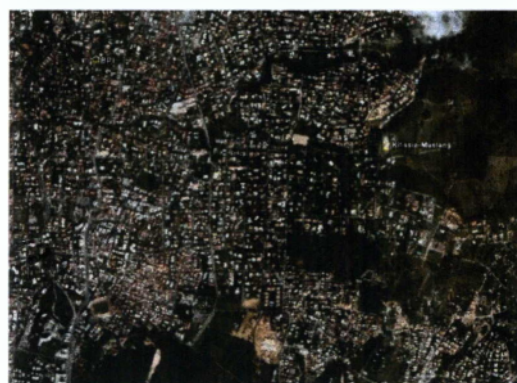
Πάτρα (Ν. Αχ. αίας), Λαγκάδια Κάψια και Δημητσάνα (Ν. Αρκαδίας)



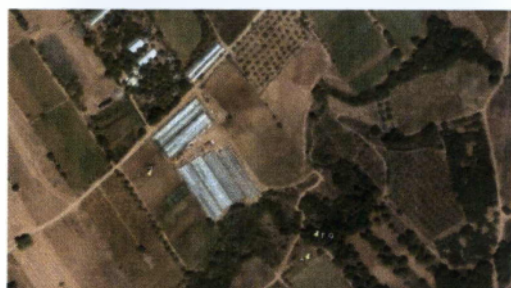
Θήβα, Τατόι, Καλέντζι, Άγιος Στέφανος, Πικέρμι, Ντράφι, Μαραθών, Κηφισιά και Ινσ. Γεωπ. Επιστημών (Μαρούσι)



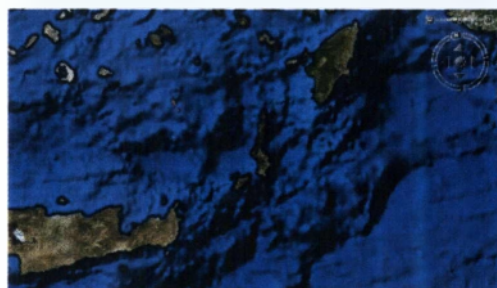
Καλέντζι (δασικό έδαφος), Άγιος Στέφανος (δασικό έδαφος χούμμος) δάσος Ι.Γ.Ε.



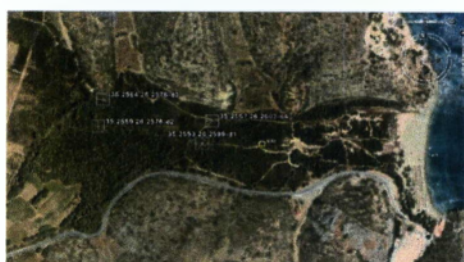
Κηφισιά



Άγιος Στέφανος (καλλιέργειες)



Κρήτη και Ρόδος



Βάνι (φαινικόδασος) στην Κρήτη



Ρόδος (δασικό έδαφος)

Πίνακας 4: Εντομοπαθογόνοι Μύκητες που βρέθηκαν σε διάφορα αρθρόποδα στην Ελλάδα

Μύκητας	Ξενιστής	Περιοχή	Γεωγρ. Πλάτος	Γεωγρ. Μήκος
Entomophthorales				
<i>Erynia conica</i>	Diptera	Τατόι	38° 9'44.87"N	23°47'32.09"E
<i>Pandora neoaphidis</i>	<i>Aphis fabae</i>	Αγ. Στέφανος	38°10'20.94"N	23°52'9.52"E
Hyphomycetales				
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Malacosoma neustria</i>	Τατόι	38° 9'44.87"N	23°47'32.09"E
<i>Beauveria bassiana</i>	Heteroptera	Τατόι	38° 9'44.87"N	23°47'32.09"E
<i>Beauveria bassiana</i>	Coleoptera	Τατόι	38° 9'44.87"N	23°47'32.09"E
<i>Beauveria bassiana</i>	Dermaptera	Τατόι	38° 9'44.87"N	23°47'32.09"E
<i>Beauveria bassiana</i>	Hymenoptera (ant)	Τατόι	38° 9'44.87"N	23°47'32.09"E
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Rhynchophorus ferrugineus</i>	Γούβες (Κρήτη)	35° 19' 28,7" N	25° 18' 30,9" E
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Rhynchophorus ferrugineus</i>	Ελληνικό (Αττική)	37° 53'15"N	23°43'42.24"E
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Coccinella septempunctata</i>	Κιθαιρών	38° 11'3.12"N	23°14'58.2"E
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Zabrus tenebrioides</i>	Θήβα	38°21'6.03"N	23° 9'59.76"E
<i>Hirsutella thompsonii</i>	<i>Abacarus sp.</i> (Eriophyidae)	Κηφισιά	38° 4'52.85"N	23°48'44.98"E
<i>Lecanicillium cf. psalliotae</i>	Collembola	Τατόι	38° 9'44.87"N	23°47'32.09"E
<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Rhynchophorus ferrugineus</i>	Γούβες (Κρήτη)	35° 19' 28.7" N	25° 18' 30.9" E
<i>Syspastospora parasitica</i>	mycoparasite of <i>B. bassiana</i>	Κιθαιρών	38° 11'3.12"N	23°14'58.2"E

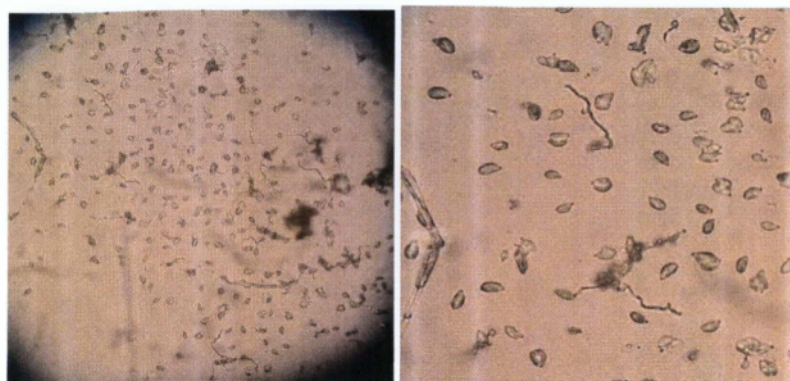
Συνολικά στην Ελλάδα βρέθηκαν 6 είδη εντομοπαθογόνων μυκήτων σε διάφορα αρθρόποδα (κυρίως έντομα και ακάρεα) και ένας υπερπαρασιτικός μύκητας.

Βρέθηκαν δύο είδη της τάξης Entomophthorales (*Erynia conica* και *Pandora neoaphidis*). Το *Erynia conica* καταγράφηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα. Επίσης βρέθηκαν 4 εντομοπαθογόνα είδη από την τάξη Hyphomycetales σε έντομα και ακάρεα. Το *B. bassiana* βρέθηκε σε όλα τα οικοσυστήματα.

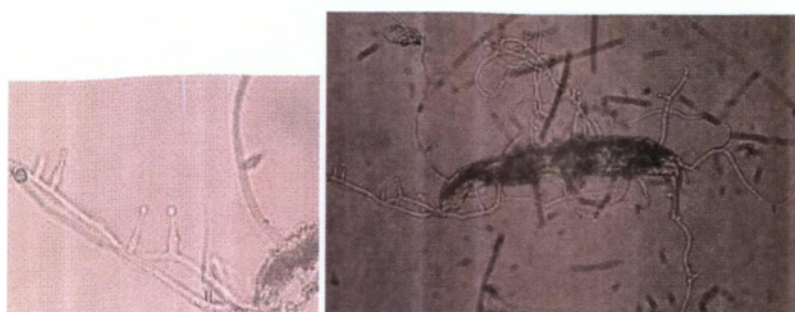
Οι καταγραφές του *Hirsutella thompsonii* στο *Abacarus hystrix* (Acari: Eriophyiidae) και του *Lecanicillium* cf. *psalliotae* σε Collembola είναι νέες για την Ελλάδα.



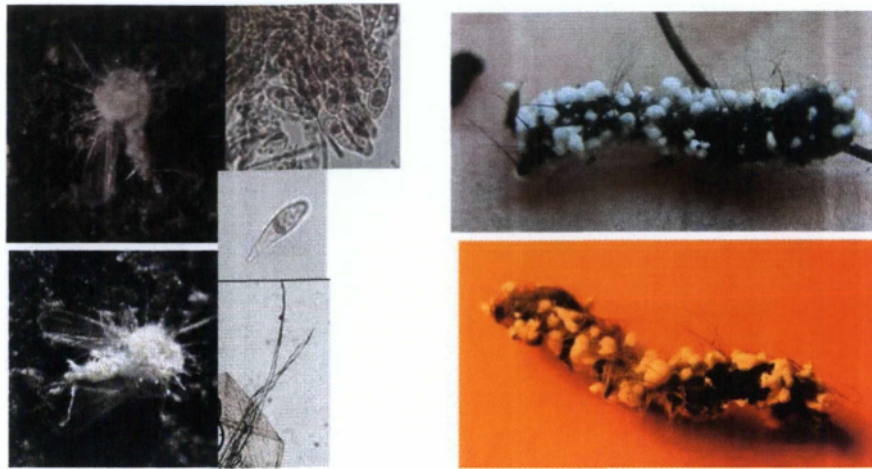
Εικόνα 21: *Aphis fabae* προσβεβλημένη από *Pandora neoaphidis*.



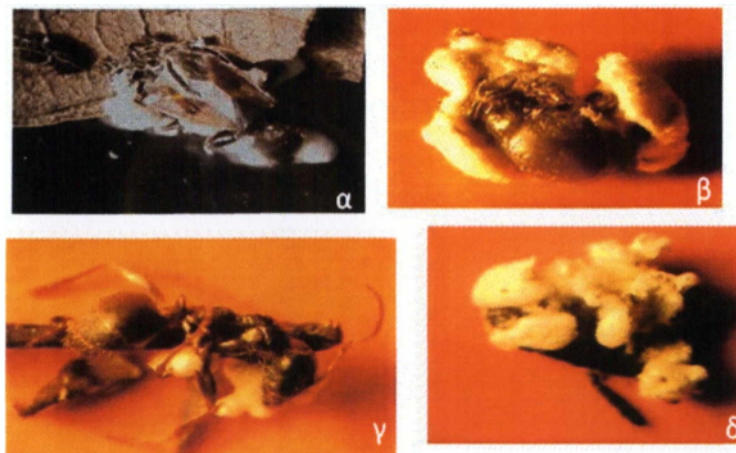
Εικόνα 22: Μικροσκοπική παρατήρηση του *Pandora neoaphidis*.



Εικόνα 23: *Hirsutella thompsonii* σε άκαρι Eriophyiidae



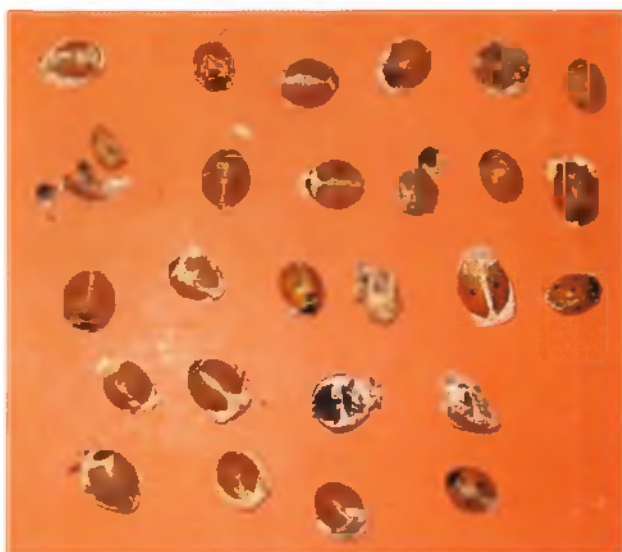
Εικόνα 24: Δίπτερα προσβεβλημένα από *Entomophthora variabilis* (αριστερά) και *Malacosoma neustria* (Lepidoptera: Lasiocampidae) προσβεβλημένο από *Beauveria bassiana* (δεξιά)



Εικόνα 25: *Beauveria bassiana* σε α) Heteroptera, β) Coleoptera, γ) Dermaptera δ) Hymenoptera



Εικόνα 26: *Beauveria bassiana* σε *Rhynchophorus ferrugineus* (άνω) και *Zabrus tenebrioides* (κάτω)



Εικόνα 27: *Beauveria bassiana* σε *Coccinella septempunctata*.

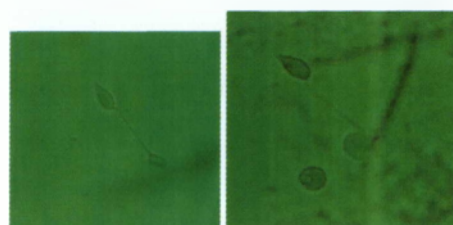
Ο εντομοπαθογόνος μύκητας *B. bassiana* βρέθηκε και απομονώθηκε από όλα τα δείγματα και προσέβαλε σε ποσοστό 20% έως 86.2% τις προνύμφες του *Galleria mellonella*. Ο εντομοπαθογόνος μύκητας *M. anisopliae* απομονώθηκε από 6 εξεταζόμενα δείγματα εδάφους και μολύνοντας τις προνύμφες της *Galleria mellonella* σε ποσοστό 10.0% έως 71.4%. Η απομόνωση που προκάλεσε τη μεγαλύτερη θνησιμότητα προήλθε από δείγμα εδάφους από καλλιέργεια μπρόκολου, στον Μαραθώνα.

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

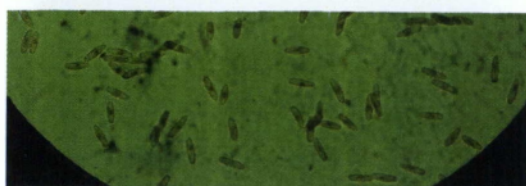
Αντίστοιχα στην Πολωνία βρέθηκαν 22 είδη εντομοπαθογόνων μυκήτων σε διάφορα αρθρόποδα (έντομα, άκαρεα και αράχνες). Δώδεκα είδη της τάξης Entomophthorales βρέθηκαν σε διάφορα έντομα και ένα είδος σε άκαρεα. Επίσης βρέθηκαν δέκα είδη μυκήτων της τάξεως Hyphomycetales σε έντομα, αράχνες και άκαρεα. Ο εντομοπαθογόνος μύκητας *Baueveria. bassiana* βρέθηκε σε όλα τα υπό έρευνα οικοσυστήματα

Πίνακας 5: Εντομοπαθογόνοι Μύκητες που βρέθηκαν σε διάφορα αρθρόποδα στην Πολωνία

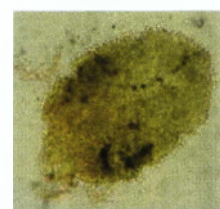
Εντομοπαθογόνος Μύκητας	Ξενιστής	Τοποθεσία
Entomophthorales		
<i>Entomophthora muscae</i>	Diptera	Białowieża
<i>Entomophthora planchoniana</i>	Aphids	Siedlce
<i>Neozygites floridana</i>	<i>Tetranychus urticae</i>	Siedlce
<i>Neozygites parvispora</i>	Thrips	Siedlce
<i>Pandora neoaphidis</i>	Aphids	Siedlce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



Εικόν 29: Κονίδια του *Zoophtora* sp.



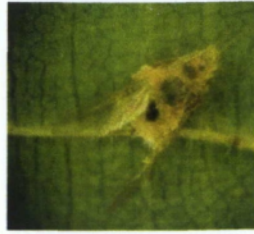
Εικόνα 28: *Zoophtora* sp. επί *Gastrophysa* sp.



Εικόνα 30: *Tetranychus* sp. προσβεβλημένο από *Neozygites floridana*



Εικ. 31: *Zoophthora* sp. σε *Orthoptera*



Εικ. 32: *Zoophthora* sp. σε *Diptera*



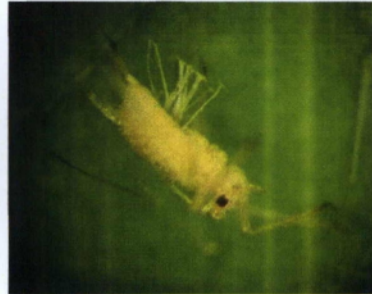
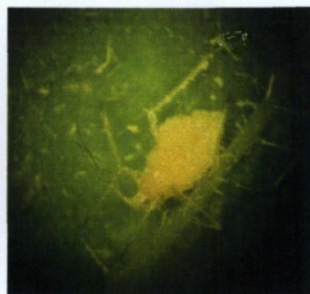
Εικ. 33: *Entomophthorales* σε *Diptera*



Εικ. 34: *Entomophthora planchoniana* σε αφίδες



Εικ. 35: Αφίδα προσβεβλημένη από *Hirsutella arhidis*



Εικ. 36: Αφίδα προσβεβλημένη από Arhidid by *Pandora neoarhidis*



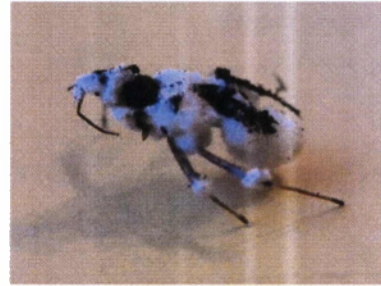
Εικόνα 37: Νύμφη λεπιδοπτερου προσβεβλημένη από *Paecilomyces tenuipes*.



/Εικόνα 38: Αράχνη προσβεβλημένη από *Gibelulla*



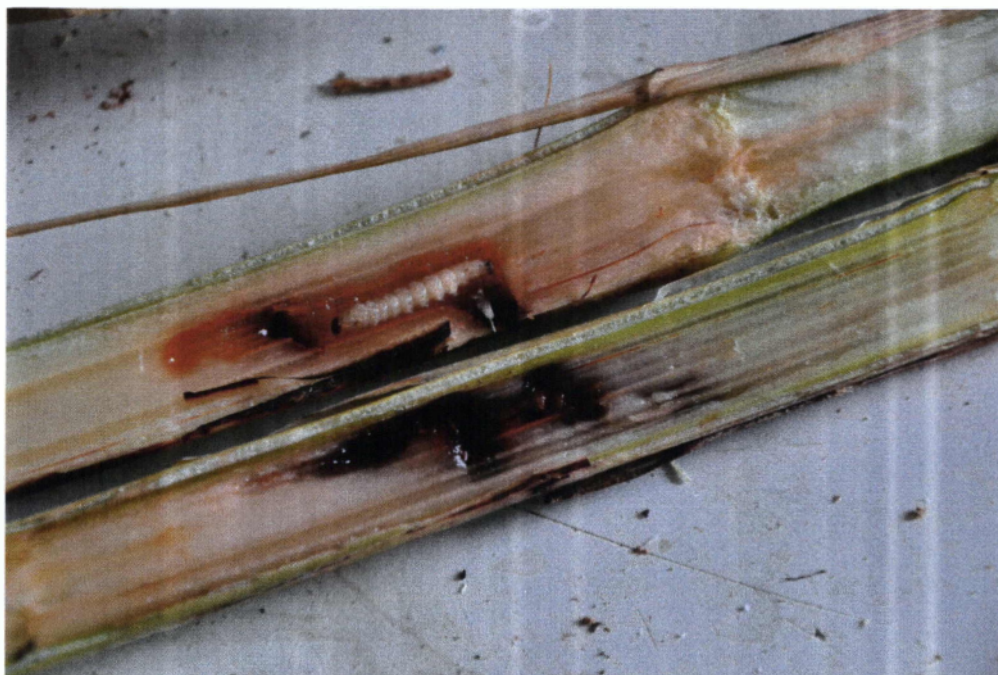
Εικ. 39: Προνόμφη *Elateridae* προσβεβλημένη από *Isaria nipponica*



Εικ. 40: *Sitona lineatus* προσβεβλημένο από *Beauveria bassiana*

3.2. Δημιουργία ενδοφυτικής συμβίωσης

Κατά την δοκιμή για τη δημιουργία ενδοφυτικής συμβίωσης στα φυτά του σόργου, διαπιστώθηκε σημαντική μείωση του μέσου μήκους των στοών αλλά και της επιβίωσης των προνυμφών της σεζάμιας εντός των στοών.



Προγραμματίζονται περαιτέρω παρατηρήσεις επί των φυτών αυτών ούτως ώστε να διαπιστωθεί ο αποικισμός από τους εντομοπαθογόνους μύκητες και τυχόν μεταβολή στο χρωματισμό των φύλλων και στη φωτοσυνθετική ικανότητα.

Οι περισσότερες αναφορές για την επίδραση των ενδοφύτων στα φυτοφάγα έντομα έχουν επικεντρωθεί στους χλοοτάπητες και τις καλλιέργειες ποώδων φυτών, που έχουν εμβολιαστεί με ενδοφυτικούς μύκητες της οικογενείας Clavicipitaceae (Ascomycota: Hypocreales), που αποκίζουν συστηματικά τα περισσότερα ποώδη Poaceae, Juncaceae, και Cyperaceae (Clay, 1989, Breen, 1994). Παραδείγματος χάριν, η μολυσμένη με *Neotyphodium*, ήρα η πολυετής (*Lolium perenne* L.) και η φεστούκα η υψηλή (*Festuca arundinacea* Schreb.), έδειξαν να έχουν αρνητική επίδραση σε περισσότερα από 40 είδη εντόμων σε έξι ταξινομήσεις (Clement et al., 1994). Κάποιες φορές έχουν αναφερθεί ποικύλες επιδράσεις σε δύο αφίδες, τη

μελανοπράσινη αφίδα της βρώμης (*Rhopalosiphum padi* (L.) και την αφίδα *Metoroporphium dirhodum* (Walker) καθώς και στο έντομο *Mayetiola destructor* (Say) (Diptera, Cecidomyiidae) που εκτέθηκαν σε διαφορετικά είδη άγριων κριθαριών, μολυσμένων με *Neotyphodium*. Λιγότερες μελέτες έχουν εξερευνήσει αυτή τη σχέση σε μη-ποώδη συστήματα. Παρόλα αυτά, ο Jallow et al. (2004) ανέφερε σημαντικές αρνητικές επιδράσεις στην προνύμφη του *Helicoverpa armigera* Hubner που μεγάλωσε σε φυτά τομάτας μολυσμένα με ένα μη ποώδες ενδόφυτο, το *Acremonium strictum* W. Gams.

Κάποια ενδόφυτα ανήκουν σε είδη *Beauveria* (Ascomycota: Hypocreales). Το *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin αναφέρθηκε ως ενδόφυτο του αραβοσίτου (Vakili, 1990, Bing and Lewis, 1991, 1992a,b, Lomer et al., 1997, Cherry et al., 1999, 2004, Wagner and Lewis, 2000, Arnold and Lewis, 2005), της πατάτας, του βαμβακιού, του ξάνθιου, του τάτουλα (Jones, 1994), της τομάτας (Leckie, 2002, Ownley et al., 2004), στο συγγενή του κακάου *Theobroma gileri* (Evans et al., 2003), στον φλοιό του *Carpinus caroliniana* Walter (Bills and Polishoo, 1991), σε σπόρους και βελόνες του *Pinus monticola* Dougl. ex. D. Don (Ganley and Newcombe, 2005), σε παπαρούνες (Quesada-Moraga et al., 2006), σε δαμασκηνιές (Gomez-Vidal et al., 2006), σε μπανανιές (Akello et al., 2007) και σε καφέ (Posada et al., 2007, και εδώ). Επιπλέον, βλαστάρια κακάου (Posada and Vega, 2005) και καφέ (Posada and Vega, 2006) εμβολιάστηκαν επιτυχώς με *B. bassiana* με την αιώρηση σπορίων στο ριζίδιο του βλαστού, αμέσως μετά το φύτερωμα. Αναφερόμενος στο *Beauveria globulifera* (= *B. bassiana*) ο Steinhaus (1949) έγραψε: «Αναπτύσσεται επίσης σε καλαμπόκι και σε κάποια άλλα συγκεκριμένα φυτά, αλλά όχι τόσο καλά όσο σε έντομα.» Δε δόθηκαν συγκεκριμένες λεπτομέρειες για το πως έγιναν αυτές οι παρατηρήσεις. Οι Fuller-Schaefer κ.α. (2005) έχουν κάνει αναφορές για την αποίκηση των ριζών των ζαχαρότευτλων από τα εντομοπαθογόνα *B. bassiana* και *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin.

Άλλοι εντομοπαθογόνοι μύκητες που έχουν επίσης αναφερθεί ως ενδόφυτα είναι: *Verticillium (Lecanicillium) lecanii* (Zimm.) Viegas σε Araceae (Petrini, 1981), *V. lecanii* και *Paecilomyces farinosus* (Holmsk.) Brown & Smith (= *Isaria farinosa*) στον κορμό του *C. caroliniana* (Bills and Polishook, 1991), *Paecilomyces* sp. σε *Musa acuminata* (Cao et al., 2002) και στο ρύζι (Tian et al., 2004); και *Paecilomyces varioti* Bain, σε μαγγρόβια φυτά (Ananda and Sridhar, 2002). Επίσης το *Oadosporium* έχει αναφερθεί ως ενδόφυτο σε *Festuca* (An et al., 1993), σε αρκετά

Ericaceae (Okane et al., 1998), σε διάφορα ποώδη (Dugan and Lupien, 2002), μαγγρόβια φυτά (Suryanarayanan et al., 1998; Ananda and Sridhar, 2002), σε *Cuscuta reflexa* Roxb., *Abutilon indicum* (L.) σιτάρι (Larran et al., 2002a), βελανιδιές (Gennato et al., 2003), *Ilex* (Takeda et al., 2003), κάκτους (Suryanarayanan et al., 2005), και σε μήλα (Cammatti-Sartori et al., 2005).

Αυτή η αρνητική επίδραση των ενδοφυτικών μυκήτων στα φυτοφάγα έντομα έχει γενικά αποδοθεί στην παραγωγή μεταβολιτών (Funk et al., 1983; Bush et al., 1997; Clay, 1988; Clay and Schardl, 2002).

Από τα ευρήματα της παρούσας μελέτης αλλά και από την αντίστοιχη εμπειρία που καταγράφεται στη διεθνή βιβλιογραφία φαίνεται ότι οι εντομοπαθογόνοι μύκητες έχουν την ικανότητα να συνεισφέρουν στην αντιμετώπιση εχθρών, στο πλαίσιο της ολοκληρωμένης παραγωγής, και με την ιδιότητά τους ως ενδόφυτα.

Βιβλιογραφία

- Anagnou-Veroniki, M. and Kontodimas, D.C., 2003. Laboratory tests of the effect of *Bacillus thuringiensis* on grape berry moth *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) and on the pseudococcids' predator *Nephus includens* (Coleoptera: Coccinellidae). *IOBC/WPRS Bulletin*, 26(8): 117-119.
- Anagnou-Veroniki, M., Kontodimas, D.C., 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.
- B.A. Bailey, H. Bae, M.D. Strem, J. Crozier, S.E. Thomas, G.J. Samuels, B.T. Vinyard, K.A. Holmes. 2008. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theodorma cacao*. *Biological Control*, p. 24-35
- Balazy, S 1993. *Fungi*. Vol XXIV P 79, 102, 136, 176, 195
- 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.
- Donald G. McNeil Jr., Fungus Fatal to Mosquito May Aid Global War on Malaria, *The New York Times*, 10 June 2005
- 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.
- Essig, E. O. 1931. A History of Entomology. Macmillan co., NY. EPA Factsheet. Retrieved on 2006-12-14. 1029 pp.
- Fernando E. Vega, Francisco Posada, M. Catherine Aime, Monica Pava-Ripoll, Francisco Infante, Stephen A. Rehner, 2008. Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control*, p. 72-82.
- G. Kulbau, C. Bacon. 2008. Clavicipitaceous endophytes: Their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses. *Biological Control*, p. 57-71.
- J.T. De Souza, B.A. Bailey, A.W.V. Pomella, E.F. Erbe, C.A. Murphy, H. Bae, P.K. Hebbar. 2008. Colonization of cacao seedlings by *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the witches broom pathogen, and its influence on plant growth and resistance. *Biological Control*, p. 36-45
- 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.
- Kleespies, R. G., Vossbrinck, C. R., Lange, M. & Jehle, J. A. (2003). Morphological and molecular investigations of a microsporidium infecting the European grapevine moth, *Lobesia botrana* Den. et Schiff., and its taxonomic determination as *Cystosporogenes legeri* nov. comb. *J. Invert. Pathol.* 83, 240-248.
- 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 *Metharhizium 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*
- Kleespies, R., H. Bathon and G. Zimmermann, 1989. Untersuchungen zum natürlichen Vorkommen von entomopathogenen Pilzen und Nematoden in verschiedenen Böden in der Umgebung von Darmstadt. *Gesunde Pflanzen* 41(10): 350–355.
- Kontodimas, D.C., Anastasopoulou, O., and Anagnou-Veroniki, M., 2005. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* and azadirachtin compounds against *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera, Tortricidae). *International Symposium on Organic Agriculture in the Mediterranean – Problems and Perspectives*. Chania, Crete, Greece, November 9-11, 2005. 30
- Kontodimas, D.C., Anastasopoulou, O., Chaleplidi, S. and Anagnou-Veroniki, M., 2005. Laboratory evaluation of *Bacillus thuringiensis* compounds on the grape berry moth *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera, Tortricidae) and the mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera:

- Pyralidae). *COST 862 Meeting: "Bacterial Toxins for Insect Control"*, Nitra, Slovakia, September 14th-18th 2005.
- Kontodimas, D.C., Athanassiou, C.G., Kavallieratos, N.G. and Anagnou-Veroniki, M., 2005. Insecticidal effect of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin against *Sitophilus oryzae* (L.) after short exposures on treated wheat. *10th European Meeting of the IOBC/WPRS Working Group "Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes"*: "Invertebrate Pathogens in Biological Control: Present and Future", 10 – 15 June, 2005, Locoronto, Bari, Italy.
- Kontodimas, D.C., 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 Εκπαιδευσεως 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.
- Luis C. Mejia, Enith I. Rojas, Zuleyka Maynard, Sunshine Van Bael, A. Elizabeth Arnold, Prakash Hebbar, Gary J. Samuels, Nancy Robbins, Edward Allen Herre, 2008. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control*, p. 4-14.
- Λυκουρέσης, 1995. *Ολοκληρωμένη αντιμετώπιση εντόμων –εχθρών καλλιεργειών. Πανεπιστημιακές παραδόσεις*. Γεωπονικό πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, 121 σελ.
- Mietkiewski, R.T., J.K. Pell and S.J. Clark, 1997. Influence of pesticide use on the natural occurrence of entomopathogenic fungi in arable soils in the UK: Field and laboratory comparisons. *Biocontrol Science and Technology* 7: 565–575.
- McNeil, Donald G. Jr., Fungus Fatal to Mosquito May Aid Global War on Malaria, *The New York Times*, 10 June 2005
- Nickle, W.R and Welch H.E, 1984. *Insect Nematodes*. In: Plant and Insect Nematodes. Ed: W.R. Nickle, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, p: 627-650.
- Phillips, D. H. & Burdekin, D. A. (1992). *Diseases of Forest and Ornamental Trees*. Macmillan. ISBN 0-333-49493-8.
- Paul A. Backman, Richard A. Sikora. 2008. Endophytes: An emerging tool for biological control. *Biological Control*, p. 1-3.
- 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

- Rachel L. Melnick, Nina K. Zidack, Bryan A. Bailey, Siela N. Maximova, Mark Gultinan, Paul A. Backman. 2008. Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. From annual as potential biological control agents of black pod rot of cacao. *Biological Control*, p. 46-56.
- Richard A. Sikora, Luis Pocasangre, Alexandra zum Felde, Bjoen Niere, Tam T. Vu, A.A. Dababat, 2008. Mutualistic endophytic fungi and in-plant suppressiveness to plant parasitic nematodes. *Biological Control*, p. 15-23.
- Roditakis E., Couzin I.D., Balrow, K., Franks, N.R. & Charnley A.K., 2000. Improving secondary pick up of insect fungal pathogen conidia by manipulating host behaviour. *Annals of Applied Biology*, 137(3): 329-335.
- Rehner, S. A., & Buckley, E. (2005). "A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs". *Mycologia* 97: 84-98.
- Screen, S.E., Hu, G. and St. Leger, R. J. 2002. Transformants of *Metarhizium anisopliae* sf. *anisopliae* overexpressing chitinase from *Metarhizium anisopliae* sf. *acridum* show early induction of native chitinase but are not altered in pathogenicity to *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology* 78: 260-266.
- Simmonds, F. J., J. M. Franz and R. I. Sailer. 1976. History of Biological Control. Ch. 2 In Huffaker, C. B. and P. S. Messenger (eds). *Theory and Practice of Biological Control*. Academic Press, NY. 788 pp.
- Smith, J.E., Lewis, CW., Anderson, J.G. and Solomons, G.L., 1994. *Mycotoxins in human nutrition and health*. Ed: EUR 16048 En Directorate – General, p: VIII, 138-139.
- Solomon, Eldra, Linda Berg, Diana Martin. 2002. *Biology*. Brooks/Cole.
- Steinhaus, E. A. 1949. *Principles of Insect Pathology*. McGraw-Hill Book Company, Inc., N.Y., U.S.A., p: 166-177, 228-9, 318-9, 417-421, 633-7.

- Steinhaus, E. A. 1956. Microbial control - the emergence of an idea. *Hilgardia* 26(2):107-60.
- Steinhaus, E. A. 1964. *Microbial diseases of insects*, In: Biological Control of Insects Pests and Weeds, Ed: DeBach, P., London, p: 521-2.
- 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.
- 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.
- Werren J.H. 1997. Biology of Wolbachia. *Annu. Rev. Entomol.* 42: 587- 609
- Zare,R. and Gams, W. (2001). A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. III. Generic classification. *Nova Hedwigia.* 72. 329-337.
- Zimmermann, G., 1986. The *Galleria* bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil. *J. Appl. Ent.* 102: 213-215.

Wagner, B. L., and L. C. Lewis. 2000. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology* 66:3468-3473.

Welch, H.E. 1963. *Nematode Infections*. In: *Insect Pathology, An Advanced Treatise*, Volume 2, Ed: Steinhaus, E, Academic Press, London, p: 364-365.