

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ, ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

Πτυχιακή Διατριβή

Επίδραση της γης διατόμων στους μύκητες και τα έντομα στο αποθηκευμένο σιτάρι

Πεντσίδης Στέφανος

Επιβλέπων Καθηγητής: Βαγγέλας Ιωάννης

Βόλος, 2024

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ, ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

Τίτλος Πτυχιακής στα αγγλικά :

Effect of diatomaceous earth on fungi and insects in stored wheat

Πεντσίδης Στέφανος

Επιβλέπων Καθηγητής: Βαγγέλας Ιωάννης

Βόλος, 2024

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Ιωάννης Βαγγέλας, Επίκουρος Καθηγητής Π.Θ. (Επιβλέπων)

Χρήστος Αθανασίου, Καθηγητής Π.Θ.

Νικόλαος Παπαδόπουλος, Καθηγητής Π.Θ.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	7
Abstract.....	8
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή.....	8
1.1: Εισαγωγή.....	10
1.2: Μετασυλλεκτικά προβλήματα οφειλόμενα σε ζωικούς εχθρούς και μύκητες.....	11
1.2.1: Κοινά μετασυλλεκτικά προβλήματα οφειλόμενα σε ζωικά παράσιτα.....	11
1.2.2: Κοινά μετασυλλεκτικά προβλήματα οφειλόμενα σε παθογόνα.....	12
1.3: Σημαντικότερα είδη εντόμων αποθηκών σε σπόρους σιταριού.....	13
1.4: Μετασυλλεκτικά έντομα και παθογόνα που ανιχνεύθηκαν στην Ελλάδα	15
1.4.1: Έντομα αποθηκών που έχουν καταγραφή στην Ελλάδα.....	15
1.4.2: Μετασυλλεκτικές ασθένειες που έχουν καταγραφή στην Ελλάδα.....	15
1.5: Μέθοδοι ανίχνευσης μετασυλλεκτικών μυκήτων και εντόμων.....	16
1.5.1: Ανίχνευση και ταυτοποίηση μυκήτων σε αποθηκευμένο σπόρο.....	16
1.5.1.1: Εξέταση σπόρων και ανίχνευση μυκήτων με την χρήση του μικροσκοπίου..	16
1.5.1.2: Εξέταση σπόρων και ανίχνευση μυκήτων με την χρήση μοριακών τεχνικών (PCR).....	16
1.5.1.3: Εξέταση σπόρων και ανίχνευση μυκήτων με την χρήση χημικών και βιοχημικών τεχνικών (gas chromatography).....	17
1.5.1.4: Κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης σπόρων σιταριού.....	17
1.5.2: Ανίχνευση και ταυτοποίηση εντόμων σε αποθηκευμένο σιτάρι.....	18
1.5.2.2: Μέτρηση της προσβολής.....	18
Κεφάλαιο 2: Υλικά και μέθοδοι, πειραματική διαδικασία.....	18
2.1: Υλικά και μέθοδοι.....	20
2.1.1: Συλλογή δειγμάτων.....	20
2.1.2: Προετοιμασία δειγμάτων του πειραματικού μέρους.....	22
2.2: Πειραματικό μέρος.....	22
2.2.1: Α. Βιοδοκιμές.....	22

2.2.1.1: Προετοιμασία πειράματος και Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν.....	22
2.2.1.2: Βιοδοκιμή I	23
2.2.1.3: Βιοδοκιμή II	24
2.2.2: Blotter test.....	27
2.2.2.1: Εκτέλεση υγρού θαλάμου για την εξέταση και την ανίχνευση μυκήτων σύμφωνα με τη μέθοδο Blotter test.....	28
2.2.2.2: Μορφολογική ταυτοποίηση μυκήτων που καταγράφηκαν σε αποθηκευμένους σπόρους σιταριού.....	29
Κεφάλαιο 3:Αποτελέσματα.....	30
3.1:Ποσοστά ανάπτυξης μυκήτων.....	30
3.1.1: Ποσοστό ανάπτυξης μυκήτων σε σπόρους.....	30
3.1.1.1:Εκτιμητική για Βιοδοκιμή I.....	30
3.1.1.1.1:Blotter test.....	36
3.1.1.2: Εκτιμητική για την βιοδοκιμή II.....	40
3.1.1.3: Συσχέτιση ανάπτυξης μυκήτων με ανάπτυξη πληθυσμού εντόμων.....	41
3.2: Μετασυλλεκτικοί μύκητες που ανιχνεύθηκαν και τα χαρακτηριστικά τους.....	39
3.3: Παραγωγή απογόνων.....	43
3.3.1: Ανάπτυξη εντόμων.....	50
3.3.1.1: Στατιστική ανάλυση.....	50
3.3.1.2: Παραγωγή απογόνων.....	50
3.4:Επίδραση της γής διατόμων στην παραγωγή απογόνων των εντόμων.....	56
3.4.1: Βιοδοκιμή I.....	56
3.4.2: Βιοδοκιμή II.....	56
3.4.3: Γη διατόμων.....	56
Κεφάλαιο 4: Συζήτηση	57
4.1: Στη βιοδοκιμή I.....	57
4.2: Στην βιοδοκιμή II.....	57

4.3: Συμπεράσματα.....	58
Βιβλιογραφία:	59
Σύνδεσμοι.....	62

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε στο εργαστήριο η ανάπτυξη των πληθυσμών των ειδών *Rhyzopertha dominica*, *Sitophilus granarius* και *Sitophilus oryzae* στο σιτάρι. Μαζί με τα έντομα στα φιαλίδια εισήχθησαν διαφορετικοί συνδυασμοί υγιών και μολυσμένων σπόρων με μύκητες, επίσης προστέθηκε σε τρεις συγκεντρώσεις ο βιολογικός παράγοντας γη διατόμων (0, 500, 1000 ppm). Εκτελέστηκαν 2 βιοδοκιμές με την πρώτη να πραγματεύεται το είδος *R.dominica* και 2 συνδυασμούς μυκήτων που εκτέθηκαν σε τρεις συγκεντρώσεις γης διατόμων και η δεύτερη να πραγματεύεται τα είδη *S.oryzae* και *S.granarius*, τέσσερις συνδυασμοί μυκήτων και 3 συγκεντρώσεις γης διατόμων (0, 500, 1000 ppm). Η βιοδοκιμή I μελετήθηκε σε φιαλίδια των 30 και 60 ημερών ενώ η βιοδοκιμή II μελετήθηκε σε φιαλίδια των 60 ημερών. Μετά το άνοιγμα των φιαλιδίων καταγράφηκε η παραγωγή απογόνων των εντόμων, η ανάπτυξη των μυκήτων στους σπόρους και η επίδραση της γης διατόμων και οι τρόποι με τους οποίους επηρεάζει το ένα το άλλο. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η γη διατόμων μειώνει την παραγωγή απογόνων όσο αυξάνονται τα άτομα ανά φιαλίδιο ενώ δεν υπήρξε σχεδόν καμία διαφορά μεταξύ των τριών συγκεντρώσεων της γης διατομών σε πολύ μικρούς πληθυσμούς ανά φιαλίδιο. Καταγράφηκε η παρουσία 5 γενών μετασυλλεκτικών μυκήτων το σημαντικότερο εκ των οποίων ήταν το γένος *Fusarium* το οποίο σε περιπτώσεις που υπήρχε μεγάλη ποσότητα μυκήτων στους σπόρους φάνηκε να κυριαρχεί και να μηδενίζει τα υπόλοιπα καθώς και αποδείχθηκε ότι νεκρώνει το έμβρυο των σπόρων. Φαίνεται ότι όσο αυξάνεται η παραγωγή απογόνων αυξάνεται και η ανάπτυξη των μυκήτων ενώ δεν υπήρξε κάποια άμεση ένδειξη ότι η γη διατόμων έχει άμεση επίδραση στην ανάπτυξη των μυκήτων.

Abstract

On this examination we evaluated in the laboratory the progeny production of *Rhyzopertha dominica*, *Sitophilus granaries* and *Sitophilus oryzae* on wheat. In the vials together with the insects where different combinations of healthy kernels and kernels infected with fungi, we also applied three different concentrations of diatomaceous earth. Two bioassays were executed: the first with the species *Rhyzopertha dominica* and two combinations of fungi was exposed on three concentrations of diatomaceous earth (0, 500, 1000 ppm) and the second was with *Sitophilus granarius* and *Sitophilus oryzae* and four combinations with fungi, that was also exposed on three concentrations of diatomaceous earth (0, 500, 1000 ppm). The bioassay I was evaluated on vials of 30 and 60 days but the bioassay II was evaluated on 60 days vials only. After the opening of the vials we recorded the progeny production, the development of fungi on the kernels, the aftereffects of diatomaceous earth and the interactions between the three. The results show that diatomaceous earth reduced the progeny production while more insects/vial increased. However, there was no effect on the vials that had small progeny production and the progeny production was the same between the three concentrations of diatomaceous earth when the insect/vial was very low. We recorded the activity of five genus of postharvest fungi with the most important genus *Fusarium*. In cases we had big concentrations of fungi on the kernels it was the one to prevail against the other fungi and we also proved that it was the genus that killed the kernels. It seems, as progeny production increased the fungi development grown, but there was no indication that diatomaceous earth has an immediate role on the reduction of fungi development.

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε το ακαδημαϊκό έτος 2023-2024 στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας καθώς και στο εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Ιωάννη Βαγγέλα, ο οποίος ήταν πάντα παρών και με καθοδηγούσε κατά τη διάρκεια της πτυχιακής μου και θα ήθελα ιδιαιτέρως να τον ευχαριστήσω ιδιαίτερος που με έβαλε στον κόσμο της φυτοπαθολογίας. Επιπροσθέτως θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κύριο Αθανασίου Χρήστο για της συμβουλές και την καθοδήγηση του στο εντομολογικό κομμάτι της διατριβής. Τέλος, θα ήθελα ευχαριστήσω την Dr. Μαρία Σακκά για την επίβλεψη και τις συμβουλές της κατά την διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων μου.

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1 Εισαγωγή

Η ασφάλεια των τροφίμων είναι προτεραιότητα παγκοσμίως (Campbel et al. 2009). Οι επιπτώσεις της κλιματικής αλλαγής έχουν γίνει αισθητές και αυτό κάνει την ασφάλεια των τροφίμων ασταθή (Hannah et al. 2013). Η ασφάλεια των τροφίμων κινδυνεύει από γεγονότα όπως αύξηση της θερμοκρασίας και της στάθμης του νερού, καθώς και τη διάδοση εντόμων και ασθενειών που μειώνουν την ποσότητα και την ποιότητα των τροφίμων (Mehrabi et al. 2022). Αυτά δημιουργούν την ανάγκη για να αναπτυχθούν μέθοδοι που θα κάνουν τα προϊόντα της φυτικής παραγωγής λιγότερο ευπαθή.

Τα σιτηρά (σιτάρι, ρύζι, καλαμπόκι κ.λ.π.) από την ύπαρξή μας αποτελούν το βασικό τμήμα της διατροφής μας. Είναι γεγονός ότι οι μισές περίπου θερμίδες που καταναλώνει ο άνθρωπος κάθε μέρα έρχονται από επεξεργασία των σπόρων των σιτηρών (Awika et al. 2011). Για να υπάρξει κατανόηση του ρυθμού αύξησης του πληθυσμού έχει υπολογιστεί ότι με τον ρυθμό που αυξάνεται ο πληθυσμός της στις αρχές του 23 αιώνα ο πληθυσμός της γης θα αγγίζει τα 14 δισεκατομμύρια. Με αυτόν τον ρυθμό αύξησης η ανάγκη για τροφή θα είναι μεγάλες και θα χρειαστεί βελτίωση τόσο στη ποσότητα όσο και στην ασφάλεια των τροφίμων (Krapivin et al. 2017).

Όσον αφορά την τροφή των ανθρώπων και των ζώων το σιτάρι είναι το σιτηρό ή ο καρπός που επικρατεί για τη διατροφή μας. Η προσαρμοστικότητα και οι προοπτικές που έχει το σιτάρι για υψηλή παραγωγή καθώς και η χρήση του για αρτοσκευάσματα, ζυμαρικά πίτσες και άλλα είναι οι λόγοι που έχει τόσο μεγάλη επιτυχία στη διατροφή μας. Επίσης το σιτηρό περιέχει αμινοξέα, μέταλλα και βιταμίνες που είναι πολύ σημαντικά για τη διατροφή και την υγεία μας (Shewry et al. 2009).

Με βάση το Υπ.Α.Α.Τ την περίοδο 2017/2018 το σιτάρι ήταν το 2^ο σε παραγωγή και κατανάλωση σιτηρό στην Ελλάδα μετά το καλαμπόκι. Όμως η παραγωγή σιτηρών στην Ελλάδα συναντά κάποια προβλήματα όπως: το αυξημένο κόστος παραγωγής και η αντίστοιχη μείωση της ανταγωνιστικότητας, τα προβλήματα διάθεσης των προϊόντων, η εξαρτώμενη τιμή των προϊόντων από τα καιρικά φαινόμενα, η ποιοτική υστέρηση προϊόντων λόγω πολλών προσμείξεων με ανεπιθύμητους σπόρους ζιζανίων και αγάνων, η έλλειψη υποδομών κ.λ.π., αλλά και αρκετά προβλήματα κατά την αποθήκευσή του από έντομα και μετασυσλεκτικές ασθένειες.

Γενικά χρειάζεται να βρεθούν τρόποι για την μείωση των απωλειών της παραγωγής. Ειδικότερα το 15-20% των ετήσιων απωλειών παραγωγής σιταριού προκύπτουν από μυκητολογικές ασθένειες, λ.χ. σκωριάσεις, ή κηλιδώσεις του φυλλώματος αλλά και από μεταλλευτικές ασθένειες οφειλόμενες στα είδη του γένους *Fusarium* spp., *Alternaria* spp αλλά και στα είδη όπως του γένους *Aspergillus* (Figueroa M. 2017). Επίσης σημαντικό ποσοστό της ετήσιας παραγωγής χάνεται εξαιτίας των εντόμων

των αποθηκευμένων προϊόντων τα όποια είτε καταναλώνουν και καταστρέφουν τα προϊόντα είτε δημιουργούν συνθήκες για την αναπτύξει μυκήτων (δρουν ως hotspot). Σύμφωνα με τους Flinn (2004), Padín (2002), και Remigiusz (2019) κάποια από τα έντομα τα οποία προσβάλουν το αποθηκευμένο σιτάρι είναι τα: *Cryptolestes ferrugineus*, *Tribolium castaneum* (κόκκινο σκαθάρι των αλεύρων), *Rhyzopertha dominica*, *Sitophilus oryzae* (σκαθάρι του ρυζιού), *Acanthoscelides obtectus* (σκαθάρι του φασολιού), *Sitophilus granarius* (σιταρόψειρα), *Tribolium confusum* (σκαθάρι των αλεύρων).

1.2: Μετασυλλεκτικά προβλήματα οφειλόμενα σε ζωικούς εχθρούς και μύκητες.

1.2.1: Κοινά μετασυλλεκτικά προβλήματα οφειλόμενα σε ζωικά παράσιτα.

Κατά κύριο λόγο οι μετασυλλεκτικές προσβολές σε αποθηκευμένα προϊόντα γενικά αλλά κυρίως σε σπόρους οι οποίες οφείλονται σε ζωικούς οργανισμούς περιλαμβάνουν κυρίως έντομα, ακάρεα, πουλιά και τρωκτικά. Ένα σημαντικό ποσοστό από αυτούς τους οργανισμούς αποτελούν τα έντομα τα οποία είτε άμεσα (τρώγοντας και καταστρέφοντας τους σπόρους), είτε έμμεσα (αφήνοντας αποχωρήματα, εκδύσεις και ουσίες που είναι αλλεργιογόνες και βλαβερές για τον άνθρωπο) υποβιβάζουν και μειώνουν την παραγωγή. Κάποια από τα είδη που έχουν βρεθεί σε μελέτες είναι: το *Tribolium castaneum* (Κόκκινο σκαθάρι των αλεύρων), το *Lasioderma serricorne* (σκαθάρι του καπνού), το *Oryzaephilus surinamensis* (πριονωτό σκαθάρι των δημητριακών), το *Plodia interpunctella* (σκώρος των σιτηρών), το *Trogoderma variabile*, το *O. mercator*, το *Stegobium paniceum* (σκαθάρι του ψωμιού), το *Rhyzopertha dominica*, το *Cadra cautella* (σκώρος του αμυγδάλου), το *Blattella germanica* (γερμανική κατσαρίδα), *Periplaneta Americana* (Αμερικανική κατσαρίδα), το *Ahasverus advena*, το *Sitophilus oryzae* (σκαθάρι του ρυζιού), και το *S. Zeamais* (σκαθάρι του καλαμποκιού) (Olsen et al. 1987, Gerken et al. 2017, Alonso-Amelot et al. 2011).

Κάποιοι άλλοι οργανισμοί που μπορούν να προκαλέσουν σημαντική ζημιά αν δεν υπάρξει παρέμβαση είναι τα τρωκτικά και τα πτηνά. Έρευνες έχουν καταγράψει απώλειες του ύψους 23.1%, τα οποία δημιουργούν φωλιές και προκαλούν ζημιές όπως η άνιση εξάπλωση του σπόρου, καταστροφή συσκευασιών, ύπαρξη φτερών και τρίχας και αποχωρήματα (Shah et al. 2023). Κάποια από τα σημαντικότερα είδη πτηνών και τρωκτικών που εισβάλλουν σε αποθηκευτικούς χώρους είναι τα είδη πτηνών *Passer domesticus* (οικιακό σπουργίτι), *Columba livia* (κοινό περιστέρι) καθώς και τα είδη των τρωκτικών *Mus musculus* (οικιακό ποντίκι), *Rattus norvegicus* (κοινός καστανός αρουραίος) και *Rattus rattus* (μαύρος αρουραίος) (Stored-grain Ecosystems by Jayas D.S).

Ένας άλλος τύπος ζωικού οργανισμού που εισβάλλει σε αποθηκευτικούς χώρους είναι τα ακάρεα, ορισμένα από τα καταγεγραμμένα είδη είναι τα *Dermatophagoides farinae* (οικιακό άκαρι της σκόνης), *Tyrophagous putrescentiae* (άκαρι των

τυριών), *Cheyletus malaccensis*, *Acrus siro* (άκαρι των αλεύρων), *Acarophenax tribolii* και *Pyemotes herfsi* (Mahgoob et al. 2006).

Όμως αυτά που μας αφορούν περισσότερο είναι τα έντομα αποθηκών (Stored Product Insects). Ως έντομα αποθηκών θεωρούνται τα έντομα τα οποία προσβάλλουν και καταστρέφουν προϊόντα σε αποθηκευτικούς χώρους αλλά επίσης μπορούν να πραγματοποιήσουν και να ολοκληρώσουν τον βιολογικό τους κύκλο σε συνθήκες αποθηκών λ.χ. μια ακρίδα που θα μπει τυχαία ή μια σφήκα που θα μπει κυνηγώντας κάποιο άλλο έντομο δεν είναι έντομα αποθηκών. Τα έντομα αποθηκών ανήκουν κυρίως στην τάξη *Coleoptera* και *Lepidoptera*, τα έντομα αποθηκών χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, σε αυτά που έχουν την ικανότητα να προσβάλουν τον ακέραιο σπόρο (πρωτεύοντα) λ.χ. είδη τα οποία ανήκουν της οικογένειες *Bostrychidae*, *Curculionidae*, *Dermestidae* και αυτά που δεν έχουν την ικανότητα να προσβάλουν ακέραιο σπόρο και προσβάλουν ήδη προσβεβλημένο σπόρο ή επεξεργασμένα προϊόντα (δευτερεύοντα) λ.χ. είδη που ανήκουν στην οικογένειες *Pyralidae*, *Tenebrionidae*, *Cucujidae* (Έντομα αποθηκών και τροφίμων, Κωνσταντίνος Θ.Μπουχέλος).

Η είσοδος των εντόμων στον αποθηκευτικό χώρο και το προϊόν γίνεται με 4 τρόπους:

1. **Κύρια μόλυνση:** είσοδος προσβεβλημένου προϊόντος (από τον αγρό), σε άδεια αποθήκη.
2. **Δευτερεύουσα μόλυνση:** είσοδος προσβεβλημένου προϊόντος σε αποθήκη με υγιές προϊόν.
3. **Αναμόλυνση:** προσβολή από έντομα που υπάρχουν στα μηχανήματα από προηγούμενη επεξεργασία.
4. **Εισβολή:** Είσοδος των εντόμων στην αποθήκη μέσω πορτών, παραθύρων, ή ανοιγμάτων στους τοίχους κ.λ.π.

1.2.2: Κοινά μετασυλλεκτικά προβλήματα οφειλόμενα σε παθογόνα.

Στους αποθηκευμένους σπόρους συνήθως παρατηρούνται μετασυλλεκτικά παθογόνα που παράγουν μυκοτοξίνες όπως π.χ. οι αφλατοξίνες οι οποίες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των μυκήτων κυρίως του γένους *Aspergillus* (Wogan et al. 1966). Γενικά είναι τοξίνες μεγάλης τοξικότητας για τις οποίες έχει βρεθεί ότι είναι καρκινογόνες σε αρκετά ζωικά είδη.

Οι μετασυλλεκτικές προσβολές σπόρων από μύκητες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: στις μολύνσεις που προϋπάρχουν στο σπόρο από τον αγρό λ.χ. γένος *Fusarium* και στις μολύνσεις που μολύνουν τον σπόρο μετασυλλεκτικά μετά την είσοδο του σπόρου στην αποθήκη λ.χ. του γένους *Rhizopus*. Οι κυριότερες μολύνσεις που γίνονται μετασυλλεκτικά από μύκητες γίνονται κυρίως από τα γένη *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Alternaria* και *Mucor* (Kolawole et al. 2013).

Οι μύκητες προσβάλλουν τον σπόρο με διαφορετικούς τρόπους, ορισμένοι μύκητες όπως λ.χ. το γένος *Fusarium* μέσω του εδάφους προσβάλλουν το φυτό και φτάνουν στο σπόρο. Οι μολυσμένοι αυτοί σπόροι, από *Fusarium*, όταν αποθηκεύονται μολύνουν και άλλους σπόρους. Οι μολυσμένοι σπόροι από το γένος *Aspergillus* αναπτύσσουν μυκήλιο στο έδαφος ή παράγουν καρποφορίες (κονιδιοφόρους με κονίδια ή σε κάποιες περιπτώσεις σχηματίζουν και σκληρώτια) και στη συνέχεια μέσω των κονιδίων μολύνουν και άλλους υγιείς σπόρους (Amaiike et al. 2011, Wicklow et al.. 1984).

Οι μυκοτοξίνες που παράγονται από τους μύκητες έχει αναφερθεί ότι στον άνθρωπο μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες του αναπνευστικού συστήματος(εισπνοή μεγάλης ποσότητας σπορείων του είδους *Aspergillus flavus* (πηγή: A Pictorial Guide for the Identification of Mold Fungi on Sorghum Grain). Επιπλέον μπορεί να προκαλέσουν καρκίνο του πνεύμονα και του δέρματος με εισπνοή ή επαφή, καρκίνο του ήπατος και η χρόνια αλληλεπίδραση μπορεί να οδηγήσει σε τερατογένεσης, ανοσοανεπάρκεια και μεταλλάξεις. Μπορεί επίσης να αναπτυχθεί μεγάλη ποσότητα από μυκοτοξίνες σε μια μικρή ποσότητα σπόρων που κάποιες από αυτές είναι η αφλατοξίνη, η τενοξίνη, τα αλκαλοειδή ή η αλτερναριόλη.

1.3:Σημαντικότερα είδη εντόμων αποθηκών σε σπόρους σιταριού

Ο Κωνσταντίνος Θ. Μπουχέλος στο βιβλίο έντομα αποθηκευμένων προϊόντων και τροφίμων αναφέρει τα παρακάτω:

Sitophilus granarius (Coleoptera: Curculionidae): Σκαθάρι του σιταριού

Ακμαίο

Το ακμαίο έχει βαθύ καστανό έως μαύρο χρώμα και το μήκος του σώματος του είναι 3-5 mm. Το πρόνωτο και τα έλυτρα έχουν ίδιο μέγεθος ενώ το ρύγχος έχει μήκος ίσο με τα 2/3 του προνώτου. Στο πρόνωτο φέρει ατρακτοειδή ή ωοειδή κοιλώματα. Στα έλυτρα φέρει αυλακώσεις με κοίλα στίγματα. Δεν έχει μεμβρανοειδές πτέρυγες και δεν πετά.

Προνύμφη

Το μήκος σώματος της προνύμφης είναι 3-4 mm, είναι κοντόχονδρη ευκέφαλη/άποδη (χαρακτηριστικό της οικογένειας *Curculionidae*) κεκαμένη με αχυρόλευκο χρώμα

Βιολογία

Είναι πρωτεύων, έχει 4-5 γενεές ανά έτος. Διαχειμάζει ως προνύμφη μέσα στους αποθηκευμένους σπόρους αλλά και ως ακμαίο στους σωρούς σπόρων ή σε άλλα σημεία της αποθήκης. Την άνοιξη, τα θηλυκά εναποθέτουν έως και 400 ωά το κάθε ένα από ένα, μέσα σε βοθρίο που ανοίγουν σε κάθε σπόρο. Το εξωτερικό άνοιγμα του βοθρίου κλείνεται με ζελατινώδες έκκριμα του εντόμου. Η εκκολαπτόμενη προνύμφη

τρέφεται και αναπτύσσεται με το εσωτερικό του σπόρου, εκεί νυμφώνεται και γίνεται ακμαίο. Πυκνή πληθυσμοί του εντόμου μπορούν να προκαλέσουν άναμμα των σπόρων και ανάπτυξη μετασυλλεκτικών ασθενειών. Προτιμά πολύ ξηρούς σπόρους παλαιών εσοδειών.

Προσβολές

Ξηρούς σπόρους δημητριακών (σιτάρι, ρύζι, βρώμη, κριθάρι, σόργο, σίκαλη, αραβόσιτο), πιο σπάνια και όσπρια(ρεβίθια).

Sitophilus oryzae (Coleoptera: Curculionidae): Σκαθάρι του ρυζιού (Κωνσταντίνος Θ. Μπουχέλος)

Ακμαίο

Είναι πρωτεύων, είναι όμοιο με το *S. granarius*. Το μήκος του σώματος του είναι 2,5-4,5 mm και το χρώμα του είναι καστανό ή βαθύ καστανό με τέσσερις ανοιχτόχρωμες κηλίδες (υπέρυθρες ή κιτρινωπές) 2 σε κάθε έλυτρο. Στον προθώρακα τα κοιλώματα είναι πυκνά κυκλικά ή πολυγωνικά. Έχει μεμβρανοειδής πτέρυγες και πετά.

Προνύμφη

Έχει μικρές διαφορές από το *S.granarius*.

Βιολογία

Σε θερμά κλίματα μπορεί να ξεπεράσει της 4 γενεές ανά έτος. Αντέχει στις χαμηλές θερμοκρασίες του χειμώνα περισσότερο από το *S. granarius*. Επειδή πετά μπορεί να προσβάλει τους σπόρους από τον αγρό και να καταλήξει της αποθήκες με το προϊόν. Γεννά μέχρι και 400 ωά.

Προσβολές

Προσβάλει το ρύζι και τους σπόρους τον δημητριακών. Λιγότερο συχνά προσβάλει αλευρώδη προϊόντα, βαμβακόσπορο, όσπρια, ξηρούς καρπούς, ζωοτροφές κ.λπ..

Rhyzopertha dominica (Coleoptera: Bostrychidae): Σκαθάρι του ρυζιού (Κωνσταντίνος Θ. Μπουχέλος)

Ακμαίο

Το ακμαίο είναι επίμηκες, κυλινδρικό, ερυθροκαστανού χρώματος και έχει μήκος σώματος 2,5-3mm. Η κεφαλή δεν φαίνεται από πάνω αλλά καλύπτεται από των προθώρακα(υπόγναθω).Οι κεραίες είναι χαρακτηριστικές με ρόπαλο από 3 αραιά τοποθετημένα άρθρα. Ο θώρακας στη ραχιαία επιφάνεια, φέρει πυκνά χιτινώδη

εξογκώματα σαν βοστρύχους (*Bostrychidae*). Στα έλυτρα υπάρχουν ευκρινείς κατά μήκος γραμμές από μικρά κοιλώματα.

Προνύμφη

Η προνύμφη είναι σκαραβαιόμορφη (κυρτό σώμα, παχύ και διογκωμένο στο μπροστινό μέρος), χρώματος λευκού και κεφαλή και πόδες καστανού χρώματος. Το μήκος της προνύμφης σε πλήρη ανάπτυξη είναι 4-6 mm.

Βιολογία

Είναι πρωτεύων, διαχειμάζει στις αποθήκες σε όλα τα στάδια. Σε θερμοκρασίες 25-28°C μπορεί να έχει 4-6 επάλληλες γενιές ανά έτος. Πολλές προνύμφες σε κάθε σπόρο και καταστρέφουν το εσωτερικό του όπου και νυμφώνονται.

Προσβολές

Είναι το πολυπληθέστερο έντομο αποθηκών σε σιτάρι και ρύζι στην Ελλάδα. Προσβάλλει επίσης κριθάρι, καλαμπόκι και άλλα προϊόντα αλεύρου όπως τα μπισκότα.

1.4: Μετασυλεκτικά έντομα και παθογόνα που ανιχνευθήκαν στην Ελλάδα.

1.4.1: Έντομα αποθηκών που έχουν καταγραφή στην Ελλάδα

Κάποια από τα πιο σημαντικά είδη και γένη εντόμων αποθηκευμένων προϊόντων που καταγραφήκαν είναι τα είδη του γένους *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae) τα οποία προσβάλουν δημητριακά όπως το σιτάρι και το καλαμπόκι, το είδος *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrychidae) το οποίο προσβάλλει δημητριακά, και άλλα όπως τα είδη των *Oryzaephilus* και *Tribolium* (Coleoptera) (Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο).

1.4.2: Μετασυλλεκτικές ασθένειες που έχουν καταγραφή στην Ελλάδα

Κάποια από τα σημαντικά είδη και γένη μετασυλλεκτικών ασθενειών που καταγράφηκαν ήταν είδη του γένους *Alternaria*, είδη του γένους *Aspergillus*, είδη του γένους *Fusarium*, είδη του γένους *Rhizopus* και είδη του γένους *Penicillium* (πηγή: Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο).

1.5: Μέθοδοι ανίχνευσης μετασυλλεκτικών μυκήτων και εντόμων.

1.5.1: Ανίχνευση και ταυτοποίηση μυκήτων σε αποθηκευμένο σπόρο

1.5.1.1: Εξέταση σπόρων και ανίχνευση μυκήτων με την χρήση του μικροσκοπίου. (A Pictorial Guide for the Identification of Mold Fungi on Sorghum Grain)

Παραδοσιακά η ανίχνευση μετασυλλεκτικών μυκήτων γινόταν με την χρήση του μικροσκοπίου, εκλαμβάνοντουσαν γύρω στα 70 φιαλίδια με σπόρους οι οποίοι εξετάζονταν σε στερεοσκόπιο για την παρατήρηση μυκηλίου και συμπτωματολογίας και στην συνέχεια με βάση αυτήν την εξέταση ακολουθούσε η κατασκευή μικροσκοπικού παρασκευάσματος και παρατήρηση της μορφολογίας του μυκήλιο, παρατήρηση της μορφολογίας εγγενών και αγενών καρποφοριών, επίσης παρατήρηση της μορφολογίας των σπορίων και αναγνώριση των ειδών με την χρήση κλειδών αναγνώρισης μυκήτων ή εγχειριδίων. Εάν στην στερεοσκοπική εξέταση υπήρχε μόνο συμπτωματολογία και όχι σημειολογία ή υπήρχε μη επαρκές υλικό για την αναγνώριση των παθογόνων ακολουθούσε τοποθέτηση των σπόρων σε υγρό θάλαμο για 7 μέρες σε θερμοκρασίες 28 ± 1 °C για την επαγωγή της ανάπτυξης του παθογόνου. Έπειτα από το πέρας των 7 ημερών ακολουθούσε εξέταση των σπόρων σε στερεοσκόπιο και μικροσκόπιο επίσης μπορούσε να πραγματοποιηθεί και καθαρή καλλιέργεια του παθογόνου. Η συγκεκριμένη τεχνική είχε και τα αρνητικά της, διότι είναι πολύ χρονοβόρα και η δραστηριότητα που παρατηρείται στο μικροσκόπιο δεν είναι αντιπροσωπευτική του πραγματικού ποσοστού των μολύνσεων και αυτό ανάγκασε τους επιστήμονες να αρχίσουν να καταφεύγουν σε πιο εξελιγμένες τεχνικές αναγνώρισης όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και η χρωματογραφία αερίων (Gas Chromatography).

1.5.1.2: Εξέταση σπόρων και ανίχνευση μυκήτων με την χρήση μοριακών τεχνικών (PCR)

Μια από της πιο σύγχρονες μεθόδους αναγνώρισης των ειδών γίνεται με την χρήση μοριακών τεχνικών μια από αυτές είναι η Multiplex PCR ,αυτό σημαίνει ότι αντί για την παραδοσιακή PCR που υπαρχή η χρήση ενός εκκινητή που επιτρέπει των πολλαπλασιασμό ενός γονιδίου σε ένα παθογόνο και έχει έναν κύκλο μεταβολής της θερμοκρασίας περιέχει πολλούς εκκινητές για πολλά παθογόνα και έχει τον κύκλο της θερμοκρασίας ρυθμισμένο έτσι ώστε να μπορούν να λειτουργήσουν όλες οι αντιδράσεις ταυτόχρονα, επίσης μπορεί να πραγματοποιηθεί και η παραδοσιακή PCR με μία αντίδραση να τρέχει. Λαμβάνονται δείγματα σπόρων από διαφορετικά σημεία της αποθήκης, μεταφέρονται σε αποστειρωμένες σακούλες στο εργαστήριο και στην συνέχεια γίνεται απομόνωση του DNA και πραγματοποιείται PCR με μία αντίδραση ή πολλές σύγχρονες. Όσων αφορά τους εκκινητές μπορούν να τοποθετηθούν εκκινητές για ένα χαρακτηριστικό γονίδιο του κάθε είδους ή μπορεί να γίνει έμμεση ανίχνευση μυκοτοξινών με την χρήση εκκινητών που προσδένονται στα γονίδια που

παράγουν την χαρακτηριστική μυκοτοξίνη του κάθε είδους (λ.χ. *Aspergillus flavus*=αφλατοξίνη) (Sadhasivam et al. 2017).

1.5.1.3:Εξετάση σπόρων και ανίχνευση μυκήτων με την χρήση χημικών και βιοχημικών τεχνικών (gas chromatography)

Μία από της βιοχημικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της δραστηριότητας μυκήτων είναι η χρωματογραφία με χρήση αερίων (gas chromatography), η οποία ανιχνεύει στην ατμόσφαιρα του αποθηκευμένου χώρου την ύπαρξη πτητικών οργανικών ενώσεων (Volatile organic compounds, VOC), οι οποίες είναι υγρές ή αέριες ενώσεις οι οποίες εκκρίνονται από όλους τους ζωντανούς οργανισμούς (λ.χ. άνθρωπος, έντομα, μύκητες) και είναι συγκεκριμένες για το κάθε είδος, επίσης το κάθε VOC αντιδρά με μία συγκεκριμένη χημική ουσία και για να γίνει η ανίχνευση του συγκεκριμένου είδους πρέπει να υπάρξει η ανάλογη ουσία για το VOC που παράγει ο κάθε μύκητας. Το αρνητικό στοιχείο αυτής της μεθόδου είναι ότι μπορεί να ανιχνεύσει μόνο την δραστηριοποίηση ενός παθογόνου και όχι το ποσοστό στο οποίο υπάρχει στην αποθήκη (Pan et al. 2014).

1.5.1.4: Κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης σπόρων σιταριού.

Η σωστή αποθήκευση των σπόρων είναι σημαντική προϋπόθεση για την μείωση απωλειών της παραγωγής και την διατήρηση της ποιότητας τους (Barkat et al. 2016). Κάποια μέτρα που πρέπει να λαμβάνονται για την ασφαλή αποθήκευση των σπόρων είναι :

- Η παρεμπόδιση εισόδου υγρασίας σε αποθηκευτικούς χώρους.
- Η μείωση της θερμοκρασίας στον χώρο αποθήκευσης .
- Η καταπολέμηση αναπτυσσόμενων παθογόνων και εντόμων στον αποθηκευτικό χώρο.
- Η παρεμπόδιση της εισόδου και της ανάπτυξης εντόμων και μυκήτων στο προϊόν.

Κάποιες από τα εργαλεία που χρησιμοποιούνται για την διατήρηση και την ασφάλεια των αποθηκευμένων προϊόντων είναι :

- Η αποξήρανση του προϊόντος με την χρήση ειδικών συσκευών
- Η χρήση συστημάτων αερισμού
- Η χημική αντιμετώπιση των μυκήτων με την χρήση μυκητοκτόνων και των εντόμων των αποθηκευμένων προϊόντων με την χρήση εντομοκτόνων ή αέριων εντομοκτόνων.

Οι πιο σημαντικές μεταβλητές για την ανάπτυξη εντόμων και μυκήτων στον αποθηκευτικό χώρο είναι η **Θερμοκρασία** και η **Σχετική Υγρασία**:

1. **Θερμοκρασία:** Κατά την διάρκεια της αποθήκευσης η θερμοκρασία αυξομειώνεται ανάλογα με της εξωτερικές καιρικές συνθήκες και της συνθήκες αποθήκευσης. Κατά μέσω όρο οι μετασυλλεκτικοί μύκητες

αναπτύσσονται πολύ καλά σε θερμοκρασίες κοντά στους 30 °C, υπάρχουν όμως και είδη του γένους *Aspergillus* που αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες 45-50 °C αντίστοιχα, επίσης έντομα των ειδών *Rhyzopertha dominica*, *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis* και *Tribolium castaneum* αναπτύσσονται καλά σε θερμοκρασίες 15-30 °C. Συνεπώς η καλύτερη λύση είναι ο σπόρος πριν την αποθήκευση να ψύχεται σε θερμοκρασίες 12-15 °C. Κατά την διάρκεια της αποθήκευσης η ψύξη του προϊόντος μπορεί να γίνει με την χρήση συσκευών κρύου αέρα (Barkat et al. 2016).

2. **Σχετική Υγρασία:** Πρέπει να γίνεται παρεμπόδιση της εισαγωγής υγρασίας στο προϊόν πριν και μετά την αποθήκευση, η ανάπτυξη μεγάλου αριθμού εντόμων αποθηκών λόγω της εκπνοή τους μπορεί να παράξει υγρασία η οποία θα προκαλέσει άναμμα τον σπόρων και ανάπτυξη μετασυλλεκτικών μυκήτων, για αυτό πρέπει να ελέγχονται προσεκτικά οι πληθυσμοί των εντόμων. Συνεπώς η σχετική υγρασία του σπόρου πρέπει να κυμαίνεται περίπου σε ποσοστό 12,5%, σπόροι με Σ.Υ 15-16% είναι επιρρεπής σε προσβολές από μύκητες (Barkat et al. 2016).

1.5.2:Ανίχνευση και ταυτοποίηση εντόμων σε αποθηκευμένο σιτάρι.

1.5.2.1: Έλεγχος κατάστασης της αποθήκης-Δειγματοληψία

Ο Κωνσταντίνος Θ. Μπουχέλος στο βιβλίο έντομα αποθηκευμένων προϊόντων και τροφίμων αναφέρει τα παρακάτω:

Μετά την αποθήκευση του προϊόντος πρέπει να γίνεται προσεκτικός έλεγχος, γιατί η μία εντομολογική προσβολή είναι κίνδυνος για το προϊόν και γενικά θα πρέπει να γίνονται προσεκτικοί έλεγχοι για την υγεία και την ακεραιότητα του σπόρου. Συχνότεροι και πιο λεπτομερείς έλεγχοι θα πρέπει να γίνονται σε περιόδους με μεγάλη θερμοκρασία ή σχετική υγρασία στην ατμόσφαιρα. Για αυτό τον σκοπό είναι απαραίτητη η χρήση θερμογράφων εντός και εκτός της αποθήκης. Όταν διαπιστώνεται η διαταραχή της κανονικής σχετικής υγρασίας του προϊόντος (ιδίως για τα σιτηρά) πρέπει να γίνεται προσδιορισμός της γενικής και κατά τόπων υγρασίας. Ο απαραίτητος επίσης έλεγχος της θερμοκρασίας των συντριμμένων εφοδίων ,σε συνάρτηση με τυχόν υπάρχουσα εντομολογική ή μυκητολογική προσβολή, γίνεται με ειδικά θερμόμετρα σε διάφορα σημεία στην επιφάνεια της αποθήκης η στο βάθος.

Αν υπάρξει εύρεση μικρού αριθμού νεκρών εντόμων στο προϊόν μας δίνεται η ιδέα πιθανής μόλυνσης. Αν όμως βρεθούν έστω και λίγα ζωντανά έντομα ειδών που είναι πολύ καταστροφικά λ.χ. *Sitophilus*, *Rhyzopertha*, *Tribolium* στα σιτηρά, *Ephestia* στην σταφίδα, *Lasioderma* στον καπνό κ.λπ. η προσβολή χαρακτηρίζεται ως επικίνδυνη. Τότε είναι αναγκαία η αντιμετώπιση της προσβολής. Η εύρεση λίγων ατόμων κολεοπτέρων (πολύ ελαφριά προσβολή) κατά το τέλος του φθινοπώρου ή λίγο πριν από την διάθεση του προϊόντος δεν είναι ουσιαστικός κίνδυνος, αλλά ο έλεγχος για την παρακολούθηση της εξέλιξης του προϊόντος πρέπει να γίνεται

συχνότερα. Η ανίχνευση παρασίτων που προσβάλουν τα επικίνδυνα έντομα, σε ικανοποιητικό βαθμό ,μπορεί να ματαίωση ή να αναβάλει την χημική επέμβαση, επιβάλλει όμως την προσεκτική παρακολούθηση του προϊόντος. Η κατάσταση του προϊόντος, η γνώση του βιολογικού κύκλου των εχθρών και παρασίτων τους, σε συνδυασμό με τις συνθήκες που επικρατούν εντός και εκτός της αποθήκης πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη για την διενέργεια η μη απεντόμωσής.

Όταν γίνεται έλεγχος σε σημεία ή χώρους που υπάρχει ύποπτη ή μη εμφανείς προσβολή οι υπεύθυνοι επιστήμονες εφαρμόζουν αυτοσχέδιες παγίδες ,οι οποίες αποτελούνται από δύο τεμάχια πλαστικού δικτυωτού πλέγματος 20 x 10 cm,στερεωμένα με μεταλλικούς συνδετήρες ώστε να σχηματίζουν φάκελο και περιέχουν μέσα φιστίκια, σταφίδες, χαρουπιά κ.λπ. Οι φάκελοι αυτοί τοποθετούνται σε χαρακτηριστικά σημεία των επιθεωρούμενων χώρων. Τα έντομα που τυχόν υπάρχουν εκεί κατευθύνονται προς το περιεχόμενο τον παγίδων και το προσβάλουν ή μένουν μέσα σε αυτό (έλκυση, θιγμοτακτισμός). Μετά από λίγες μέρες γίνεται συλλογή των παγίδων, γίνεται αφαίρεση των συνδετήρων και εξετάζεται το περιεχόμενο με φακό ή γίνεται μεταφορά των δειγμάτων στο εργαστήριο για στερεοσκοπική εξέταση. Τα είδη και ο αριθμός των εντόμων που τυχόν βρέθηκαν, φανερώνουν το ποιόν και το μέγεθος της προσβολής. Οι παγίδες μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν πολλές φορές, επίσης μπορεί να γίνει ενισχύσει τον παγίδων με φερομόνες για μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα.

1.5.2.2: Μέτρηση της προσβολής (Κωνσταντίνος Θ. Μπουχέλος)

Προσδιορισμός του CO₂

Μετριέται η συγκέντρωση του CO₂ σε δείγματα μετά από 24 ώρες παραμονής υπό ειδικές συνθήκες, πχ συγκέντρωση 1% CO₂σημαίνει επικίνδυνα υψηλή εντομολογική προσβολή. Απαιτούνται όμως επαναλήψεις ,δεν υπολογίζει τα νεκρά έντομα και στη μέτρηση υπεισέρχεται επίσης CO₂ της αναπνοής του προϊόντος.

Προσδιορισμός του ουρικού οξέος

Είναι πιο αποτελεσματική για την μέτρηση τυχόν προηγηθήσεις προσβολής, γιατί σε κυμαινόμενοι τοιαύτη, το ύψος του αναγκαίου εντομικού πλήθους για την παραγωγή μετρήσιμου ουρικού οξέος στο εφόδιο, είναι υψηλή.

Εμβάπτιση σπόρου σε διάφορα διαλείμματα

Χρησιμοποιούνται : Σαλικυλικό Na σε νερό, με χλωροφόρμιο και ειδικό λάδι ή διάλειμμά νιτρικού σιδήρου. Λόγω του μικρότερου ειδικού βάρους τους, οι προσβεβλημένοι σπόροι επιπλέουν και γίνεται καταμέτρηση της προσβολής.

Συσκευή των Ashman-Simon

Χειροκίνητη συσκευή που αποτυπώνει σε ταινία χαρτιού της κηλίδες των συντεθλιμμένων εντόμων. Είναι ιδιαιτέρως ευαίσθητη και εμφανίζει με ικανοποιητική ακρίβεια έστω και μικρή προσβολή.

Χρήση εντομοπαγίδας -σόντας.

Ειδική συσκευή με σχήμα μεγάλης σόντας (δειγματολήπτη) με διπλά τοιχώματα, που εμποδίζει την είσοδο προϊόντος μέσα σε αυτή, επιτρέπει την είσοδο εντόμων και ακάρεων αλλά όχι την έξοδο τους. Τοποθετείται μέσα στο προϊόν και αφήνεται εκεί για αρκετό καιρό. Είναι ενδεικτική για τη διαπίστωση πιθανής προσβολής μεταξύ κανονικών δειγματοληψιών αλλά όχι ταχεία (ενισχύεται με ελκυστικές ουσίες).

Ακτίνες X

Η πλέον διαδεδομένη, ασφαλής και ταχεία μέθοδος. Παρέχει την δυνατότητα ασφαλούς ανίχνευσης εσωτερικών προσβολών εντομών και ακάρεων σε όλα τα στάδια τους. Γίνονται ακτινογραφίες επί δείγματα 100gr περίπου, λαμβανομένων σε κανονικές αποστάσεις μεταξύ τους. Η αρχική συσκευή βελτιώνεται συνεχώς.

Ηλεκτροακουστική συσκευή.

Μετρά εξωτερικώς αόρατη προσβολή μέσα σε δείγμα (κυρίως σπόρων), μετατρέποντας τους θορύβους από την κίνηση των εντόμων (ακμαίο, προνύμφη) σε ενδείξεις.

Κεφάλαιο 2: υλικά και μέθοδοι, πειραματική διαδικασία

Εργαστηριακό Μέρος – Βιοδοκιμές

2.1:Υλικά και Μέθοδοι

2.1.1: Συλλογή δειγμάτων

Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν υγιείς σπόροι μαλακού σιταριού, μη επεξεργασμένοι καθώς και σπόροι σιταριού με συμπτωματολογία μυκήτων. Οι σπόροι σιταριού προετοιμάστηκαν σε μίγματα υγιούς και προσβεβλημένων από μύκητες σπόρων, όπως παρουσιάζεται αναλυτικά στις παραγράφους βιοδοκιμές I και II. Στα μίγματα των σπόρων αυτών χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές δόσεις της γης διατόμων όπως παρουσιάζεται αναλυτικά στην παράγραφο προετοιμασία. Όλα τα παραπάνω έγιναν σε φιαλίδια τα οποία διατηρήθηκαν για διάστημα 30 και 60 ημέρες και στο διάστημα αυτό αντίστοιχα ελήφθησαν μετρήσεις. Τα φιαλίδια περιείχαν

ενήλικα *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: *Bostrichidae*) (Εικόνα 1) ,ή *Sitophilus granarius*, ή *Sitophilus oryzae* (ξεχωριστά φιαλίδια για κάθε έντομο). Αξιολογήθηκε, η παραγωγή απογόνων για κάθε είδος, καθώς και των διαφορετικών ειδών μυκήτων που αναπτύχθηκαν στους σπόρους αυτούς.



Εικόνα 1: Καλλιέργεια εντόμων του είδους *Rhyzopertha dominica*.

2.1.2: Προετοιμασία δειγμάτων του πειραματικού μέρους

Για τις βιοδοκιμές χρησιμοποιήθηκαν πλαστικά φιαλίδια (3 εκατοστά διάμετρο και 8 εκατοστά ύψος) όπου τοποθετήθηκαν 10 g κόκκοι σιταριού/φιαλίδιο.

2.2: Πειραματικό μέρος

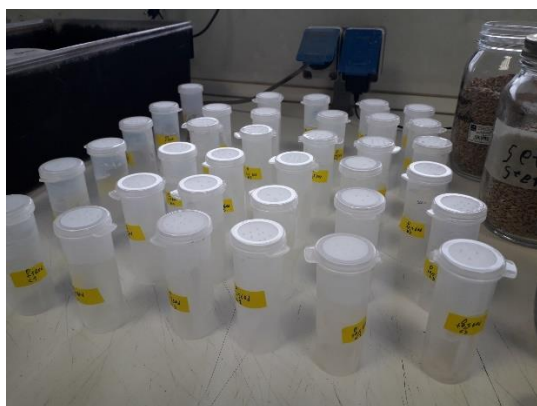
A. Βιοδοκιμές: Στην βιοδοκιμή I εισήχθη στα φιαλίδια ενήλικα *R. dominica* σε σπόρους σιταριού με τρεις συγκεντρώσεις γης διατόμων (0, 500, 1000 ppm) και δύο συνδυασμούς υγιών και προσβεβλημένων σπόρων, στην Βιοδοκιμή II εισήχθησαν ενήλικα *S. oryzae* και *S. granarius* σε σπόρους σιταριού με τρεις συγκεντρώσεις γης διατόμων (0, 500, 1000 ppm) και τέσσερεις συνδυασμούς υγιών και προσβεβλημένων σπόρων, η διαδικασία αναλύεται παρακάτω.

B. Blotter test: Στους σπόρους και των 2 βιοδοκιμών μετά το πέρας των 30 και 60 ημερών ακολούθησε μικροσκοπική και στερεοσκοπική εξέταση και εφαρμόστηκε Blotter test για την επαγωγή της ανάπτυξης των μυκήτων στους σπόρους τους οποίους υπήρξε ανάπτυξη μυκήτων αλλά δεν ήταν αρκετή για την καταγραφή αποτελεσμάτων.

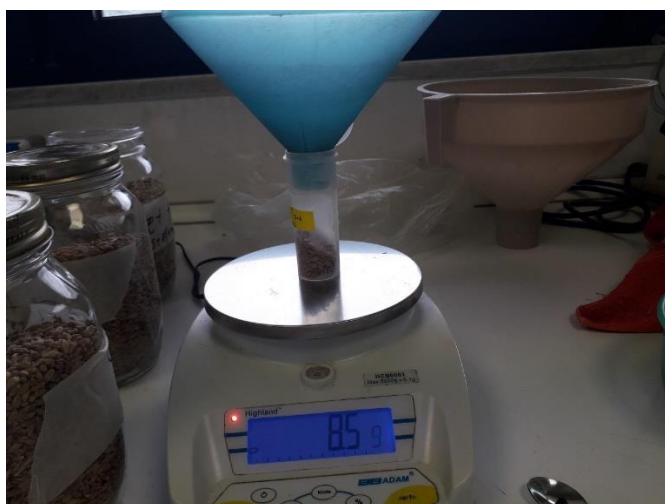
2.2.1: Α. Βιοδοκιμές

2.2.1.1: Προετοιμασία πειράματος και Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν

Αρχικά πραγματοποιήθηκε προετοιμασία των υλικών και τοποθέτηση του υλικού Fluon (insect barrier), στα φιαλίδια (εικόνα 2). Στην συνέχεια έγινε ζύγιση υγιούς σπόρου σιταριού. Συγκεκριμένα 500 g σπόρων σιταριού τοποθετήθηκαν σε 3 βάζα του 1 L και στο κάθε βάζο έγινε προσθήκη γης διατόμων σε αναλογίες 0 ppm, 500 ppm, και 1000 ppm (Εικόνα 4). Μετά την τοποθέτηση της γης διατόμων το κάθε βάζο ανακινήθηκε για 1 περίπου λεπτό ώστε για να γίνει ο ομοιόμορφος καταμερισμός της γης διατόμων στους κόκκους του σιταριού. Για το control (Μάρτυρα), χρησιμοποιήθηκαν σπόροι σιταριού χωρίς τη προσθήκη γης διατόμων. Η υγρασία των σπόρων του σιταριού μετρήθηκε με υγρασιόμετρο (Multitest, GODE Co, France) και ήταν σε όλες τις περιπτώσεις όχι μεγαλύτερη του 13.5%.



Εικόνα 2: Φιαλίδια που χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα.



Εικόνα 3: Ζυγαριά που χρησιμοποιήθηκε για την ζύγιση των σπόρων.

2.2.1.2: Βιοδοκιμή I

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν πλαστικά φιαλίδια στα οποία είχε τοποθετηθεί fluon (όπως αναφέρθηκε παραπάνω), και είχαν τρυπηθεί στην κορυφή τους έτσι ώστε να μπορεί να εισέρχεται αέρας. Στην συνέχεια, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, με τη βοήθεια ζυγαριάς τοποθετήθηκε στο κάθε φιαλίδιο ποσότητα 10 g σπόρων σιταριού (Εικόνα 3).

Υπήρχαν διαφορετικοί συνδιασμοί του μολυσμένου σπόρου και υγιούς σπ'ρου όπως παρουσιάζονται παρακάτω:1. Στη μία ομάδα τοποθετήθηκε στα φιαλίδια 9 g υγιούς σπόρου σιταριού και 1 g μολυσμένου σπόρου σιταριού από μύκητες,2 Στην δεύτερη ομάδα τοποθετήθηκε στα φιαλίδια 9,5 g υγιούς σπόρου σιταριού και 0,5 g μολυσμένου σπόρου σιταριού από μύκητες.

Στη συνέχεια σε κάθε φιαλίδιο των παραπάνω μεταχειρίσεων τοποθετήθηκαν 10 ακμαία *R. dominica*. Η βιοδοκιμή επαναλήφθηκε τρεις (3) φορές. Τα φιαλίδια διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία 26 ± 1 °C και σχετική υγρασία $60 \pm 5\%$ (RH) για 30 και 60 ημέρες. Μετά το πέρας των 30 ή των 60 ημερών, μετρήθηκε στο κάθε φιαλίδιο η παραγωγή απογόνων και καταγράφηκε η παρουσία γενών φυτοπαθογόνων ή σαπροφυτικών μυκήτων.



Εικόνα 4: Ζύγιση γης διατόμων σε ζυγαριά ακριβείας.

2.2.1.3: Βιοδοκιμή II

Ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία με την βιοδοκιμή I. Συγκεκριμένα η βιοδοκιμή χωρίστηκε σε 4 μεταχειρήσεις :

- 1. Στην πρώτη ομάδα, εισήχθησαν (στο κάθε φιαλίδιο) 5 g υγιούς σπόρου σιταριού και 5 g μολυσμένου σπόρου σιταριού προσβεβλημένου με μύκητες. Στη συγκεκριμένη μεταχείριση της βιοδοκιμής χρησιμοποιήθηκαν περίπου 60 φιαλίδια (Εικόνα 5).
- 2. Στην δεύτερη ομάδα, εισήχθησαν (στο κάθε φιαλίδιο) 8 g υγιούς σπόρου σιταριού και 2 g μολυσμένου σπόρου σιταριού προσβεβλημένου με μύκητες.
- 3. Στην τρίτη ομάδα, εισήχθησαν (στο κάθε φιαλίδιο) 10 g μολυσμένου σπόρου σιταριού προσβεβλημένου με μύκητες μόνο.
- 4. Στην τέταρτη ομάδα, η οποία αποτελούσε και το μάρτυρα (control), το κάθε φιαλίδιο είχε 10 g υγιούς σπόρου σιταριού μόνο.

Πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις με τρεις υποεπαναλήψεις για κάθε συνδυασμό. Τα φιαλίδια διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ και σχετική υγρασία $60 \pm 5\%$ (RH) για 60 ημέρες. Μετά το πέρας των 60 ημερών, μετρήθηκε η παραγωγή απογόνων. Επιπλέον καταγράφηκε παρουσία φυτοπαθογόνων και σαπροφυτικών μυκήτων όπως αναφέρθηκε παραπάνω.



Εικόνα 5: Φιαλίδια με σπόρους υγιείς και μολυσμένους.

Μετρήσεις ανά μεταχείριση των βιοδοκιμών I και II

α. Έντομα

β. Μύκητες

Μετρήσεις ανά μεταχείριση των βιοδοκιμών I και II

α. Έντομα: Για το είδος *R. dominica*, μετρήθηκε η θνησιμότητα των ακμαίων, β. Μύκητες: επίσης για το είδος *R. dominica* από 12 τυχαία φιαλίδια καταγράφηκε η

παρουσία γενών ή ειδών μυκήτων οι οποίοι αναπτύσσονται στο έμβρυο ή στον κόκκο του σιταριού.

α. Έντομα: Για τα είδη *S. granarius* και *S. oryzae* μετρήθηκε η θνησιμότητα των ακμαίων και η παραγωγή απογόνων (progeny production). β. Μύκητες: Επίσης η ίδια διαδικασία όσον αφορά τους μύκητες πραγματοποιήθηκε και για τα είδη των εντόμων *S. granarius* και *S. oryzae* σε σύνολο των 24 (12+12) φιαλίδια.

B. Blotter test (με βάση το Chitosan in Agriculture: A New Challenge for Managing Plant Disease και το A Pictorial Guide for the Identification of Mold Fungi on Sorghum Grain)

Μελέτη και ανίχνευση μυκήτων σε σπόρους σιταριού στις Βιοδοκιμές I και II

Διαχωρισμός υγιών και προσβεβλημένων αποθηκευμένων σπόρων σιταριού.

Στη βιοδοκιμή I μελετήθηκαν με τη βοήθεια του στερεοσκοπίου και του μικροσκοπίου τόσο υγιείς όσο και προσβεβλημένοι σπόροι σιταριού. Συγκεκριμένα όπως αναφέρθηκε εξετάστηκαν, σπόροι σιταριού από 12 τυχαία φιαλίδια από τα οποία είχαν μετρηθεί και αφαιρεθεί τα ακμαία του είδους *R. dominica*. Επίσης, όπως αναφέρθηκε εξετάστηκαν και οι σπόροι από τα φιαλίδια από τα οποία είχαν μετρηθεί και συνέχεια αφαιρεθεί τα ακμαία των ειδών *S. granarius* και *S. oryzae*. Το περιεχόμενο του κάθε φιαλιδίου τοποθετήθηκε σε ένα τρυβλίο. Στο τρυβλίο αυτό με τη βοήθεια του στερεοσκοπίου αναγνωρίστηκαν και χωρίστηκαν σε δύο ομάδες οι υγιείς και οι σπόροι οι οποίοι έφεραν συμπτωματολογία μυκήτων (μεταχρωματισμούς είτε μυκήλια). Στην Εικόνα 6 παρουσιάζονται δύο κόκκοι σιταριού με ή χωρίς συμπτωματολογία μυκήτων.



Εικόνα 6: Παρατήρηση με τη βοήθεια του στερεοσκοπίου υγιών (δεξιά) και προσβεβλημένων από μύκητες (αριστερά) σπόρων σιταριού.

Τόσο από τους υγιείς σπόρων σιταριού όσο και από την ομάδα των προσβεβλημένων σπόρων ελήφθησαν δείγματα (παρασκευάσματα) τα οποία εξετάστηκαν για την

παρουσία μυκήτων. Στις περιπτώσεις που παρατηρήθηκαν μύκητες με τη βοήθεια του εγχειριδίου (**Illustrated genera of imperfect fungi – fourth edition. Barnett y Hunter**) έγινε η ταξινόμηση των μυκήτων τουλάχιστον στο επίπεδο του γένους.



Εικόνα 7: Φιαλίδιο με σπόρους οι οποίοι έχουν υποστεί άναμμα.

2.2.2: Blotter test

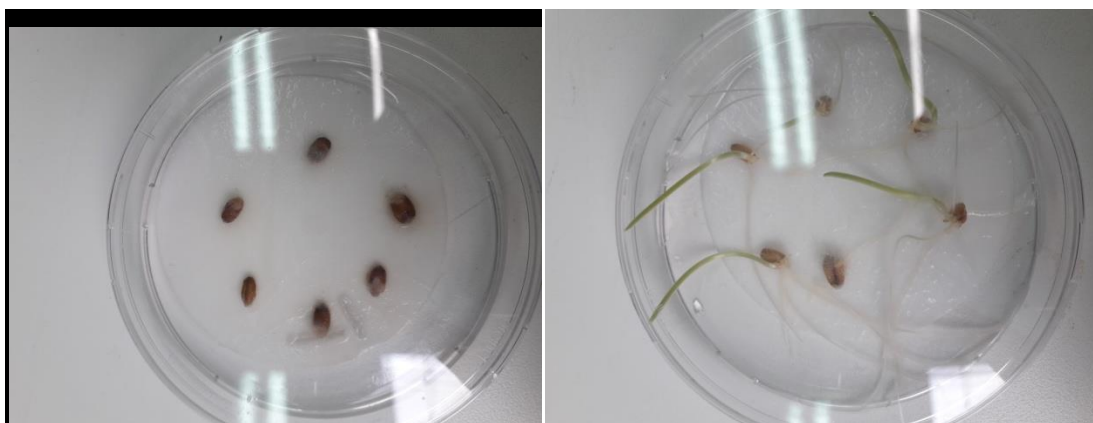
Μόνο μύκητες κυρίως για ποσοστά.

2.2.2.1: Εκτέλεση υγρού θαλάμου για την εξέταση και την ανίχνευση μυκήτων σύμφωνα με τη μέθοδο Blotter test.

Βάσει της πειραματικής διαδικασίας της τεχνικής του Blotter test με τη χρήση χαρτιού (paper) τοποθετήθηκαν σπόροι σιταριού σε τρυβλία (6 σπόροι ανά τρυβλίο) και επώαστηκαν σε θερμοκρασία 25 ± 2 °C για 7 ημέρες με σκοπό να προάγουμε την ανάπτυξη μυκήτων. Τα τρυβλία περιείχαν την κατάλληλη υγρασία όπως αναφέρουν οι (βιβλίο και Chapter) και πριν την επώαση σφραγίστηκαν με parafilm. Μετά το πέρας των 7 ημερών της επώασης τα τρυβλία εξετάστηκαν για την κατάσταση των σπόρων (συμπτωματολογία μεταχρωματισμών) και την ανάπτυξη μυκήτων. Σε όλες τις περιπτώσεις και όταν υπήρχαν μεταχρωματισμοί αλλά και μυκήλια πραγματοποιήθηκαν παρασκευάσματα για περεταίρω παρατήρηση στο μικροσκόπιο.



Εικόνα 8: Προετοιμασία Blotter test.

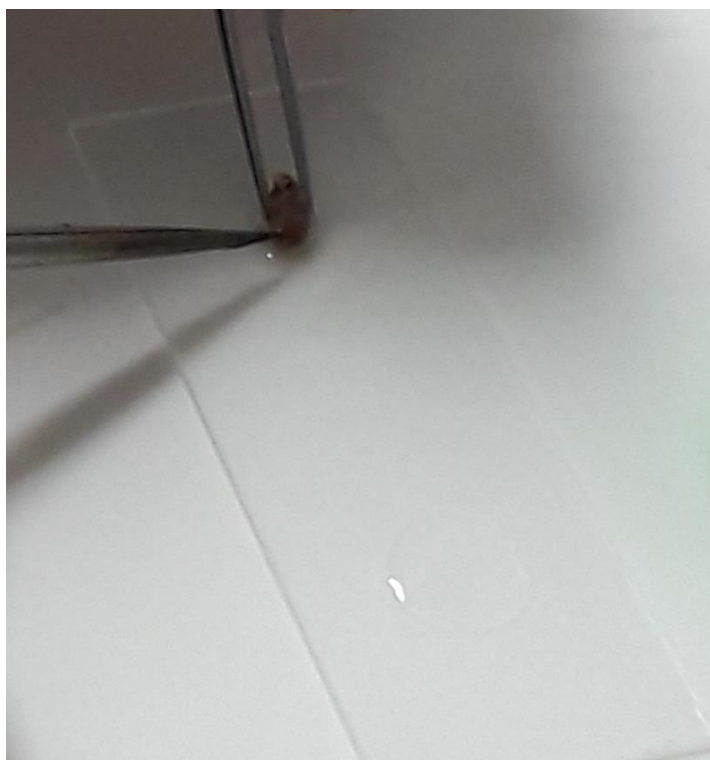


Εικόνα 9: Παρατήρηση μετά το πέρας της επώασης υγιών (δεξιά) και προσβεβλημένων από μύκητες (αριστερά) σπόρων σιταριού.

2.2.2.2:Μορφολογική ταυτοποίηση μυκήτων που καταγράφηκαν σε αποθηκευμένους σπόρους σιταριού (Illustrated genera of imperfect fungi-fourth edition. Barnett y Hunter)

Μετά από 7 μέρες στον υγρό θάλαμο οι σπόροι σιταριού παρατηρήθηκαν για την ανάπτυξη συμπτωματολογίας και σημειολογίας μυκήτων και την βλάστηση των υγιών σπόρων (βλάστηση ριζιδίου και βλαστιδίου). Από τους σπόρους αποθηκευμένου σιταριού που είχαν αναπτύξει συμπτώματα (απόκτηση συνολικού σκούρου χρώματος στην επιφάνεια του σπόρου και έντονου σκούρου κάστανου χρώματος στην περιοχή του εμβρύου επίσης νέκρωση του εμβρύου δηλαδή μη

βλάστηση βλαστιδίου και ριζιδίου το οποίο συνέβη στους υγιείς σπόρους) και σημεία (ανάπτυξη λευκού μυκηλίου από την περιοχή του εμβρύου και μυκηλίων διαφορετικών χρωμάτων όπως πρασινομπλέ ή λευκό κίτρινο να περιβάλλουν τον σπόρο) πάρθηκαν δείγματα τα οποία εξετάστηκαν με την βοήθεια μικροσκοπικού παρασκευάσματος. Η ταυτοποίηση των μυκήτων έγινε με την μορφολογία του μυκηλίου, τον σπορείων και άλλων χαρακτηριστικών. Υπήρξε πρόθεση για την απομόνωση των μυκήτων για την δημιουργία καλλιεργειών αλλά δεν ήταν δυνατό εξαιτίας της ύπαρξης μεγάλου αριθμού μυκητοφάγων άκαρι.



Εικόνα 10: Προετοιμασία μικροσκοπικού παρασκευάσματος από μολυσμένο σπόρο.

Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα

Αποτελέσματα

Εκτελέστηκε εκτιμητική στους σπόρους μετά το πέρας των 30 και των 60 ημερών και για της δυο Βιοδοκιμές, εκτιμήθηκε το ποσοστό των μυκήτων σε τρεις περιοχές των σπόρων (1) στο έμβρυο, 2) στον θύσανο, 3) στο ενδοσπέρμιο και τον φλοιό) για σπόρους με μικρή έως μέτρια ανάπτυξη μυκήτων και συνολικό ποσοστό μυκήτων στον σπόρο για σπόρους με μεγάλη ποσότητα μυκήτων και τους σπόρους μετά το blotter test. Σε ποιες περιοχές μετρήθηκαν ποσοστά μυκήτων λ.χ. μόνο στην περιοχή του εμβρύου σύμφωνα με τους Πίνακες 1, 1α, 1β, και 1γ.

3.1: Ποσοστά ανάπτυξης μυκήτων

3.1.1: Ποσοστό ανάπτυξης μυκήτων σε σπόρους.

3.1.1.1: Εκτιμητική για Βιοδοκιμή I

Σύμφωνα με τον **Πίνακα 1**, στη περιοχή του εμβρύου τα γένη *Penicillium*, *Aspergillus* και *Rhizopus* παρατηρήθηκαν σε μεγαλύτερα ποσοστά (21-35%), έναντι των γενών *Alternaria* και *Fusarium* τα οποία παρατηρήθηκαν σε ποσοστά 5 - 20%. Σύμφωνα με τις εικόνες στους **Εικόνες 11, 12, 13** και μικροσκοπική εξέταση αναπτύχθηκε ο Πίνακας της εκτιμητικής.

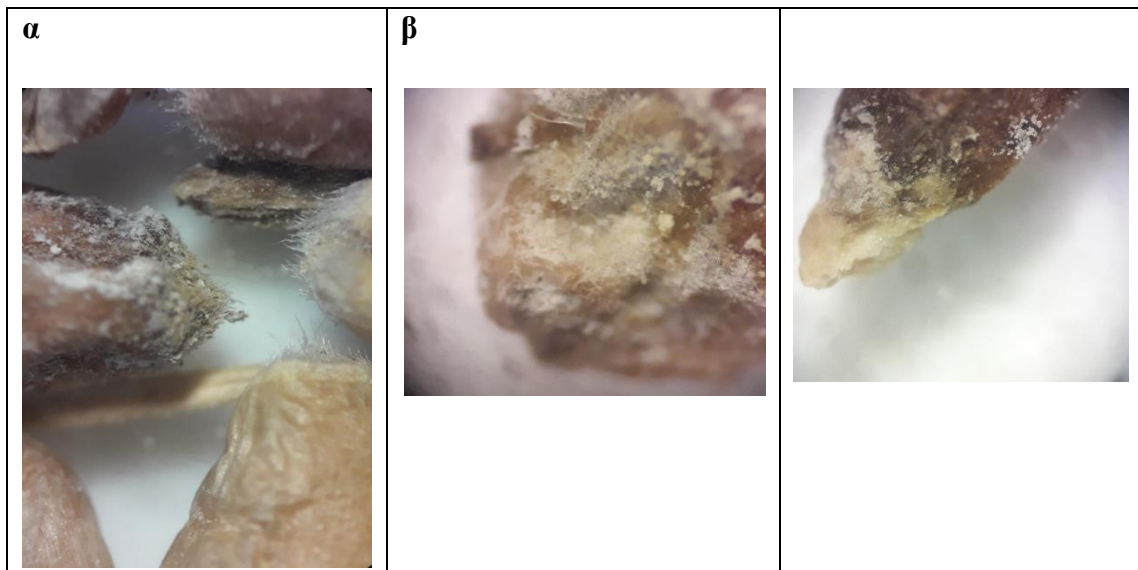
Πίνακας 1: Ποσοστά ανάπτυξης μυκήτων σε σπόρους του blotter test μόνο στην περιοχή του εμβρύου.

Εκτιμητική, με βάση κλίμακα 0-5	0	1	2	3	4	5
<i>Alternaria</i> spp.		+				
<i>Fusarium</i> spp.		+				
<i>Penicillium</i> spp.			+			
<i>Aspergillus</i> spp.			+			
<i>Rhizopus</i> spp			+			

Όπου; 0 : κανένα παθογόνο, 1 : ύπαρξη παθογόνου σε ποσοστό 0-5%, 2 : ύπαρξη παθογόνου σε ποσοστό 5-20%, 3 : ύπαρξη παθογόνου σε ποσοστό 21-35%, 4 : ύπαρξη παθογόνου σε ποσοστό 35-50%, 5 : ύπαρξη παθογόνου σε ποσοστό 50-75%.

Εικόνα 11: Προσβολή του εμβρύου από μυκήλια του γένους *Aspergillus* spp., στην **Εικόνα α** παρατηρείται στα αριστερά σπόρος με μυκήλιο του μύκητα στην περιοχή

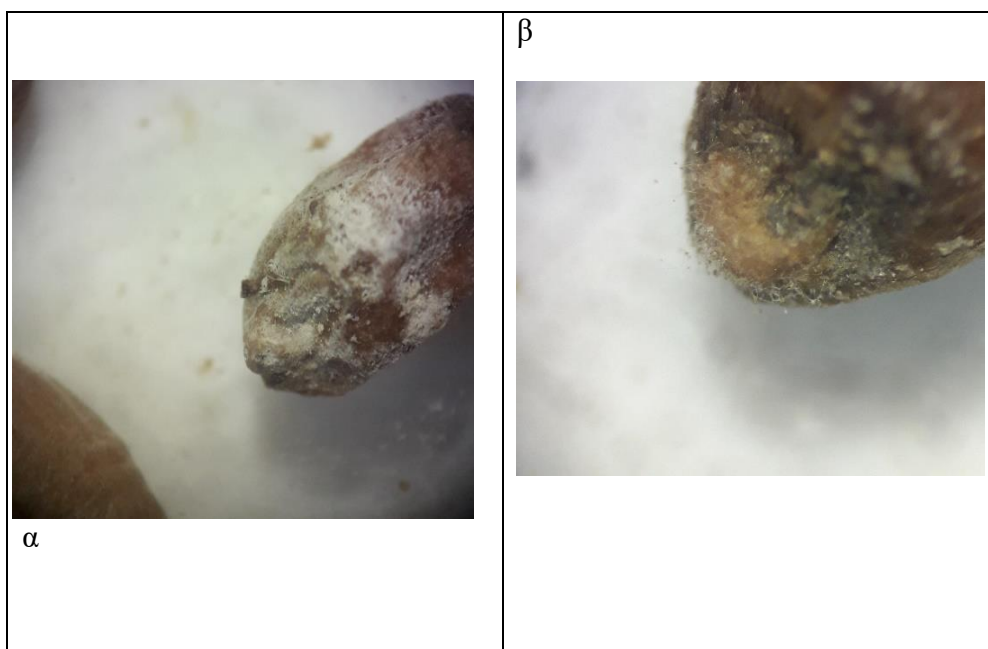
του εμβρύου και περιτριγυρίζεται από υγιείς σπόρους, στην **Εικόνα β** παρατηρείται έμβρυο σπόρου με μυκήλιο του μύκητα σε μεγάλη μεγέθυνση στο στερεοσκόπιο, στην **Εικόνα γ** παρατηρείται μυκήλιο του μύκητα στην περιοχή ου εμβρύου.



Εικόνα 12: Μύκητας του γένους *Penicillium spp.* στην περιοχή του εμβρύου, στην **εικόνα α** παρατηρείται πάνω δεξιά σπόρος στον οποίο αναπτύχθηκε μυκήλιο του μύκητα στην περιοχή του εμβρύου και γύρω υπάρχουν υγιείς σπόροι.



Εικόνα 13: Εικόνα του είδους *Rhizopus stolonifer* στην περιοχή του εμβρύου, στην **Εικόνα α** παρατηρείται αναπτύχθηκε μυκήλιο του μύκητα στην περιοχή του εμβρύου, στην **Εικόνα β** παρατηρείται στον οποίο αναπτύχθηκε μυκήλιο του μύκητα στην περιοχή του εμβρύου σε μεγαλύτερη μεγέθυνση.



Σύμφωνα με τον **Πίνακα 2**, στη περιοχή του θυσάνου του σπόρου το γένος *Rhizopus* παρατηρήθηκε σε μεγαλύτερο ποσοστό (5-20%), έναντι των γενών *Alternaria* , *Fusarium* , *Penicillium*, *Aspergillus* τα οποία παρατηρήθηκαν σε ποσοστά 0 - 5%. Σύμφωνα με τις εικόνες στον **Εικόνα 14** και μικροσκοπική εξέταση αναπτύχθηκε ο πίνακας της εκτιμητικής.

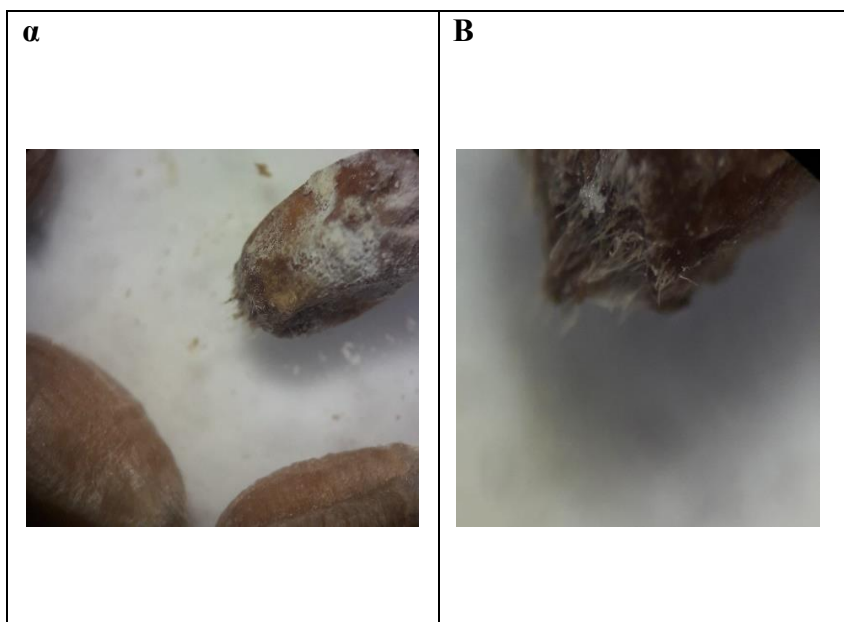
Πίνακας 2: Ποσοστά πριν το blotter test στην περιοχή του θυσάνου του σπόρου.

Εκτιμητική, με βάση κλίμακα 0-5	0	1	2	3	4	5
<i>Alternaria spp.</i>		+				
<i>Fusarium spp.</i>		+				

<i>Penicillium spp.</i>		+				
<i>Aspergillus spp.</i>		+				
<i>Rhizopus spp.</i>			+			

Όπου 0 : κανένα παθογόνο, Όπου 1 : ύπαρξη παθογόνου σε ποσοστό 0-5%, Όπου 2 : ύπαρξη παθογόνου σε ποσοστό 5-20%, Όπου 3 : ύπαρξη παθογόνου σε ποσοστό 21-35%, Όπου 4 : ύπαρξη παθογόνου σε ποσοστό 35-50%, Όπου 5 : ύπαρξη παθογόνου σε ποσοστό 50-75%.

Εικόνα 14: Μύκητας του είδους *Rhizopus stolonifer* στην περιοχή του θυσάνου, στην **Εικόνα α** παρατηρείται ανάπτυξη του μύκητας την περιοχή του θυσάνου, στην **Εικόνα β** παρατηρείται ανάπτυξη του μύκητας την περιοχή του θυσάνου σε μεγαλύτερη μεγέθυνση στο στερεοσκόπιο.



Σύμφωνα με τον **Πίνακα 3**, στη περιοχή του ενδοσπέρμιου και του φλοιού του σπόρου το γένος *Fusarium* παρατηρήθηκε σε μεγαλύτερο ποσοστό (21-35%), έναντι των γενών *Alternaria* , *Rhizopus* , *Penicillium*, *Aspergillus* τα οποία παρατηρήθηκαν σε ποσοστά 0 - 5%. Σύμφωνα με τις εικόνες στον **Εικόνα 15** και μικροσκοπική εξέταση αναπτύχθηκε ο πίνακας της εκτιμητικής.

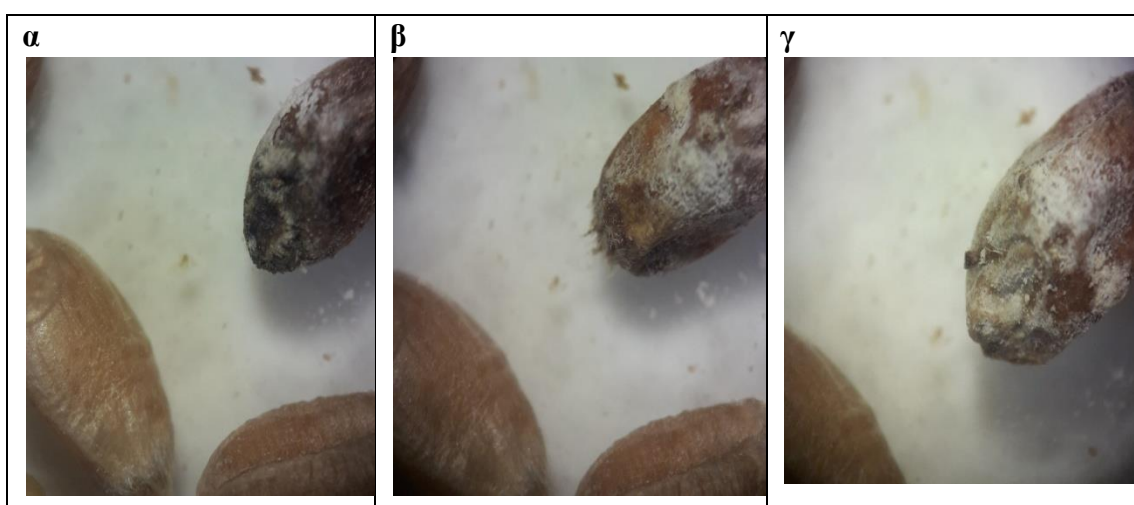
Πίνακας 3: Ποσοστά πριν το blotter test στο ενδοσπέρμιο και τον φλοιό του σπόρου.

Εκτιμητική, με βάση	0	1	2	3	4	5
---------------------	---	---	---	---	---	---

κλίμακα 0-5						
<i>Alternaria spp.</i>		+				
<i>Fusarium spp.</i>				+		
<i>Penicillium spp.</i>		+				
<i>Aspergillus spp.</i>		+				
<i>Rhizopus spp.</i>		+				

Όπου 0 :κανένα παθογόνο, Όπου 1 : ύπαρξη παθογόνου σε ποσοστό 0-5%, Όπου 2 : ύπαρξη παθογόνου σε ποσοστό 5-20%, Όπου 3 : ύπαρξη παθογόνου σε ποσοστό 21-35%, Όπου 4 : ύπαρξη παθογόνου σε ποσοστό 35-50%, Όπου 5 : ύπαρξη παθογόνου σε ποσοστό 50-75%.

Εικόνα 15: Γένος *Fusarium spp.* στην περιοχή του ενδοσπέρμιου και του φλοιού, στην **Εικόνα α** πάνω δεξιά παρατηρείται ανάπτυξη του μύκητα την περιοχή του ενδοσπέρμιου και του φλοιού ενώ γύρο παρατηρούνται υγιείς σπόροι ενώ στο έμβρυο δραστηριοποιείται το γένος *Penicillium* , στην **Εικόνα β** πάνω δεξιά παρατηρείται ανάπτυξη του μύκητα την περιοχή του ενδοσπέρμιου και του φλοιού ενώ γύρο παρατηρούνται υγιείς σπόροι ενώ στο έμβρυο δραστηριοποιείται το γένος *Rhizopus* , στην **Εικόνα γ** πάνω δεξιά παρατηρείται ανάπτυξη του μύκητα την περιοχή του ενδοσπέρμιου και του φλοιού ενώ γύρο παρατηρούνται υγιείς σπόροι ενώ στο έμβρυο δραστηριοποιείται το γένος *Aspergillus*, στην **Εικόνα δ** παρατηρείται ανάπτυξη του μύκητα την περιοχή του ενδοσπέρμιου και του φλοιού σε μεγάλη μεγέθυνση στο στερεοσκόπιο.



δ		
		

3.1.1.1:Blottertest

αποτελέσματα και τήξη

Σύμφωνα με τον **Πίνακα 4**, Μετά το πέρας του Blotter test το γένος *Fusarium* παρατηρήθηκε σε πολύ μεγάλο ποσοστό (35-50%), έναντι των γενών *Rhizopus* , *Penicillium*, *Aspergillus* τα οποία παρατηρήθηκαν σε ποσοστά 5 - 20% και το γένος *Alternaria* που παρατηρήθηκε σε ποσοστό 0-5% . Σύμφωνα με τις εικόνες στους **Εικόνες 16, 17 και 18** και μικροσκοπική εξέταση αναπτύχθηκε ο πίνακας της εκτιμητικής. Σύμφωνα με τον **Εικόνα 19** μετά την εφαρμογή του Blotter test υπήρξαν σπόροι οι οποίοι βλάστησαν και σπόροι στους οποίους είχε νεκρωθεί το έμβρυο και σύμφωνα με τα ποσοστά της εκτιμητικής (**Πίνακα 4**), και τους σπόρους από τους οποίους πραγματοποιήθηκε μικροσκοπικό παρασκεύασμα (**Εικόνα 17**) καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι την τήξη των σπόρων την προκάλεσε μύκητας του γένους *Fusarium*.

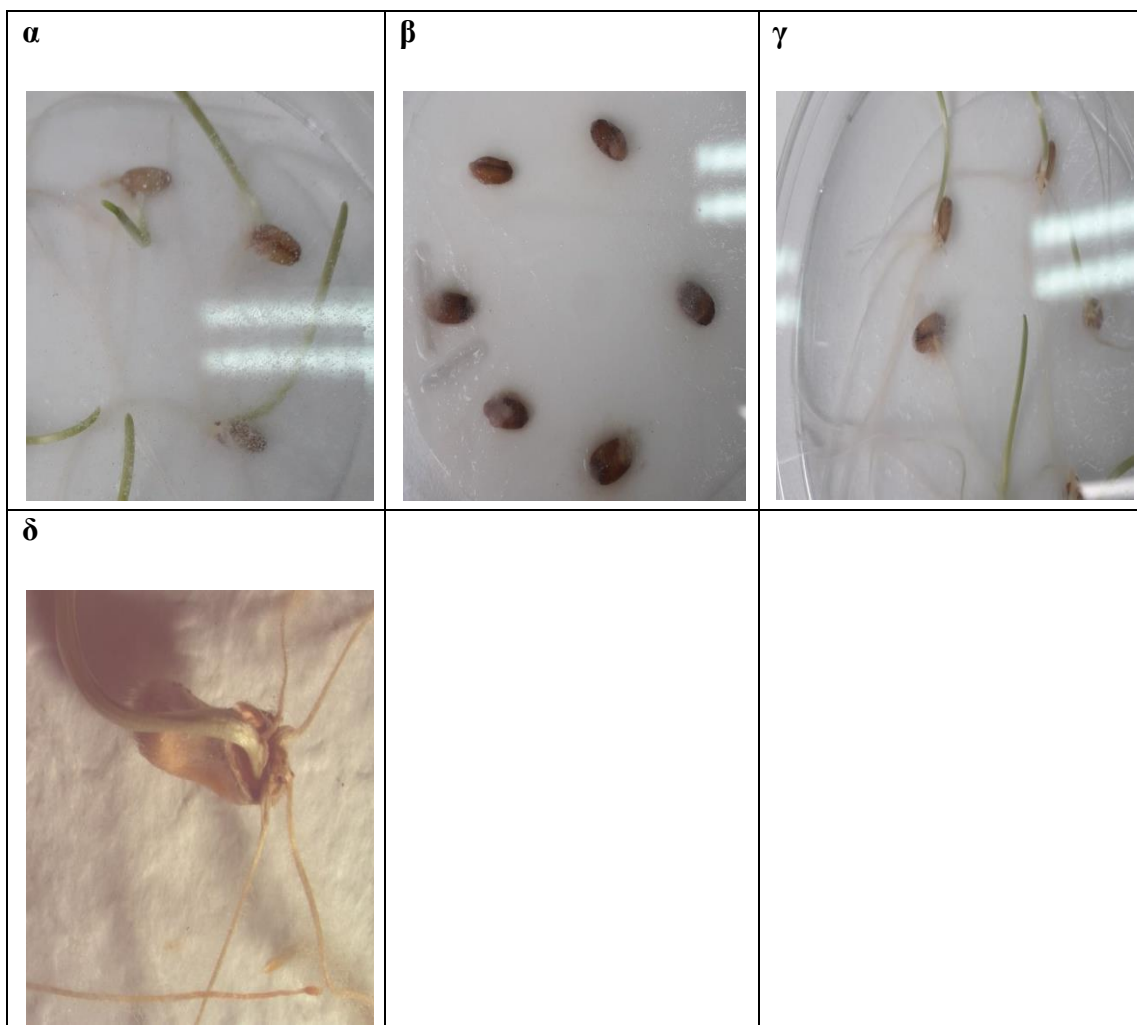
Πίνακας 4:Ποσοστά μυκήτων μετά το blotter test.

Εκτιμητική, με βάση κλίμακα 0-5	0	1	2	3	4	5
<i>Alternaria spp.</i>		+				
<i>Fusarium spp.</i>					+	
<i>Penicillium spp.</i>			+			
<i>Aspergillus spp.</i>			+			

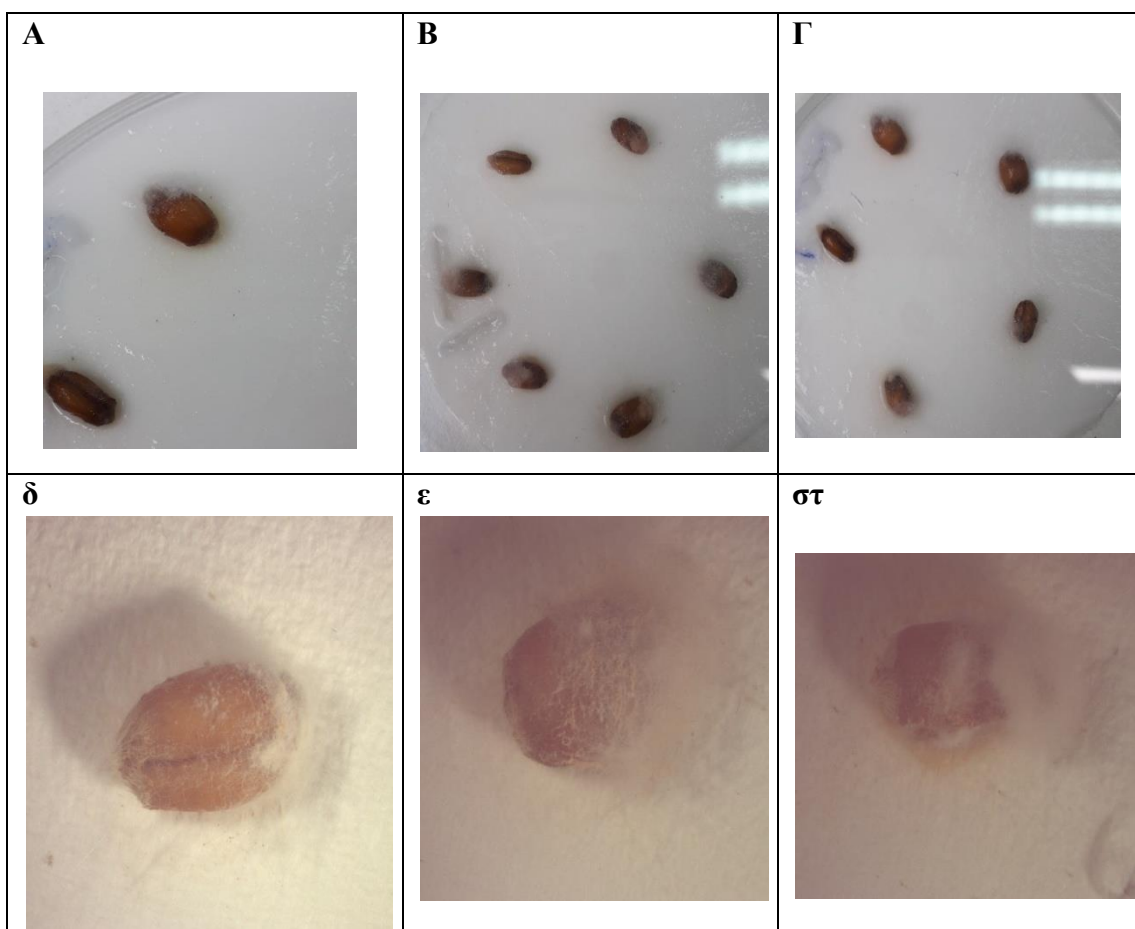
<i>Rhizopus spp</i>			+			
---------------------	--	--	---	--	--	--

Όπου 0 : κανένα παθογόνο, Όπου 1 : ύπαρξη παθογόνου σε ποσοστό 0-5%, Όπου 2 : ύπαρξη παθογόνου σε ποσοστό 5-20%, Όπου 3 : ύπαρξη παθογόνου σε ποσοστό 21-35%, Όπου 4 : ύπαρξη παθογόνου σε ποσοστό 35-50%, Όπου 5 : ύπαρξη παθογόνου σε ποσοστό 50-75%.

Εικόνα 16: *Rhizopus stolonifera* αναπτύσσεται σε σπόρους υγιείς και μη, στις **εικόνες α και γ** παρατηρείται ανάπτυξη του μύκητα πάνω σε υγιείς σπόρους που έχουν βλαστήσει μετά το Blotter test (7 ημέρες επώαση), στην **Εικόνα δ** παρατηρείται ανάπτυξη του μύκητα πάνω σε υγιείς σπόρους που έχουν βλαστήσει σε μεγάλη μεγέθυνση στο στερεοσκόπιο, στην **Εικόνα β** σε κάποιους από τους μεταχρωματισμένους σπόρους στους οποίους είχε νεκρωθεί το έμβρυο και δεν βλάστησαν παρατηρείτε ανάπτυξη του μύκητα.



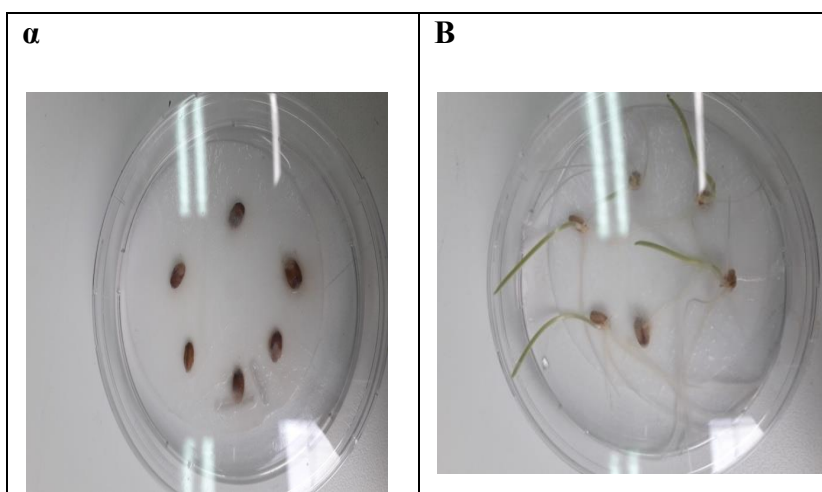
Εικόνα 17: Γένος *Fusarium spp.* σε σπόρους που δεν βλαστήσανε στην περιοχή του εμβρύου, στις **Εικόνες α, β και γ** σε κάποιους από τους μεταχρωματισμένους σπόρους στους οποίους είχε νεκρωθεί το έμβρυο και δεν βλάστησαν παρατηρείτε ανάπτυξη του μύκητα, στις **Εικόνες δ, ε και στ** σε κάποιους από τους μεταχρωματισμένους σπόρους στους οποίους είχε νεκρωθεί το έμβρυο και δεν βλάστησαν παρατηρείτε ανάπτυξη του μύκητα σε μεγάλη μεγέθυνση με την βοήθεια στερεοσκοπίου.



Εικόνα 18: Γένη *Aspergillus spp.* και *Penicillium spp.* σε σπόρους που έχουν βλαστήσει, στις **Εικόνες α και γ** παρατηρείται ανάπτυξη των δύο γενών μύκητα πάνω σε υγιείς σπόρους που έχουν βλαστήσει μετά το Blotter test (7 ημέρες επώαση), στην **Εικόνα γ** παρατηρείται ανάπτυξη των δύο γενών μυκήτων πάνω σε υγιείς σπόρους που έχουν βλαστήσει μετά το Blotter test (7 ημέρες επώαση) σε ,μεγάλη μεγέθυνση με την βοήθεια στερεοσκοπίου.



Εικόνα 19: Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται σπόροι οι οποίοι υποβλήθηκαν σε Blotter test και μετά από 7 ημέρες καταγράφηκαν τα αποτελέσματα, στους σπόρους με έντονο μεταχρωματισμό δεν υπήρξε βλάστηση ριζιδίου και βλαστιδίου και υπήρξε ανάπτυξη μυκηλίου σημαντικού ποσοστού στις περιοχές του εμβρύου, του ενδοσπέρμιου και του φλοιού (**εικόνα α**), από την άλλη στους υγιείς σπόρους υπήρξε ανάπτυξη ριζιδίου και βλαστιδίου οπός και ένα μικρό ποσοστό μυκήτων το οποίο δεν είχε την ικανότητα να μειώσει την φυτρωτική ικανότητα και την ανάπτυξη του σπόρου (**εικόνα β**).



3.1.1.2: Εκτιμητική για την βιοδοκιμή II

Σύμφωνα με τον **Πίνακα 5**, Μετά από 60 ημέρες με την δραστηριοποίηση μεγάλου αριθμού ατόμων του γένους *Sitophilus* κατά μέσο όρο 200-300 άτομα ανά φιαλίδιο(**διάγραμμα 2**) επικράτησε το γένος *Fusarium* παρατηρήθηκε σε παρά πολύ μεγάλο ποσοστό (50-75%). Σύμφωνα με μικροσκοπική εξέταση αναπτύχθηκε ο πίνακας της εκτιμητικής

Πίνακας 5: Ποσοστά ανάπτυξης μυκήτων σε σπόρους που δραστηριοποιήθηκαν τα είδη *S.granarius* και *S.oryzae*.

Εκτιμητική, με βάση κλίμακα 0-5	0	1	2	3	4	5
<i>Alternaria</i> spp.	+					
<i>Fusarium</i> spp.						+
<i>Penicillium</i> spp.	+					
<i>Aspergillus</i> spp.	+					
<i>Rhizopus</i> spp	+					

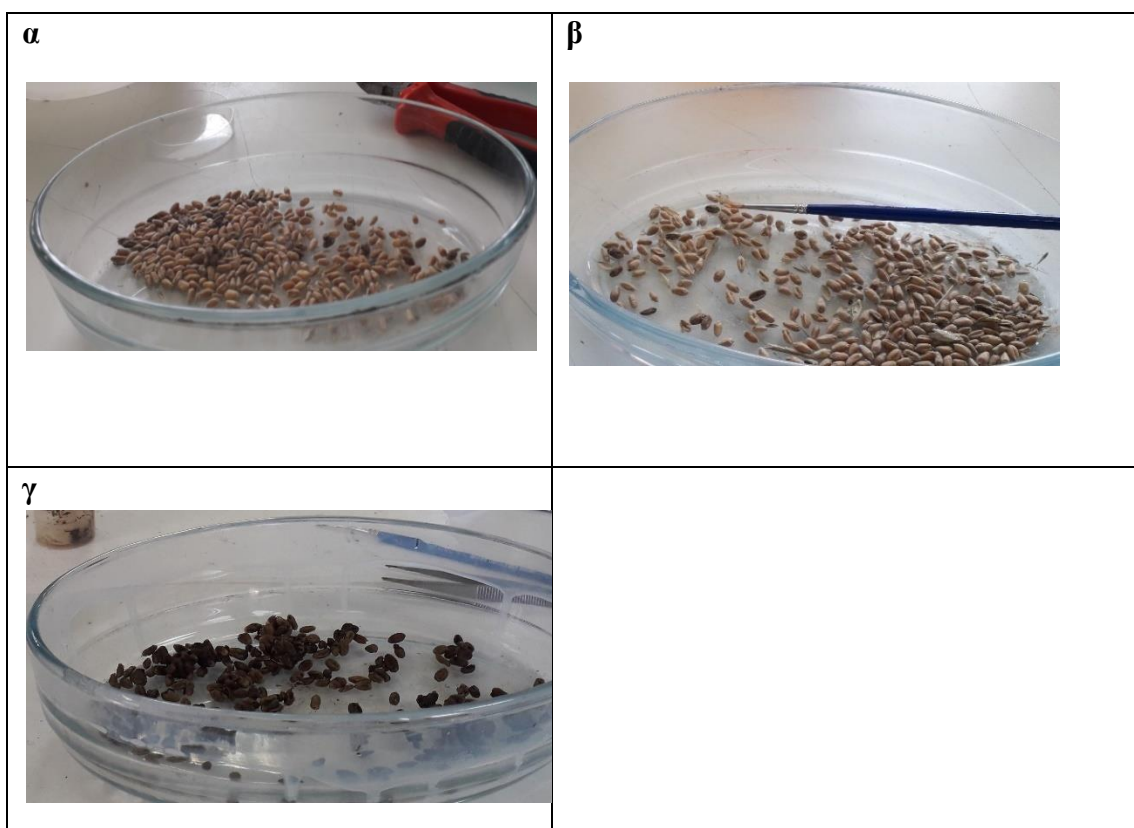
Όπου; 0 : κανένα παθογόνο, 1 : ύπαρξη παθογόνου σε ποσοστό 0-5%, 2 : ύπαρξη παθογόνου σε ποσοστό 5-20%, 3 : ύπαρξη παθογόνου σε ποσοστό 21-35%, 4 : ύπαρξη παθογόνου σε ποσοστό 35-50%, 5 : ύπαρξη παθογόνου σε ποσοστό 50-75%.

3.1.1.3: Συσχέτιση ανάπτυξης μυκήτων με ανάπτυξη πληθυσμού εντόμων

Στο πείραμα παρατηρήθηκε διαφορετική ποσότητα μυκήτων στα φιαλίδια , η οποία φάνηκε να είναι ανάλογη την παραγωγή απογόνων των εντόμων, φιαλίδια με μεγαλύτερη παραγωγή απογόνων εμφανίζανε μεγαλύτερη ανάπτυξη μυκήτων από άλλα τα οποία είχαν μικρότερη παραγωγή απογόνων. Στα έντομα του γένους *S. oryzae* και *S. granarius* που είχαν πολύ μεγάλη παραγωγή απογόνων (**διάγραμμα 2**) παρατηρήθηκε σημαντική ανάπτυξη μυκήτων όπως φαίνεται στον **πίνακα 6**. Φαίνεται πως η ανάπτυξη μετασυλλεκτικών μυκήτων ήταν ανάλογη με την ανάπτυξη των πληθυσμών των εντόμων διότι στα φιαλίδια που τοποθετήθηκαν ακμαία του είδους *R. dominica* δεν είχαν πολύ μεγάλη παραγωγή απογόνων (**διάγραμμα 1**) δεν παρατηρήθηκε σχεδόν καθόλου ανάπτυξη μυκήτων όπως φαίνεται στον **πίνακα 6**. Συμπεραίνουμε ότι στην βιοδοκιμή I ότι δεν υπήρξε ανάπτυξη των μυκήτων και ότι όσοι μπόηκαν στα φιαλίδια τόσοι μετρηθήκαν, ενώ στην βιοδοκιμή II υπήρξε πολύ μεγάλη ανάπτυξη μυκήτων.

Εικόνα 20: Στον παρακάτω πίνακα παρατηρούνται σπόροι πάνω στους οποίους επώαστηκαν για 30 μέρες με την παρουσία του είδους *R. dominica* (**εικόνα α**) με παραγωγή απογόνων περίπου 10 άτομα ανά φιαλίδιο (**διάγραμμα 1**), 60 ημέρες με την παρουσία του είδους *R. dominica* (**εικόνα β**) με παραγωγή απογόνων περίπου 20-30 άτομα ανά φιαλίδιο (**διάγραμμα 1**), και 60 μέρες με την παρουσία του είδους *S. oryzae* ή του είδους *S. granarius* (**εικόνα γ**) με παραγωγή απογόνων περίπου 200-300 άτομα ανά φιαλίδιο (**διάγραμμα 2**). Στην **Εικόνα γ** παρατηρείται ολικός σκούρος μεταχρωματισμός των σπόρων και μεγάλη ανάπτυξη μυκηλίου που τους κάνει να

κολάνε μεταξύ τους, ενώ στις **Εικόνες α και β** παρατηρούνται μικρό ποσοστό μεταχρωματισμένων σπόρων και στις 2 περιπτώσεις.



3.2 :Μετασυλλεκτικοί μύκητες που ανιχνεύθηκαν και τα χαρακτηριστικά τους.

Alternaria alternata

Συμπτώματα στον σπόρο

Ο μύκητας παράγει σχήματος μάλλινων ή σε μορφή σκόνης αλυσίδων από κονίδια χρώματος σκούρου καφέ και τα κονίδια ποικίλουν σε μήκος και σχήμα. Το χρώμα της αποικίας διαφέρει αρκετά από λαδί μέχρι και σκούρο καφέ.

Μορφολογία

Το μυκήλιο μπορεί να είναι αραιό ή άφθονο και διαφέρει σε χρώμα κυρίως λαδί μέχρι σκούρο καφέ. Οι υφές είναι χρώματος σκούρο καστανό χοντρές με septa και διακλαδισμένες. Οι κονιδιοφόροι σχηματίζονται σε μια εκβολή που δημιουργείται σε ένα κύτταρο του μυκηλίου και αναπτύσσονται με την διαίρεση του κυττάρου, είναι απλές κατακόρυφες και έχουν μήκος 40-50 μm και πλάτος 2-6 μm και

ομαδοποιημένες. Οι κονιδιοφόροι παράγουν σκοτεινά χρωματισμένα κονίδια με διαδοχικότητα αλογοπετάλου από απλές η διακλαδωμένες αλυσίδες. Οι αλυσίδες συνήθως στο ράμφος του σπορίου ή στα πλάγια του ράμφους. Τα κονίδια έχουν εγκάρσια και επιμήκη septa , και έχουν διαστάσεις 10-18x20-65 μm, ωοειδές ή οβοειδές σχήμα με ανεπτυγμένο τερματικό κύτταρο. Τα κονίδια συχνά έχουν ένα κωνικό η κυλινδρικό ράμφος που έχει μήκος το 1/3 του μήκους του κονιδίου και έχει διαστάσεις 2-5x10-20 μm. Τα τοιχώματα της επιφάνειας είναι λεία και είναι γλωμού έως και χρυσοκαστανού χρώματος.

Γρήγορο στοιχείο

Οι αλυσίδες από κονίδια παράγονται στο ράμφος του κονιδίου ή στα πλάγια του ράμφους.

Σημαντικότητα

Ο μύκητας είναι παγκόσμια διαδεδομένος και συνήθως αναπτύσσεται σε σπόρους. Προκαλεί κηλιδώσεις φύλων και καπνιά σε μπιζέλι περιστέρι (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.), ρεβίθι (*Cicer arietinum* L), αραχίδα (*Arachis hypogaea* L). Από το *A.alternata* έχουν απομονωθεί αρκετές τοξίνες και μεταβολίτες: τεντοξίνη, αφλατοξίνες I και II, αλκαλοειδή, αλτερναριόλη και μανιτόλη.

Aspergillus flavus

Συμπτώματα στον σπόρο

Παρατηρείται στην επιφάνεια του σπόρου μυκήλιο χρώματος ελαφρού κιτρινοπράσινου, βαθύ κιτρινοπράσινου, λαδί προς καφέ ή καφέ το οποίο δημιουργεί αποικία και εξαπλώνεται πάνω στον σπόρο. Οι κονιδιοφόροι είναι διογκωμένοι και φέρουν αρκετά κύτταρα που φέρουν κονίδια (φιαλίδια) που φέρουν κονίδια σε μακριές ξηρές αλυσίδες. Οι κονιδιοφόρες κεφαλές είναι τυπικά σφαιρικού σχήματος και διαχωρίζονται σε στήλες που δεν ξεχωρίζονται εύκολα που σπάνια είναι μεγαλύτερες από 500-600 μm διάμετρο αλλά κυρίως είναι 300-400 μm.

Μορφολογία

Οι κονιδιοφόροι προκύπτουν από μία εκβολή που σχηματίζεται σε ένα κύτταρο του μυκηλίου και καθώς αναπτύσσονται σχηματίζουν στην άκρη την κεφαλή πάνω στην οποία σχηματίζονται τα φιαλίδια στα οποία σχηματίζονται τα κονίδια, οι κονιδιοφόροι έχουν παχιά κυτταρικά τοιχώματα, υάλινα και χοντρά τραχωμένα και συνήθως έχουν μήκος <1 mm και πλάτος 10-20 μm κάτω από το τέλος. Οι κορυφές είναι μακρυσμένες σε νεαρή ηλικία και στην συνέχεια γίνονται ημισφαιρικές και σφαιρικές με διάμετρο 10-65 μm αλλά συνήθως είναι 25-45 μm. Μπορούν αν υπάρχουν μία η περισσότερες σειρές από φιαλίδια και βοηθητικά κύτταρα αλλά αυτό

εξαρτάτε από το είδος. Τα βοηθητικά κύτταρα συνήθως είναι 6-10 x 4-6 μm αλλά μερικές φορές φτάνουν 15-16 x 8-9 μm σε διάμετρο. Τα φιαλίδια είναι 6-10 x 3-5 μm. Τα κονίδια είναι τυπικά σφαιρικά με ημισφαιρικά, εμφανώς ακανθώδης, μεταβλητά 3-6 μm διάμετρο και πολλές φορές έχουν οβάλ ή αχλαδόμορφο σχήμα στην αρχή αλλά στην συνέχεια παραμένουν έτσι.

Γρήγορο στοιχείο

Ο *A. flavus* ξεχωρίζεται από της κεφαλές σπορείων χρώματος απαλό κιτρινοπράσινο, βάθι κιτρινοπράσινο, λαδί προς καφέ και καφέ, συμπαγής υφής και σφαιροειδούς ή κιονοειδούς σχήματος.

Σημαντικότητα

Η αφλατοξίνες που παράγονται από τον *A. flavus* είναι τοξικές για ανθρώπους και ζώα καθώς επίσης μειώνει την γεύση των σπόρων για τροφή και φαγητό. Η προσβολή του σπόρου μπορεί να μειώσει την βλαστικότητα του σπόρου. Η παραγωγή μεγάλου αριθμού αναμεταδιδόμενων σπορείων μπορεί να προκαλέσει ασθένειες του αναπνευστικού συστήματος σε ανθρώπους και ζώα. *A. flavus* έχει χρησιμοποιηθεί περισσότερο στην βιομηχανία από οποιαδήποτε άλλη ομάδα μυκήτων για την παραγωγή ζυμών.

Fusarium spp.

Συμπτώματα στον σπόρο

Οι αποικίες στον σπόρο είναι εναέριες λευκού χρώματος στην συνέχεια γίνονται μωβ στο απορροφητικό χαρτί στο τριβλίο. Το μυκήλιο έχει μορφή σκόνης εξαιτίας αλυσίδων που αποτελούνται από Μικροκονίδια. Πορτοκαλί μάζες σπορείων με ασυνήθιστο σχήμα και μέγεθος εμφανίζονται κατά καιρούς.

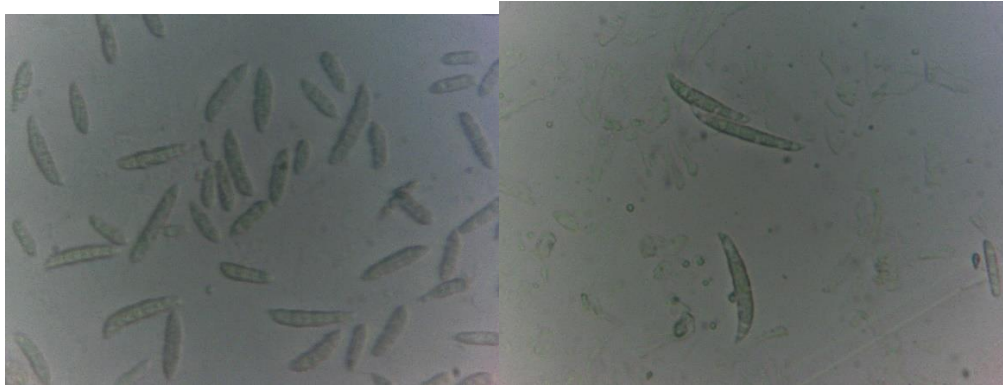
Μορφολογία

Τα μικροκονίδια δημιουργούνται σε φιαλίδια που σχηματίζονται στα πλάγια του μυκηλίου (ψευδοκεφαλές). Είναι υαλώδη συνήθως μονοκύτταρα αλλά κατά περιπτώσεις δικύτταρα 5-12 x 1-3 μm, οβάλ έως ροπαλοειδούς σχήματος και λίγο πεπλατυσμένα στο τέλος. Τα μακροκονίδια είναι πολυκύτταρα (ότι έχει πάνω από 3 κύτταρα είναι μακροκονίδιο) υαλώδη λεπτά με σχήμα από καμπυλωτό έως ίσιο, 3-7 septa, 25-60 x 2-4 μm και έχουν πελματοειδές κύτταρο στην βάση και ραμφοειδές κύτταρο στην κορυφή. Τα χλαμιδοσπόρια είναι σφαιρικά και σχηματίζονται στην μέση ή την άκρη του μυκηλίου. Σπανίως σχηματίζονται περιθύκια μπλε έως μαύρου χρώματος 250-350 x 220-300 μm. Οι ασκοί είναι ροπαλοειδείς με 4-8 ασκοσπόρια. Τα ασκοσπόρια είναι συνήθως υαλώδη ευθεία με 1 septa 4-7 x 12-17 μm διαστάσεις.

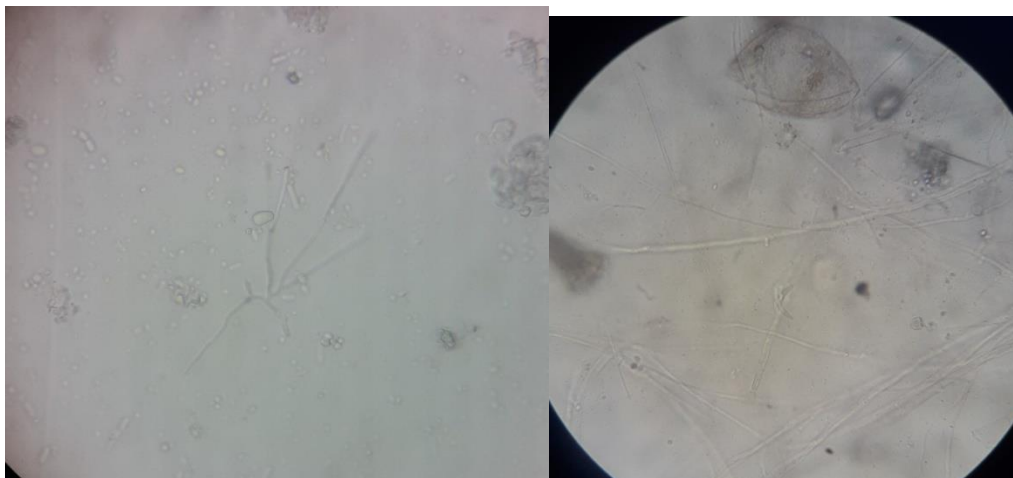
Γρήγορο στοιχείο

Πυκνές κατασκευές από μικροκονίδια σχηματίζουν αλυσίδες που μπορούν να παρατηρηθούν εύκολα με το scotch-tape method στο μικροσκόπιο σε χαμηλή ένταση (x 100). Χλαμυδοσπώρια δεν σχηματίζονται ποτέ.

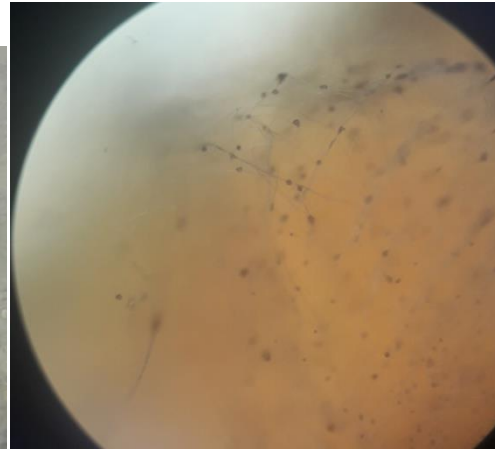
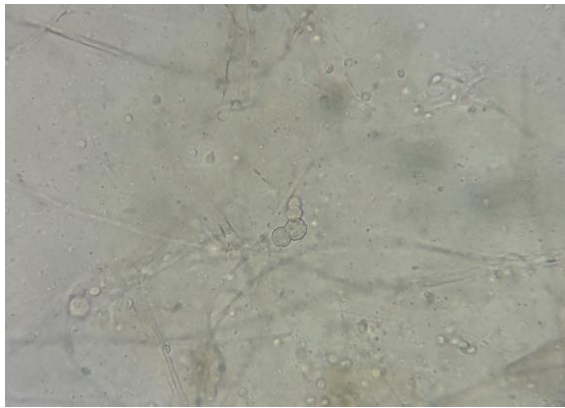
Ο μύκητας παράγει την μυκοτοξίνη φουμονισίνη που είναι τοξική σε ανθρώπους και ζώα αν καταλαληθεί σπόρος με μεγάλο ποσοστό προσβολής. Είναι αρκετά διαδεδομένος σε υγρές και λιγότερο υγρές περιοχές, θερμές ζώνες και τροπικές και υποτροπικές περιοχές. Είναι παθογόνο καραντίνας στην Αίγυπτο.



Εικόνα 30: Μακροκονίδια (πάνω από τρία κύτταρα) του γένους *Fusarium* spp.



Εικόνα 31: Μυκηλικές υφές του γένους *Fusarium* spp.



Εικόνα 32: Χλαμυδοσπώρεια του γένους **Εικόνα 33:** Ψευδοκεφαλές *Fusarium* spp.

Penicillium spp.

Συμπτώματα στον σπόρο

Ο μύκητας αναγνωρίζεται από τους πολυκύτταρους κονιδιοφόρους που στην άκρη σχηματίζουν μακριές ευδιάκριτες στήλες από κονίδια. Οι αποικίες αποτελούνται σε μεγάλο βαθμό από εξίδρωση κίτρινου ή διάφανου ή καστανού χρώματος στο κέντρο. Σε άγαρ η ανάπτυξη του μυκηλίου είναι πιο αργή και συνήθως πυκνή με μεγάλο αριθμό κονιδίων. Τα κονίδια του πενικίλιου έχουν χρώμα συνήθως σε σκιές του γκρι έως μπλε ή γαλαζοπράσινου.

Μορφολογία

Οι κονιδιοφόροι γεννιούνται από της υφές της επιφάνειας του μυκηλίου ή την επιφάνειας του , πραγματοποιείται διαίρεση ενός κυττάρου του μύκητα με φορά προς τα πάνω και με μιτοτικές διαιρέσεις ξεκινάει ο σχηματισμός του κονιδιοφόρου , στην συνέχεια πραγματοποιείται σπάσιμο του τελευταίου κυττάρου και σχηματίζονται διακλαδώσεις πάνω στις οποίες σχηματίζονται τα φιαλίδια στα οποία θα σχηματιστούν ευδιάκριτες αλυσίδες από κονίδια. Οι κονιδιοφόροι έχουν απαλά τοιχώματα και μήκος 100-300μm, τα φιαλίδια έχουν μορφή αμπούλας και μήκος 7-8 μm κάποιες φορές και 12. Τα κονίδια είναι σφαιρικά και ημισφαιρικά, 2, 2-3 μm με απαλά ή ελαφρός τραχιά τοιχώματα τα οποία σχηματίζονται σε μακριές καλοσχηματισμένες αλυσίδες.

Γρήγορο στοιχείο

Το *penicillium* αναγνωρίζεται από τους κονιδιοφόρους με septa που διακλαδίζονται λίγο πριν το τέλος και πάνω στις διακλαδώσεις σχηματίζονται τα φιαλίδια με της ευδιάκριτες αλυσίδες κονιδίων.

Σημαντικότητα

Αρκετοί δευτερογενείς μεταβολίτες του γένους *Penicillium* όπως για παράδειγμα η σιτρίνη (*P. citrinum*) είναι επικίνδυνες μυκοτοξίνες. Σε πουλερικά όπως οι κότες, οι πάπιες και η γαλοπούλες η σιτρίνη προκαλεί υγρή διάρροια, αυξημένη κατανάλωση φαγητού και μείωση σωματικού βάρους εξαιτίας νευρικής ανεπάρκειας. Οι επιπτώσεις της σιτρίνης στους ανθρώπους δεν είναι καταγεγραμμένη, παρόλα αυτά φαίνεται πως όσοι καταναλώνουν την μυκοτοξίνη για μεγάλο χρονικό διάστημα εμφανίζουν προβλήματα στα νεφρά. Το είδος *P. citrinum* που παράγει την εν λόγω τοξίνη είναι ένας από τους πιο διαδεδομένους μικροοργανισμούς στην γη, υπάρχει παντού σε έδαφος ή προϊόντα ή ακόμα και των αέρα και είναι πολύ ισχυρός βιοαποικοδομιτής που προκαλεί καταστροφές σε τρόφιμα, έγγραφα, πίνακες ζωγραφικής και πλαστικά.



Εικόνα 34: Καρποφορίες, κονιδιοφόροι του γένους *Penicillium* (Μεγέθυνση x 40 φορές)

Rhizopus stolonifer

Συμπτώματα στον σπόρο

Οι αποικία στους σπόρους αναπτύσσεται σε στόλones με πυκνό γκρι μυκήλιο. Οι στόλones παράγουν πολλούς καφέ σποριαγκιοφόρους και ριζοειδή.

Μορφολογία

Οι στόλones είναι υαλώδης και γίνονται καφέ κοντά στους κόμβους, που μπορεί να υπάρξει και ένα septa. Τα ριζοειδή είναι κοντά καφέ και πολλές φορές λείπουν. Οι σποριαγκιοφόροι σχηματίζονται στο κοινοκύταρο μυκήλιο ταυτόχρονα με τα ριζοειδή από μία εκβλάστηση και στην κορυφή του σποριαγγειοφόρου σχηματίζεται μία κεφαλή και ένας σάκος μέσα στον οποίο σχηματίζονται τα σποριαγκιοσπόρια, οι σποριαγκιοφόροι αναπτύσσονται μόνοι τους ή σε μικρές ομάδες στους κόμβους

στους στόλones. Είναι καστανοί απαλοί χωρίς septa, 1000-3500 μm μήκος και φτάνουν μέχρι και 34 μm πλάτος. Τα σποριάγγεια είναι λευκά αρχικά και στην συνέχεια γίνονται μαύρα, έχουν διάμετρο 100-350 μm με αρκετά σπόρια. Η κεφαλή είναι ανοιχτό καστανό σφαιρική με διαστάσεις 63-224 x 70-140 και ομπρελόμορφη όταν αποκόπτεται. Τα σποριαγκισπόρια είναι κίτρινα έως ανοιχτό καστανό, σφαιρικού ή οβάλ σχήματος, ριγέ κατά μήκος με διαστάσεις 5-8 x 20-26 μm .

Γρήγορο στοιχείο

Σκοτεινά σφαιρικά σποριάγγεια μπορούν να φανούν στο μικροσκόπιο, καθιστώντας δυνατή την αναγνώριση του μύκητα. Ο μύκητας συχνά αναφέρεται συχνά ως μύκητας καρφίτσα διότι τα σποριαγγεία θυμίζουν μαύρες καρφίτσες και είναι απλωμένα παντού σε μορφή βαμβακώδους μυκηλίου.

Σημαντικότητα

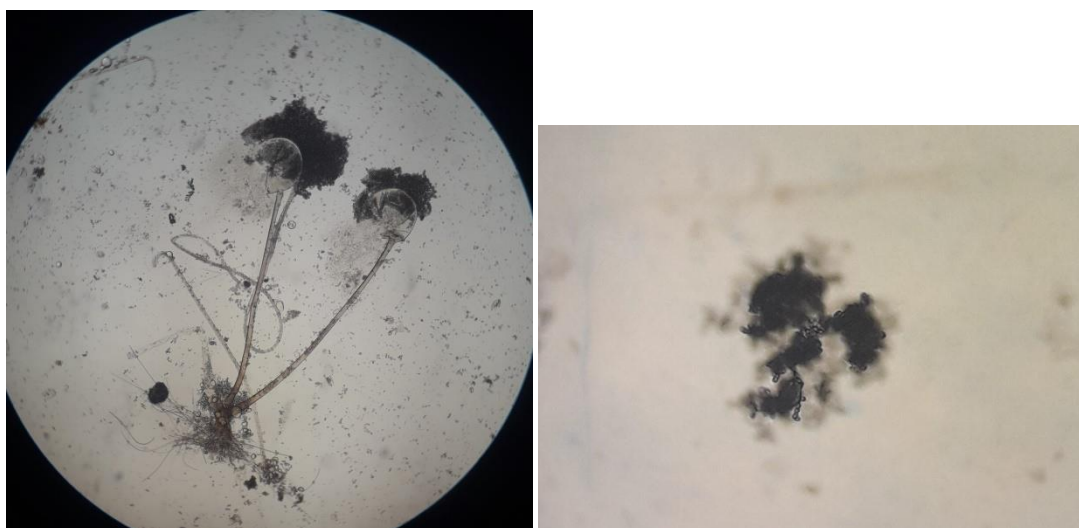
Ο μύκητας είναι διαδεδομένος παγκοσμίως. Είναι σαπροφυτικό και προαιρετικό παράσιτο σε ώριμα φρούτα και λαχανικά. Είναι σημαντικό στην αποθήκευση σε συνθήκες μεγάλης θερμοκρασίας και υγρασίας.



Εικόνα 35: Σποριαγγειοφόροι του *Rhizopus stolonifer* (Μεγέθυνση x 40 φορές).



Εικόνα 36: *Rhizopus stolonifer* σποριάγγελια με σπορειοαγγειοσπόρια.



Εικόνα 37: Σπασμένα σποριάγγελια και σπορειοαγγειοσπόρια *Rhizopus stolonifer*.

3.3: Παραγωγή απογόνων

3.3.1: Ανάπτυξη εντόμων

3.3.1.1: Στατιστική ανάλυση

Πριν από την ανάλυση, όλα τα δεδομένα ελέγχθηκαν για την κανονικότητα και την ομοιογένεια των διακυμάνσεων χρησιμοποιώντας την δοκιμή O'Brien. Όταν δεν υπήρχε κανονικότητα στα αποτελέσματα με της δοκιμές άνιςων αποκλίσεων, χρησιμοποιήθηκαν οι δοκιμές Wilcoxon. Για το πρώτο πείραμα, η παραγωγή απογόνων αναλύθηκε με three way ANOVA με συνδυασμούς συγκεντρώσεις, μέρας και μυκήτων ως κύριες μεταβλητές. Για το δεύτερο πείραμα η παραγωγή απογόνων αναλύθηκε με two way ANOVA με την συγκέντρωση και τους μύκητες ως κύρια μεταβλητή. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με την χρήση του λογισμικού

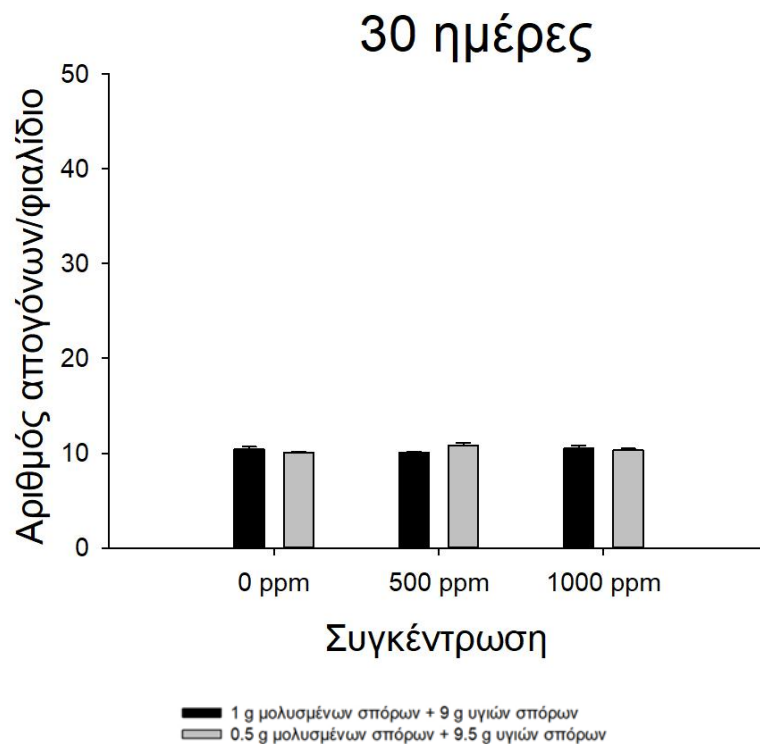
JMP 7. Οι μέσοι διαχωρίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμή Tukey Kramer Honest Significant Difference (HSD) στο επίπεδο 0.05.

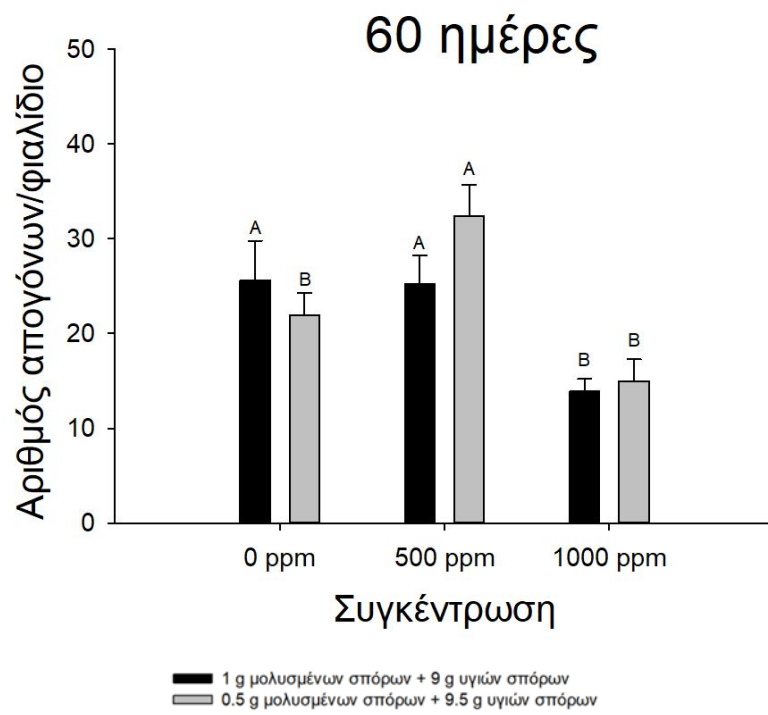
3.3.1.2: Παραγωγή απογόνων

Πίνακας7: Παράμετροι της ANOVA για την παράγωγή απογόνων του είδους *Rhyzopertha dominica* όταν αυτό έχει εκτεθεί σε τρεις συγκεντρώσεις γης διατόμων (0, 500 και 1000 ppm) μετά από 30 και 60 ημέρες, και 2 διαφορετικούς συνδυασμούς με μύκητες.

	<i>df</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Μεταξύ των μεταβλητών	11	14.45	<0.001
Τιμή αποκοπής	1	756.73	<0.001
Συγκέντρωση	2	12.48	<0.001
Συνδυασμός	1	0.45	0.505
Ημέρα	1	100.83	<0.001
Συγκέντρωση x Συνδυασμός	2	2.10	0.128
Συγκέντρωση x Ημέρα	2	12.59	<0.001
Συγκέντρωση x Ημέρα	1	0.41	0.525
Συγκέντρωση x Συνδυασμός x Ημέρα	2	1.44	0.242

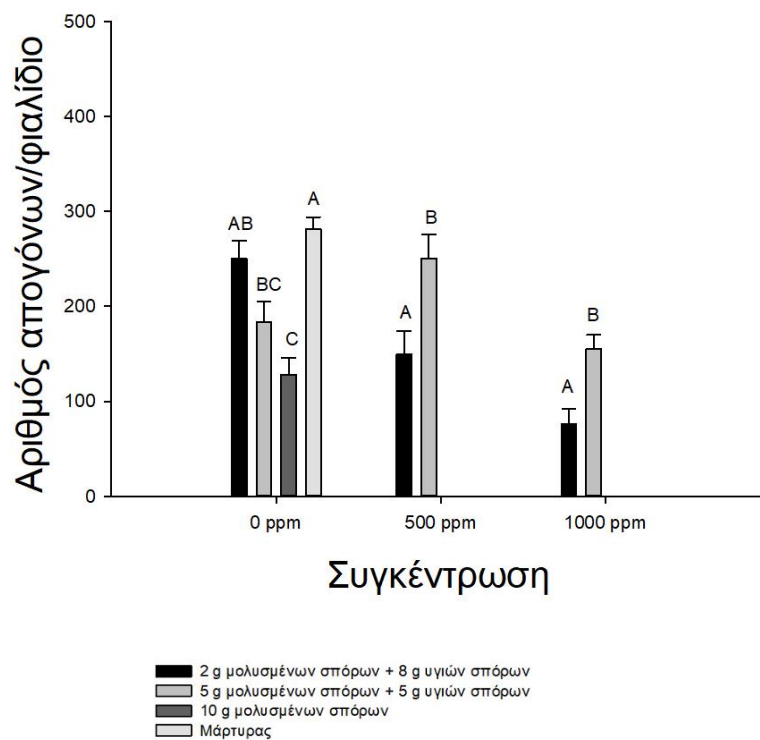
Διάγραμμα 1: Οι μέσοι αριθμοί ($\pm$ SEM) της παραγωγής απογόνων του είδους *Rhizopertha dominica* μετά από 30 και 60 ημέρες (σε όλες της περίπτωσης σφάλμα $df=17$) και είχαν εκτεθεί σε 2 συνδυασμούς με μύκητες (1) 9 γραμμάρια υγιείς σπόρους και 1 γραμμάριο σπόρους μολυσμένους με μύκητες 2) 9,5 γραμμάρια υγιείς σπόρους και 0,5 γραμμάρια με σπόρους μολυσμένους από μύκητες). Σε κάθε στήλη και συγκέντρωση οι μέσοι που ακολουθούνται από το ίδιο κεφαλαίο γράμμα δεν έχουν σημαντική διαφορά, όπου δεν υπάρχουν γράμματα δεν υπήρξε σημαντική διαφορά, δοκιμή HSD σε 0,05.



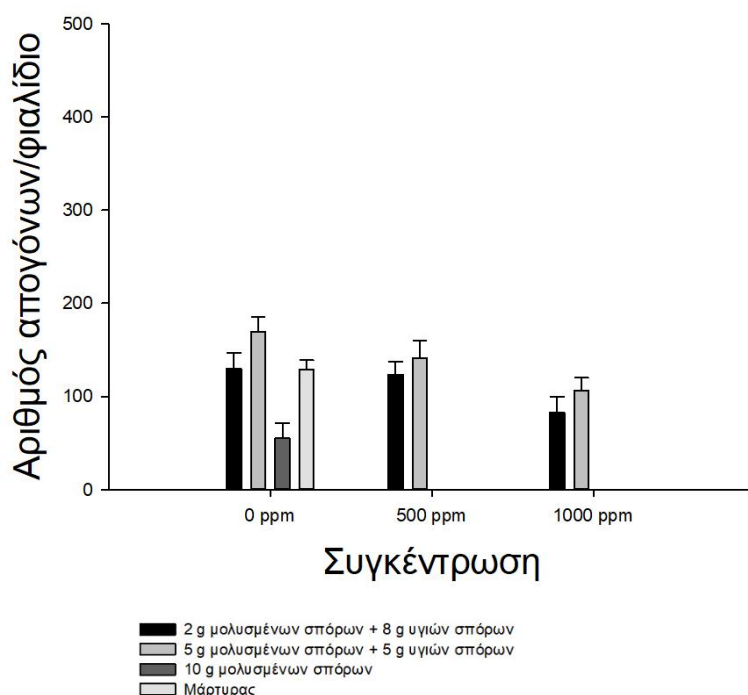


Διάγραμμα 2: Οι μέσοι αριθμοί ($\pm$ SEM) της παραγωγής απογόνων των ειδών *Sitophilus oryzae* και *Sitophilus granarius* μετά από 60 μέρες (σε όλες της περίπτωσης σφάλμα $df=17$) και είχαν εκτεθεί σε 4 συνδυασμούς με μύκητες (8 γραμμάρια υγιείς σπόρους και 2 γραμμάρια σπόρους μολυσμένους με μύκητες, 5 γραμμάρια υγιείς σπόρους και 5 γραμμάρια σπόρους μολυσμένους με μύκητες, 10 γραμμάρια σπόρους μολυσμένους με μύκητες και 10 γραμμάρια υγιείς σπόρους (control). Σε κάθε στήλη και συγκέντρωση οι μέσοι που ακολουθούνται από το ίδιο κεφαλαίο γράμμα δεν έχουν σημαντική διαφορά, όπου δεν υπάρχουν γράμματα δεν υπήρξε σημαντική διαφορά, δοκιμή HSD σε 0,05.

Sitophilus oryzae



Sitophilus granarius



3.4: Επίδραση της γης διατόμων στην παραγωγή απογόνων των εντόμων.

3.4.1: Βιοδοκιμή I

Με βάση το **διάγραμμα 1** στις 30 ημέρες η παραγωγή απογόνων ήταν ίδια μεταξύ των τριών συγκεντρώσεων της γης διατόμων, στις 60 ημέρες παρατηρούμε μειωμένη παραγωγή απογόνων μεταξύ των 1000 ppm με τα 0 και τα 500.

3.4.2: Βιοδοκιμή II

Με βάση το **διάγραμμα 2** παρατηρούμε το *S.oryzae* να αναπτύσσει μεγαλύτερους πληθυσμούς από το *S.granarius* και στις τρεις συγκεντρώσεις γης διατόμων, και στα 2 είδη η συγκέντρωση των 1000 ppm ήταν πιο αποτελεσματική στο να μειώσει την παραγωγή απογόνων των εντόμων από της άλλες 2 περιπτώσεις, αλλά η συγκέντρωση των 500 ppm ήταν πιο αποτελεσματική στην μείωση του πληθυσμού των εντόμων από την έλλειψη εφαρμογής σε σύγκριση με την βιοδοκιμή I.

3.4.3: Γη διατόμων

Με βάση τα αποτελέσματα βγαίνει το συμπέρασμα ότι οι διαφορετικές συγκεντρώσεις της γης διατόμων αρχίζουν να δείχνουν αποτελέσματα όσο αυξάνεται η παραγωγή απογόνων των εντόμων καθώς στο **διάγραμμα 1** που υπάρχει μικρή παραγωγή απογόνων παρατηρείται μειωμένη παραγωγή απογόνων μόνο στα 1000 ppm στις 60 ημέρες, ενώ στο **διάγραμμα 2** που βλέπουμε μεγάλη παραγωγή απογόνων βλέπουμε

διαφορές σε όλες της συγκεντρώσεις της γης διατόμων με πιο αποτελεσματική την συγκέντρωση τον 1000 ppm.

Κεφάλαιο 4: Συζήτηση

Συζήτηση

4.1: Στη βιοδοκιμή I

στις 30 ημέρες υπήρξε:

- Μηδαμινή διαφορά στην παραγωγή απογόνων μεταξύ των φιαλιδίων που είχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις της γης διατόμων (**Διάγραμμα 1**)
- Μηδαμινή διαφορά στην ποσότητα των μυκήτων που εισήχθησαν με τους μύκητες που ανιχνεύθηκαν μετά το πέρας των 30 ημερών (**Πίνακας 6**).
- Καταγράφηκαν τα γένη μυκήτων *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Fusarium* σε διαφορετικά ποσοστά με σημαντικότερο το γένος *Fusarium* το οποίο αποδεδείχθηκε ότι νεκρώνει το έμβρυο.

στις 60 ημέρες

- Τα έντομα ανά φιαλίδιο στη μεταχείριση 1000 ppm γης διατόμων (**Διάγραμμα 1**) παρουσίασαν μικρότερη παραγωγή απογόνων.
- Τα έντομα που είχαν 0 και 500 ppm, η παραγωγή απογόνων μεταξύ των εντόμων που ήρθαν σε επαφή με τα 0 και τα 500 ppm γης διατόμων ήταν η ίδια (**Διάγραμμα 1**). Δεν υπήρξε αρκετή παραγωγή απογόνων για να προκληθεί άναμμα του σπόρου και η ποσότητα μυκήτων ήταν η ίδια με της 30 ημέρες. (**Πίνακας 6**).
- Καταγράφηκαν τα γένη μυκήτων *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Fusarium* σε διαφορετικά ποσοστά (**πίνακες 1, 2, 3**) με σημαντικότερο το γένος *Fusarium* το οποίο αποδεδείχθηκε ότι νεκρώνει το έμβρυο (**Πίνακας 4, 4β, 4δ**).

4.2: Στην βιοδοκιμή II

στις 60 ημέρες

- Με βάση το **διάγραμμα 2** παρατηρούμε το *S. oryzae* να αναπτύσσει μεγαλύτερους πληθυσμούς από το *S. granarius* και στις τρεις συγκεντρώσεις γης διατόμων, και στα 2 είδη η συγκέντρωση των 1000 ppm ήταν πιο αποτελεσματική στο να μείωση την παραγωγή απογόνων των εντόμων από της άλλες 2 περιπτώσεις.
- Η συγκέντρωση των 500 ppm ήταν πιο αποτελεσματική στην μείωση του πληθυσμού των εντόμων από την έλλειψη εφαρμογής.

- Υπήρξε άναμμα των σπόρων και έντονος σκούρος μεταχρωματισμός σε όλους τους σπόρους, επίσης καταγράφηκε μεγάλη μυκηλιακή ανάπτυξη (**Εικόνα 20**).
- Με βάση τον **Πίνακα 5** στην συγκεκριμένη βιοδοκιμή στο τέλος επικράτησε το μόνο γένος *Fusarium* σε ποσοστά 50-75% το οποίο είναι το σημαντικότερο από τα παθογόνα που ανιχνεύθηκαν καθώς όπως αποδείχθηκε από τον **Πίνακα 4** και της **Εικόνες 17** και **19** έχει την ικανότητα να νεκρώνει το έμβρυο

4.3: Συμπεράσματα

Όσον αφορά την γη διατόμων αν μελετήσουμε την παραγωγή απογόνων στα **διαγράμματα 1 και 2** εμφανίζονται αποτελέσματα όσο αυξάνονται οι πληθυσμοί, στις 30 ημέρες το *R. dominica* δεν είχε διαφορές μεταξύ των συγκεντρώσεων της γης διατόμων ενώ στις 60 είχε διαφορά μόνο στα 1000 ppm, τα έντομα του γένους *Sitophilus* που ανέπτυξαν μεγάλους πληθυσμούς είχαν διαφορές με τα 1000 ppm να είναι τα πιο αποτελεσματικά και μετά να ακολουθούν τα 500. Φαίνεται πως η γη διατόμων έχει αποτέλεσμα στα έντομα όσο αυξάνεται ο πληθυσμός τους. Με βάση την **Εικόνα 20** δεν φαίνεται η γη διατόμων να έχει άμεσο αποτέλεσμα στους μύκητες διότι η ανάπτυξη των μυκήτων φαίνεται να συσχετίζεται με την παραγωγή απογόνων των εντόμων. Η δραστηριότητα και η αναπνοή των εντόμων αυξάνουν την θερμοκρασία και την σχετική υγρασία με αποτέλεσμα να δημιουργούν συνθήκες που επάγουν την αναπαραγωγή των εντόμων, θα μπορούσαμε να πούμε ότι καταπολεμώντας τα έντομα με την γη διατόμων έμμεσα καταπολεμούμε τους μύκητες επειδή αποτρέπουμε την ανάπτυξη συνθηκών που θα επάγουν την ανάπτυξη του. Αν και η παραγωγή απογόνων συσχετίζεται με την ανάπτυξη των μυκήτων δεν υπάρχει κάποια ένδειξη στα αποτελέσματα για κάποιο κρίσιμο νούμερο που αν ο πληθυσμός των εντόμων το ξεπεράσει θα αρχίσει να υπάρχει μεγάλη ανάπτυξη μυκήτων κάτι το οποίο μπορεί να ερευνηθεί μελλοντικά.

Βιβλιογραφία

Campbell, B.M. (2009). Beyond copenhagen: redd+, agriculture, adaptation strategies and poverty. *global environmental change-human and policy dimensions*, 19, 397-399. doi:10.1016/j.gloenvcha.2009.07.010

Mehrabi, Z., Delzeit, R., Ignaciuk, A.M., Levers, C., Braich, G., Bajaj, K., Amo-Aidoo, A., Anderson, W.B., Balgah, R.A., Benton, T.G., Chari, M.M., Ellis, e.c., Gahi, N.Z., Gaupp, F., Garibaldi, L.A., Gerber, J.S., Godde, C.M., Grass, I., Heimann, T., Hirons, M., Hoogenboom, G., Jain, M., James, D., Makowski, D., Masamha, B., Meng, S., Monprapussorn, S., Müller, D., Nelson, A., Newlands, N.K., Noack, F., Oronje, M., Raymond, C., Reichstein, M., Rieseberg, L.H., Rodriguez-Llanes, J.M., Rosenstock, T.S., Rowhani, P., Sarhadi, A., Seppelt, R., Sidhu, B.S., Snapp, S.S., soma, t., sparks, a.h., teh, l.s., tigchelaar, m., vogel, m.m., west, p.c., wittman, h., &You, L. (2022). research priorities for global food security under extreme events. *one earth (cambridge, mass.)*, 5, 756 - 766. doi:10.1016/j.oneear.2022.06.008

Hannah, L., Hannah, L., Ikegami, M., Hole, D.G., hole, D.G., Seo, C., Butchart, S.H., peterson, a.t., & roehrdanz, p.r. (2013). global climate change adaptation priorities for biodiversity and food security. *plos one*, 8. doi:10.1371/journal.pone.0072590

Awika, J.M. (2011). major cereal grains production and use around the world. doi:10.1021/bk-2011-1089.ch001

Krapivin, V.F., Varotsos, C.A., & Soldatov, V.Y. (2017). the earth's population can reach 14 billion in the 23rd century without significant adverse effects on survivability. *international journal of environmental research and public health*, 14. doi:10.3390/ijerph14080885

Ελληνική Δημοκρατία υπουργείο αγροτικής ανάπτυξης & τροφίμων γραφείο γενικού γραμματέα προοπτικές τομέα σιτηρών (με βάση προτάσεις & συμπεράσματα περιφερειακών μελετών νέας καπ) πίνακας ισοζυγίου σιτηρών 2017/2018

Figuerola, M., Hammond-Kosack, K.E., & Solomon, P.S. (2018). a review of wheat diseases-a field perspective. *molecular plant pathology*, 19 6, 1523-1536 .doi:10.1111/mpp.12618

Saeed, M.F., Jamal, A., Ahmad, I., Ali, S., Shah, G.M., Husnain, S.K., Farooq, A., & Wang, j. (2020). storage conditions deteriorate cotton and wheat seeds quality: an assessment of farmers' awareness in pakistan. *agronomy*. doi:10.3390/agronomy10091246

categorization of aspergillus flavus and aspergillus parasiticus isolates of stored wheat grains in to aflatoxinogenics and non-aflatoxinogenics Maliha Rashid1*, Samina Khalil , Najma Ayub1 ,Waseem Ahmed , and Abdul Ghaffar Khan1

Flinn, P.W., Subramanyam, B.H., & Arthur, F.H. (2004). comparison of aeration and spinosad for suppressing insects in stored wheat. *journal of economic entomology*. doi:10.1603/0022-0493-97.4.1465

Padin, S.B., Bello, G.M., & Fabrizio, M.C. (2002). grain loss caused by *tribolium castaneum*, *sitophilus oryzae* and *acanthoscelides obtectus* in stored durum wheat and beans treated with *beauveria bassiana*. *journal of stored products research*, 38, 69-74. doi:10.1016/s0022-474x(00)00046-1

Alonso-Amelot, M.E., & Avila-Núñez, J.L. (2011). comparison of seven methods for stored cereal losses to insects for their application in rural conditions. *journal of stored products research*, 47, 82-87. doi:10.1016/j.jspr.2011.01.001

Gałęcki, R., Bakula, T., Wojtacki, M., & Zuk-Gołaszewska, K. (2019). susceptibility of ancient wheat species to storage pests *sitophilus granarius* and *tribolium confusum*. *journal of stored products research*. doi:10.1016/j.jspr.2019.06.006

Olsen, A.R., Bryce, J.R., Lara, J.R., Madenjian, J.J., Potter, R.W., Reynolds, G.M., & Zimmerman, M.L. (1987). survey of stored-product and other economic pests in import warehouses in los angeles. *journal of economic entomology*, 80, 455-459. doi:10.1093/jee/80.2.455

Gerken, A.R., & Campbell, J.F. (2021). spatial and temporal variation in stored-product insect pest distributions and implications for pest management in processing and storage facilities. *annals of the entomological society of america*, 115, 239 - 252. doi:10.1093/aesa/saab049

Campbell, J.F., Mullen, M.A., & Dowdy, A.K. (2002). monitoring stored-product pests in food processing plants with pheromone trapping, contour mapping, and mark-recapture. *journal of economic entomology*, 95 5, 1089-101. doi:10.1093/jee/95.5.1089

Shah, M.a., Manj, I.A., Naseer, J., Anjum, K., Hafeez, S., Ahmad, H.m., & Faridi, T. (2023). damage patterns of different birds and rodent species in grain storages in bahawalpur, pakistan. *agricultural sciences journal*. doi:10.56520/asj.v5i2.270

Aahgoob, A.E., Badawy, A., & Badoor, I.M. (2006). survey of mites associated with grain residues and mixed flour in warehouses and mills in great cairo. *arab universities journal of agricultural sciences*, 14, 509-529. doi:10.21608/ajs.2006.15583

Wogan, G.N. (1966). chemical nature and biological effects of the aflatoxins. *bacteriological reviews*, 30, 460 - 470. doi:10.1128/br.30.2.460-470.1966

Wicklow, D.T., & Donahue, J.E. (1984). sporogenic germination of sclerotia in *aspergillus flavus* and *a. parasiticus*. *transactions of the british mycological society*, 82, 621-624.doi:10.1016/s0007-1536(84)80101-1

οδηγος ορθης πρακτικης για την ολοκληρωμενη διαχειριση προστασιας από ζωικούς εχθρους & εντομα στις επιχειρησεις τροφίμων

μπενάκειο φυτοπαθολογικό ινστιτούτο (2009). έκθεση εργασιών, issn 1105-1612. διαθέσιμο στο www.bpi.gr/publications/2009/html/files/assets/basic-html/page1.html

Sarrocco, S., & Vannacci, G. (2017). preharvest application of beneficial fungi as a strategy to prevent postharvest mycotoxin contamination: a review. *crop protection*.doi:10.1016/j.cropro.2017.11.013

Pan, L., Zhang, W., N.A, Z., Mao, S., & Tu, K. (2014). early detection and classification of pathogenic fungal disease in post-harvest strawberry fruit by electronic nose and gas chromatography–mass spectrometry. *food research international*, 62, 162-168.doi:10.1016/j.foodres.2014.02.020

Arnold, G.R. (1989). Barnett, H. L.; B. B. hunter: illustrated genera of imperfect fungi. fourth edition. v + 218 s. macmillan publishing co., new york, and collier macmillan, london, 1987. isbn 0–02–306395–5. *feddes repertorium*, 100, 566-566. doi:10.1002/fedr.4911000913

fungi in food – an overview L B Bullerman, university of nebraska-lincoln, lincoln, ne, usa

current status of the taxonomic position of *fusarium oxysporum* formae specialis *cubense* within the *fusarium oxysporum* complex g. fourie a,*, e.t. steenkamp a , r.c. ploetz b , t.r. gordon c , a. viljoen

έντομα αποθηκών και τροφίμων, κωνσταντίνος θ.μπουχέλος

Sadhasivam, S., Britzi, M., Zakin, V., Kostyukovsky, M., Trostanetsky, A., Quinn, E., & sionov, e. (2017). rapid detection and identification of mycotoxigenic fungi and mycotoxins in stored wheat grain. *toxins*, 9. doi:10.3390/toxins9100302

Kumar, A., Gupta, A., Atwal, S.S., Maheshwari, V.K., & Singh, C.B. (2016). post harvest management of karnal bunt, a quarantine disease in wheat. *plant pathology journal*, 14, 23-30.doi:10.3923/ppj.2015.23.30

Doohan, F.M., Mentewab, A., & Nicholson, P. (2000). antifungal activity toward *fusarium culmorum* in soluble wheat extracts. *phytopathology*, 90 6, 666-71 . doi:10.1094/phyto.2000.90.6.666

Vilela, G.R., Almeida, G., D’arce, M.A., Moraes, M.H., Brito, J.O., Silva, M.F., Silva, S.C., Piedade, S.M., Calori-Domingues, M.A., & Gloria, E.M. (2009). activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *eucalyptus globulus* labill.,

against the storage fungi *aspergillus flavus* link and *aspergillus parasiticus* speare. *journal of stored products research*, 45, 108-111. doi:10.1016/j.jspr.2008.10.006

Crespo, R., Jurez, M.p., Bello, G.M., Padin, S.B., Fernández, G.C., & Pedrini, N. (2002). increased mortality of *acanthoscelides obtectus* by alkane-grown *beauveria bassiana*. *biocontrol*, 47, 685-696. doi:10.1023/a:1020545613148

Barkat, E.H. (2016). fungi associated with stored wheat grain in australia: isolation, identification and characterisation.

Orzali, L., Corsi, B., Forni, C., & Riccioni, L. (2017). chitosan in agriculture: a new challenge for managing plant disease. doi:10.5772/66840

Σύνδεσμοι

Oxford academic, Journal of experimented botany

<https://academic.oup.com/jxb/article/60/6/1537/517393> (πρόσβαση 2023)

Annual reviews, *Aspergillus Flavus* Annual Review of Phytopathology [Aspergillus flavus | Annual Review of Phytopathology \(annualreviews.org\)](https://www.annualreviews.org/) (πρόσβαση 2023)

Research gate, Postharvest pathogenic fungi of wheat circulating in Lagos Nigeria. (PDF) [R.M. Kolawole, B.T. Thomas, A.A. Adekunle and Afolabi Oluwadun \(2013\). Postharvest Pathogenic Fungi of Wheat Circulating in Lagos State, Nigeria. Nigeria. American Journal of Research Communication, 1\(12\): 421-428 \(researchgate.net\)](#) (Πρόσβαση 2024)

Rodents and birds as invaders of stored grain ecosystems

https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=osvp6ouyvn4c&oi=fnd&pg=pa289&dq=rodents+and+birds+in+warehouse&ots=9c4ydxflu7&sig=eudeyjzvzhmc3ia-focjfloyjic&redir_esc=y#v=onepage&q=rodents%20and%20birds%20in%20warehouse&f=false (Πρόσβαση 2024)