

ΑΤΕΙ ΔΥΤΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ  
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ  
ΑΜΑΛΙΑΔΑ

**ΤΙΤΛΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:**

**“ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΔΡΑΣΗΣ  
ΕΝΤΟΜΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ  
ΝΗΜΑΤΩΔΩΝ ΣΤΗΝ ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΩΝ  
ΠΡΟΝΥΜΦΩΝ ΤΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ *EPHESTIA*  
*KUEHNIELLA* ”**

ΤΗΣ: **ΙΩΑΝΝΑΣ Β. ΖΑΜΠΑΡΑ**

ΕΠΙΒΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: **Δρ ΕΙΡΗΝΗ ΚΑΡΑΝΑΣΤΑΣΗ**

- ΑΜΑΛΙΑΔΑ 2014 -

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ (Ευχαριστίες).....	i
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	ii
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1. Το έντομο <i>Ephestia kuehniella</i> .....	2
1.1.1. Γεωγραφική κατανομή και ξενιστές.....	2
1.1.2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά της <i>Ephestia kuehniella</i> .....	3
1.1.3. Βιολογία της <i>Ephestia kuehniella</i> .....	5
1.1.4. Καταπολέμηση της <i>Ephestia kuehniella</i> .....	6
1.2. Ολοκληρωμένη Αντιμετώπιση των Εχθρών (Integrated Pest Management).....	7
1.3. Βιολογική καταπολέμηση.....	8
1.3.1. Παρασιτοειδή και αρπακτικά έντομα.....	8
1.3.2. Εντομοπαθογόνοι ιοί.....	9
1.3.3. Εντομοπαθογόνα πρωτόζωα.....	10
1.3.4. Εντομοπαθογόνοι μύκητες.....	10
1.3.5. Εντομοπαθογόνοι νηματώδεις (EPNs).....	11
1.3.5.1. <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> Poinar – Μορφολογία των μολυσματικών ανηλίκων.....	12
1.3.5.2. Το βακτήριο <i>Photorhabdus luminescens</i> .....	13
1.3.5.3. Βιολογικός κύκλος του νηματώδη <i>H. bacteriophora</i> .....	14
1.3.5.4. Τρόπος δράσης του νηματώδη.....	15
1.3.6. Εντομοπαθογόνα βακτήρια του γένους <i>Bacillus</i> .....	16
1.3.6.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	16
1.3.6.2. Εμπορικά σκευάσματα του <i>B. thuringiensis</i> .....	20
1.4. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ εντομοπαθογόνων μικροοργανισμών.....	21
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	23
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	24
3.1. Εκτροφή των εντόμων.....	24
3.2. Παθογόνοι παράγοντες.....	26
3.2.1. Νηματώδεις.....	26
3.2.2. Βακτήριο.....	26
3.3. Μελέτη της επίδρασης των παθογόνων μικροοργανισμών επί των προνυμφών.....	26
3.4. Μαθηματική μέθοδος προσδιορισμού της αλληλεπίδρασης των παθογόνων παραγόντων.....	27
3.5. Στατιστική επεξεργασία.....	28
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	29
4.1. Μακροσκοπική εξέταση των προνυμφών <i>E. kuehniella</i> .....	34
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	37
6. ΕΠΙΛΟΓΟΣ.....	39
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	40

## **ΠΡΟΛΟΓΟΣ (Ευχαριστίες)**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμότατα την επιβλέπουσα Δρα Ειρήνη Καραναστάση, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Τεχνολόγων Γεωπόνων του ΑΤΕΙ Δυτικής Ελλάδος, για την σημαντική καθοδήγησή της και τη σωστή επίβλεψη της εργασίας, αλλά και για την ευκαιρία που μου προσέφερε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο πείραμα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμότατα τον Δρα Σπυρίδωνα Μαντζούκα του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών, για την πολύτιμη στήριξη και καθοδήγησή του κατά την εκπόνηση του πειράματος και τη γραφή της εργασίας.

Την εργασία αφιερώνω στην οικογένειά μου για την αγάπη τους, ιδιαίτερος στον αδελφό μου και συμφοιτητή μου Χριστόφορο, ο οποίος με βοήθησε και πρακτικά κατά τη διάρκεια του πειράματος.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία στηρίζεται στη μελέτη της συνδυασμένης δράσης του εντομοπαθογόνου βακτηρίου *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) και του εντομοπαθογόνου νηματώδη *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Nematoda: Rhabditida) επί προνυμφών του εντόμου *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) σε σπόρους σίτου. Το έντομο *Ephestia kuehniella* συγκαταλέγεται στα σημαντικότερα έντομα-εχθρούς αποθηκευμένων γεωργικών προϊόντων.

Στις δοκιμές χρησιμοποιήθηκαν 10 προνύμφες 4<sup>ης</sup> ηλικίας οι οποίες τοποθετήθηκαν σε τρυβλία Petri τα οποία περιείχαν 10g αποστειρωμένου σιταριού. Το σιτάρι είχε προηγουμένως ψεκάσει με υδατικό διάλυμα βακίλου στις συγκεντρώσεις των 500ppm, 1500 ppm και 3000ppm. Στη συνέχεια στις προνύμφες εφαρμόστηκε 1ml υδατικού διαλύματος το οποίο περιείχε 1000 μολυσματικά ανήλικα του νηματώδη (1000II/ml). Τα τρυβλία, αφού σφραγίστηκαν καλά, τοποθετήθηκαν με τυχαίο τρόπο σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών όπου η θερμοκρασία ήταν σταθερή στους 25°C και η υγρασία σε επίπεδο 80% .

Από τον συνδυασμό των εντομοπαθογόνων παραγόντων στις 3 διαφορετικές δόσεις του βακίλου προέκυψαν διαφορετικά ποσοστά θνησιμότητας. Αξιοσημείωτη είναι η υψηλή δραστηριότητα του συνδυασμού Btk - νηματώδη στην χαμηλή συγκέντρωση του βακίλου (500ppm - 94% θνησιμότητα), αλλά και η μειωμένη δραστηριότητα του συνδυασμού Btk - νηματώδη στις δύο υψηλότερες δόσεις του βακίλου (1500 και 3000ppm - 27% και 44% θνησιμότητα αντίστοιχα).



# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Απώλειες της γεωργικής παραγωγής σημειώνονται όχι μόνο κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου αλλά και μετασυλλεκτικά, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Ο όρος αποθήκευση αναφέρεται στους μετασυλλεκτικούς χειρισμούς που αφορούν στην επεξεργασία, την συσκευασία και μεταφορά των γεωργικών προϊόντων και τροφίμων. Η αποθήκευση γίνεται μέσα σε διάφορους χώρους όπου πραγματοποιούνται τα μετασυγκομιστικά στάδια, δηλαδή τα στάδια από την συγκομιδή έως και την τελική διάθεση του προϊόντος στην αγορά (Μπουχέλος 1996, Σφακιωτάκης 2004). Πλήθος, λοιπόν, αγροτικών προϊόντων που δεν προωθούνται άμεσα στην κατανάλωση, αποθηκεύονται για μεγάλο ή μικρό χρονικό διάστημα σε κατάλληλα διαμορφωμένους αποθηκευτικούς χώρους. Από τη στιγμή της αποθήκευσης και μετά ξεκινά η ποιοτική υποβάθμιση του προϊόντος λόγω χρονικής φθοράς (Σφακιωτάκης 2004).

Είναι μεγάλη λοιπόν ανάγκη να διατηρούνται οι ποιοτικές και ποσοτικές απώλειες σε όσο το δυνατόν χαμηλότερα επίπεδα για όσο διάστημα το προϊόν παραμένει στην αποθήκη. Οι απώλειες αυτές που αποδίδονται σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες του περιβάλλοντος της αποθήκης και στην αλληλεπίδραση αυτών, έχουν γίνει αντικείμενο μελέτης από πολλούς ερευνητές (Haines 1991, Hall 1970, Rowley 1984). Οι σχετικές μελέτες θεωρούν την μάζα του προϊόντος ως οικοσύστημα, όπου το αβιοτικό φυσικό και χημικό περιβάλλον αλληλεπιδρά με την χλωρίδα και πανίδα μέσω των τροφικών σχέσεων της παραγωγής, κατανάλωσης και αποσύνθεσης (Calderon 1981, Dunkel 1992, Haines 1991, Sinha 1973, 1995). Η συνεχής αυτή αλληλεπίδραση οδηγεί στην ποσοτική και ποιοτική υποβάθμιση του προϊόντος.

Μεγάλο ποσοστό των μετασυλλεκτικών απωλειών οφείλεται στη δραστηριότητα εντόμων, ακάρεων, τρωκτικών, βακτηρίων και μυκήτων. Τα έντομα, στα οποία αποδίδεται το 10% των απωλειών των αποθηκευμένων προϊόντων, συνθέτουν τη μεγαλύτερη και κυριότερη κατηγορία προκαλώντας, μέσω της διατροφικής και αναπαραγωγικής τους δραστηριότητας, σημαντικές ποιοτικές και ποσοτικές απώλειες (Σταμόπουλος 1995, Xu 2010).

Επομένως, στην κατηγορία των εντόμων-αποθηκών συγκαταλέγονται όσα έντομα προσβάλλουν και ζημιώνουν αμέσως ένα προϊόν, και αναπτύσσονται και αναπαράγονται σε μία αποθήκη ή άλλο χώρο όπου διατηρούνται προϊόντα και

τρόφιμα. Σε αποθηκευτικούς χώρους απαντώνται και άλλα έντομα, τα οποία δεν τρέφονται με τα αποθηκευμένα προϊόντα αλλά με άλλα έντομα ή αρθρόποδα (αρπακτικά ή παράσιτα). Η παρουσία και μόνο αυτών των εντόμων, αν και αποτελεί ένδειξη της ύπαρξης προσβεβλημένων ή υποβαθμισμένων προϊόντων, συμβάλλει και αυτή στην υποβάθμιση των αποθηκευμένων τροφίμων. Τα κυριότερα έντομα-εχθροί αποθηκών ανήκουν στις Τάξεις των Λεπιδοπτέρων, Κολεοπτέρων και σπανιότερα Διπτέρων και Υμενοπτέρων (Μπουχέλος 1996, Σταμόπουλος 1995).

### 1.1. Το έντομο *Ephestia kuehniella*

Η *Ephestia kuehniella* Zeller είναι από τα σημαντικότερα έντομα αποθηκών, πλήττοντας κυρίως άλευρα και δημητριακά (Xu 2010). Η κατάταξη του εντόμου είναι η ακόλουθη:

Βασίλειο	Animalia
Φύλο	Arthropoda
Κλάση	Insecta
Τάξη	Lepidoptera
Υπεροικογένεια	Pyraloidea
Οικογένεια	Pyalidae
Υποοικογένεια	Phyctinae
Γένος	<i>Ephestia</i>
Είδος	<i>E. kuehniella</i>

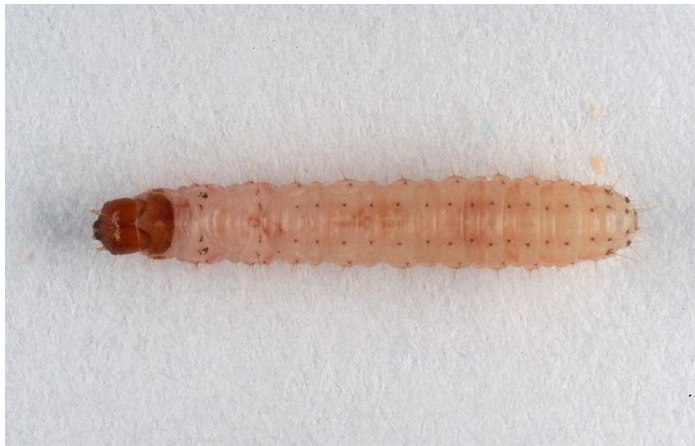
#### 1.1.1. Γεωγραφική κατανομή και ξενιστές

Τα περισσότερα έντομα αποθηκευμένων προϊόντων παρουσιάζουν ευρεία γεωγραφική κατανομή λόγω της εξάπλωσής τους μέσω της διεθνούς μεταφοράς προϊόντων και της δραστηριότητας του ανθρώπου. Το είδος *E. kuehniella* έχει κοσμοπολίτικο χαρακτήρα, ευρισκόμενο πρωτίστως σε εύκρατες και μεσογειακές περιοχές. Είναι πολυφάγο έντομο προσβάλλοντας μια μεγάλη γκάμα αποθηκευμένων προϊόντων. Η *E. kuehniella* τρέφεται με άλευρα, δημητριακά, ξηρούς καρπούς, σιτηρά, κ.ά. προϊόντα τα οποία αναπόφευκτα υποβαθμίζονται λόγω των περιττωμάτων, μετάξιων νημάτων, εκδυμάτων και βομβυκίων που παράγονται από τη δραστηριότητά της (Cox & Bell 1991, Sedlacek et al. 1996, Trematerra & Gentile 2010).

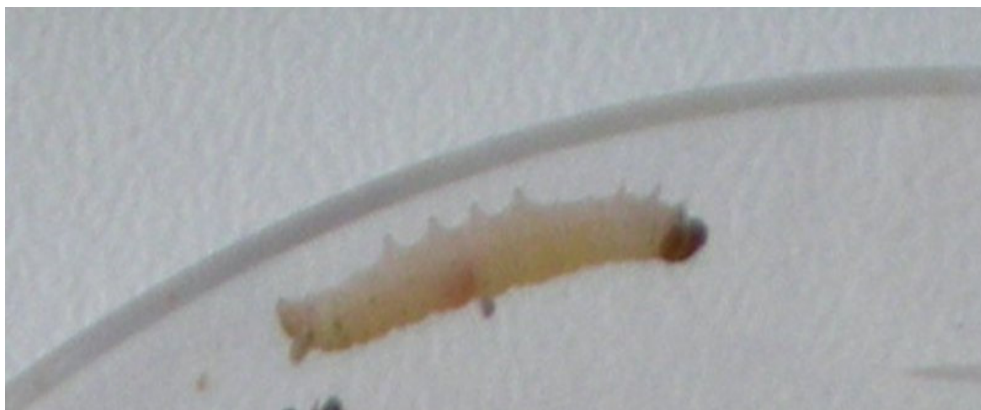
### 1.1.2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά της *E. kuehniella*

Το ωό είναι συνήθως οβάλ, λευκού χρώματος. Λίγο πριν εκκολαφθούν οι προνύμφες, το χρώμα των ωών αποκτά ένα ανοιχτό κίτρινο χρώμα λόγω της ανάπτυξης του εμβρύου (Xu 2010).

Η προνύμφη, υπόλευκου συνήθως χρώματος, έχει κεφαλή καλά αναπτυγμένη και μασητικά στοματικά μόρια. Η κεφαλή ξεχωρίζει από τον θώρακα, ο οποίος φέρει θωρακικούς πόδες και ψευδόποδες (Xu 2010) (Εικόνα 1.1.2.1., 1.1.2.2.). Η προνύμφη παραμένει σημαντικά ίδια κατά την ανάπτυξή της ενώ διαφέρει σε σημαντικό βαθμό από το ακμαίο στο οποίο τελικά εξελίσσεται (Xu 2010).



**Εικόνα 1.1.2.1.** Προνύμφη *E. kuehniella*.



**Εικόνα 1.1.2.2.** Προνύμφη *E. kuehniella* πειράματος, 4<sup>ης</sup> ηλικίας.

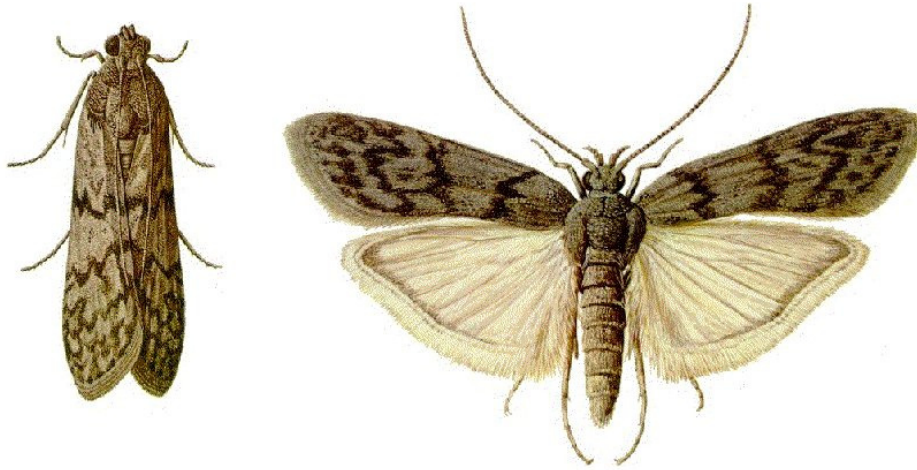


Η χρυσαλίδα, αν και αδρανής, αλλάζει διαρκώς και μορφολογικά και φυσιολογικά, έως ότου το σώμα της να μετατραπεί σε τέλειο έντομο. Έχει καφεκόκκινο χρώμα ενώ την τελευταία μέρα της ανάπτυξης της, προτού εξέλθει το ακμαίο, αποκτά βαθύ καφέ χρωματισμό (Xu 2010) (Εικόνα 1.1.2.3.). Το ακμαίο προκύπτει μετά από 24 ώρες. Το μέσο μήκος της χρυσαλίδας είναι 9mm (Xu 2010).



**Εικόνα 1.1.2.3.** Χρυσαλίδα *E. kuehniella*.

Το ακμαίο της *E. kuehniella* είναι το μεγαλύτερο σε μέγεθος έντομο του γένους του (Xu 2010). Το ενήλικο έχει μικρή σφαιρική κεφαλή με μακριές χειλικές προσαρκτίδες. Το μήκος του ανοίγματος των εμπρόσθιων πτερύγων είναι 20-25mm και οι πτέρυγες χαρακτηρίζονται από τρεις εγκάρδιες κυματοειδείς σκούρες γραμμές. Οι οπίσθιες πτέρυγες είναι ανοιχτού γκρι χρώματος (Xu 2010) (Εικόνα 1.1.2.4.).



**Εικόνα 1.1.2.4.** Ενήλικο άτομο *E. kuehniella*  
(<http://www.greatplainschemicals.com/pestid.html>)

#### 1.1.3. Βιολογία της *Ephestia kuehniella*

Η *E. kuehniella* έχει 4 στάδια ανάπτυξης (ωό – προνύμφη 6 ηλικίες – χρυσαλίδα – ακμαίο) και έως και 5 γενεές το χρόνο (Xu 2010).

Τα θηλυκά έχουν μικρότερη διάρκεια ανάπτυξης από τα αρσενικά. Οι αναπαραγωγικές δραστηριότητες (κάλεσμα, σύζευξη, ωοτοκία) λαμβάνουν χώρα κυρίως κατά τη διάρκεια της σκοτοφάσης. Τα θηλυκά είναι έτοιμα για σύζευξη και ωοτοκία σχεδόν αμέσως μετά την εμφάνισή τους. Εναποθέτουν τα ωά στην επιφάνεια των αλεύρων κατά ομάδες (Xu et al. 2008, Xu 2010).

Όταν οι νεαρές προνύμφες εκκολαφθούν, τρέφονται με τα αποθηκευμένα προϊόντα και υφαίνουν μετάξινα νήματα τα οποία χρησιμοποιούν ως καταφύγιο (Locatelli et al. 2008, Xu 2010) (Εικόνα 1.2.3.1.). Οι προνύμφες της πρώτης ηλικίας τρέφονται με το έμβryo του σπόρου διότι είναι πιο τρυφερό και πλούσιο σε πρωτεΐνες, ενώ οι πιο προχωρημένες ηλικίες καταναλώνουν και το περικάρπιο (Locatelli et al. 2008). Όταν φτάσουν στην τελευταία προνυμφική ηλικία, παύουν να τρέφονται και υφαίνουν κουκούλι για να διέλθουν το στάδιο της χρυσαλίδας (Xu 2010)

Η *E. kuehniella* έχει σχετικά περιορισμένες διατροφικές ανάγκες καθώς μπορεί να αναπτυχθεί σε επεξεργασμένα άλευρα. Το συγκεκριμένο είδος έχει υψηλές ανάγκες σε υδατάνθρακες ενώ η διατροφή που στερείται πρωτεϊνών επιφέρει επιβράδυνση της ανάπτυξης και αυξάνει τη θνησιμότητα των χρυσαλίδων (Locatelli et al. 2008).



**Εικόνα 1.2.3.1.** Τα χαρακτηριστικά μετάξινα νήματα τα οποία υφαίνουν οι προνύμφες.

#### 1.1.4. Καταπολέμηση της *Ephestia kuehniella*

Η *E. kuehniella* εντοπίζεται σε αποθήκες γεωργικών δημητριακών και αμυλούχων προϊόντων καθώς και σε αλευρόμυλους. Εφόσον η δράση του εντόμου αμεληθεί, δημιουργούνται προβλήματα στη ροή των προϊόντων προς τον εξοπλισμό, εξαιτίας των νημάτων που υφαίνουν οι προνύμφες. Επίσης, η παρουσία προνυμφών, περιττωμάτων, ιστού και εκδυμάτων στο τελικό προϊόν συνθέτει μια άκρως αρνητική εικόνα προϊόντος, απαγορευτικής για κατανάλωση. Το μεγαλύτερο ποσοστό των ατόμων του εντόμου εντοπίζεται σε 'κρίσιμα σημεία', κοντά δηλαδή στα μηχανήματα όπου οι ποσότητες τροφής αφθονούν και οι περιβαλλοντικές συνθήκες είναι σε ευνοϊκά για το έντομο επίπεδα (Trematerra & Gentile 2010).

Οι πρακτικές αντιμετώπισης του εντόμου βασίζονται ακόμα στην εφαρμογή χημικών καπνογόνων-εντομοκτόνων, μια ή δυο φορές ετησίως, και στην εφαρμογή εντομοκτόνων που δρουν εξ επαφής. Ειδικά στους μικρούς μύλους, προτιμώνται εντομοκτόνα με βάση τις φυσικές και χημικές πυρεθρίνες και τα οργανοφωσφορικά. Η απαγόρευση του βρωμιούχου μεθυλίου με το Πρωτόκολλο του Μόντρεαλ, η αυξανόμενη συνειδητοποίηση της βλαβερότητας των χημικών σκευασμάτων για την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον, αλλά και η αυξανόμενη ζήτηση των καταναλωτών για βιολογικά προϊόντα, έχουν στρέψει το ερευνητικό ενδιαφέρον σε

φιλικότερους προς το περιβάλλον τρόπους καταπολέμησης (Ayvaz et al. 2008, Trematerra & Gentile 2010).

## **1.2. Ολοκληρωμένη Αντιμετώπιση Εχθρών (Integrated Pest Management)**

Σε αντίθεση με τα φυσικά οικοσυστήματα, το οικοσύστημα της αποθήκης δημιουργείται και ελέγχεται από τον άνθρωπο (Sinha 1995). Όπως προαναφέρθηκε, η υποβάθμιση των αποθηκευμένων προϊόντων επάγεται από την αλληλεπίδραση των βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων του περιβάλλοντός της. Πιο συγκεκριμένα, οι αβιοτικοί παράγοντες που συμπεριλαμβάνουν τις ιδιότητες της αποθήκης (δομή και κατασκευή, θερμοκρασία, σχετική υγρασία, ατμοσφαιρική σύνθεση κ.ά.) και τις ιδιότητες του προϊόντος (είδος, θερμοκρασία προϊόντος, περιεκτικότητα σε υγρασία, μηχανικά χαρακτηριστικά κ.ά.), επηρεάζουν σημαντικά την δράση των βιοτικών παραγόντων που αποτελούνται από αρθρόποδα (έντομα και ακάρεα), τρωκτικά, μύκητες και άλλους μικροοργανισμούς (Pixton 1982, Prakash & Goel 1993).

Η Ολοκληρωμένη Αντιμετώπιση Εχθρών στους αποθηκευτικούς χώρους αποτελεί μία προσέγγιση, η οποία εφαρμόζει έναν εναρμονισμένο συνδυασμό μεθόδων υγιεινής, τεχνικών, τεχνολογικών, βιοτεχνολογικών, φυσικών μεθόδων καθώς και μεθόδων βιολογικής και χημικής καταπολέμησης, ο οποίος αποβλέπει στην επίτευξη του επιδιωκόμενου αποτελέσματος και την παράλληλη εξασφάλιση της υγείας του ανθρώπου και της προστασίας του περιβάλλοντος (Abo-el-Saad et al. 2011, Gassmann et al. 2008, Reichmuth 1996, Trematerra & Gentile 2010, Xu et al. 2008).

Η εγκατάσταση εντομοπροστατευτικών δικτύων και σητών, η διατήρηση της σωστής υγιεινής του χώρου αποθήκευσης και επεξεργασίας, και ο επιμελής έλεγχος για την αποφυγή ή/και διαπίστωση εστιών μόλυνσης συνιστούν μερικά από τα ενδεικτικά μέτρα προληπτικής φύσεως που έχουν από μόνα τους μεγάλη αξία (Σταμόπουλος 1995). Όταν όμως τα εκάστοτε προληπτικά μέτρα αποτυγχάνουν, είναι επιτακτική η ανάγκη καταπολέμησης των εντόμων-εχθρών για την αποφυγή ανεπανόρθωτων ζημιών στα αποθηκευμένα, έτοιμα προς κατανάλωση, προϊόντα.

Η πιο αποτελεσματική μέθοδος αντιμετώπισης θεωρείται ακόμα και σήμερα η χημική μέθοδος, αν και η χρήση της παρουσιάζει μια σειρά σημαντικών μειονεκτημάτων, όπως οι επιβλαβείς συνέπειες στην υγεία του ανθρώπου και το περιβάλλον. Αν σε αυτές τις συνέπειες προστεθεί και η αυξανόμενη ανθεκτικότητα

των εντόμων στα χημικά σκευάσματα, τονίζεται ακόμα περισσότερο η ανάγκη εύρεσης και εφαρμογής εναλλακτικών μεθόδων για τον έλεγχο των πληθυσμών των βλαβερών εντόμων. Τέτοιες μέθοδοι μπορεί να εφαρμόζονται μεμονωμένα, συνδυαστικά ή ακόμα σε συνδυασμό με χημικές μεθόδους εφόσον το αποτέλεσμα είναι εξίσου ικανοποιητικό αλλά και φιλικό προς το περιβάλλον (Μπουχέλος 1996).

Η Ολοκληρωμένη Προστασία των Αποθηκευμένων Αγροτικών Προϊόντων (Integrated Stored Product Protection, I.S.P.P.) αποβλέπει στην εναρμονισμένη εφαρμογή όλων των παραπάνω μεθόδων καθώς και τη διατήρηση της ποιότητας (quality maintenance). Η I.S.P.P., όπως αναφέρει ο Adler (1998), αποτελεί έναν συνδυασμό μεθόδων μη επιβλαβών για το περιβάλλον και τον άνθρωπο που σκοπό έχουν την πρόληψη, έγκαιρη επισήμανση και καταπολέμηση των εχθρών χρησιμοποιώντας φυσικά, βιολογικά και βιοτεχνολογικά μέσα.

### **1.3. Βιολογική καταπολέμηση**

Το σκέλος της βιολογικής καταπολέμησης είναι ένα από τα κεντρικά σημεία στα πλαίσια της ολοκληρωμένης προστασίας των αποθηκευμένων προϊόντων αφορώντας, πιο συγκεκριμένα, στην άμεση ή έμμεση χρήση βιολογικών παραγόντων για την πρόληψη, μείωση ή θεραπεία ζημιών που προκλήθηκαν στην παραγωγή ή τα υπάρχοντα του ανθρώπου από ζώντες οργανισμούς. Οι παράγοντες που επιστρατεύονται στα πλαίσια της βιολογικής φυτοπροστασίας των αγροτικών γεωργικών προϊόντων για να αντιμετωπιστούν οι απώλειες από τους βιοτικούς παράγοντες, είναι:

- παρασιτοειδή έντομα
- αρπακτικά έντομα και ακάρεα
- εντομοπαθογόνοι μικροοργανισμοί και ιοί
- εντομοπαθογόνοι νηματώδεις

#### **1.3.1. Παρασιτοειδή και αρπακτικά έντομα**

Παρασιτοειδή είναι τα έντομα που διέρχονται μέρος του βιολογικού τους κύκλου μέσα ή πάνω στο σώμα των ξενιστών τους τρεφόμενα εις βάρος των τελευταίων. Επιβαρύνουν τον οργανισμό του ξενιστή, τον οποίο μπορεί και να θανατώσουν μέσω διαφόρων διεργασιών (π.χ. έκκριση τοξινών, εξάντληση θρεπτικών στοιχείων), αν και η θανάτωση δεν αποτελεί τον κανόνα. Ορισμένα

ενδοπαράσιτα π.χ., προκαλούν μوميοποίηση των ξενιστών, το σώμα των οποίων διογκώνεται, σκληραίνει και μεταχρωματίζεται. Τα ωφέλιμα παρασιτοειδή έντομα ανήκουν κυρίως στα Υμενόπτερα. Τα είδη του γένους *Trichogramma* sp., π.χ. είναι πολύ μικρά Υμενόπτερα που παρασιτούν σε αυγά Λεπιδοπτέρων των οικογενειών Noctuidae, Tortricidae, Pyralidae (DeBach 1974, Schöller et al. 1994). Τα αρπακτικά έντομα και ακάρεα που είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος από τη λεία τους, πρώτα θανατώνουν και έπειτα τρώγουν τα θηράματά τους (DeBach 1974).

### 1.3.2. Εντομοπαθογόνοι ιοί

Οι ιοί είναι σωματίδια αποτελούμενα από ένα νουκλεοξύ (RNA ή DNA) και ένα πρωτεϊνικό περίβλημα που λειτουργεί προστατευτικά για το νουκλεοξύ. Οι ιοί είναι υποχρεωτικά παράσιτα γιατί χρησιμοποιούν τη μεταβολική λειτουργία του κυττάρου του ξενιστή για τον αναδιπλασιασμό της αλυσίδας του νουκλεοξέος τους. Απαραίτητη προϋπόθεση για να νοσήσει ένα έντομο είναι να τραφεί πρώτα με τη μολυσμένη τροφή (π.χ. ψεκασμένο φύλλωμα). Μόλις εισέλθει ο ιός στον πεπτικό σωλήνα, το αλκαλικού pH (pH 9 – 10.5) πεπτικό υγρό του εντόμου διαλύει την πρωτεΐνη του καψιδίου και απελευθερώνει τα σωματίδια του ιού. Τα τελευταία είναι σε θέση πλέον να μολύνουν τα κύτταρα του πεπτικού σωλήνα, να πολλαπλασιαστούν και να εξαπλωθούν στο υπόλοιπο έντομο. Ο χρόνος θανάτωσης ενός εντόμου κυμαίνεται από 3-7 ημέρες έως και 3-4 εβδομάδες, σε συνάρτηση με την αλληλεπίδραση μεταξύ του εντόμου, του ιού και του φυτού (Τζανακάκης 1995).

Έχουν αναγνωριστεί και κατηγοριοποιηθεί δέκα οικογένειες που περιέχουν εντομοπαθογόνους ιούς. Η πιο σημαντική εξ αυτών είναι η Baculoviridae στην οποία συγκαταλέγονται τα περισσότερα είδη ιών με πρακτική και εμπορική αξία για την βιολογική καταπολέμηση εντόμων. Οι ιοί αυτής της οικογένειας έχουν εντοπιστεί αποκλειστικά σε πληθυσμούς εντόμων, κυρίων των τάξεων των Υμενόπτερων, Λεπιδόπτερων και Κολεόπτερων (Τζανακάκης 1995).

Το προσβεβλημένο έντομο παρουσιάζει χαρακτηριστικά συμπτώματα, τα οποία καταλήγουν στη θανάτωσή του. Αρχικά, είναι εμφανής η μειωμένη ευρωστία και δραστηριότητα του εντόμου, η οποία μπορεί να συνοδευτεί από μεταχρωματισμούς, δημιουργία κηλίδων, λύσεις των ιστών και γενική αποσύνθεση του εντόμου. Τα συμπτώματα ποικίλλουν αναλόγως το είδος του εντόμου και του ιού (Μαντζούκας 2012).

### 1.3.3. Εντομοπαθογόνα πρωτόζωα

Τα πρωτόζωα αποτελούν ενδοκυττάρια υποχρεωτικά παράσιτα, όπως οι ιοί, ενώ το μολυσματικό τους στάδιο είναι συνήθως εκείνο της σπορίωσης (Τζανακάκης 1995). Μολύνουν δια της τροφής του εντόμου, εφόσον δηλαδή το έντομο τα καταπιεί. Σε μερικά είδη πρωτόζωων, η μετάδοση είναι εφικτή μέσω των ωών και μέσω των οπών ωοτοκίας παρασιτικών Υμενοπτέρων. Τα πρωτόζωα προσβάλλουν και θανατώνουν, μέσω κυτόλυσης, έντομα σε διάφορα στάδια της ανάπτυξής τους. Έχουν μικρή εντομοπαθογόνο ικανότητα και αργή δράση, γεγονός που δεν τα κατατάσσει στους ευρέως χρησιμοποιούμενους βιολογικούς παράγοντες καταπολέμησης (Τζανακάκης 1995).

### 1.3.4. Εντομοπαθογόνοι μύκητες

Ο μύκητες συνθέτουν μια μεγάλη ομάδα οργανισμών που περιέχει περισσότερα από 500 είδη με εντομοπαθογόνο δράση. Εντομοπαθογόνοι μύκητες ανήκουν στις διαιρέσεις Zygomycota, Ascomycota, Deuteromycota, Oomycota και Chytridiomycota. Πολλά γένη εντομοπαθογόνων μυκήτων που διερευνώνται για τις εντομοπαθογόνες ιδιότητες τους, ανήκουν στην κλάση Entomophthorales των Zygomycota και στην κλάση Hyphomycetes των Deuteromycota. Αναφέρεται ότι δρουν επιτυχώς εναντίον ενός μεγάλου αριθμού εντόμων, όπως προνύμφες λεπιδοπτέρων, αφίδων και θριπών που προκαλούν εκτεταμένες ζημιές σε καλλιέργειες ανά τον κόσμο (Shahid et al. 2012). Εντομοπαθογόνοι μύκητες με αποτελεσματική δράση και εμπορική εφαρμογή είναι του γένους *Metarhizium*, με σημαντικότερα είδη τα *Metarhizium robertsii*, *M. flooviridae* και *M. album* ενώ, από την τάξη Moniliales έχουν ξεχωρίσει οι *Beauveria bassiana* και *Verticillium lecanii* (Howard et al. 2010, Shahid et al. 2012).

Ο βιολογικός κύκλος των εντομοπαθογόνων μυκήτων συγχρονίζεται και με τα βιολογικά στάδια του ξενιστή και τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Shahid et al. 2012). Κατά κανόνα, ο βιολογικός κύκλος τους ξεκινά όταν βλαστάνει ένα σπόριο, από το οποίο σχηματίζεται μια μυκηλιακή υφή, ο βλαστικός σωλήνας. Στην άκρη της βλαστικής υφής αναπτύσσεται η πλάκα προσκόλλησης. Ο μύκητας μολύνει τον ξενιστή μέσω των κονιδίων, τα οποία είναι αγενή σπόρια. Ο εντομοπαθογόνος μύκητας διαπερνά το δερμάτιο του εντόμου με συνδυασμό της πίεσης που ασκεί ο βλαστικός σωλήνας και της ενζυματικής δράσης των πρωτεασών και χιτινασών που παράγονται και έχουν αποδομητική ιδιότητα. Διείσδυση του δερματίου μπορεί να

λάβει χώρα και μέσω των πλακών προσκόλλησης. Εν συνεχεία, οι μυκηλιακές υφές φτάνουν στο αιμόκοιλο και προκαλούν το θάνατο του εντόμου μέσα σε 3 με 14 ημέρες από τη στιγμή που διασκορπίζονται τα σπόρια (Γζανακάκης 1995, Shahid et al. 2012).

Εφόσον ο μύκητας διαπεράσει το δερμάτιο, εισβάλλει και προσβάλλει το κυκλοφορικό και τους ιστούς του εντόμου. Στοιχεία της επιφάνειας του εντόμου όπως η παρουσία νερού, λιπαρών οξέων και θρεπτικών στοιχείων καθώς και η φυσιολογική κατάσταση του εντόμου διευκολύνουν ή δυσχεραίνουν τη βλάστηση και δράση των σπορίων. Η επιτυχής δηλαδή βλάστηση προϋποθέτει την ύπαρξη κατάλληλων συνθηκών, την δυνατότητα αξιοποίησης θρεπτικών στοιχείων του ξενιστή αλλά και την ανθεκτικότητα του μύκητα στις πιθανώς υπάρχουσες τοξίνες του εντόμου (Shahid et al. 2012).

#### 1.3.5. Εντομοπαθογόνοι νηματώδεις (EPNs)

Οι νηματώδεις σκώληκες συνθέτουν μια από τις πολυπληθείς ομάδες του ζωικού βασιλείου (Nemata ή Nematoda). Ανάλογα με τον ρόλο τους στο οικοσύστημα διακρίνονται σε:

- παρασιτικούς του ανθρώπου και των ζώων
- φυτοπαρασιτικούς
- σαπροφάγους που υφίστανται ελεύθεροι στο έδαφος και το νερό
- εντομοπαθογόνους

Οι εντομοπαθογόνοι νηματώδεις συγκαταλέγονται στους μικροοργανισμούς που παρασιτούν σε έντομα και ακάρεα, στα οποία μπαίνουν είτε παθητικά μέσω της διατροφής του εντόμου, ως αυγά ή ως ενήλικα θηλυκά που βρίσκονται κοντά στην ωοτοκία, είτε ενεργητικά διαπερνώντας το δερμάτιο του εντόμου ή χρησιμοποιώντας φυσικές οπές (Poinar 1990).

Μόλις τη δεκαετία του 1930 διαπιστώθηκε η εντομοπαθογόνος ιδιότητα των νηματώδων μετά από έρευνα των Gaser και Fox, η οποία έδειξε ότι το σκαθάρι *Popillia japonica* καταπολεμάται με νηματώδη τον οποίο ονόμασαν *Neoaplectana* (*Steinernema*) *glaseri* (Smart 1995).

Το ενδιαφέρον εστιάζει σε 7 οικογένειες: Mermithidae, Allantonematidae, Neotylenchidae, Spaerularidae, Rhabditidae, Steinernematidae, Heterorhabditidae

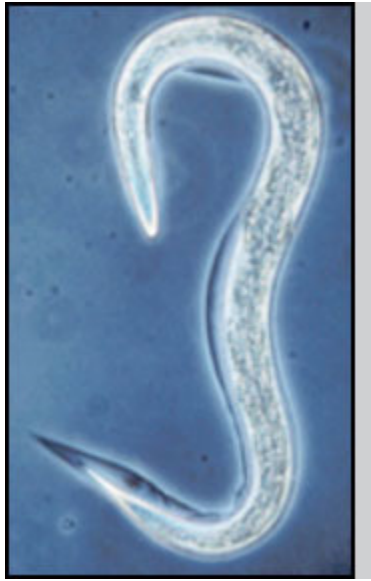


(Rhabditida: Nematoda), αν και οι τελευταίες δύο είναι εκείνες που έχουν αξιοποιηθεί εμπορικά σε μεγάλη κλίμακα. Όλα τα μέλη της τάξης Rhabditida είναι βακτηριοφάγα αλλά κάποιοι νηματώδεις εξελίχθηκαν σε παθογόνα εντόμων (Smart 1995). Οι νηματώδεις της οικογένειας Heterorhabditidae διακρίνονται γιατί α) κατά την εξελικτική τους πορεία ανέπτυξαν κοιλότητα στο σώμα τους για τη μεταφορά συμβιωτικών βακτηρίων, β) έχουν εύρος ξενιστών το οποίο περιλαμβάνει την πλειοψηφία των τάξεων και οικογενειών των εντόμων, γ) μπορούν να παραχθούν σε μεγάλη κλίμακα πάνω ή μέσα σε στέρεα ή υγρά υποστρώματα, και δ) θανατώνουν τα έντομα εντός 48 ωρών (Poinar 1990).

#### 1.3.5.1. *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar – Μορφολογία των μολυσματικών ανήλικων

Τα πρώτης γενιάς ανήλικα είναι ερμαφρόδιτα. Τα μολυσματικά ανήλικα του τρίτου σταδίου συνήθως περιβάλλονται από το έκδυμα του δεύτερου σταδίου, το οποίο φέρει χαρακτηριστικές πτυχές κατά μήκος του. Το στοματικό άνοιγμα και η έδρα είναι κλειστά γιατί τα μολυσματικά ανήλικα δεν τρέφονται. Φέρουν έναν ραχιαίο οδόντα.

Το άκρο της ουράς είναι αιχμηρό (Εικόνα 1.3.5.1.1.). Τα κύτταρα των συμβιωτικών βακτηρίων εντοπίζονται εντός της κοιλότητας του διατροφικού σωλήνα (Poinar 1990).



**Εικόνα 1.3.5.1.1.** Μολυσματικό ανήλικο. Ξεχωρίζει η αιχμηρή ουρά.  
(<http://www.biocontrol.entomology.cornell.edu/pathogens/nematodes.html>)

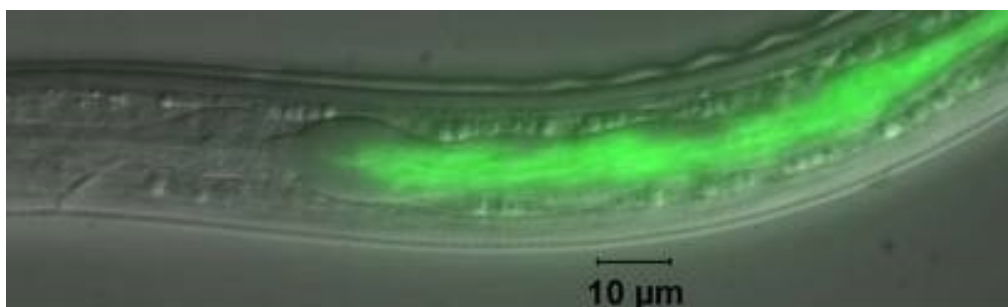
#### 1.3.5.2. Το βακτήριο *Photorhabdus luminescens*

Το είδος *Heterorhabditis bacteriophora* συμβιώνει με το βακτήριο *Photorhabdus luminescens*. Μια περιοχή στο πίσω μέρος του εντερικού σωλήνα των ανήλικων ατόμων του νηματώδη εξελίχθηκε σε θάλαμο για τη μεταφορά των κυττάρων συμβιωτικών βακτηρίων (Poinar 1990, Smart 1995).

Στα πλαίσια του φυσιολογικού βιολογικού κύκλου τους, τα βακτήρια αυτής της κατηγορίας συμβιώνουν με νηματώδεις της οικογένειας Heterorhabditidae. Το βακτήριο αποικίζει το εντερικό σύστημα του μολυσματικού ανήλικου. Μόλις το μολυσματικό ανήλικο βρεθεί στον ξενιστή, ενεργοποιούνται αγνώστου ταυτότητας σήματα, με τα οποία ξεκινά η απελευθέρωση του βακτηρίου (Easom et al. 2010).

Τα βακτήρια που έχουν μηχανισμό καταστολής ή αποφυγής του αμυντικού συστήματος του εντόμου, πολλαπλασιάζονται και, εντός 48-72 ωρών από την μόλυνση, προκαλούν σηψαιμία στο έντομο. Στο σημείο αυτό, όλα τα εσωτερικά όργανα του εντόμου έχουν μετατραπεί σε βακτηριομάζα. Η βιομετατροπή διευκολύνεται με τη δράση υδρολυτικών ενζύμων που εκκρίνει το βακτήριο, όπως οι πρωτεάσες και οι λιπάσες (Easom et al. 2010). Ο νηματώδης αρχίζει να απελευθερώνει το βακτήριο με ρυθμό ένα κύτταρο κάθε δυο λεπτά. Η συνύπαρξη του νηματώδη με το βακτήριο είναι συμβιωτικής-υποχρεωτικής φύσεως εφόσον, χωρίς το βακτήριο ο νηματώδης δεν είναι σε θέση να παρασιτησει και να τραφεί με το έντομο, ενώ ο ίδιος προσφέρει στο βακτήριο καταφύγιο. Επίσης, το βακτήριο δημιουργεί μια

προστατευτική γωνιά για το ίδιο και τον νηματώδη μέσω της παραγωγής αντιβιοτικών ουσιών που απαγορεύουν την αποίκιση του εντόμου από άλλα ανταγωνιστικά βακτήρια (Cliché 2007).



**Εικόνα 1.3.5.2.1.** Το συμβιωτικό βακτήριο *Photorhabdus luminescens* εντός του νηματώδη διαφαίνεται με το φωσφορίζον φως (Cliché 2007).

#### 1.3.5.3. Βιολογικός κύκλος του νηματώδη *H. bacteriophora*

Ο βιολογικός κύκλος αποτελείται από το στάδιο του ωού – 4 ανήλικα στάδια (που διαχωρίζονται από εκδύσεις) – και το ενήλικο. Το μολυσματικό στάδιο είναι το τρίτο ανήλικο στάδιο (infective juvenile – IJ) (Muthulakshmi et al. 2012).

Ο αναπαραγωγικός κύκλος του νηματώδη ξεκινά όταν εισέρχεται το μολυσματικό ανήλικο στο έντομο. Το μολυσματικό ανήλικο μετατρέπεται σε ερμαφρόδιτο, το οποίο ωοτοκεί και τα ανήλικα που προκύπτουν αναπτύσσονται εντός του εντόμου τρεφόμενα με τη βιομάζα του βακτηρίου. Η αναπαραγωγή του νηματώδη συνεχίζεται για 2-3 γενεές έως ότου, για λόγους που δε γνωρίζουμε, δίνεται ένα σήμα, με το οποίο προκύπτει το επόμενο μολυσματικό ανήλικο που εγκαταλείπει τον πρώην ξενιστή αφού πρώτα έχει εφοδιαστεί με κύτταρα του βακτηρίου. Η διαδικασία της μετάδοσης του βακτηρίου στο νέο μολυσματικό ανήλικο είναι πολύπλοκη και μόλις πρόσφατα έχει περιγραφεί μακροσκοπικά (Eason et al. 2010).

Ο αριθμός των ανήλικων που εγκαταλείπουν το νεκρό έντομο είναι μεταξύ δεκάδων και εκατοντάδων χιλιάδων αναλόγως με το μέγεθος και το είδος του ξενιστή. Ο κύκλος από την είσοδο των μολυσματικών ανήλικων μέχρι την έξοδο μολυσματικών ανήλικων εξαρτάται από το είδος και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Σε γενικές γραμμές όμως διαρκεί 7 έως 10 ημέρες στους 25 βαθμούς κελσίου (Wang & Bedding 1996).

Χαρακτηριστικό γνώρισμα της οικογένειας *Heterorhabdidae* είναι ότι όλα τα ανήλικα της πρώτης γενιάς γίνονται ερμαφρόδιτα ενώ στη δεύτερη γενιά αναπτύσσονται αρσενικά, θηλυκά και ερμαφρόδιτα άτομα (Smart 1995). Δεύτερο γνώρισμα των νηματωδών του γένους *Heterorhabditis* είναι ότι η είσοδος ενός μόνο ανήλικου επαρκεί για να αρχίσει η αναπαραγωγή του (Kary et al. 2009).

Τα μολυσματικά ανήλικα του *H. bacteriophora* δεν τρέφονται. Εν τούτοις, επιβιώνουν για μεγάλες περιόδους, έως και μήνες, με τα αποθηκευμένα αποθέματα τους. Η ικανότητά τους αυτή αποτελεί και την κυριότερη στρατηγική επιβίωσης που διακρίνει τους *Heterorhabditis*. Ο χρόνος που τα ανήλικα μπορούν να επιβιώσουν στο έδαφος χωρίς ξενιστή εξαρτάται από τη θερμοκρασία και την υγρασία του εδάφους, την παρουσία φυσικών εχθρών και τον τύπο του εδάφους. Σε γενικές γραμμές, οι πιθανότητες επιβίωσης είναι μεγαλύτερες σε αμμώδη εδάφη με χαμηλή υγρασία και σε θερμοκρασία μεταξύ 15 και 25 βαθμούς κελσίου. Οι νηματώδεις απειλούνται από άλλους νηματώδεις, τερμίτες, βακτήρια, μύκητες και άλλους οργανισμούς εδάφους (Kaya 1990, Smart 1995).

#### 1.3.5.4. Τρόπος δράσης του νηματώδη

Ο *Heterorhabditis* κινείται κάθετα στο έδαφος και μπορεί να δρα αποτελεσματικά σε διάφορα βάθη, σε αντίθεση με άλλα είδη (π.χ. *S. feltiae*) που κινούνται οριζοντίως. Οι παράγοντες εδάφους, βιοτικοί (π.χ. το βάθος στο οποίο βρίσκονται οι προνύμφες-ξενιστές) και αβιοτικοί (υγρασία εδάφους κ.α.), επηρεάζουν τον παρασιτισμό. Σε πείραμα με διάφορους νηματώδεις, συμπεριλαμβανομένου του *Heterorhabditis* sp., εναντίον του δίπτερου *Anastrepha* spp., ο *Heterorhabditis* sp. δεν ανταποκρίθηκε καλά σε χαμηλή υγρασία εδάφους, σε αντίθεση με τον *S. riobrave* που παρέμεινε λειτουργικός σε μεγάλο εύρος τιμών υγρασίας (Toledo et al. 2005).

Οι *Heterorhabditis* ψάχνουν ενεργητικά την λεία τους αξιοποιώντας στην αναζήτησή τους στοιχεία που προδίδουν την ύπαρξη του εντόμου-ξενιστή σε κοντινή απόσταση, όπως το διοξείδιο του άνθρακα αλλά και την τερπίνη (E)-beta-carboxyphyllanem, που απελευθερώνεται από τις ρίζες των φυτών όταν εκείνα δέχονται επίθεση από φυτοφάγα έντομα. Επομένως, οι νηματώδεις έχουν αναπτύξει χημειοκινητικούς ανιχνευτές για τον εντοπισμό ξενιστών αλλά και τοποθεσιών όπου πιθανώς βρίσκονται οι ξενιστές (Cliché 2007). Το μολυσματικό ανήλικο μπαίνει στο έντομο-ξενιστή μέσω φυσικών οπών όπως το στόμα, το οπίσθιο τμήμα κ.α., ή διαπερνώντας το δερμάτιο του εντόμου μέσω πληγών. Εάν το τμήμα εισόδου είναι το

στόμα ή το οπίσθιο μέρος, ο νηματώδης διαπερνά το εντερικό τείχος έως το αιμόκοιλο. Εφόσον χρησιμοποιηθούν οι σπές αναπνοής, ο νηματώδης διαπερνά το τείχος της αναπνευστικής οδού. Με την είσοδο του νηματώδη στο έντερο, ξεκινά ο βιολογικός του κύκλος και η εντομοπαθογόνος δράση του (Poinar 1990) (Εικόνα 1.3.5.4.1.).



**Εικόνα 1.3.5.4.1.** Προνύμφη *E. kuehniella* που έχει προσβληθεί από τον νηματώδη *H. bacteriophora*. Ο ερυθρός μεταχρωματισμός είναι συμπτωματικός της δράσης του νηματώδη.

### 1.3.6. Εντομοπαθογόνα βακτήρια του γένους *Bacillus*

Έχουν αναγνωρισθεί περισσότερα των 100 είδη εντομοπαθογόνων βακτηρίων αλλά μόνο ορισμένα του γένους *Bacillus* έχουν φέρει ικανοποιητικά αποτελέσματα ώστε να χαίρουν εμπορικής κυκλοφορίας. Από αυτά το πιο γνωστό και με εύρος εφαρμογών είναι το είδος *B. thuringiensis*.

#### 1.3.6.1. *Bacillus thuringiensis*

Τα σκευάσματα με το εντομοπαθογόνο βακτήριο *B. thuringiensis* συγκαταλέγονται στα βιολογικά εντομοκτόνα με εκλεκτική δράση, τα οποία δε βλάπτουν το περιβάλλον και δεν είναι τοξικά για τα έντομα, ακόμα και για όσα έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα σε χημικές ουσίες. Το εντομοπαθογόνο βακτήριο *B. thuringiensis* απομονώθηκε για πρώτη φορά στην Ιαπωνία το 1902 αλλά επίσημα κατεγράφη το 1915 από τον Ernst Berliner, ο οποίος το απομόνωσε από την *E.*

*kuehniella*. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί διάφορα είδη του βακτηρίου με εξειδικευμένη δράση σε διάφορα έντομα (George & Crickmore 2012).

Ο *B. thuringiensis* ανήκει στα θετικά κατά Gram βακτήρια. Κατά την σπορίωση, παράγει ένα κρυσταλλικό έγκλειστο σωματίο (inclusion body), που περιέχει εντομοτοξικές κρυσταλλικές πρωτεΐνες (προτοξίνες, cry proteins) (Εικόνα 1.3.6.1.1.). Ο βιολογικός κύκλος του *Bacillus thuringiensis* μπορεί να χωριστεί σε φάσεις:

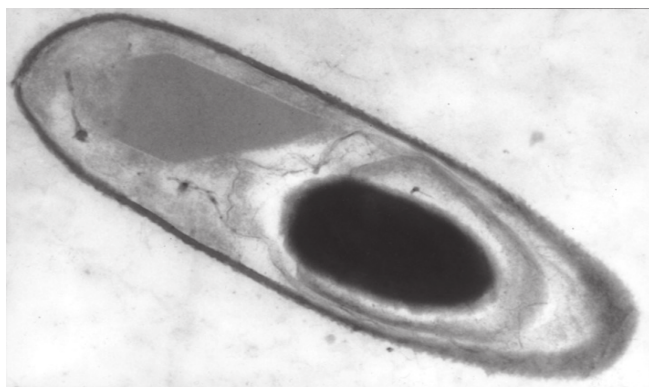
Φάση I – φυτική ανάπτυξη

Φάση II – μετάβαση στη βλάστηση

Φάση III – βλάστηση

Φάση IV- ωρίμανση των σπορίων και λύση των κυττάρων

(George & Crickmore 2012).



**Εικόνα 1.3.6.1.1.** Το βακτήριο προς το τέλος της σπορίωσης. Η μαύρη οβάλ περιοχή περιέχει τα σπόρια ενώ η πυραμιδοειδής δομή που διαφαίνεται, περιέχει τις κρυσταλλικές πρωτεΐνες (Sanchis & Bourguet 2008).

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις κρυσταλλικές πρωτεΐνες βρίσκονται σε μεγάλα πλασμίδια (15–120 Md), αν και έχουν σημειωθεί θέσεις πάνω στο χρωμόσωμα (Lereclus et al. 1982). Η κάθε θέση που έχει προσδιοριστεί αντιστοιχεί σε μια υπεύθυνη τοξίνη. Οι υπεύθυνες τοξίνες χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες (Burges 1982):

1. Στην πρώτη κατηγορία η υπεύθυνη τοξίνη είναι η πρωτεΐνη (P1) με

μοριακό βάρος 130kb και μια δεύτερη πρωτεΐνη (P2) με μοριακό βάρος 66kb που είναι τοξική στα Λεπιδόπτερα (CryIAa, CryIAb, CryIAc)(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) (Öztürk et al. 2008, Rukmini et al. 2000).

2. Στην δεύτερη κατηγορία αντιστοιχούν οι πρωτεΐνες που είναι τοξικές σε Δίπτερα με μοριακό βάρος από 25 – 140 kb (*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*).
3. Στην τρίτη κατηγορία αντιστοιχεί τοξίνη που δρα εναντίον των κολεοπτέρων με μοριακό βάρος 66kb (CryIIIa and CryIIIb) (*Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*) (Krieg 1983).
4. Στην τετάρτη κατηγορία η υπεύθυνη τοξίνη με μοριακό βάρος 130kb δρα εναντίον Διπτέρων και Λεπιδοπτέρων.

Οι κρυσταλλικές πρωτεΐνες είναι δύο τύπων: οι Cry τοξίνες και οι Cyt τοξίνες. Οι Cry τοξίνες βρίσκονται εντός του κρυσταλλικού σωματίου, ενώ οι Cyt τοξίνες έχουν κυτολυτική και αιμολυτική δράση. Οι Cry τοξίνες προσδένονται σε εξειδικευμένους υποδοχείς στη μεμβράνη των κυττάρων του ξενιστή. Ο αριθμός αλλά και η συγγένεια των υποδοχέων του μεσεντέρου με τις Cry πρωτεΐνες καθορίζει την ευπάθεια των εντόμων σε αυτές. Οι Cyt πρωτεΐνες, από την άλλη, δεν προϋποθέτουν την ύπαρξη πρωτεϊνικών υποδοχέων για τη δράση τους αλλά προσδένονται απευθείας στα λιπίδια της μεμβράνης του μεσεντέρου. Το μεσέντερο των Λεπιδοπτέρων και Διπτέρων, όντας αλκαλικό, διευκολύνει τη διαλυτοποίηση των Cry τοξινών. Ακολουθεί η είσοδος των τοξινών στη μεμβράνη του μεσεντέρου, η δημιουργία πόρων και ο θάνατος του εντόμου (Federici et al. 2010, George & Crickmore 2012, Gill 1995, Sanchis & Bourguet 2008, Schnepf et al. 1998).



**Εικόνα 1.3.6.1.2.** Νεκρή προνύμφη *E. kuehniella* που είχε προσβληθεί με *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

Πιο αναλυτικά, όταν οι κρυσταλλικές πρωτεΐνες καταποθούν από ευαίσθητες προνύμφες, διαλυτοποιούνται στο μεσέντερο λόγω του αλκαλικού περιβάλλοντος (pH 8-12). Η τοξίνη μετατρέπεται σε μια ενεργοποιημένη μορφή μέσω της δράσης των πρωτεασών του μεσεντέρου, οι οποίες διασπούν την τοξίνη σε μικρότερα, ανθεκτικά στις πρωτεάσες, μόρια. Η τοξίνη επιδρά πολύ γρήγορα καθώς εντός ολίγων λεπτών παραλύουν το στομάχι και τα μασητικά όργανα, με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η πρόσληψη τροφής. Το επιθήλιο του μεσεντέρου υφίσταται φούσκωμα, απολέπιση και κατάρρευση. Συμβαίνουν ιστολογικές αλλαγές όπου αλλάζει η περατότητα του μεσεντέρου, αυξάνεται η συγκέντρωση των ιόντων  $K^+$  και  $Na^+$  στην αιμολέμφο, αυξάνεται το pH στην αιμολέμφο και μειώνεται στο μεσέντερο, αυξάνεται η απορρόφηση της γλυκόζης και μειώνεται η απορρόφηση του ATP, αυξάνεται η κατανάλωση του  $O_2$  και περιορίζεται η κανονική μεταφορά του ιόντος  $K^+$ . Έτσι τα κύτταρα αρχίζουν να διογκώνονται και υφίστανται κοκκιοποίηση. Ο πυρήνας διογκώνεται, το ενδοπλασματικό δίκτυο σταδιακά μοιάζει με κενοτόπιο και τα κύτταρα υφίστανται λύση, καταλήγοντας σε εκτεταμένες ζημίες στο μεσέντερο που τελικά προκαλούν τον θάνατο της προνύμφης (Gill 1995, Schnepf et al. 1998) (Εικόνα 1.3.6.1.2.). Σε προνύμφες κουνουπιών τα πρώτα συμπτώματα εκδηλώνονται και 30 λεπτά μετά τη μόλυνση (George & Crickmore 2012).



Η ενεργοποίηση των Cry πρωτεϊνών φαίνεται ότι ξεκινά κατά την έναρξη της βλάστησης, οπότε αρχίζει και η μεταγραφή των Cry γονιδίων. Παράλληλα με τις Cry τοξίνες που παράγει το εντομοπαθογόνο βακτήριο *B. thuringiensis*, παράγονται και μολυσματικοί παράγοντες όπως η φωσφολιπάση C, πρωτεάσες και αιμολυσίνες που θεωρείται ότι ενισχύουν την τοξικότητα του βακτηρίου, αν και από μόνοι τους δεν επαρκούν ώστε να θεωρηθούν παθογόνοι παράγοντες (George & Crickmore 2012).

Η ευπάθεια των εντόμων σε παθογόνα επηρεάζεται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος όπως η θερμοκρασία και η Σ.Υ. Έχει βρεθεί για παράδειγμα, ότι η υψηλή Σ.Υ. σχετίζεται με αυξημένη θνησιμότητα σε έντομα που έχουν προσβληθεί με μύκητες και ιούς. Η παθογόνος δράση του εντομοπαθογόνου βακτηρίου *B. thuringiensis* σε γενικές γραμμές αυξάνει με την αύξηση της θερμοκρασίας. Οι περιβαλλοντικές συνθήκες επηρεάζουν το σύστημα παθογόνου-ξενιστή που έχει να κάνει με τη βιολογία του παθογόνου, την αντίδραση ανοσοποίησης του ξενιστή αλλά και τον ρυθμό εισόδου του παθογόνου στον ξενιστή (Mostafa et al. 2005). Οι Mostafa et al. (2005) για παράδειγμα, πραγματοποίησαν επεμβάσεις εναντίον προνυμφών της 5ης ηλικίας της *E. kuehniella* σε 3 διαφορετικές τιμές θερμοκρασίας και Σ.Υ., δίνοντάς τους τροφή που περιείχε το βακτήριο. Εν συνεχεία, μέτρησαν τον χρόνο που χρειάστηκαν οι προνύμφες μέχρι να γίνουν χρυσαλίδες καθώς και το ποσοστό θρόμβων στην αιμολέμφο τους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι προνύμφες που είχαν τραφεί με σιτάρι που περιείχε σπόρια και κρυστάλλους του εντομοπαθογόνου βακτηρίου *B. thuringiensis* παρουσίασαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις θρόμβων στην αιμολέμφο στην μεγαλύτερη τιμή της Σ.Υ. και θερμοκρασίας. Επίσης, το ποσοστό των προνυμφών που ολοκλήρωσαν επιτυχώς το στάδιο της χρυσαλίδας ήταν σημαντικά μικρότερο μεταξύ εκείνων που τράφηκαν με μολυσμένο στάρι.

#### 1.3.6.2. Εμπορικά σκευάσματα του *B. thuringiensis*

Το εντομοπαθογόνο βακτήριο *B. thuringiensis* έχει ήδη χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στην καταπολέμηση πολλών ειδών φυλλοφάγων Λεπιδοπτέρων (González-Cabrera et al. 2011). Το βακτήριο είναι λιγότερο αποτελεσματικό εναντίον των φυλλορρυκτικών, φλοιορρυκτικών και ξυλοφάγων εντόμων (Τζανακάκης 1995).

Σήμερα χρησιμοποιούνται περίπου 410 σκευάσματα του *B. thuringiensis* και 7 του *B. popilliae* και *B. lentimorbus*. Τα προϊόντα του *B. thuringiensis* αντιπροσωπεύουν το 90% της παγκόσμιας αγοράς βιολογικών σκευασμάτων. Τα περισσότερα σκευάσματα περιέχουν τις κρυσταλλικές πρωτεΐνες του βακτηρίου και

κάποια ενεργά σπόρια, ενώ σε μερικά σκευάσματα τα σπόρια είναι ανενεργά. Στην αγορά κυκλοφορούν αρκετά σκευάσματα βρέξιμων κόκκων όπως το Biotrol BTB 183 25W, Biotrol XK, και Dipel. Γαλακτοποιήσιμα σκευάσματα είναι τα Thuricide HPC, Thuricide 90 TS, κ.ά. Εναντίον φυλλοφάγων εντόμων, κυρίως Λεπιδοπτέρων, κυκλοφορούν εμπορικά σκευάσματα με τα ονόματα Bactospreine, Biobit, Agree κ.ά. (Τζανακάκης 1995, Ahmedani et al. 2008).

Επίσης, γίνονται προσπάθειες, με γενετικές και μοριακές μεθόδους (π.χ. με ανασυνδυασμούς γονιδίων διαφορετικών φυλών του βακτηρίου ή με γονίδια άλλων βακτηρίων ή βακουλιοϊών), να αναβαθμιστεί η εντομοτοξικότητα των εφαρμογών αλλά και να διευρυνθεί το φάσμα της δράσης ορισμένων γονότυπων (Τζανακάκης 1995). Από τον ανασυνδυασμό πρωτεϊνών του *B. thuringiensis* με πρωτεΐνες του *B. sphaericus*, για παράδειγμα, προέκυψαν πρωτεΐνες τοξικές για τις προνύμφες κουνουπιών, μάλιστα έως και 10 φορές πιο θανατηφόρες από τους μητρικούς γονότυπους (Federici et al. 2010).

#### **1.4 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ εντομοπαθογόνων μικροοργανισμών**

Η πλειοψηφία των εφαρμοσμένων και θεωρητικών μελετών για το πώς αλληλεπιδρούν μεταξύ τους οι εντομοπαθογόνοι παράγοντες, εστιάζει περισσότερο στην δυναμική μεταξύ ενός παθογόνου (ή παράσιτου) και του ξενιστή ενώ λιγότερο έχουν διερευνηθεί οι περιπτώσεις όπου ο ξενιστής προσβάλλεται ταυτόχρονα από δύο ή και περισσότερους εντομοπαθογόνους παράγοντες (Thomas et al. 2003). Σύμφωνα με τον Cox (2001), όμως, σε φυσικές συνθήκες, η περίπτωση των *μεικτών μολύνσεων* (mixed infections) όπου εμπλέκονται δύο ή/και περισσότεροι παθογόνοι παράγοντες δεν είναι απλά συνήθης αλλά ίσως να αποτελεί τον κανόνα. Η αλληλεπίδραση μεταξύ δύο ή και περισσότερων εντομοπαθογόνων παραγόντων μπορεί να χαρακτηρίζεται από την αύξηση ή την μείωση της δράσης του ενός ή και των δύο (ή περισσότερων) παραγόντων, ή από την πιθανότητα η δράση του ενός να αυξηθεί, περιορίζοντας τη δράση του άλλου (ή των άλλων) (Thomas et al. 2003). Η αλληλεπίδραση μεταξύ των παθογόνων παραγόντων διαμορφώνεται ως συνεργιστική, προσθετική ή ανταγωνιστική.

Ο συνεργισμός μεταξύ δύο παθογόνων παραγόντων που εφαρμόζονται ταυτόχρονα, εκδηλώνεται με τη δράση του ενός να ενισχύει, άμεσα ή έμμεσα, τη δράση του άλλου (Mantzoukas et al. 2013). Τα επίπεδα της θνησιμότητας αλλά και

άλλες παράμετροι της πειραματικής επέμβασης (π.χ. ο χρόνος μέχρι τη θνησιμότητα, η δόση εφαρμογής, η μολυσματικότητα, το είδος των παθογόνων κτλ), αποτελούν συνιστώσες που περιγράφουν την φύση της αλληλεπίδρασης μεταξύ τους.

Επίσης, η αλληλεπίδραση μεταξύ των παθογόνων παραγόντων μπορεί να χαρακτηριστεί ως θετική ή αρνητική. Στην πρώτη περίπτωση, το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης είναι συνεργιστικό ή προσθετικό, ενώ στη δεύτερη περίπτωση οι παράγοντες λειτουργούν ανταγωνιστικά (Thomas et al. 2003). Η συνδυαστική εφαρμογή διαφορετικών ειδών εντομοπαθογόνων παραγόντων μπορεί να αυξήσει την αποτελεσματικότητα του βιολογικού ελέγχου (Mahmoud 2009). Οι Jabbour et al. (2011) κατέληξαν ότι η βιοποικιλότητα των εντομοπαθογόνων παραγόντων αυξάνει την θνησιμότητα του ξενιστή, πράγμα που οφείλεται στον μεταξύ τους συνεργισμό.

## 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η διερεύνηση του τρόπου με τον οποίο αλληλεπιδρούν οι εντομοπαθογόνοι μικροοργανισμοί επί των ξενιστών τους αποβλέπει στην εύρεση και εφαρμογή αποτελεσματικότερων τεχνικών βιολογικής καταπολέμησης εντόμων - εχθρών. Η αποτελεσματικότητα της συνδυασμένης δράσης του εντομοπαθογόνου βακτηρίου *B. thuringiensis* και του εντομοπαθογόνου νηματώδη *H. bacteriophora* σε έντομα έχει αποτελέσει αντικείμενο μελετών με αφετηρία τη γνώση ότι οι εν λόγω μικροοργανισμοί από μόνοι τους είναι ιδιαίτερα τοξικοί σε μεγάλο εύρος εντόμων (Benfarhat et al. 2013, Koppenhofer et al. 1999, Nielsen-LeRoux et al. 2012, Salem et al. 2007).

Σκοπός της πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ του βακτηρίου *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (*B.t.k.*) και του νηματώδη *H. bacteriophora* επί προνυμφών του Λεπιδοπτέρου *E. kuehniella* σε τρεις διαφορετικές δόσεις του βακτηρίου. Πρόκειται για την πρώτη απόπειρα συνδυαστικής εφαρμογής των εν λόγω εντομοπαθογόνων παραγόντων επί προνυμφών του συγκεκριμένου λεπιδοπτέρου.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1. Εκτροφή εντόμων

Η εκτροφή του λεπιδοπτέρου *E. kuehniella* πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Φυτών του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών. Χρησιμοποιήθηκαν ξύλινοι κλωβοί διαστάσεων 30X30X30cm. Ο σκελετός των κλωβών ήταν ξύλινος, οι δύο πλάγιες πλευρές ήταν καλυμμένες με πλαστικό πλέγμα και η οπίσθια πλευρά ήταν επίσης ξύλινη (MDF). Η πρόσθια πλευρά του κλωβού ήταν καλυμμένη με πλαστικό πλέγμα μικρής διατομής, το οποίο λειτουργούσε και σαν είσοδος για το εσωτερικό του. Το δάπεδο του κλωβού ήταν ξύλινο (MDF) (Εικόνα 3.1.1).



**Εικόνα 3.1.1.** Κλωβός εκτροφής *E. kuehniella*.

Στους κλωβούς τοποθετήθηκαν πλαστικά δοχεία 1000ml που περιείχαν 250g χονδρό σιμιγδάλι μαζί με 5g αντιμυκητιακού παράγοντα που χρησίμευε ως τεχνητό υπόστρωμα ωτοκίας (Εικόνες 3.1.2, 3.1.3).



**Εικόνα 3.1.2.** Κλωβός εκτροφής που περιέχει το πλαστικό δοχείο (1000g) με την τροφή των προνυμφών *E. kuehniella*.



**Εικόνα 3.1.3.** Πλαστικά δοχεία (1000g) που περιέχουν σιμιγδάλι για την διατροφή των προνυμφών *E. kuehniella*.

Τα πλαστικά δοχεία (1000g) παρέμεναν στον κλωβό για 4 ημέρες και μετά τοποθετούνταν σε ξεχωριστό σκοτεινό χώρο. Το χονδρό σιμιγδάλι αποτελούσε την τροφή των νέο-εκκολαπτόμενων προνυμφών. Τα έντομα, σε όλα τα στάδια της ανάπτυξής τους, διατηρούνταν σε περιβάλλον με σταθερή θερμοκρασία  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , υγρασία 80% και φωτοπερίοδο 16:8 ώρες φως: σκοτάδι.

### 3.2. Παθογόνοι παράγοντες

#### 3.2.1. Νηματώδεις

Χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό σκεύασμα Larvanem (Novagrica, Greece), το οποίο περιέχει το είδος *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Nematoda: Heterorhabditidae). Σε κάθε εφαρμογή με νηματώδεις χρησιμοποιήθηκε 1ml υδατικού διαλύματος του σκευάσματος το οποίο περιείχε 1000 μολυσματικά ανήλικα (IJ) του νηματώδη.

#### 3.2.2. Βακτήριο

Στις βακτηριακές επεμβάσεις χρησιμοποιήθηκε το Bactospreine® που περιέχει τον *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Hellafarm A.E, Greece). Πρόκειται για βακτηριακό σκεύασμα σε μορφή βρέξιμων κόκκων, με δραστηριότητα 32.000 IU/mg. Τα υδατικά διαλύματα του *B. thuringiensis* παρασκευάστηκαν με την διάλυση του σκευάσματος σε αποστειρωμένο νερό (100ml), σε φιάλη Erlenmeyer, με την βοήθεια αποστειρωμένης σπάτουλας. Στη συνέχεια το διάλυμα αναδεύτηκε σε μαγνητικό αναδευτήρα για 3 λεπτά.

### 3.3. Μελέτη της επίδρασης των παθογόνων μικροοργανισμών επί των προνυμφών

Για την μελέτη της συνδυαστικής εφαρμογής του εντομοπαθογόνου βακτηρίου *B. thuringiensis* με τον εντομοπαθογόνο νηματώδη *H. bacteriophora*, παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα, για τον βάκιλο με πυκνότητα 500ppm, 1500ppm και 3000ppm, και για τον νηματώδη 1ml υδατικού διαλύματος που περιείχε 1000 μολυσματικά ανήλικα του νηματώδη και εφαρμόστηκε με την χρήση πιπέτας. Τα τρυβλία που περιείχαν τον νηματώδη αναδεύτηκαν ελαφρώς προκειμένου να υπάρξει ομοιόμορφη διασπορά.

Για κάθε πυκνότητα πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις των 10 ατόμων. Οι προνύμφες του λεπιδοπτέρου ήταν 4<sup>ης</sup> προνυμφικής ηλικίας και τοποθετήθηκαν σε

αποστειρωμένα τρυβλία Petri, διαμέτρου 9 εκατοστών, τα οποία περιείχαν 10g σπόρων σιταριού. Οι σπόροι αφέθηκαν να στεγνώσουν μετά τον κάθε χειρισμό, για 15 λεπτά προτού τοποθετηθούν οι προνύμφες, ώστε να αποφευχθεί τυχόν πνιγμός των προνυμφών από την υδαρή υφή τους.

Για την αλληλεπίδραση επιλέχθηκαν οι ακόλουθοι συνδυασμοί: 500ppm & *H. bacteriophora* (1000 IJ/ml), 1500ppm & *H. bacteriophora* (1000 IJ/ml), 3000ppm & *H. bacteriophora* (1000 IJ/ml). Το πειραματικό πρωτόκολλο περιελάμβανε για κάθε συνδυασμό 3 επαναλήψεις των 10 ατόμων. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν προνύμφες παρόμοιας ηλικίας που ψεκάστηκαν με αποστειρωμένο νερό.

Με την ολοκλήρωση της προετοιμασίας, τα τρυβλία σφραγίστηκαν με υδατοστεγή ταινία και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών όπου η θερμοκρασία διατηρούνταν στους 25°C και η σχετική υγρασία σε επίπεδο 80%. Οι μετρήσεις θνησιμότητας λάμβαναν χώρα κάθε 7 ημέρες. Οι νεκρές προνύμφες απομακρύνονταν με αποστειρωμένη λαβίδα ενώ οι χρυσαλίδες μεταφέρονταν σε άλλα αποστειρωμένα τρυβλία.

#### 3.4. Μαθηματική μέθοδος προσδιορισμού της αλληλεπίδρασης των παθογόνων παραγόντων

Η αλληλεπίδραση μεταξύ των παθογόνων υπολογίστηκε από τον τύπο των Robertson και Preisler:  $P_E = P_0 + (1 - P_0) * (P_1) + (1 - P_0) * (1 - P_1) * (P_2)$  όπου:  $P_E$  η αναμενόμενη θνησιμότητα από τον συνδυασμό των δυο παθογόνων,  $P_0$  η θνησιμότητα του μάρτυρα,  $P_1$  η θνησιμότητα του πρώτου παθογόνου και  $P_2$  η θνησιμότητα του δεύτερου παθογόνου. Η κατανομή προσδιορίστηκε από τον μαθηματικό τύπο  $\chi^2$ :  $\chi^2 = (L_0 - L_E)^2 / L_E + (D_0 - D_E)^2 / D_E$  όπου:  $L_0$  ο αριθμός των ζωντανών προνυμφών που παρατηρήθηκε,  $D_0$  ο αριθμός των νεκρών προνυμφών που παρατηρήθηκε,  $L_E$  ο αριθμός των αναμενόμενων ζωντανών προνυμφών και  $D_E$  ο αριθμός των αναμενόμενων νεκρών προνυμφών. Ο μαθηματικός τύπος χρησιμοποιήθηκε για να ελέγξουμε την υπόθεση της ανεξάρτητης μεταβλητής ( $df=1$ ,  $P=0.05$ ) (Mantzoukas et al. 2013, Rahman et al. 2010).

Αν  $\chi^2 < 3.84$ , η σχέση ορίζεται ως προσθετική. Αν  $\chi^2 > 3.84$  και η θνησιμότητα που παρατηρήθηκε είναι μεγαλύτερη από την αναμενόμενη, η σχέση ορίζεται ως συνεργιστική. Αντίθετα αν  $\chi^2 > 3.84$  και η θνησιμότητα που



παρατηρήθηκε είναι μικρότερη από την αναμενόμενη, η σχέση ορίζεται ως ανταγωνιστική (Mantzoukas et al. 2013, Rahman et al. 2010).

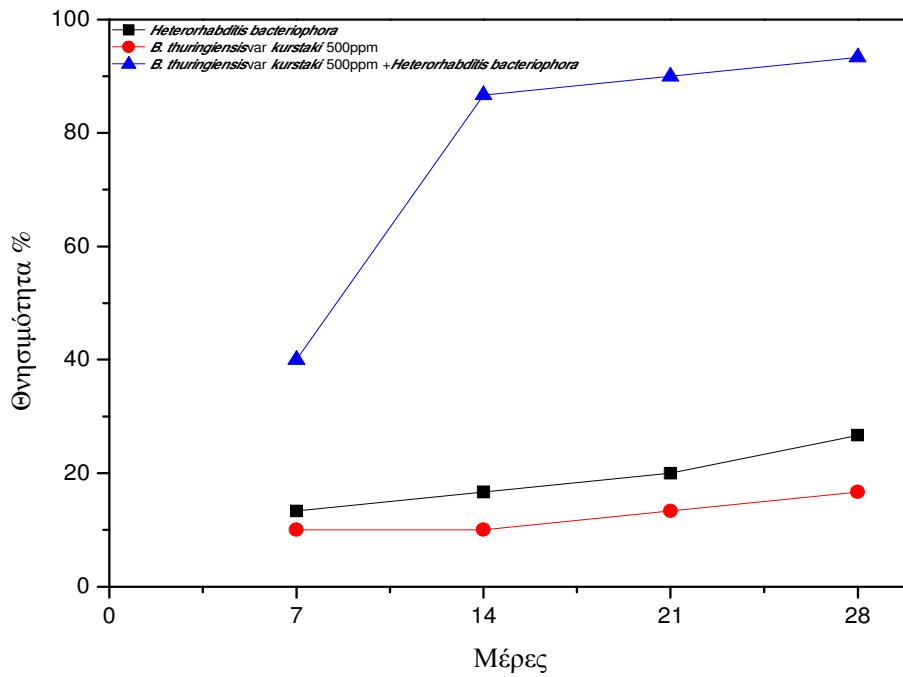
### 3.5. Στατιστική επεξεργασία

Η ανάλυση της διακύμανσης των μέσων όρων των τιμών θνησιμότητας των προνυμφών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την τεχνική της ανάλυσης της διακύμανσης ως προς το χειρισμό και το χρόνο. Το στατιστικό πακέτο IBM SPSS (SPSS Inc., IL, USA, version 22.0) χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση της διακύμανσης των δεδομένων. Τα δεδομένα, όπου κρίνονταν αναγκαία μετατρέπονταν κατάλληλα ( $\arcsin$ ) προκειμένου να τηρηθούν οι προϋποθέσεις της παραμετρικής ανάλυσης για ίσες παραλλακτικότητες μεταξύ των μεταχειρίσεων. Η σύγκριση των μέσων τιμών για τη διαπίστωση στατιστικά σημαντικών ή μη διαφορών μεταξύ των υπό μελέτη παραμέτρων έγινε με το τεστ Bonferroni για επίπεδο σημαντικότητας  $P=0.05$ . Επίσης επιλέχθηκε η μέθοδος Kaplan-Meier (μη παραμετρική) για να προσδιοριστεί ο μέσος συνολικός χρόνος επιβίωσης των προνυμφών *E. kuehniella* για τους συνδυασμούς πυκνοτήτων των παθογόνων παραγόντων. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων της συνάρτησης επιβίωσης έγινε με το τεστ κατανομής. Η αποτελεσματικότητα επί των προνυμφών κάθε παθογόνου υπολογίστηκε με τον τύπο του Abbott (Abbott 1925, Kurstak 1982).

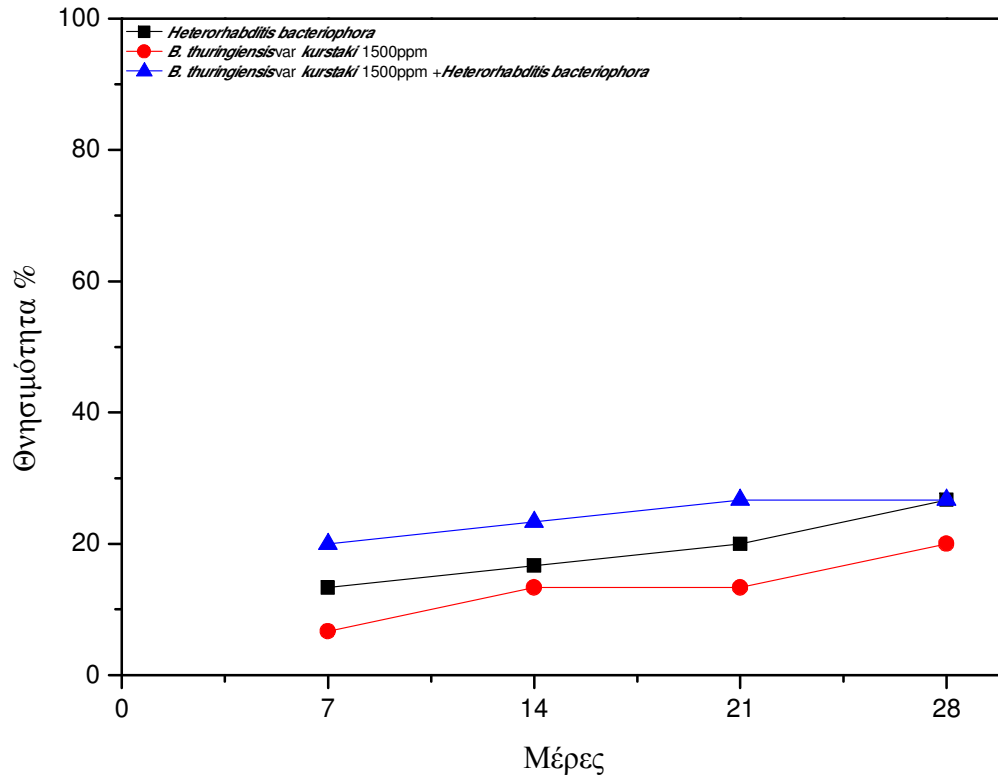
#### 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στα διαγράμματα (1-3) παρουσιάζεται η θνησιμότητα των προνυμφών του εντόμου λόγω της μεμονωμένης δράσης του βακίλου και του νηματώδη. Η θνησιμότητα που προέκυψε μετά από είκοσι οκτώ ημέρες από τις μεταχειρίσεις ήταν για τον *H. bacteriophora* 27%, για τον *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (500ppm) 17%, για τον *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (1500ppm) 20% και για τον *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (3000ppm) 44%, ενώ η θνησιμότητα του μάρτυρα ήταν 7%. Από τα αποτελέσματα δεν διαπιστώθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων που πραγματοποιήθηκαν επί των προνυμφών του εντόμου ( $F=1.012$ ,  $df=12$ ,  $P= 0.457$ ) (Διαγράμματα 1-3).

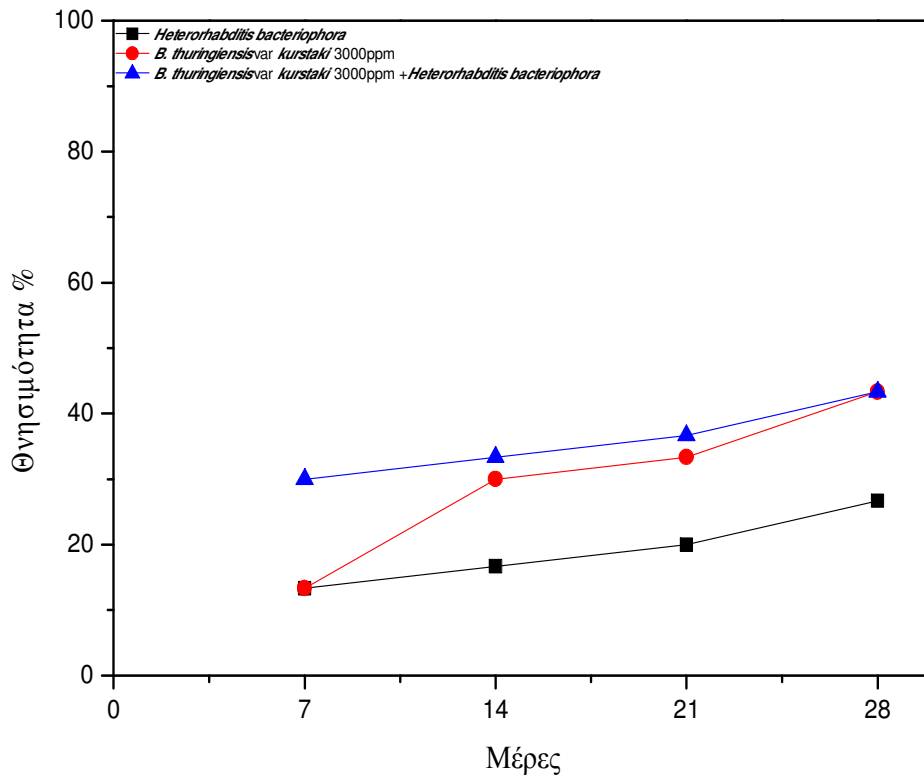
Η θνησιμότητα του συνδυασμού των παθογόνων παραγόντων κυμάνθηκε μεταξύ 27-93% των προνυμφών, ανάλογα με την πυκνότητα του παθογόνου παράγοντα. Στα διαγράμματα (2-3) παρατηρούμε ότι σε δύο συνδυασμούς η θνησιμότητα ήταν μικρότερη ή παρόμοια με αυτή των δύο παθογόνων όταν εξετάστηκαν μεμονωμένα. Αντίθετα, στο διάγραμμα 1 παρατηρούμε ότι η θνησιμότητα του βακίλου με τον νηματώδη ήταν μεγαλύτερη αυτής των δύο παθογόνων παραγόντων όταν εξετάστηκαν μεμονωμένα.



**Διάγραμμα 1.** Θνησιμότητα (%) των προνυμφών της *E. kuehniella* λόγω μεμονωμένης δράσης του *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 500ppm και του *H. bacteriophora* (1000IJs/ml), και λόγω του συνδυασμού *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 500ppm & *H. bacteriophora* (1000IJs/ml) (25°C, n=30).



**Διάγραμμα 2.** Θνησιμότητα (%) των προνυμφών της *E. kuehniella* λόγω μεμονωμένης δράσης του *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 1500ppm και του *H. bacteriophora* (1000IJs/ml), και λόγω του συνδυασμού *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 1500ppm & *H. bacteriophora* (1000IJs/ml) (25°C, n=30).



**Διάγραμμα 3.** Θνησιμότητα (%) των προνυμφών της *E. kuehniella* λόγω μεμονωμένης δράσης του *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 3000ppm & *H. bacteriophora* (1000IJs/ml), και λόγω του συνδυασμού *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 3000ppm & *H. bacteriophora* (1000IJs/ml) (25°C, n=30).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο συνδυασμός των δυο παθογόνων παραγόντων σε μία περίπτωση αύξησε την θνησιμότητα των προνυμφών. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των παθογόνων παραγόντων στις 7 ημέρες ήταν προσθετική σε δύο συνδυασμούς και συνεργιστική σε έναν συνδυασμό. Στις 14 ημέρες, η αλληλεπίδραση μεταξύ των παθογόνων παραγόντων ήταν προσθετική σε δύο συνδυασμούς και συνεργιστική σε έναν συνδυασμό. Στις 21 ημέρες, ομοίως, η αλληλεπίδραση ήταν προσθετική σε δύο συνδυασμούς και συνεργιστική σε έναν συνδυασμό. Τέλος, στις 28 ημέρες, οι παθογόνοι παράγοντες λειτούργησαν ανταγωνιστικά σε δύο συνδυασμούς και συνεργιστικά σε έναν συνδυασμό. (Πίνακας 1).

**Πίνακας 1. Θνησιμότητα (%) των προνυμφών *E.kuehniella* σε 7, 14, 21 και 28 ημέρες λόγω συνδυαστικής δράσης του εντομοπαθογόνου βακτηρίου *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Bt) και του εντομοπαθογόνου νηματώδη *H. bacteriophora* σε τρεις συνδυασμούς (Π= προσθετική αλληλεπίδραση, Α= ανταγωνιστική αλληλεπίδραση, Σ = συνεργιστική αλληλεπίδραση) (n=30). \*Αναμενόμενη θνησιμότητα βάσει του υπολογισμού των Robertson και Preisler (Mantzoukas et al. 2013).**

Δόση	Θνησιμότητα (%)		$\chi^2$ (1 df, P=0.05)	Άλλη/ δράση	Θνησιμότητα (%)		$\chi^2$ (1 df, P=0.05)	Άλλη/ δράση	Θνησιμότητα (%)		$\chi^2$ (1 df, P=0.05)	Άλλη/ δράση	Θνησιμότητα (%)		$\chi^2$ (1 df, P=0.05)	Άλλη/ δράση
	Παρατηρ.	αναμεν. *			παρατηρ.	αναμεν. *			παρατηρ.	αναμεν. *			παρατηρ.	αναμεν. *		
Bt+νημ.	7 ημέρες				14ημέρες				21ημέρες				28ημέρες			
500ppm + 1000 (IJ/ml)	40	25	3.8	Σ	87	28	53	Σ	90	35	39	Σ	94	43	31	Σ
1500pp m+1000 (IJ/ml)	20	22	0.06	Π	23	30	0.7	Π	27	35	1	Π	27	45	4.2	Α
3000pp m+1000 (IJ/ml)	30	27	0.1	Π	33	44	1.3	Π	37	50	2.2	Π	44	62	4	Α

Διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη θνησιμότητα των προνυμφών του εντόμου μεταξύ των συνδυαστικών επεμβάσεων ( $F=3.626$ ,  $df=6$ ,  $P=0.011$ ). Η ανάλυση επιβίωσης Kaplan–Meier (Breslow-Gelam) έδειξε ότι ο μέσος όρος ζωής των προνυμφών ήταν  $12.8 \pm 1.2$  ημέρες για την συνδυαστική επέμβαση 500ppm *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* - *H. bacteriophora* (1000IJs/ml),  $23 \pm 1.7$  ημέρες για τον συνδυασμό 1500ppm *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* - *H. bacteriophora* (1000IJs/ml) και  $21 \pm 1.8$  ημέρες για τον συνδυασμό 3000ppm *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* - *H. bacteriophora* (1000IJs/ml).

Διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των συνδυαστικών δόσεων στην ανάλυση Kaplan–Meier με τα τεστ Breslow (Generalized Wilcoxon), Log Rank (Mantel-Cox) και Tarone – Ware (Πίνακας 2). Η ανάλυση Kaplan-Meier έδειξε ότι ο μέσος όρος ζωής των προνυμφών της *E. kuehniella* για όλες τις συνδυαστικές επεμβάσεις ήταν  $19 \pm 1$  ημέρες.

**Πίνακας 2.** Ανάλυση Kaplan–Meier [ $P < 0.05$ ] των συνδυαστικών επεμβάσεων (Log Rank, Breslow, Tarone Ware). Δόση 1: (500ppm *B.t.k.* + *H. bacteriophora*), Δόση 2: (1500ppm *B.t.k.* + *H. bacteriophora*), Δόση 3: (3000ppm *B.t.k.* + *H. bacteriophora*).

	Δόση	1		2		3	
		$\chi^2$	Σημαντικότητα	$\chi^2$	Σημαντικότητα	$\chi^2$	Σημαντικότητα
Log Rank (Mantel – Cox)	1			23.872	.000	15.088	.000
	2	23.872	.000			1.111	.292
	3	15.088	.000	1.111	.292		
Breslow (Generalized Wilcoxon)	1			17.841	.000	9.524	.002
	2	17.841	.000			1.095	.295
	3	9.524	.002	1.095	.295		
Tarone-Ware	1			20.831	.000	12.205	.000
	2	20.831	.000			1.109	.292
	3	12.205	.000	1.109	.292		

#### 4.1. Μακροσκοπική εξέταση των προνυμφών *E. kuehniella*

Στον συνδυασμό *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (500ppm) & *H. bacteriophora* (1000IJs/ml), το σώμα των προνυμφών παρουσίασε μαύρα στίγματα στον θώρακα, την κεφαλή και το οπίσθιο τμήμα ενώ στο πάνω μέρος της κοιλίας η προνύμφη φέρει μεταχρωματισμό υπόλευκο προς ανοιχτό ροζ (Εικόνα 4.1.1., 4.1.2.).



**Εικόνα 4.1.1.** Προνύμφη της *E. kuehniella* που μολύνθηκε με *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* & *H. bacteriophora*. Το τμήμα του σώματος της προνύμφης με τον ανοιχτό ερυθρό μεταχρωματισμό έχει προσβληθεί από τον νηματώδη ενώ τα μαυρισμένα τμήματα υποδεικνύουν βακτηριακή μόλυνση.



**Εικόνα 4.1.2.** Νεκρή προνύμφη από προσβολή *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* & *H. bacteriophora*. Το σώμα της προνύμφης φέρει τα χαρακτηριστικά σημεία (σκούρες κηλίδες και ροζ μεταχρωματισμός) που υποδηλώνουν μόλυνση με νηματώδη και βακτήριο.

Οι μακροσκοπικές ενδείξεις επιβεβαιώνουν την ταυτόχρονη δράση των δύο παθογόνων παραγόντων όπως περιγράφεται στους Nielsen-LeRoux et al. (2012). Τα



μαύρα στίγματα στην επιδερμίδα της προνύμφης οφείλονται σε βακτηριακή μόλυνση (Εικόνα 4.1.3.), ενώ οι λευκο-ροζ επιδερμικοί μεταχρωματισμοί οφείλονται στη δράση των νηματωδών (Εικόνα 4.1.4.). Το ίδιο συνεργιστικό αποτέλεσμα παρατηρήθηκε όταν συνδυάστηκαν οι *B. thuringiensis* και *Xenorhabdus nematophila* επί προνυμφών *E. kuehniella* όπου η δράση των δ-ενδοτοξινών του βακτηρίου διευκόλυνε την είσοδο του νηματώδη στην αιμολέμφο (Benfarhat et al. 2013).



**Εικόνα 4.1.3.** Νεκρή προνύμφη που προσβλήθηκε με *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Οι μαύρες κηλίδες είναι συμπτωματικές βακτηριακής μόλυνσης.



**Εικόνα 4.1.4.** Νεκρή προνύμφη της *E. kuehniella* που προσβλήθηκε με *H. bacteriophora*. Ο ροζ μεταχρωματισμός είναι ενδεικτικός της δράσης του νηματώδη.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μόλυνση των εντόμων με περισσότερα του ενός παθογόνα ταυτοχρόνως (μεικτές μολύνσεις) (Cox 2001) δεν είναι μόνο συνήθης αλλά μάλλον αποτελεί τον κανόνα σε φυσικές συνθήκες (Cox 2001, Thomas et al. 2003 ) Στις μεικτές μολύνσεις προκύπτουν σύνθετες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παθογόνων παραγόντων, κατά τις οποίες μπορεί η δράση του ενός παθογόνου παράγοντα να ενισχυθεί περιορίζοντας τη δράση του άλλου, ή μπορεί η δράση και των δύο παθογόνων παραγόντων είτε να ενισχυθεί είτε να κατασταλεί (Cox 2001, Thomas et al. 2003). Η αλληλεπίδραση μεταξύ των παθογόνων παραγόντων μπορεί δηλαδή να λειτουργήσει αρνητικά, επηρεάζοντας αρνητικά και τα παθογόνα και τον ξενιστή.

Αντιθέτως, η αλληλεπίδραση μεταξύ των παθογόνων παραγόντων μπορεί να είναι συνεργιστική ή προσθετική όταν, εφαρμοζόμενα συνδυαστικά, ένα από τα παθογόνα αυξάνει, άμεσα ή έμμεσα, την εντομοκτόνο δράση του άλλου (Mantzoukas et al. 2013). Η εργασία επικεντρώνεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ του *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* και του *H. bacteriophora* επί προνυμφών της *E. kuehniella*.

Μετά από 7, 14 και 21 ημέρες, οι παθογόνοι παράγοντες αλληλεπίδρασαν θετικά όταν εφαρμόστηκαν συνδυαστικά. Η θετική αλληλεπίδραση ήταν κυρίως προσθετική, έως και συνεργιστική σε έναν μόνο εκ των συνδυασμών (Πίνακας 2). Παρομοίως, οι Korpenhofer et al. (1999) παρατήρησαν θετική, προσθετική αλληλεπίδραση μεταξύ των *B. thuringiensis* και *H. bacteriophora* επί των *Cyclocephala hirt*, *C. pasadenae* και *Anomala orientalis* μετά από 7, 14, 21 και 28 ημέρες.

Αντιθέτως, στο πείραμα, μετά από 28 ημέρες διαπιστώθηκε αρνητική αλληλεπίδραση μεταξύ των παθογόνων παραγόντων σε δύο συνδυασμούς και συνεργιστική αλληλεπίδραση σε έναν μόνο συνδυασμό.

Η αρνητική αλληλεπίδραση μεταξύ του *B. thuringiensis* και *H. bacteriophora* επί της *E. kuehniella* μπορεί να εξηγηθεί με δύο πιθανούς τρόπους. Πρώτον, ενδέχεται ο βάκιλος, στις μέτριες και υψηλές δόσεις, να αλλοίωσε τους ιστούς του ξενιστή με πιο γρήγορο ρυθμό από τον νηματώδη, με αποτέλεσμα να διαταραχθεί η λειτουργία του εσωτερικού της προνύμφης και ο νηματώδης να λιμοκτονήσει. Δεύτερον, είναι πιθανόν ο βάκιλος να ανταγωνίζεται το συμβιωτικό βακτήριο *Photorhabdus luminescens* που απελευθερώνεται από τον νηματώδη *H.*

*bacteriophora* στην κατανάλωση θρεπτικών στοιχείων. Έχει βρεθεί ότι το εν λόγω συμβιωτικό βακτήριο ανταγωνίζεται τον *B. thuringiensis* για θρεπτικά στοιχεία και σε ανάπτυξη μέσα στο σώμα της προνύμφης *Galleria mellonella* (Nielsen-LeRoux et al. 2012).

Τρίτον, ενδέχεται οι βακτηριακές τοξίνες, στις μέτριες και υψηλές δόσεις του εντομοπαθογόνου βακτηρίου, να θανατώνουν τον νηματώδη. Οι Wei et al. (2003) διατύπωσαν ότι οι τοξίνες του βακίλου είναι αποτελεσματικές εναντίον των νηματωδών όταν αυτοί βρίσκονται στο παρασιτικό τους στάδιο (Infective Juveniles - IJ). Οι Laznik και Trdan (2013) παρατήρησαν μείωση του αριθμού των ζωντανών μολυσματικών ανήλικων των νηματωδών *H. bacteriophora* και *Steinernema carposcapsae* κατόπιν εφαρμογής των τοξινών του *B. thuringiensis*.

Τέλος, προκύπτει ότι οι τοξίνες του βακίλου, ειδικά στις υψηλότερες συγκεντρώσεις (1500ppm και 3000ppm), είναι κυρίως αυτές που προκαλούν τη θνησιμότητα των προνυμφών. Στους συνδυασμούς 1500ppm *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* & *H. bacteriophora* (1000IJ/ml) και 3000ppm *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* & *H. bacteriophora* (1000IJ/ml), ενώ στην αρχή του πειράματος οι παθογόνοι παράγοντες λειτούργησαν προσθετικά, η αλληλεπίδρασή τους εξελίχθηκε σε ανταγωνιστική μέχρι το τέλος του πειράματος. Αντίθετα, στον συνδυασμό 500ppm *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* & *H. bacteriophora* (1000IJ/ml) η αλληλεπίδραση των παθογόνων παραγόντων ήταν συνεργιστική σε όλη τη διάρκεια του πειράματος πράγμα που δείχνει ότι, στη χαμηλότερη συγκέντρωση, ο ένας παθογόνος παράγοντας συμπληρώνει τη δράση του άλλου.

## 6. ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Σε φυσικές συνθήκες, η προσβολή των εντόμων από περισσότερα του ενός παθογόνα είναι αρκετά συχνές. Επομένως, είναι μεγάλη η ανάγκη κατανόησης του τρόπου με τον οποίο τα παθογόνα αλληλεπιδρούν. Στις μεικτές μολύνσεις, είναι πιθανό η δράση του ενός ή και των δύο παθογόνων να βελτιωθεί, να ενισχυθεί ή να περιοριστεί.

Τα αποτελέσματα του πειράματος δείχνουν ότι τα παθογόνα που εξετάστηκαν στις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις είναι συμβατά σε εργαστηριακές συνθήκες. Η συμβατότητα των παθογόνων υπογραμμίζει την δυνατότητα της δημιουργίας νέων τεχνικών και στρατηγικών που μπορεί να χρησιμοποιηθούν στα πλαίσια της ολοκληρωμένης διαχείρισης των εντόμων αποθηκών. Συνεπώς η αλληλεπίδρασή τους πρέπει να διερευνηθεί πιο εκτεταμένα.

## 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### A. ΕΛΛΗΝΙΚΗ

- Μαντζούκας, Δ. Σ. 2012. Διερεύνηση της επίδρασης του εκχυλίσματος κρόκου στην αύξηση των εντομοπαθογόνων μυκήτων με την μέθοδο των ημικλεκτικών υποστρωμάτων και στην αποτελεσματικότητά τους επί των προνυμφών του εντόμου *Sesamia nonagrioides*, Μεταπτυχιακή Μελέτη, Πανεπιστήμιο Πατρών.
- Μπουχέλος, Κ. 1996. Έντομα Αποθηκευμένων Προϊόντων και Τροφίμων.
- Σταμόπουλος, Δ. Κ. 1995. Έντομα Αποθηκών Μεγάλων Καλλιεργειών και Λαχανικών, Εκδόσεις ΖΗΤΗ, Θεσσαλονίκη, σελ. 7-11, 15-21.
- Σφακιωτάκης, Ε. 2004. Μετασυλλεκτική φυσιολογία και Τεχνολογία Νωπών Οπωροκηπευτικών Προϊόντων. 2<sup>η</sup> έκδοση. Τυρο ΜΑΝ, Θεσσαλονίκη, σελ. 131-162, 228-248.
- Τζανακάκης, Μ. Ε. 1995. Εντομολογία, University Studio Press, Θεσσαλονίκη, σελ. 380-388.

### B. ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol., 18: 265-267.
- Abo-El-Saad, M. M., Elshafie, H. A., Al Ajlan, A. M., Bou-Khowh, I. A. 2011. Non-Chemical Alternatives to Methyl Bromide against *Ephestia cautella* (Lepidoptera: Pyralidae): Microwave and Ozone. Agriculture and Biology Journal of North America, vol. 2 (8): 1222-1231.
- Adler, C. 1998. What is integrated protection? IOBC/wprs Bull. 21(3):1-8.
- Ahmedani, M. S., Haque, M. I., Afzal, S. N., Iqbal, U., Naz, S. 2008. Scope of Commercial Formulations of *Bacillus thuringiensis* Berliner as an alternative to Methyl Bromide against *Tribolium Castaneum* adults. Pak. J. Bot., vol. 40 (5): 2149-2156.
- Ayvaz A., Albayrak, S., Karaborklu, S. 2008. Gamma radiation sensitivity of the eggs, larvae and pupae of Indian meal moth *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). Pest Manag. Sci., 64 (5): 505-512.

- BenFarhat, D., Dammak, M., Khedher, S. B., Mahfoudh, S., Kammoun, S., Tounsi, S. 2013. Response of larval *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) to individual *Bacillus thuringiensis kurstaki* toxins mixed with *Xenorhabdus nematophila*. *J. of Inv. Path.*, 114: 71–75.
- Burges, H. D. 1982. Control of insects by bacteria. *Parasitology*, 84: 79-117.
- Calderon, M. 1981. The ecosystem approach for apprehending the extent of postharvest grain losses. *Phytoparasitica*, 9: 157 – 167.
- Cliche, T. 2007. The biology and genome of *Heterorhabditis bacteriophora*. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.135.1, <http://www.wormbook.org>.
- Cox P. D., Bell, C. H. 1991. Biology and ecology of moth pests of stored foods in: Ecology and management of food industry pests. FDA Techn. Bull.; ed. J. R. Gorham. The Association of Official Analytical Chemists, Arlington, USA. 4: 181-193.
- Cox, F. E.G. 2001. Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology*, 122: 23–38.
- DeBach, P. 1974. Chapters 4 & 5 in: Biological Control by natural enemies. Cambridge University Press, σελ. 71-154.
- Dunkel, F. V. 1992. The stored grain ecosystem. *J. stored Prod. Res.*, 28: 73 – 87.
- Easom, A. C., Joyce, A. S., Clarke, J. D. 2010. Identification of genes involved in the mutualistic colonization of the nematode *Heterorhabditis bacteriophora* by the bacterium *Photorhabdus luminescens*. *BMC Microbiology*, vol. 10 (45), doi: [10.1186/1471-2180-10-45](https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-45).
- Federici, B. A., Park, H.-W., Bideshi, D. 2010. Overview of the Basic Biology of *Bacillus thuringiensis* with Emphasis on Genetic Engineering of Bacterial Larvicides for Mosquito Control. *The Open Toxicology Journal*, vol. 3: 83-100.
- Gassmann, A. J., Stock, P. S., Sisterson, M. S., Carrière, Y., Tabashnik, B. E. 2008. Synergism between entomopathogenic nematodes and *Bacillus thuringiensis* crops: integrating biological control and resistance management. *Journal of Applied Ecology*, 45: 957-966.
- George, Z., Crickmore, N. 2012. *Bacillus thuringiensis* Applications in Agriculture, Chapter 2 in: *Bacillus thuringiensis* Biotechnology, XVI, Springer, σελ. 19-39.

- Gill, S. S. 1995. Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis* Toxins. Mem Inst Oswaldo Cruz, vol. 90 (1): 69-74.
- González-Cabrera, J., Mollá, O., Montón, H., Urbaneja, A. 2011. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) in controlling the tomato borer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). BioControl, vol. 56:71-80.
- Haines, C. P. 1991. Insects and arachnids of tropical stored products: their biology and identification. Natural Resources Institute. Chatham, UK, σελ. 246.
- Hall, D. W. 1970. Handling and storage of food grains in tropical and subtropical areas. Agriculture Development Paper 90m. F.A.O. Rome, Italy, σελ. 350.
- Howard, FV. A., N'Guessan, R., Koenraadt, JM., Asidi, A., Farenhorst, M., Akogbéto, M., Thomas, B. M., Knols, GJ. B., Takken, W. 2010. The entomopathogenic fungus *Beauveria Bassiana* reduces instantaneous blood feeding in wild multi-insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus* mosquitoes in Benin, West Africa. Parasites & Vectors, vol. 3, doi:10.1186/1756-3305-3-87.
- Jabbour, R., Crowder, D. W., Aultman, E. A., Snyder, W. D. 2011. Entomopathogen biodiversity increases host mortality. Biological Control, vol. 59: 277-283.
- Kary, E. N., Niknam, G., Griffin, T. C., Mohammadi, S. A., Moghaddam, M. 2009. A survey of entomopathogenic nematodes of the families Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditida) in the North-West of Iran. Nematology, vol. 11 (1): 107-116.
- Kaya, H. K. 1990. Soil Ecology in: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control, ed. Randy Gaugler & Harry K. Kaya, CRC Press Inc., USA, σελ. 93-115.
- Koppenhofer, A. M., Choo, H. Y., Kaya, H. K., Lee, D. W., Gelernter, W. D. 1999. Additive and Synergistic Increased Field and Greenhouse Efficacy against Scarab Grubs with a Combination of an Entomopathogenic Nematode and *Bacillus thuringiensis*. Biol. Con., 14: 37-44.
- Krieg, A., Huger, A. M., Langenbruch, G. A., Schnetter, W. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: Ein neuer gegenüber larven von coleopteren wirksamer pathotyp. Z. Angew. Entomol., 96: 500-508.
- Kurstak, E. 1982. Microbial and Viral Pesticides. Marker Dekker Ink. New York.
- Laznik, Z., Trdan, S. 2013. The influence of insecticides on the viability of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and

- Heterorhabditidae) under laboratory conditions. Pest Manag. Sci. doi: 10.1002/ps.3614.
- Locatelli, D. P., Limonta, L., Stampini, M. 2008. Effect of particle size of soft wheat flour on the development of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Stored Products Research, vol. 44: 269-272.
- Mahmoud, M. F. 2009. Pathogenicity of Three Commercial Products of Entomopathogenic Fungi, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Lecanicillium lecanii* against Adults of Olive Fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Diptera:Tephritidae) in the Laboratory. Plant Protect. Sci., vol. 45 (3): 98-102.
- Mantzoukas, S., Milonas, P., Kontodimas, D., Angelopoulos, K. 2013. Interaction between the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and two entomopathogenic fungi in bio-control of *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre) (Lepidoptera: Noctuidae) Annals of Microbiology, 63: 1083-1091.
- Mostafa, A. M., Fields, P. G., Holliday, N. J. 2005. Effect of Temperature and Relative Humidity on the Cellular Defense Response of *Ephestia kuehniella* larvae fed *Bacillus thuringiensis*. Journal of Invertebrate Pathology, vol. 90: 79-84.
- Muthulakshmi, A., Kumar, S., Subramanian, S. 2012. Biology of entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* sp. and *Steinernema* sp. Biology of entomopathogenic nematodes. JBiopest, vol. 5: 60-61.
- Nielsen-LeRoux, C., Gaudriault, S., Ramarao, N., Lereclus, D. and Givaudan, A. 2012. How the insect pathogen bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus/Photorhabdus* occupy their hosts. Curr. Opin. in Microbiol, 15: 220–231.
- Öztürk, F., Açıık, L., Ayvaz, A., Bozdoğan, B., Suludere, Z. 2008. Isolation and Characterization of Native *Bacillus thuringiensis* Strains from Soil and Testing the Bioactivity of Isolates against *Ephestia kuenhiella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) Larvae. Turkish Journal of Biochemistry, vol. 33 (4): 202-208.
- Pixton, S. W. 1982. The importance of moisture and equilibrium relative humidity in stored products. Trop. Stored Prod. Inf., 43: 16 – 29.



- Poinar, G., O., Jr. 1990. Taxonomy and Biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae in: Entomopathogenic nematodes in Biological Control, ed. Randy Gaugler & Harry K. Kaya, CRC Press Inc., USA, σελ. 23-61.
- Prakash, A. & Goel S. C. 1993. Factors affecting losses due to insects and their management in rice storage. Sanatan Dharm College. Muzzafarnagar, India, σελ. 50 – 54.
- Rahman K. M. A., Barta, M., Cagan, L. 2010. Effect of combining *Beauveria bassiana* and *Nosema pyrausta* on the mortality of *Ostrinia nubilalis*. Cent Eur J Biol., 5:472-480.
- Reichmuth, CH. 1996. Stored product protection with alternative methods. Strasbourg, France. 1995, σελ. 129 – 135.
- Rowley, J. Q. 1984. An assessment of losses during handling and storage of millet in Mali. Trop. Stored Prod. Inf., 47: 21 – 33.
- Rukmini, V., Reddy, C. Y., Venkateswerlu, G. 2000. *Bacillus thuringiensis* crystal endotoxin: roles of proteases in the conversion of protoxin to toxin. Biochimie, 82:109-116.
- Salem, S. A., Abdel-Rahman, H. A., Zebitz, C. P. W., Saleh, M. M. E., Fawkia, I. A., El-Kholy, M. Y. 2007. Interaction Between Entomopathogenic Nematodes and *Bacillus thuringiensis* as a New Approach for Biological Control of some Lepidopterous Pests. Journal of Applied Sciences Research, vol. 3 (5): 333-342.
- Sanchis, V., Bourguet, D. 2008. *Bacillus thuringiensis*: Applications in Agriculture and Insect Resistance Management: a Review. Agron. Sustain. Dev., vol. 28: 11-20.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R., Dean, D. H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its Pesticidal Crystal Proteins. Microbiology & Molecular Biology Reviews, vol. 62(3):775-806.
- Schöller, M., Reichmuth, Ch., Hassan, S.A. 1994. Studies on biological control of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep.: Pyralidae) with *Trichogramma evanescens* Westwood (Hym.: Trichogrammatidae) - host-finding ability in wheat under laboratory conditions. Proceedings of the 6th International Working Conference on Stored-product Protection, 17-23 April 1994, Canberra, Australia, vol. 2: 1142-1146.

- Sedlacek, J. D., Weston P. A., Barney R. J. 1996. Lepidoptera and Psocoptera in: Integrated Management of insects in stored products; eds. B. Subramanyam, D. W. Hagstrum. Marcel Dekker, New York, σελ. 41-70.
- Shahid, A. A., Rao, A. Q., Bakhsh, A., Husnain, T. 2012. Entomopathogenic Fungi as Biological Controllers: New Insights into their Virulence and Pathogenicity. Arch. Biol. Sci., 64 (1):21-42.
- Sharma, H. C., Dhillon, M. K., Arora, R. 2008. Effects of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin-fed *Helicoverpa armigera* on the survival and development of the parasitoid *Campoletis chloridae*. Entomologica Experimentalis et Applicata, 126: 1-8.
- Sinha, R. N. 1973. Ecology of storage. Ann.Technol. Agric.. 22: 351 – 359.
- Sinha, R. N. 1995. The stored grain Ecosystem in : Stored – Grain. (eds) Jayas, D.S, N.D.G WHITE & W.E. WILLIAMS, Marcel Dekker Inc, New York. Chapter 1, σελ. 1 – 32.
- Smart, C. G., Jr. 1995. Viewpoint, Entomopathogenic Nematodes for the Biological Control of Insects. Supplement to the Journal of Nematology, vol. 27 (48): 529-534.
- Thomas, M. B., Watson, E. L., Valverde-Garcia, P. 2003. Mixed infections and insect pathogen interactions. Ecol. Lett., 6: 183–189.
- Toledo, J., Ibarra, J. E., Liedo, P., Gómez, A., Rasgado, M. A., Williams, T. 2005. Infections of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) larvae by *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) under laboratory and field conditions. Biocontrol Science and Technology, vol. 15 (6): 627-634.
- Trematerra, P., Gentile, P. 2010. Five Years of Mass Trapping of *Ephestia kuehniella* Zeller: a component of IPM in a flour mill. Journal of Applied Entomology, vol. 134: 149-156.
- Wang, J., Bedding, A. R. 1996. Population Development of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* in the larvae of *Galleria mellonella*. Fundam. Appl. Nematol., vol. 19 (4): 363-367.
- Wei, J.-Z., Hale, K., Carta, L., Platzer, E., Wong, C., Fang, S. C., Aroian, R. V. 2003. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. PNAS, 100 (5): 2760–2765.

- Xu, J. 2010. Reproductive Behavior of *Ephestia Kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), PhD thesis, Massey University, New Zealand.
- Xu, J., Wang, Q., He, Z. Z. 2008. Emergence and Reproductive Rhythms of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). New Zealand Plant Protection, vol. 61: 277-282.