

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Σχολή Γεωπονικών Επιστημών
Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και
Αγροτικού Περιβάλλοντος

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΕΜΑΧΙΔΙΩΝ ΤΟΥ *Tribolium*
confusum ΣΕ ΑΜΥΛΟΥΧΑ ΠΡΟΙΟΝΤΑ ΜΕ ΤΗ
ΧΡΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ

ΔΕΛΗΓΙΩΡΓΗ ΑΦΡΟΔΙΤΗ

ΒΟΛΟΣ 2013



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ & ΚΕΝΤΡΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 12593/1
Ημερ. Εισ.: 11/04/2014
Δωρεά: Συγγραφέα
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ-ΦΠΑΠ
20:3
ΔΕΛ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Σχολή Γεωπονικών Επιστημών
Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και
Αγροτικού Περιβάλλοντος

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΜΕ ΘΕΜΑ

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΕΜΑΧΙΔΙΩΝ ΤΟΥ *Tribolium*
confusum ΣΕ ΑΜΥΛΟΥΧΑ ΠΡΟΙΟΝΤΑ ΜΕ ΤΗ
ΧΡΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Ευάγγελος Βέλλιος
Χρήστος Γ. Αθανασίου
Νικόλαος Τσιρόπουλος

ΔΕΛΗΓΙΩΡΓΗ ΑΦΡΟΔΙΤΗ

ΒΟΛΟΣ 2013

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ θερμά τους επιβλέποντες καθηγητές μου κ. Ε. Βέλλιο και κ. Χ.Γ. Αθανασίου για τις γνώσεις που μου παρείχαν και τη βοήθεια που μου έδωσαν για την ολοκλήρωση της πτυχιακής αυτής. Την οικογένειά μου και τους φίλους μου για τη στήριξη και την υπομονή τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1. ΣΙΤΗΡΑ.....	9
1.2. ΑΛΕΥΡΑ.....	10
1.3. ENTOMA ΑΠΟΘΗΚΩΝ	
1.3.1. ENTOMA	12
1.3.2. ΜΕΡΙΚΑ ΑΠΟ ΤΑ ΠΙΟ ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ENTOMA ΤΩΝ ΑΠΟΘΗΚΩΝ ΚΑΙ Η ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥΣ	15
1.3.3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΟ ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ ΤΩΝ ΑΠΟΘΗΚΕΥΜΕΝΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ	22
1.3.4. ΠΑΡΟΥΣΙΑ ENTOMΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΟΣ	23
1.3.5. ΜΕΣΑ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ENTOMΩΝ ΕΧΘΡΩΝ ΤΩΝ ΑΠΟΘΗΚΕΥΜΕΝΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ	23
1.3.5.1. ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	23
1.3.5.2. ΒΙΟΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	24
1.3.5.3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	25
1.3.5.4. ΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	25
1.3.6 . ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΧΩΡΩΝ ΓΙΑ ΤΜΗΜΑΤΑ ENTOMΩΝ ΣΕ ΑΛΕΥΡΑ	26
1.4. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ	
1.4.1. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ <i>Tribolium Confusum</i>	26
1.4.2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ENTOMΩΝ ΣΕ ΠΡΟΙΟΝΤΑ.....	26

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
2.1. ΕΚΤΡΟΦΗ ΤΟΥ <i>Tribolium confusum</i>	32
2.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ	32
2.3. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ PCR	34
2.4. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	35
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
3.1. DNA extraction-PCR από <i>Tribolium confusum</i>	36
3.2. DNA extraction από βιολογικά cornflakes(A1) και αλεύρι επιμολυσμένο τεχνητά με τμήματα εντόμου <i>T.confusum</i> (A2)	38
3.3. Έλεγχος διαφόρων δειγμάτων για misspriming	39
3.4. Ποσοστά από μίγμα εντόμων <i>T.confusum</i> 1%, 0.1%, 0.01% επιβεβαίωση αποτελεσμάτων από τη χρήση της μεθόδου με αυτή του (et. Al. White 2007)	40
3.5. Έλεγχος τυχαίων δειγμάτων συσκευασμένου αλεύρου εμπορίου	42
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	45
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	47

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα μιας νέας απλής μεθόδου ανίχνευσης τμημάτων εντόμου του είδους *Tribolium confusum* σε μοριακό επίπεδο με τη χρήση της PCR. Η μέθοδος αυτή, προέρχεται από συνδυασμό παλαιότερων μεθόδων ανίχνευσης που τροποποιήθηκαν ανάλογα με τις ανάγκες και τον εξοπλισμό του εργαστηρίου. Για το σκοπό αυτό, αρχικά, πραγματοποιήθηκε η εκτροφή του εντόμου στο εργαστήριο υπό συνθήκες δωματίου. Στη συνέχεια, έγινε η απομόνωση του DNA του εντόμου από τις αποικίες εκτροφής του εργαστηρίου, για τη παραγωγή του θετικού μάρτυρα. Η απομόνωση του DNA βασίστηκε στο πρωτόκολλο των Doyle & Doyle (1990). Μετά την παραγωγή μάντας στις 150 βάσεις με τη μέθοδο της PCR, ακόμα και σε αραιώσεις έως και 1/1000 που πραγματοποιήθηκαν στο γενετικό υλικό, ακολούθησαν επαληθεύσεις με ποσοστά σύμφωνα με το άρθρο του (White, 2007). Τέλος, μετά από δειγματοληψία μικρής ποσότητας αλεύρων από συσκευασίες του εμπορίου, έγινε προσπάθεια ανίχνευσης τμημάτων εντόμων του είδους *T. confusum* σε αυτές. Γενικά, η αποτελεσματικότητα του πειράματος και της διαδικασίας που ακολουθήθηκε παρέμεινε αξιόπιστη, όμως σύμφωνα με τα δείγματα από τα άλευρα του εμπορίου κρίθηκε με μηδενικά αποτελέσματα, πράγμα που μπορεί να οφείλεται είτε στο μικρό αριθμό δειγμάτων που πραγματοποιήθηκαν, είτε σε μη μόλυνση των αποθηκευμένων αυτών προϊόντων από το συγκεκριμένο είδος εντόμου.

ABSTRACT

In the present study, the detection of fragments of *Tribolium confusum* was evaluated, by using molecular techniques. Based on this method, rearing of the above species was carried out under laboratory conditions. Then, the DNA of the species was extracted, for the production of positive controls. Extraction was based on the protocol described by Doyle & Doyle (1990). After the production of *T. confusum* detection at 150 bases by using PCR, confirmation was carried out based on the protocol described by White (2007). Finally, the same technique was used in order to detect the species in commercially available packages of amylaceous commodities. The detection method was

generally reliable, but no insects were detected in the commercial samples. This could be attributed to the low number of samples and/or to the absence of *T. confusum* from the specific samples.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Με τον όρο αποθήκευση εννοούμε τους χειρισμούς μετά τη συγκομιδή, κατά την επεξεργασία, τη συσκευασία και μεταφορά των γεωργικών προϊόντων και τροφίμων. Τα αποθηκευμένα προϊόντα υφίστανται προσβολές από μικροοργανισμούς, αρθρόποδα και τρωκτικά είτε συνεργιστικά, είτε μεμονωμένα, με αποτέλεσμα την ποιοτική αλλά και ποσοτική υποβάθμισή τους. Τις σημαντικότερες ζημιές στα αποθηκευμένα προϊόντα τις συναντάμε από αρθρόποδα, αλλά σε αυτούς τους χώρους συναντάμε επίσης και άλλες τάξεις εντόμων όπως, Κολεόπτερα, Λεπιδόπτερα, Υμενόπτερα, Δικτυόπτερα, Ημίπτερα. Από αυτές τις τάξεις πιο επιβλαβή για τον αποθηκευτικό χώρο και το προϊόν του, θεωρούνται τα Κολεόπτερα και τα Λεπιδόπτερα.

Τα αποθηκευμένα προϊόντα, και κυρίως τα άλευρα, είναι πολύ σημαντικής σημασίας για τον άνθρωπο, καθώς αυτά αποτελούν την κύρια μορφή ενέργειας στη διατροφή του σε καθημερινή βάση. Ο άνθρωπος από την αρχαιότητα ακόμα, αποθήκευε τα τρόφιμά του για να τα καταναλώνει σταδιακά. Σήμερα, η αποθήκευση των γεωργικών προϊόντων από τους παραγωγούς σε όλο τον κόσμο γίνεται κυρίως για την εξασφάλιση καλύτερων τιμών με τη μετέπειτα μεταπώλησή του. Σε κάποιες χώρες τα άλευρα, η εξαγωγή- εισαγωγή- συντήρηση- αποθήκευσή τους, είναι ο πιο σημαντικός οικονομικός τους παράγοντας. Σύμφωνα με στοιχεία του FAO, οι απώλειες του συγκομισμένου προϊόντος κατά την αποθήκευσή του ανέρχεται στο 17% της παγκόσμιας παραγωγής. (Μπουχέλος1995). Ο τρόπος λοιπόν, αποθήκευσης και συντήρησης των προϊόντων αυτών , χρίζει ιδιαίτερης σημασίας εξαιτίας των συχνών προσβολών από έντομα εχθρούς που μειώνουν και υποβαθμίζουν την ποιότητά του.

Ο μόνος τρόπος όμως για να προστατευτεί το αποθηκευμένο προϊόν , είναι με την παρέμβαση του ανθρώπου, που καταφεύγει στη δημιουργία διαφόρων μεθόδων ανίχνευσης και αντιμετώπισης των εχθρών αυτών. Οι μέθοδοι ανίχνευσης, με την πάροδο του χρόνου έχουν εξελιχθεί και παρέχουν όσο το δυνατόν μεγαλύτερη προστασία στο ίδιο το προϊόν, στο χώρο που αποθηκεύεται και στον άνθρωπο που το διαχειρίζεται και το καταναλώνει. Παρόλο τις εξελιγμένες μορφές μεθόδων ανίχνευσης εντόμων εχθρών που ανακαλύπτονται σταδιακά, είναι επίσης σημαντικό να τηρούνται ορισμένες προϋποθέσεις τόσο στην αποθήκευση όσο και στην μετέπειτα επεξεργασία του

αποθηκευμένου προϊόντος, έτσι ώστε να περιορίζονται οι απώλειές του από τους εχθρούς αυτούς, προκαλώντας μηδενική οικονομική ζημία στον παραγωγό και στον διαχειριστή του.

1.1 ΣΙΤΗΡΑ

Το σιτάρι, μαλακό και σκληρό, είναι ιδιαίτερης οικονομικής και αγρονομικής σημασίας τόσο για την Ελλάδα, όσο και για τις υπόλοιπες χώρες του κόσμου. Ιστορικά είναι το πιο παλιό είδος που ξεκίνησε να καλλιεργείται χιλιάδες χρόνια πιο πριν.

Το τετραπλοειδές σκληρό σιτάρι (*Triticum turgidum* var. *durum*) καλύπτει μια μεγάλη ιστορική διαδρομή, που φτάνει έως το 5000 π.Χ. Ο τόπος προέλευσής του βρίσκεται μεταξύ της Μέσης Ανατολής, Β. Αφρικής, Νοτιοανατολικής Ευρώπης και Αιθιοπίας. Γενικά, το σκληρό σιτάρι, χαρακτηρίζεται ως μια ανοιξιάτικη καλλιέργεια, όμως στις μεσογειακές χώρες καλλιεργείται το φθινόπωρο. Χαρακτηρίζεται από μεγάλη ανθεκτικότητα στην ξηρασία και το μεγαλύτερο ποσοστό καλλιέργειας το συναντάμε σε ημιξηρικές περιοχές. Στην Ελλάδα, το 1931 κάλυπτε το 66,6% της συνολικής καλλιεργούμενης έκτασης αν και η στρεμματική απόδοσή του δεν ξεπερνούσε τα 60kg. Σταδιακά η υπεροχή του έπεσε και άρχισε να αντικαθίσταται από το μαλακό σιτάρι. Με το πέρασμα των χρόνων, έχει διαπιστωθεί αύξηση και μείωση της παραγωγής. Το 2005 η παραγωγή κάλυπτε τα 7,5 εκατ. στρέμματα, ενώ το 2010 μειώθηκε στα 5,3. Σε γενικές γραμμές το σκληρό σιτάρι καλύπτει το 10% της παγκόσμιας παραγωγής. Από το σκληρό σιτάρι, παράγονται μεγάλοι, υαλώδεις σπόροι από τους οποίους, παρασκευάζεται το σιμιγδάλι και τα άλευρα για την παραγωγή ζυμαρικών.

Το εξαπλοειδές μαλακό σιτάρι (*Triticum aestivum* L. Em. Thell), είναι ένα χειμερινό σιτηρό με αναγκαιότητα στο ψύχος όμως στην Ελλάδα καλλιεργούνται μόνο ο ανοιξιάτικος και ενδιάμεσος τύπος και όχι ο χειμερινός. Γενικά, στον ελλαδικό χώρο τη δεκαετία του 1950 έως τέλος του 1970 υπήρξε σε αυτάρκεια, κρατώντας πλεόνασμα για τη χώρα έως το 1984. Στη συνέχεια μειώθηκε και αυξήθηκε το σκληρό. Το 1980 καλλιεργούνταν 7 εκατ. στρέμματα, το 2004 μόνο 900 χιλ. ενώ το 2010 εμφανίζεται μια αύξηση στην καλλιέργεια του που καλύπτει τα 1,3 εκατ. στρέμματα. Το μαλακό σιτάρι

έχει μεγάλη θρεπτική αξία και έχει αναδειχθεί το πιο σημαντικό εμπορικό είδος τροφίμου για το 35% του παγκόσμιου πληθυσμού. Χρησιμοποιείται για την παραγωγή αλεύρων στις αρτοποιηχανίες.

Εκτός από τα είδη του μαλακού και σκληρού σιταριού, έχουν δημιουργηθεί και άλλες ποικιλίες που φέρουν ειδικά χαρακτηριστικά. Όπως το υβρίδιο τριτικάλε που εμφανίζει καλύτερη απόδοση και συμπεριφορά στα ελληνικά εδάφη και προέρχεται από το συνδυασμό του μαλακού ή του σκληρού σιταριού με τη σίκαλη. Παράγεται αλεύρι ισάξιο των μαλακών ποικιλιών. Υπάρχουν επίσης και άλλα είδη, διπλοειδή και τετραπλοειδή.

1.2 ΆΛΕΥΡΑ

Ο σκοπός της άλεσης του σιταριού είναι η παραγωγή αλεύρου όσο το δυνατόν καλύτερα διαχωρισμένο από τα πίτυρα και το φύτρο. Η τεχνολογία άλεσης του σιταριού περιλαμβάνει τα παρακάτω βασικά στάδια :

1. Παραλαβή του σιταριού
2. Προκαθαρισμός
3. Αποθήκευση
4. Διαβροχή
5. Άλεση
6. Συσκευασία προϊόντων και υποπροϊόντων
7. Αποθήκευση και διακίνηση των αλεύρων.

Ο βαθμός άλεσης εκφράζει το ποσοστό του καθαρισμένου σιταριού το οποίο μετατρέπεται σε αλεύρι κατά την άλεση. Αλεύρι σίτου ή απλά αλεύρι ονομάζεται αυστηρά και μόνο το προϊόν της άλεσης υγιούς σιταριού που είναι βιομηχανικά

καθαρισμένο από κάθε οργανική ή ανόργανη ύλη. Τα άλευρα πρέπει κατά την τριβή μεταξύ των δακτύλων να μην εμφανίζονται ως πολύ μαλακά ή πολύ κονιοποιημένα ή ελαφρώς υγρά ή θερμά, δηλ. να μην σχηματίζουν ενιαία μάζα ή σφαίρα. Τα άλευρα καλής ποιότητας δεν πρέπει να παρουσιάζουν όψη κιμωλίας, το δε χρώμα τους δεν πρέπει να είναι τελείως καθαρό λευκό. Πρέπει να έχουν ευχάριστη οσμή νωπότητας και όχι την οσμή μούχλας η οποία προδίδει κακή αποθήκευση υγρού αλεύρου σε μη καλώς αεριζόμενες αποθήκες. Η γεύση πρέπει να είναι ευχάριστη, υπογλυκίζουσα. Εάν το αλεύρι έχει πικρή γεύση τότε τα άλευρα έχουν αποθηκευθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Η μειωμένη αρτοποιητική ικανότητα στα άλευρα είναι δυνατό να οφείλεται σε κακές συνθήκες αποθήκευσης (θερμοκρασία πάνω από 30°C).

Τα μεγαλύτερα προβλήματα από έντομα εμφανίζονται κατά το στάδιο της αποθήκευσης του αλεύρου. Κατά την μακρά και κακή αποθήκευση των αλεύρων αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται διάφορα έντομα και μικροοργανισμοί. Η προσβολή των αλεύρων από έντομα και μικροοργανισμούς αν και δεν αλλάζουν την σύσταση του αλεύρων υποβαθμίζουν όμως την ποιότητα του. Πηγή ανάπτυξης των εντόμων και των διαφόρων μικροοργανισμών μέσα στον αποθηκευτικό χώρο, μπορεί να προέρχεται με την παρτίδα νέων σιτηρών από τα μεταφορικά μέσα ή από τον ίδιο τον εξοπλισμό μέσα στον χώρο ή ακόμα και από τον ίδιο τον αγρό. Ακόμα, πηγή ανάπτυξης και εμφάνισης εντόμων μπορεί να δημιουργήσουν και οι συνθήκες διατήρησης του προϊόντος μέσα στον αποθηκευτικό χώρο, πιο συγκεκριμένα η διατήρηση των υψηλών θερμοκρασιών που ενισχύει την αναπαραγωγή διαφόρων σκαθαριών και λεπιδόπτερων. Τέτοια μπορεί να είναι *Sitophilus granarius*, *Oryzaephilus surinamensis*, ‘the confused beetle’ *Tribolium confusum*, ‘the red rust beetle’ *Tribolium castaneum*.

1.3. ENTOMA ΑΠΟΘΗΚΩΝ

1.3.1 ENTOMA

«Έντομο αποθηκών» θεωρείται κάθε είδος εντόμου που προσβάλλει και ζημιώνει άμεσα ένα προϊόν και μπορεί να αναπτυχθεί και να αναπαραχθεί σε μια αποθήκη ή χώρο που φιλοξενεί για αρκετό χρονικό διάστημα γεωργικά προϊόντα ή τρόφιμα (Μπουχέλος 1993). Υπάρχουν διάφορες οικογένειες εντόμων με τις πιο γνωστές να ανήκουν στις τάξεις των Κολεόπτερον και των Λεπιδόπτερον. Χαρακτηριστικό των εντόμων αποθηκών είναι η γεωγραφική τους εξάπλωση, επειδή μπορούν να ταξιδεύουν σε όλο τον κόσμο κυρίως με τη βοήθεια του ανθρώπου. Το μέγεθός τους είναι μικρό και χαρακτηρίζονται ως τέλειοι ζωικοί εχθροί γιατί μπορούν να βρουν πολύ εύκολα καταφύγιο σε διάφορους χώρους αποθήκευσης αλλά και να αποφύγουν πανεύκολα τους φυσικούς ζωικούς εχθρούς τους.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Τα σπουδαιότερα έντομα αποθηκών

ΕΙΔΟΣ	ΚΟΙΝΟ ΟΝΟΜΑ	ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ
A. ΚΟΛΕΟΠΤΕΡΑ		
<i>Lasioderma serricorne</i>	Σκαθάρι του καπνού	Anodiidae
<i>Stegobium paniceum</i>	Anodiidae	
<i>Sitophilus granarius</i>	Σκαθάρι του σιταριού	Curculionidae
<i>Sitophilus oryzae</i>	Σκαθάρι του ρυζιού	Curculionidae
<i>Acanthoscelides obtectus</i>	Βρούχος των φασολιών	Bruchidae
<i>Bruchus pisorum</i>	Βρούχος των μπιζελιών	Bruchidae
<i>Bruchus lentis</i>	Βρούχος της φακής	Bruchidae
<i>Oryzaephilus surinamensis</i>	Ψείρα του σταριού	Sylvanidae
<i>Trogoderma granarium</i>	Τρωγόδερμα των σπόρων	Dermestidae
<i>Trogoderma inclusum</i>	Τρωγόδερμα των σπόρων	Dermestidae

<i>Tenebrioides mauritanicus</i>	Σκαθάρι των σπόρων	Trogostidae
<i>Rhizopertha dominica</i>	Σκαθάρι του ρυζιού	Bostrychidae
<i>Tribolium confusum</i>	Ψείρα ή σκαθάρι των αλεύρων	Tenebrionidae
<i>Tribolium castaneum</i>	Σκούρο σκαθάρι των αλεύρων	Tenebrionidae
Β. ΛΕΠΙΔΟΠΤΕΡΑ		
<i>Ephestia elutella</i>	Σκουλήκι καπνού ή κακάο	Pyralididae
<i>Ephestia kuehniella</i>	Σκουλήκι των αλεύρων	Pyralididae
<i>Ephestia cautella</i>	Σκουλήκι σύκων, σταφίδας	Pyralididae
<i>Plodia interpunctella</i>	Κοινό σκουλήκι αποθηκών	Pyralididae
<i>Sitotroga cerealella</i>	Σιτότρογα	Geleghiidae
Γ. ΔΗΠΤΕΡΑ		
<i>Piophilidae casei</i>	Σκουλήκι του τυριού	Piophilidae
Δ. ΑΚΑΡΕΑ		
<i>Acarus siro</i>	Ακάρι των αλεύρων	Acaridae

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: σπουδαιότερες οικογένειες εντόμων και οι προσβολές τους

ΚΟΛΕΠΟΤΕΡΑ	
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	ΠΡΟΣΒΟΛΕΣ
<i>Anodiidae</i>	Εχθρός του καπνού. Προσβάλλει τσιγάρα, πούρα, κακάο, μπαχαρικά, όσπρια, ζυμαρικά
<i>Curculionidae</i>	Σπόρους δημητριακών (σιτάρι, ρύζι, βρώμη, κριθάρι, αραβόσιτο)
<i>Bruchidae</i>	Ρύζι και σπόρους δημητριακών

<i>Demestidae</i>	Μόνο με φυτικές ύλες. Καταστρεπτικό στα αποθηκευμένα σιτηträ.
<i>Trogostidae</i>	Η προνύμφη προσβάλλει τους σπόρους σιτηρών, που έχουν προσβληθεί ήδη από άλλα ήδη. Το τέλειο τρέφεται από άλλα έντομα αποθηκών.
<i>Bastrychidae</i>	Προσβάλλει σιτάρι, κριθάρι, καλαμπόκι, μπισκότα και γενικά προϊόντα αλεύρου
<i>Tenebrionidae</i>	Όλα τα είδη σπόρων, άλευρα, πίτυρα, μπαχαρικά, ξηρές φυτικές ύλες
ΛΕΠΙΔΟΠΤΕΡΑ	
<i>Pyralidae</i>	Άλευρα, σπόρους, κακάο, όσπρια, ξηρούς καρπούς, ξηρά φρούτα, ζυμαρικά, σκόνη γάλακτος κ.ά.
<i>Gelechiidae</i>	Σοβαρός εχθρός των σπόρων

Τα έντομα αποθηκών ανάλογα με τις διατροφικές τους συνήθειες κατατάσσονται στις εξής κατηγορίες:

- Είδη διατρεφόμενα με σπόρους. Η προσβολή μπορεί να ξεκινήσει από το χωράφια και να συνεχιστεί η ανάπτυξη μέσα στους χώρους αποθήκευσης.
- Είδη διατρεφόμενα με μύκητες. Τα έντομα αυτά τρέφονται με τη μυκοχλωρίδα που αναπτύσσεται επάνω στην επιφάνεια των διαφόρων προϊόντων εξαιτίας των περιβαλλοντικών συνθηκών που επικρατούν και κυρίως της υψηλής συγκέντρωσης υγρασίας.
- Είδη διατρεφόμενα με νεκρά φυτικά υλικά.
- Είδη διατρεφόμενα με ξύλο.
- Διάφορα σαπροφάγα είδη.

- Αρπακτικά και παρασιτοειδή. Έντομα που τρέφονται με άλλα έντομα αποθηκών ή παρασιτούν σ'αυτά.

Έχουν βρεθεί πάνω από 100 είδη διαφόρων εντόμων αποθηκών σε αποθήκες σιτηρών και σε διάφορα άλλα αποθηκευτικά μέρη και θεωρούνται αναπόσπαστο κομμάτι των οικοσυστημάτων των αποθηκών. Οι απώλειες που σημειώνονται κάθε χρόνο από τον FAO στις λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες σε κάθε είδος εδώδιμου σπόρου, ανέρχονται στις 81 εκατ. τόνους. Το 10% της παγκόσμιας ετήσιας παραγωγής χάνεται από τα διάφορα αρθρόποδα αποθηκών. Χώρες όπως η Νιγηρία και η Αιθιοπία χάνουν το 30% της παραγωγής τους σε αραβόσιτο, ενώ η Ιταλία το 5% σε δημητριακά.

1.3.2 ΜΕΡΙΚΑ ΑΠΟ ΤΑ ΠΙΟ ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΕΝΤΟΜΑ ΤΩΝ ΑΠΟΘΗΚΩΝ ΚΑΙ Η ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥΣ

ΚΟΛΕΟΠΤΕΡΑ

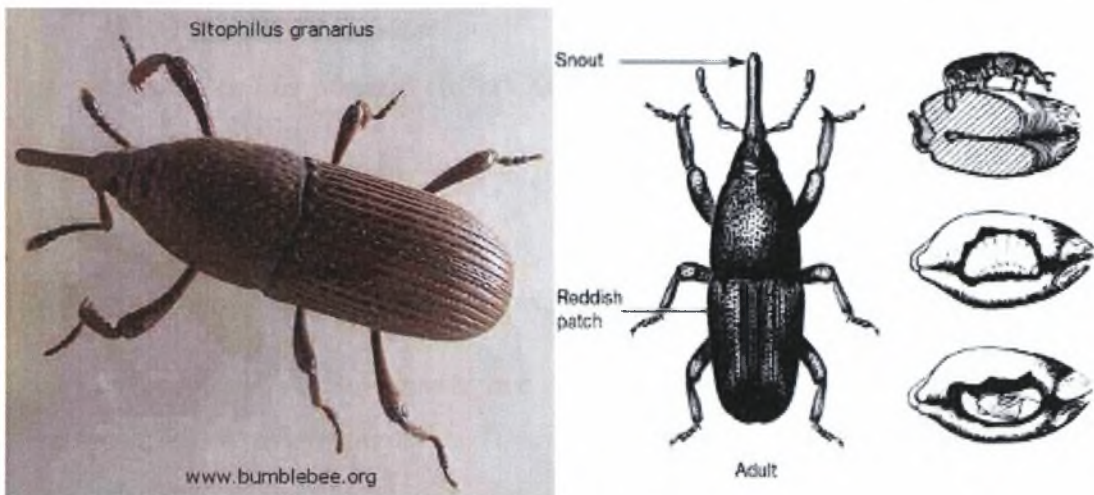
- ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ *Curculionidae*

1. *Sitophilus granarius* (ΣΚΑΘΑΡΙ ΤΟΥ ΣΙΤΑΡΙΟΥ)

Τέλειο: μήκος 3-4 mm. Τα έλυτρα φέρουν αυλακώσεις.

Προνύμφη: μήκος 3-4 mm, κιτρινωπή, κοντόχοντρη, κεκαμένη

Βιολογία- Προσβολές: 2-5 γεννεές ανά έτος. Γεννά μέχρι 400 αυγά σε τρύπες που ανοίγουν σε κάθε σπόρο. Η ανάπτυξη της προνύμφης γίνεται μέσα στ σπόρο. Προσβολές γίνονται σε όλους τους σπόρους δημητριακών ,σπανιότερα σε όσπρια και ξηρούς καρπούς.



Εικ. 1. Ακμαίο του *Sitophilus granarius*.

2. *Sitophilus oryzae* (ΣΚΑΘΑΡΙ ΤΟΥ ΡΥΖΙΟΥ)

Τέλειο: μήκος 3-4 mm. Τα έλυτρα φέρουν αυλακώσεις και παρατηρούνται 4 ανοιχτόχρωμες κηλίδες. Μπορεί και πετά.

Προνύμφη: μήκος 3-4 mm, κοντόχοντρη, κεκαμμένη, κιτρινωπή.

Βιολογία –Προσβολές: παρατηρούνται 4-5 γεννεές ανά έτος. Γεννά έως 400 αυγά σε τρύπες που ανοίγουν μέσα στο σπόρο. Η προνύμφη αναπτύσσεται εκεί μέσα και μετά προσβάλλει τα φυτά και τον αγρό. Το ακμαίο προσβάλλει όλους τους σπόρους των δημητριακών σπανιότερα όσπρια και ξηρούς καρπούς.



Εικ.2 Ακμαίο του *Sitophilus oryzae*.

- ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ *Bruchidae*

1. *Acanthoscelides obtectus* (ΒΡΟΥΧΟΣ ΤΩΝ ΦΑΣΟΛΙΩΝ)

Τέλειο: μήκος 3-4 mm, σχήμα ωοειδές, χρώμα καστανό- μαύρο, σώμα καλυπτόμενο με χνούδι.

Προνύμφη: μήκος 3mm, σαρκώδης, κυρτή, λευκή με κίτρινη κεφαλή.

Βιολογία – Προσβολές: 3-4 γεννεές ανά έτος. Η προσβολή ξεκινάει από το φυτό στον αγρό και εξελίσσεται στην αποθήκη. Προσβάλλει τη σόγια και τα φασόλια.



#58472
© Agriculture Western Australia
Photographed by Natarsha Zilm



Εικ.3 Ακμαίο του *Acanthoscelides obtectus* και η προσβολή του σε σπόρους φασολιού.

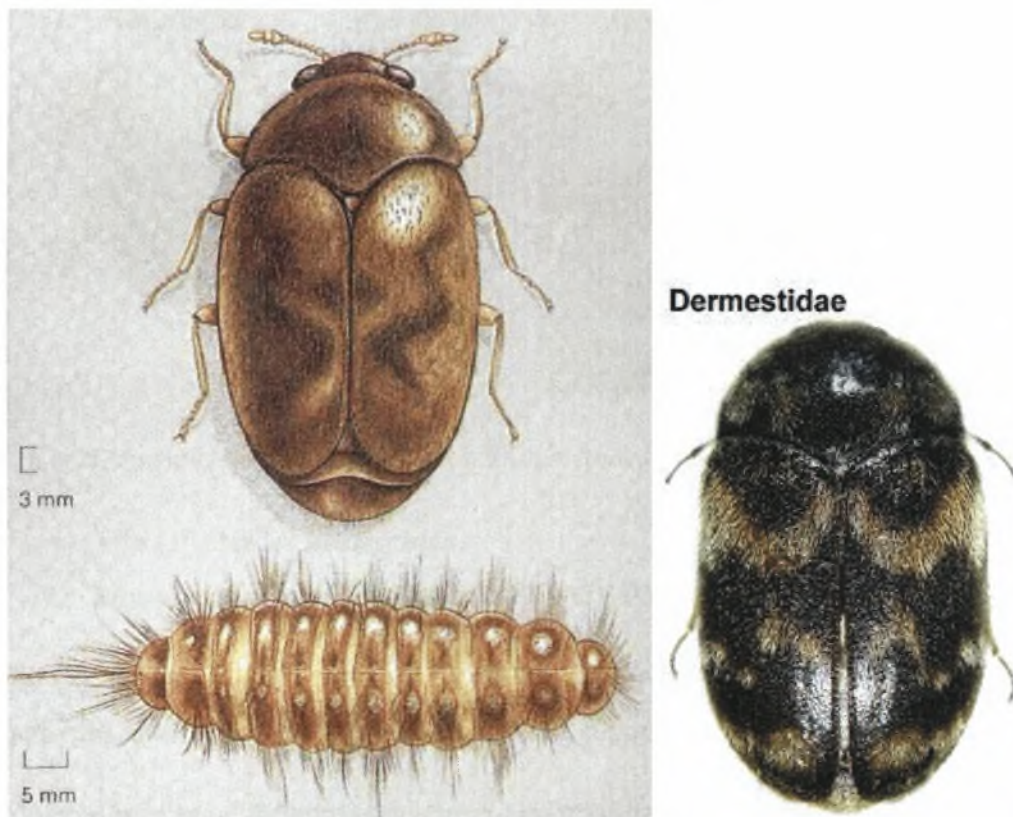
- ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ *Dermastidae*

1. *Trogoderma granarium* (ΤΡΩΓΟΔΕΡΜΑ ΤΩΝ ΣΠΟΡΩΝ)

Τέλειο: μήκος 3mm, σχήμα ωοειδές, χρώμα καστανό.

Προνύμφη: μήκος 5 mm, χρώμα ανοιχτό κασταν, το σώμα φέρει μακριές και λεπτές κοκκινωπές τρίχες.

Βιολογία- Προσβολές: Θεωρείται έντομο καραντίνας για πολλές χώρες. Το τέλειο δεν τρέφεται ενώ η προνύμφη εμφανίζει μακρά διάπαυση (έως και 8 έτη) και να δραστηριοποιηθεί κάτω από ευνοικές ξηροθερμικές συνθήκες. Προσβάλλονται τα σιτηρά, οι ελαιώδεις σπόροι (ελιά) και οι πλακούντες.



Εικ.4. Ακμαίο και προνύμφη του *Trogoderma granarium*.

- ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ *Trogostidae*

1. *Tenebrioides mauritanicus* (ΣΚΑΘΑΡΙ ΤΩΝ ΣΠΟΡΩΝ)

Τέλειο: μήκος 8-11 mm, καστανόμαυρο χρώμα, σώμα με κεραίες καστανέρυθρες και πόδια. Τα έλυτρα φέρουν ραβδώσεις.

Προνύμφη: μήκος 15-20 mm, χρώμα λευκό-κίτρινο με σώμα που φέρει τρίχες.

Βιολογία- Προσβολή: Μακρόβιο έντομο. Το τέλειο ζει 1-2 έτη και η προνύμφη 2- 3 έτη. Γέννα 800- 1000 αβγά ανθεκτικά στο ψύχος. Το τέλειο είναι αρπακτικό- νεκροφάγο, τρέφεται δηλαδή με άλλα έντομα αποθηκών ή νεκρά κομμάτια αυτών. Η προνύμφη τρέφεται από ήδη προσβεβλημένους σπόρους (άλευρα, πίτουρα, βαμβακόσπορο).



Εικ.5. Ακμαίο και η προνύμφη του *Tenebrioides mauritanicus* σε προσβολή σιτηρών.

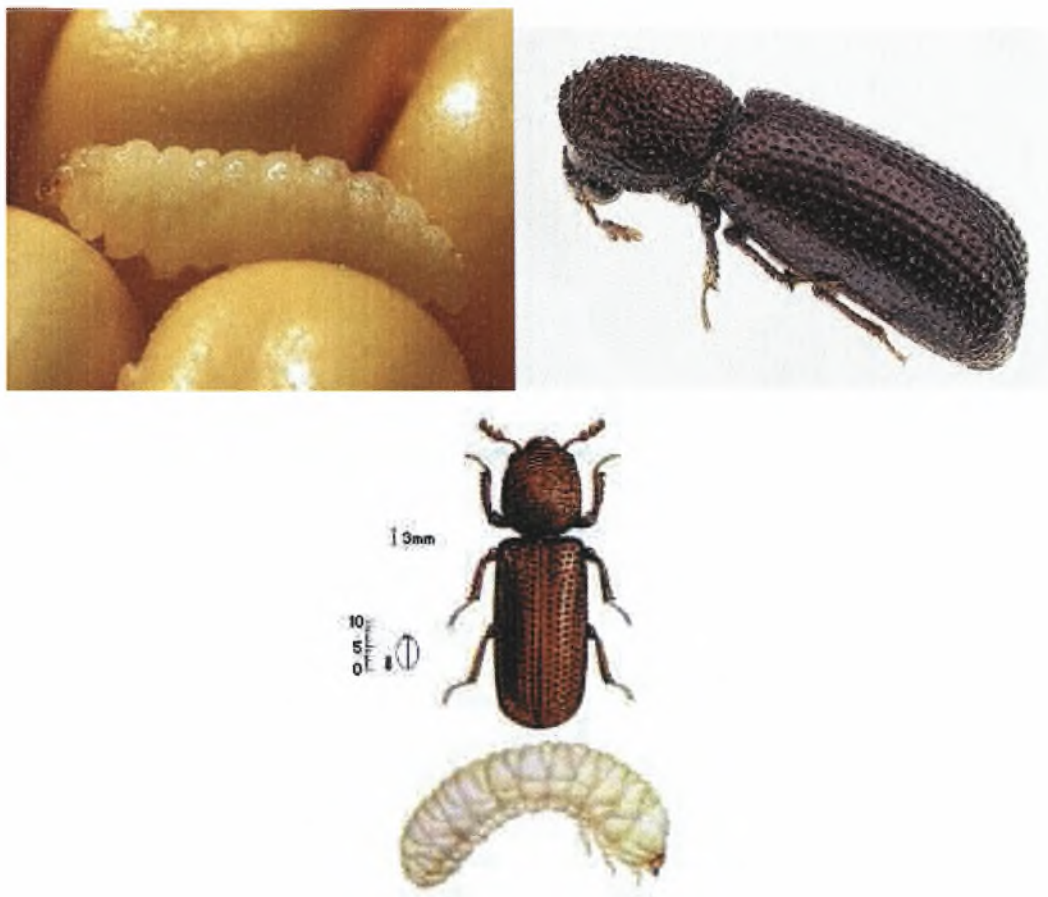
- ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ *Bostrychidae*

1. *Rhyzopertha dominica* (ΣΚΑΘΑΡΙ ΤΟΥ ΡΥΖΙΟΥ)

Τέλειο: μήκος 3 mm, σώμα κυλινδρικό επιμήκες, χρώμα καστανό. Η κεφαλή δεν φαίνεται, ενώ τα έλυτρα φέρουν κατά μήκος ευκρινείς γραμμές από μικρά κοιλώματα.

Προνύμφη: μήκος 4-6 mm, σώμα παχύ, κυρτό διογκωμένο εμπρός, υπόλευκη.

Προσβολές –Βιολογία: 4-6 γεννεές ανά χρόνο. Πολλές προνύμφες προσβάλλουν ένα σπόρο και νυμφώνονται. Το πιο συνήθες έντομο προσβολής σε αποθήκες ρυζιού στην Ελλάδα. Εκτός από ρύζι, προσβάλλει καλαμπόκι και κριθάρι.



Εικ.6. Προνύμφη και ακμαίο του *Rhyzopertha dominica*.

- ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ *Tenebrionidae*

1. *Tribolium castaneum* (ΣΚΟΥΡΟ ΣΚΑΘΑΡΙ ΤΩΝ ΑΛΕΥΡΩΝ)

Τέλειο: μήκος 3,5 mm, σώμα πεπλατυσμένο ερυθρό καστανό, γυαλιστερό.

Προνύμφη: μήκος 5mm, λευκοκίτρινη και φέρει πυλωρικά τριχίδια.

Προσβολές – Βιολογία: 5 γεννεές ανά έτος. Το θυληκό γεννά έως 600 αυγά. Προτιμούν ήδη προσβεβλημένους και σπασμένους σπόρους. Προσβάλλει όλα τα είδη σπόρων.



Εικ.7. Ακμαίο του *Tribolium castaneum*.

ΛΕΠΙΔΟΠΤΕΡΑ

- ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ Pyralidae

1. *Sitotroga cerealalla* (ΣΙΤΟΤΡΩΓΑ)

Τέλειο: πτέρυγες κροσσωτές, μυτερές, οι πρόσθιες έχουν κίτρινο τεφρό χρώμα ενώ οι οπίσθιες τεφρό. Άνοιγμα πτερύγων 12-16 mm.

Προνύμφη: μήκος 9 mm, χρώμα ανοιχτό καστανό ή υπόλευκο.

Προσβολές – Βιολογία: 3-4 γεννεές ανά έτος. Γεννά πάνω στους σπόρους. Οι προνύμφες ζουν και αναπτύσσονται μέσα στους σπόρους. Προσβάλλουν όλους τους σπόρους αλλά και διάφορα καλλιεργούμενα αγρωστώδη.



Εικ.8. Ακμαίο του *Sitotroga cerealalla*.

1.3.3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΟ ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ ΤΩΝ ΑΠΟΘΗΚΕΥΜΕΝΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

- Υγειονομική κατάσταση του προϊόντος πριν την επεξεργασία ή την αποθήκευσή του
- Συνθήκες περιβάλλοντος που επικρατούν μέσα στους αποθηκευμένους χώρους
- Ικανότητα πτήσης εντόμων
- Συμπεριφορά εντόμων
- Καταλληλότητα και προστασία των αποθηκευτικών χώρων

Το αποθηκευόμενο προϊόν πριν την αποθήκευσή του πρέπει να βρίσκεται σε άριστη κατάσταση, απαλλαγμένο από έντομα εχθρούς που ενδεχομένως υπάρχουν σε αυτό από προσβολές στο χωράφι και είναι δυνατόν να συνεχίσουν την αναπαραγωγική τους δραστηριότητα και το βιολογικό τους κύκλο μέσα στον αποθηκευμένο χώρο. Πριν την αποθήκευση του προϊόντος, είναι αναγκαία η σωστή αποξήρανσή του εφόσον αυτό δεν τηρεί τις κατάλληλες προϋποθέσεις αποθήκευσης. Το ποσοστό υγρασίας του αποθηκευμένου προϊόντος (σπόρου) δεν πρέπει να ξεπερνάει το 14%. Όσο αυξάνεται η υγρασία τόσο πιο εύκολη είναι η προσβολή. Παράλληλα, με την αποξήρανσή του το προϊόν, αυξάνει σε θερμοκρασία υποβαθμίζοντας την ποιότητά του. Η διάρκεια αποξήρανσης και ο τρόπος είναι χαρακτηριστικός για κάθε προϊόν που προορίζεται για αποθήκευση. Επιπλέον, οι συνθήκες περιβάλλοντος μέσα στον αποθηκευτικό χώρο παίζουν σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και στην εξάπλωση των εντόμων εχθρών αλλά και διαφόρων ειδών μυκήτων. Τα επίπεδα υγρασίας και θερμοκρασίας, πρέπει να είναι ελεγχόμενα και να ρυθμίζονται έτσι ώστε να μην δημιουργούνται ευνοϊκές συνθήκες για οποιαδήποτε προσβολή. Η καταλληλότητα του χώρου αποθήκευσης, όπως η στεγανότητα, και τα κατάλληλα μονωτικά υλικά επιδρούν θετικά στις προσβολές, όπως και τα είδη των εντόμων και η βιολογική τους συμπεριφορά.

1.3.4. ΠΑΡΟΥΣΙΑ ENTOMΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΟΣ

Ο ακριβής προσδιορισμός του είδους του εντόμου εχθρού που υπάρχει μέσα στον αποθηκευτικό χώρο, βοηθάει στην επιλογή της κατάλληλης μεθόδου αντιμετώπισής του. Το *Tribolium castaneum* διαθέτει την ικανότητα πτήσης, άρα πρέπει η αντιμετώπιση να είναι γρήγορη και αποτελεσματική διότι η εξάπλωση της προσβολής μπορεί να είναι ταχύτατη, ενώ το *Tribolium confusum*, δεν διαθέτει την ικανότητα πτήσης και θα υπάρξει μεγαλύτερος διαθέσιμος χρόνος ως προς την αντιμετώπισή του.

1.3.5. ΜΕΣΑ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ENTOMΩΝ ΕΧΘΡΩΝ ΤΩΝ ΑΠΟΘΗΚΕΥΜΕΝΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

Οι παρακάτω μέθοδοι μπορούν να εφαρμοστούν μεμονωμένα ή σε συνδυασμό για την αντιμετώπιση των εντόμων των αποθηκευμένων προϊόντων

- Χημικές μέθοδοι
- Βιοτεχνικές και βιοτεχνολογικές μέθοδοι
- Βιολογικές μέθοδοι
- Φυσικές μέθοδοι

1.3.5.1. ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η χημική καταπολέμηση είναι η πιο γρήγορη, η πιο οικονομική και κάποιες φορές η πιο αποτελεσματική μέθοδος που μπορεί να εφαρμοστεί για την αντιμετώπιση των εντόμων. Τα σκευάσματα που χρησιμοποιούνται είναι κυρίως οργανοφωσφορικά, πυρεθρινοειδή και καρβαμιδικά και κάποια άλλα υπό μορφή καπνογόνων. Πρέπει να είναι αποτελεσματικά και να θανατώνουν αμέσως τον οργανισμό χωρίς να επηρεάζουν τον υπόλοιπο χώρο και τον ανθρώπινο οργανισμό, αλλά να μην διαθέτουν και μεγάλη υπολειμματική διάρκεια με μη αποδεκτά υπολείμματα στα προϊόντα. Από τα οργανοφωσφορικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν το methyl, pyrimithos, fenthion, και

από τα πυρεθρινοειδή κυρίως το deltamethrin και από τα καρβαμιδικά το carbaryl, proroxur. Έντομα αποθηκών όπως το *Tribolium castaneum*, *Tribolium confusum*, *Rhizopertha dominica*, *Ephestia cautella*, έχουν αποκτήσει ανθεκτικότητα στο melathion και σε διάφορα άλλα οργανοφωσφορικά, ενώ άλλα είδη όπως το *Sitophilus spp.* στα πυρεθρινοειδή (Arthur 1996). Τα κοινά εντομοκτόνα εφαρμόζονται πριν ή κατά την εισαγωγή των προϊόντων στην αποθήκη.

Τα καπνογόνα δρούν μέσω των ατμών και μπορεί να είναι ουσίες όπως το βρωμιούχο αιθύλιο και η φωσφίνη. Το πρώτο έχει απαγορευτεί από την Ε.Ε. και η εφαρμογή του μπορεί να γίνει είτε σε άδειες αποθήκες είτε σε γεμάτες.

1.3.5.2. ΒΙΟΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι βιοτεχνικές μέθοδοι αποτελούν τη χρήση παγίδων και φερομόνων, ή τη χρήση ρυθμιστών ανάπτυξης εντόμων. Οι παγίδες και οι φερομόνες έχουν σκοπό να γνωστοποιήσουν και να ανιχνεύσουν την παρουσία διαφόρων εντόμων εχθρών, καθώς και την διακύμανση του πληθυσμού τους (Phillips et al. 2000). Γνωρίζοντας το είδος και τον πληθυσμό του εντόμου λαμβάνεται έγκαιρα η μέθοδος, ο τρόπος και ο χρόνος αντιμετώπισης των εντομολογικών προσβολών. Υπάρχουν διάφορων ειδών παγίδες, επιφανειακές, εναέριες, τύπου σόντας, φωτεινές ή ηλεκτρικές. Από αυτές, το τελευταίο είδους εκμεταλλεύεται το φαινόμενο του φωτοτροπισμού. Προσελκύουν και θανατώνουν τα έντομα με χρήση ηλεκτρικού ρεύματος, μόνο όμως όσα εμφανίζουν θετικό φωτοτροπισμό. Τα έντομα που εμφανίζουν αρνητικό φωτοτροπισμό και επομένως τέτοιου είδους παγίδες δεν είναι αποτελεσματικές είναι τα είδη *Sitophilus granarius*, *Tribolium confusum*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Oryzaephilus mercator* κ. ά.

Στη χρήση ρυθμιστών ανάπτυξης ανήκουν οι μιμητές ορμόνης νεότητας, οι ανταγωνιστές εκδυστεροειδών και οι παρεμποδιστές σύνθεσης χιτίνης. Οι ουσίες αυτές εμποδίζουν την μεταμόρφωση των ατελών σταδίων των εντόμων ή πολλές φορές και την εκκολαψιμότητα των ωών. (Oberlander et al. 2000).

1.3.5.3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι μέθοδοι αυτές κάνουν χρήση διαφόρων ζωντανών οργανισμών, που διαθέτουν την ικανότητα να παρασιτούν ή να τρέφονται ή να ασθενούν τα έντομα εχθρούς των αποθηκευμένων προϊόντων. Τέτοιοι μικροοργανισμοί μπορεί να είναι μύκητες, βακτήρια, ιοί, παρασιτοειδή ή αρπακτικά.

1.3.5.4. ΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Σε αυτού του είδους την καταπολέμηση, ανήκουν οι τεχνητές τροποποιήσεις που μπορούν να προκληθούν στον περιβάλλοντα χώρο της αποθήκης, με μεταβολές στην υγρασία και θερμοκρασία τόσο του περιβάλλοντος όσο και του ίδιου του αποθηκευμένου προϊόντος, με τη χρήση ακτινοβολιών, με χρήση ελεγχόμενων ατμοσφαιρών κ.ά.

Η υγρασία αποτελεί έναν από τους πιο κρίσιμους παράγοντες που ευνοεί την ανάπτυξη των εντόμων αλλά και κάποιων ειδών μυκήτων που είναι ιδιαίτερα επιβλαβής στο αποθηκευμένο προϊόν με την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών τους, τις μυκοτοξίνες. Η ξήρανση των προϊόντων είναι ιδιαίτερα σημαντική, εφόσον δεν προκαλείται αλλοίωση τους, και γίνεται συνήθως με χρήση ανεμιστήρων που τροφοδοτούν θερμό αέρα.

Η μεταβολή της θερμοκρασίας ωστόσο, είναι η πιο αποτελεσματική μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί καθώς τα έντομα δεν μπορούν να αναπτυχθούν και να αναπαραχθούν σε θερμοκρασίες μικρότερες από 13°C και μεγαλύτερες από 35°C. Η διάρκεια της εφαρμογής των ακραίων θερμοκρασιών εξαρτάται από το είδος του αποθηκευτικού υλικού, το είδος του εντόμου, το στάδιο ανάπτυξής του και την αντοχή που παρουσιάζει στις μεταβολές της θερμοκρασίας (Fields 1992). Η χρήση των υψηλών θερμοκρασιών είναι πιο αποτελεσματική, όμως μπορεί να είναι καταστρεπτική για την ποιότητα και διάρκεια ζωής του αποθηκευμένου υλικού. Παρόλο του μεγάλου ποσοστού θνησιμότητας των υψηλών θερμοκρασιών, η επίδραση χαμηλών θεωρείται καλύτερης διαχείρισης μέθοδος. Είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική χωρίς να προκαλεί αλλοιώσεις και υποβαθμίσεις των συστατικών του αποθηκευμένου προϊόντος. Έχει την ικανότητα είτε

να μειώνει το ρυθμό ανάπτυξης, διατροφής, αναπαραγωγής είτε τη μείωση του ποσοστού επιβίωσης των εντόμων εχθρών, ωστόσο χρήζει ιδιαίτερης προσοχής διότι έκθεση για μεγάλο χρονικό διάστημα προκαλεί ανθεκτικότητα των εντόμων.

Μια ακόμα εξίσου σημαντική και αποτελεσματική μέθοδος είναι η χρήση ελεγχόμενων ατμοσφαιρών. Η μέθοδος αυτή αποσκοπεί στον έλεγχο του πληθυσμού εντόμων που προσβάλλουν προϊόντα σε καλά κλεισμένους και μεγάλους χώρους (σιλό), μεταβάλλοντας τη σύνθεση του ατμοσφαιρικού αέρα. Η μεταβολή αυτή μπορεί να γίνει με πρόσθεση CO₂ ή N₂, ή με αφαίρεση O₂, ή με παράλληλη μεταβολή της σχετικής υγρασίας και της ατμοσφαιρικής πίεσεως. Η θνησιμότητα των εντόμων μπορεί να αυξηθεί με συνδυασμό των παραπάνω μεθόδων έως και 98% για τα είδη *Tribolium confusum* και *Tribolium castaneum* (Jay et al. 1971).

1.3.6 ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΧΩΡΩΝ ΓΙΑ ΤΜΗΜΑΤΑ ΕΝΤΟΜΩΝ ΣΕ ΑΛΕΥΡΑ

Ο FDA (US Food and Drug Administration), ο αμερικάνικος οργανισμός φαρμάκων και τροφίμων έχει βγάλει με ανακοίνωση ότι στα 50gr αλεσμένου αλεύρου, πρέπει το ανώτερο 75 τμήματα εντόμων. (FDA, 1988).

1.4. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ

1.4.1 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ *TRIBOLIUM CONFUSUM*

Το σκαθάρι *Tribolium confusum* (the confused flour beetle) ανήκει στα κολεόπτερα στην οικογένεια Tenabrionidae (Jacquelin du Val) και είναι το δεύτερο κύριο έντομο αποθηκευμένων προϊόντων μετά το *Tribolium castaneum* που προκαλεί μεγάλα οικονομικά προβλήματα στα παραγόμενα είδη. Μπορεί να βρεθεί σε σπόρους δημητριακών, φασόλια, μπαχαρικά, μακαρόνια, άλευρα όλων των ειδών. Επίσημως, έχει γίνει η καταγραφή των ειδών στα οποία βρέθηκαν αποικίες τους (Chtenden 1896, 1897).

Το σκαθάρι αυτό, προκαλεί κυρίως οικονομικά προβλήματα υποβαθμίζοντας την ποιότητα του προϊόντος, μειώνοντας την θρεπτική του αξία και τέλος δημιουργώντας ευνοϊκές συνθήκες για δευτερογενή ανάπτυξη διαφόρων μυκήτων όπως *Aspergillus* sp. και *Fusarium* sp. Σε κάποιες χώρες, όπως οι Η.Π.Α. έχει υπολογιστεί πως η οικονομική καταστροφή που μπορεί να προκαλέσει ανέρχεται στα 1.2 έως 2.5 δισεκατομμύρια δολάρια κάθε χρόνο (Flinn et. al. 2007). Στην Ελλάδα ωστόσο, δεν έχουν αναφερθεί ακόμα ζημιές από το είδος αυτό, ίσως εξαιτίας της έλλειψης ελεγκτικού μηχανισμού.

Είναι ένα ολομετάβολο έντομο και συνεπώς πραγματοποιεί ολοκληρωμένη μεταμόρφωση με τα στάδια ανάπτυξής του να διακρίνονται σε αυγό (egg), προνύμφη (larva), νύμφη ή πλαγγών (pupa), ενήλικο ή τέλειο (adult) (Thomas Park 1934). Το όνομά του 'the confused beetle' το πήρε από την ακανόνιστη κίνησή του (Stanley 1932, 1934).

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Συστηματική κατάταξη *Tribolium confusum*

ΒΑΣΙΛΕΙΟ	ANIMALIA
ΦΥΛΟ ΑΡΘΡΟΠΟΔΑ	ARTHROPODA
ΚΛΑΣΗ	INSECTA
ΤΑΞΗ	COLEOPTERA
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	TENEBRIONIDAE
ΓΕΝΟΣ	<i>Tribollium</i>
ΕΙΔΟΣ	<i>Tribolium Confusum</i>

Τέλειο: τα θυληκά και μπορούν να ζήσουν έως και 2 έτη (Κ. Μπουχέλος 1993). Το μήκος του ακμαίου φτάνει τα 4-4,5 χιλιοστά και το σώμα του εμφανίζει καστανοκόκκινο χρωματισμό και είναι γυαλιστερό. Η κεφαλή και το δίκρανο του τελευταίου κοιλιακού τμήματος έχουν σκούρο καστανό χρώμα. Είναι επιμήκες, πεισμένο, λείο, χωρίς τριχωμα. Η κεφαλή του και το επιθωράκιο έχουν πολλά μικρά στίγματα. Οι κεραίες του έχουν

άρθρα που βαθμιαία μεγεθύνονται από τη βάση προς τα άκρα και με χρωματισμό ελύτρων ερυθροκάστανο.

Προνύμφη: το μήκος φτάνει έως τα 5 mm, είναι ευκέφαλη ,ολιγόποδη, ωχροκίτρινη και φέρει πλευρικά τριχίδια. Στα πρώτα στάδια έχει υπόλευκο χρωματισμό, ενώ στα επόμενα, το σχετικά ισχυρό χιτινισμένο δέρμα της έχει χρώμα κιτρινοκάστανο. Η κεφαλή σκοτεινού χρώματος, Στο τελευταίο κοιλιακό τμήμα της υπάρχει μια χαρακτηριστική χιτινισμένη απόφυση. Η προνύμφη φθάνει σε πλήρη ανάπτυξη κάτω από ευνοϊκές συνθήκες σε 3-5 εβδομάδες. Μπορεί να αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες από 20 - 37,5 ο C. Αντέχει σε συνθήκες ξηρασίας, με σχετική υγρασία 10%.

Βιολογικός κύκλος: ολοκληρώνεται σε διάστημα 4-5 εβδομάδων, με 4-5 γεννεές το χρόνο (στα θερμά κλίματα μπορεί περισσότερες), και το θηλυκό γεννάει 400-800 αυγά τη φορά. Τα αυγά είναι λευκά γλοιώδη 0,6 - 0,3 mm, τα οποία εναποθέτονται μεμονωμένα και σε αργό ρυθμό ημερισίως, επάνω στα άλευρα, στους σπόρους , τα πίτουρα και σε διάφορα άλλα υποστρώματα. Η εκκόλαψη εξαρτάται από την θερμοκρασία (30-35 ο C) .Τα αυγά ύστερα από 1 - 2 εβδομάδες εκκολάπτονται και οι νεαρές προνύμφες αρχίζουν να τρέφονται κατά προτίμηση από άλευρα και σπασμένους σπόρους ή προσβεβλημένους από άλλα έντομα.. Τα ενήλικα διαχειμάζουν μέσα στο αλεύρι ή στους αποθηκευμένους σπόρους. Τα τέλεια και οι προνύμφες τρέφονται με αποθηκευμένους σπόρους αραχίδας, κεχριού, σόργου, με αλεύρι σταριού, κεχριού, με σιμιγδάλι, με σπασμένους σπόρους σιτηρών, πίτουρα, ξηρά λαχανικά, σουσάμι, σοκολάτα, ελαιούχους πλακούντες, κακάο, φρυγανιές, γλυκοπατάτα, μαύρο πιπέρι, με φαρμακευτικά προϊόντα κ.ά. Γενικά, ολόκληροι και υγιείς σπόροι σιτηρών δεν προσβάλλονται από το *Tribolium confusum*.

Τέλος , είναι πιθανό να σημειωθεί επιμύκηση του βιολογικού κύκλου, εφόσον η τροφή των προνυμφών δεν είναι κατάλληλη για την ανάπτυξή τους, όπως επίσης και ο αριθμός των εκδύσεων μπορεί να αυξηθεί στις 12- 13 από τις 6 – 7 που είναι ο φυσιολογικός σε παρατηρήσεις που έγιναν σε εργαστηριακό περιβάλλον.



Εικ 9: Μορφολογία ακμαίου *Tribolium confusum*

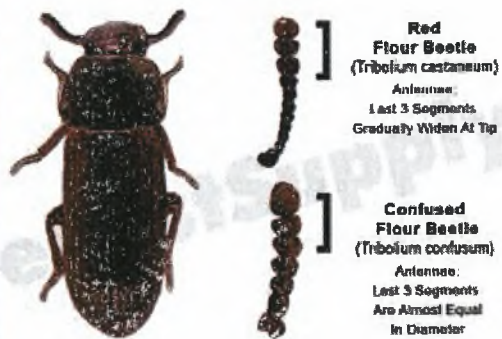
A



B



C



Εικ 10: στάδια ανάπτυξης *Tribolium confusum* a) larva b) pupa c) adult **Εικ 11:** διαφοροποίηση στις κεραίες των *Tribolium castaneum* και *Tribolium confusum*



Εικ 12. Προσβολές από *Tribolium confusum* σε σπόρους

Προσβολή: Σε ψυχρές και μη θερμαινόμενες αποθήκες αναστέλλεται η δραστηριότητα του και διαχειμάζει στο στάδιο του ακμαίου στα διάφορα προϊόντα και ύλες με τις οποίες μπορεί να τραφεί, καθώς και σε ρωγμές και άλλα καταφύγια. Όταν οι συνθήκες του αποθηκευτικού χώρου γίνουν περισσότερο ευνοϊκές (άνοδος της θερμοκρασίας) τα τέλεια άτομα αναλαμβάνουν δραστηριότητα, ζευγαρώνουν και τα θηλυκά αρχίζουν να ωοτοκούν. είναι κολεόπτερα αλεύρων και των υποπροϊόντων τους, ακόμα προσβάλλουν τους σπόρους των σιτηρών ή διάφορους άλλους ελαιώδεις σπόρους αλλά συναντώνται και σε διάφορα λοιπά τρόφιμα.

Οικονομική σημασία: το είδος αυτό είναι ένα από τα πιο σοβαρά γένη του είδους *Tribolium* και ένα από τα πιο σημαντικά σκαθάρια που συμβάλλουν στην οικονομία. Στον Καναδά, αυτό το σκαθάρι βρίσκεται πιο συχνά σε αλευρόμυλους και εργοστάσια ζωοτροφών, προκαλώντας σημαντικές ζημιές στα παραγώμενα προϊόντα.

Συμπεριφορά: είναι γνωστή η κανιβαλική συμπεριφορά του μέσα στην αποικία (Charman 1928, Park 1933). Τα ενήλικα δηλαδή, μπορούν να τραφούν με τα αυγά, τις μόλις εκκολαπτόμενες προνύμφες και νύμφες. Το γεγονός αυτό όμως είναι σχετικό, ειδικά όταν έχουν άπλετη τροφή αλεύρων και προτιμούν να τρέφονται από αυτά. Ακόμα

μια παράξενη συμπεριφορά που φαίνεται να εμφανίζει το είδος αυτό είναι η ομοσεξουαλικότητα που παρουσιάζουν τα αρσενικά μέλη της αποικίας. Είναι ένα συχνό φαινόμενο που παρουσιάζεται όταν τα θηλυκά δεν μπορούν να έρθουν σε σύζευξη με όλα τα αρσενικά. Ενώ τέλος, σε εργαστηριακά πειράματα μαζί με το είδος *Tribolium castaneum*, έχει παρατηρηθεί η αρμονική συνύπαρξή τους σε χαμηλή πυκνότητα πληθυσμού, εφόσον η τροφή είναι επαρκής.

Χημική μέθοδος αντιμετώπισης: Έχει διαπιστωθεί πως οργανοφωσφορικά σκευάσματα όπως το pyrimiphos-methyl (Evans 1985) και το chlorpyrifos-methyl (Arthur 1992) μπορούν να δώσουν ικανοποιητικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση του *T. confusum*. Έχει αναπτύξει ανθεκτικότητα στα σκευάσματα melathion και lindane (Evans 1985).

Φυσική μέθοδος αντιμετώπισης: Θεωρείται ένα από τα πιο ανθεκτικά είδη στη χρήση γη διατόμων (Athanasίου et. al. 2004). Η χρήση της γης διατόμων είναι αποτελεσματική ακόμα και σε μύλους ή φούρνους όπου η χημική καταπολέμηση δεν είναι επιτρεπτή. Οι Michalaki et al. 2005 μελέτησαν την αποτελεσματικότητα του εντομοπαθογόνου μύκητα *Metarhizium anisopliae Sorokin* σε συνδυασμό με το σκευάσμα της γης διατόμων SilicoSec κατά των προνύμφων *T.confusum* και έδειξαν ότι η παρουσία του SilicoSec ενδυνάμωσε την μυκητοκτόνο δράση του *M. anisopliae* υπό συγκεκριμένες συνθήκες.

1.4.2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ ΣΕ ΠΡΟΙΟΝΤΑ

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για την ανίχνευση των εντόμων, και η χρήση τους είναι ανάλογη του χρόνου, του κόστους και της λεπτομέρειας των αποτελεσμάτων που θέλουμε να έχουμε. Η πιο απλή αναπτυσσόμενη μέθοδος που ακολουθείται σε πειραματικό στάδιο, είναι αυτή της ανίχνευσης με PCR. (White, 2007). Η διαδικασία είναι απλή αλλά απαιτεί χρόνο, δίνοντας ως αποτέλεσμα την ύπαρξη κάποιας ποσότητας εντόμου χωρίς να γίνεται ο ακριβής αριθμός της ποσότητας του. Επόμενη διαδεδομένη μέθοδος και αρκετά υποσχόμενη είναι αυτή της ανοσοενζυμικής ELISA (Kitto, 1991). Είναι πιο ευαίσθητη μέθοδος και μπορεί να μετρήσει μικρές ποσότητες ng των εντόμων.

Η NIR μέθοδος (near infrared spectroscopy), είναι επίσης μια απλή και οικονομική μέθοδος που χρησιμοποιείται συχνά στις βιομηχανίες σιτηρών. Έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την ανίχνευση διαφόρων κολεοπτέρων (Dowell et al., 1999). Είναι λιγότερο ευαίσθητη από την standard flotation (J. Perez Mentoza et al., 2003). Μια πιο πρόσφατη μέθοδος είναι η LFM (light filth method) που έχει τη δυνατότητα αναγνώρισης του είδους του εντόμου και του φύλου του (P. Trematerra et al., 2011).

Η παρακάτω πτυχιακή πραγματοποίησε τον εντοπισμό τμημάτων εντόμου του είδους *T. confusum* με την απλή μέθοδο μοριακής ανίχνευσης PCR.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΕΚΤΡΟΦΗ ΤΟΥ *Tribolium confusum*

Η εκτροφή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο της εντομολογίας του γεωπονικού πανεπιστημίου. Με τον τρόπο αυτό διατηρήθηκε καθαρή εκτροφή των εντόμων σε συνθήκες περιβάλλοντος. Από την εκτροφή αυτή συλλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα, ακμαία του *Tribolium confusum* ζωντανά ή μη.

2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΕΝΤΟΜΩΝ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΛΕΥΡΩΝ

Αρχικά έγινε απομόνωση DNA από άτομα *Tribolium confusum* προερχόμενα από αποικίες εκτροφής του τμήματος εντομολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η απομόνωση του DNA βασίστηκε στο πρωτόκολλο των Doyle & Doyle (1990), με

κάποιες όμως τροποποιήσεις βασισμένες στις ανάγκες του πειράματος που έγιναν εν συνεχεία μέσα στο εργαστήριο για τον πιο εύκολο και σωστό χειρισμό του.

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, αρχικά, έγινε η παραγωγή γενετικού υλικού *T.confusum* για να χρησιμοποιηθεί ως θετικός μάρτυρας. Ζυγίστηκαν ομάδες 10 εντόμων και το βάρος τους ήταν κατά μέσο όρο περίπου 0,025 gr. Ο παγωμένος ιστός, κονιορτοποιήθηκε σε προψυγμένο γουδί με τη βοήθεια υγρού αζώτου. Προστέθηκαν 600ml προθερμασμένου ρυθμιστικού διαλύματος CTAB PH:8 (2% w/v hexadecyltrimethylammonium bromide ,Sigma H-5882 , NaCl 1.4M, 2-mercaptoethanol 0.2%, EDTA 20mM, Tris-HCl 100mM, pH :8.0. Το αιώρημα του αλεσμένου ιστού θερμάνθηκε στους 60°C για 30 min. Ακολούθησε καθαρισμός του αιωρήματος με προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης:χλωροφορμίου (1:1 v/v), καλή ανάδευση ώστε το αιώρημα να αποκτήσει τη μορφή γαλακτώματος, φυγοκέντρωση για 5 λεπτά ,στις 10.000 g και παραλαβή της υδατικής φάσης. Στη συνέχεια, στην υδατική φάση προστέθηκε 1/2 του όγκου NaCl και 2 φορές του όγκου 95% αιθανόλης (θερμοκρασίας -20°C). Το δείγμα ανακινήθηκε καλά και διατηρήθηκε για 1h στους -20°C. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε 10 min στις 10.000 g και στη συνέχεια απορρίφθηκε το υπερκείμενο. Στο ίζημα προστέθηκε 1ml EtOH, ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 10.000 g για 5 λεπτά, απόρριψη του υπερκείμενου και παραμονή του για σύντομο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη. Κατόπιν το ίζημα διαλύθηκε σε 100μl αποστειρωμένου απιονισμένου νερού (sdiH₂O). Έπειτα, πραγματοποιήθηκε επώαση του δείγματος στους 37°C με RNάση A (προστέθηκε 1 μl από αρχικό διάλυμα (Sambrook et.at.1989) για 30 λεπτά. Με το τέλος της πέψης, ακολούθησε ανάδευση του δείγματος και καθαρισμός του με ίσο όγκο μίγματος φαινόλης: χλωροφορμίου (1:1 v/v), όπως έχει περιγραφεί ήδη. Ο καθαρισμός με μίγμα φαινόλης: χλωροφορμίου (1:1 v/v), επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές και στη συνέχεια το δείγμα κατακρημνίστηκε με προσθήκη 1/10 του όγκου 3M οξικού νατρίου και 2,5 όγκων 100% παγωμένης EtOH. Ακολούθησε παραμονή του δείγματος στους -20°C για 1-1^{1/2} h και στη συνέχεια φυγοκέντρωση στις 10,000 g για 10 λεπτά. Το ίζημα που προκύπτει καθαρίζεται αρχικά δύο φορές με 70% παγωμένης EtOH και τέλος μια φορά με 100% EtOH, και επαναδιαλύεται σε 100μl sdiH₂O. Τελικά το δείγμα αποθηκεύεται στους -20°C.

Μετά την διαδικασία της απομόνωσης και του καθαρισμού του DNA, υπολογίζεται η καθαρότητα και η ποσότητα του δείγματος με βάση την απορρόφηση του σε μήκος κύματος 260 nm και 280 nm στο φασματοφωτόμετρο. Απορρόφηση στα 260nm ίση με τη μονάδα αντιστοιχεί σε 50ng/μl, διπλής έλικας του DNA. Κάνοντας αραιώση 1/20 του δείγματος, δηλαδή λαμβάνοντας 5μl από το δείγμα και προσθέτοντας 95μl sdiH₂O, μετρήθηκε η απορρόφηση (A₂₆₀) αυτού του αραιωμένου υδατικού διαλύματος στα 260nm στο φασματοφωτόμετρο. Άρα η συγκέντρωση του δείγματος δίνεται από την σχέση C_{δείγματος} (ng/μl) = 50 x 20 x A₂₆₀ = 1000 X A₂₆₀. Η καθαρότητα του δείγματος προκύπτει από το λόγο A₂₆₀/ A₂₈₀ και οι επιθυμητές τιμές καθαρότητας του DNA είναι μεταξύ 1,8 και 2,0. (Sambrook et.al. 1989).

Με τη μέθοδο αυτή, παραλήφθηκε DNA από άτομα *T. confusum* που χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας στις PCR που ακολούθησαν. Για την ανίχνευση ατόμων *T.confusum* μέσα σε δείγματα αλεύρων έγιναν κάποιες μικρές μετατροπές στη μέθοδο. Αρχικά, το 1gr του παγωμένου ιστού διαλύεται σε 4ml προθερμασμένου CTAB, ενώ στο σημείο της επώασης με RNάση A, πραγματοποιήθηκε και μια νέα επώαση του δείγματος με πρωτεϊνάση K (από αρχικό διάλυμα προστέθηκε 1μl /400 μl) στους 50°C για 2h ,για να καθαριστεί το δείγμα από πρωτεΐνες. Τα υπόλοιπα στάδια ακολουθήθηκαν κανονικά.

2.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Τα αντιδρώντα της PCR για 50 μl τελικός όγκος ήταν : 5 μl 10x PCR buffer (NEB), 5 μl 2mM dNTPS (NEB) , 1μl από κάθε εκκινητή (20pmol/μl, Sigma), 36,5μl sdiH₂O νερό, 0,5μl Taq polymerase 5000 u/ml (NEB), 1μl δείγματος DNA. Η αντίδραση έλαβε χώρασε μικροσωλήνες PCR χωρητικότητας 0,2 ml (Greiner bio-one).

Ο υπολογισμός του σημείου υβριδισμού των εκκινητών γίνεται με βάση τον τύπο $T_m \{4(G+C)+2(A+T)-5\}^{\circ}C$, και για τους εκκινητές η θερμοκρασία αυτή υπολογίστηκε στους 53°C.

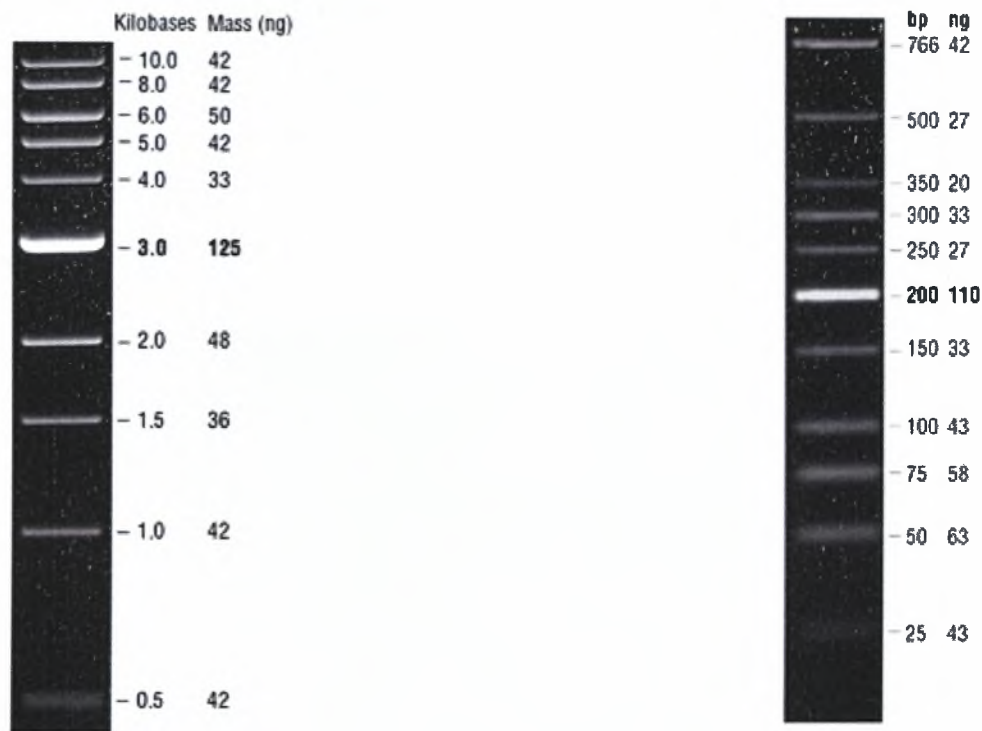
Οι συνθήκες της PCR όταν χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος **TconfA- TconfB** ήταν οι εξής : 94°C ,2min για τον πρώτο κύκλο, 94°C 10sec ,53°C 20sec, 72°C 2min, 72°C 10min . Οι αλληλουχίες των εκκινητών δίνονται από τον πίνακα παρακάτω.

Ζεύγος primers	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ	ΒΑΣΕΙΣ
T.Confusum TconfA	5' GTGTATCTACACACACACAC 3'	20b
T.Confusum TconfB	3' GAACCGCCAATATTGAGTTG 5'	20b

2.4 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Τα προϊόντα που πήραμε από την διαδικασία της PCR, αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% σε διάλυμα 5x TBE (54 gr Tris base, 27.5 gr βορικού αξέος, 20ml 0.5 M EDTA, pH: 8.0) με τη χρήση συσκευής οριζόντιας ηλεκτροφόρησης.

Οι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι 1Kb DNA και LMW : low molecular weight DNA δείκτη της εταιρίας New England Biolabs (NEB) που αποτελείται από τμήματα DNA 50 βάσεις, 75 βάσεις κλπ.



Εικ. 13. 1 kb DNA Ladder visualized by ethidium bromide staining on a 0.8% TBE agarose gel. Mass values are for 0.5 µg/lane. Size range: 500- 10,002 bp . **Εικ.14.** LMW DNA Ladder visualized by ethidium bromide staining on a 1.8% TBE agarose gel. Mass values are for 0.5 µg/lane. Size range : 25-766 bp

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. DNA extraction-PCR από *Tribolium confusum*

Τα άντομα εκκολάφθηκαν σε ιδανικές συνθήκες στο εργαστήριο με σκοπό την χρήση τους. Για το πείραμα αυτό χρειάστηκαν 10 έντομα που ζυγίζουν 0,0125gr και αφού αλέσθηκαν με την διαδικασία του υγρού αζώτου για DNA extraction ,μεταφέρθηκαν σε 600µl CTAB. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας και την μέτρηση της καθαρότητας του δείγματος στο φασματοφωτόμετρο, έγινε και η μέτρηση της ποσότητας του DNA του.

Καθαρότητα: 2.092 , Ποσότητα DNA : 400ng/μl

Το πείραμα ολοκληρώθηκε με αραιώσεις που έγιναν από το αρχικό δείγμα του DNA του εντόμου με τις παρακάτω αναλογίες 1/10, 1/100, 1/1000 (1μl DNA + 9μl H₂O) και μεταφέρθηκε για την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και τέλος την φωτογράφιση της πηκτής.

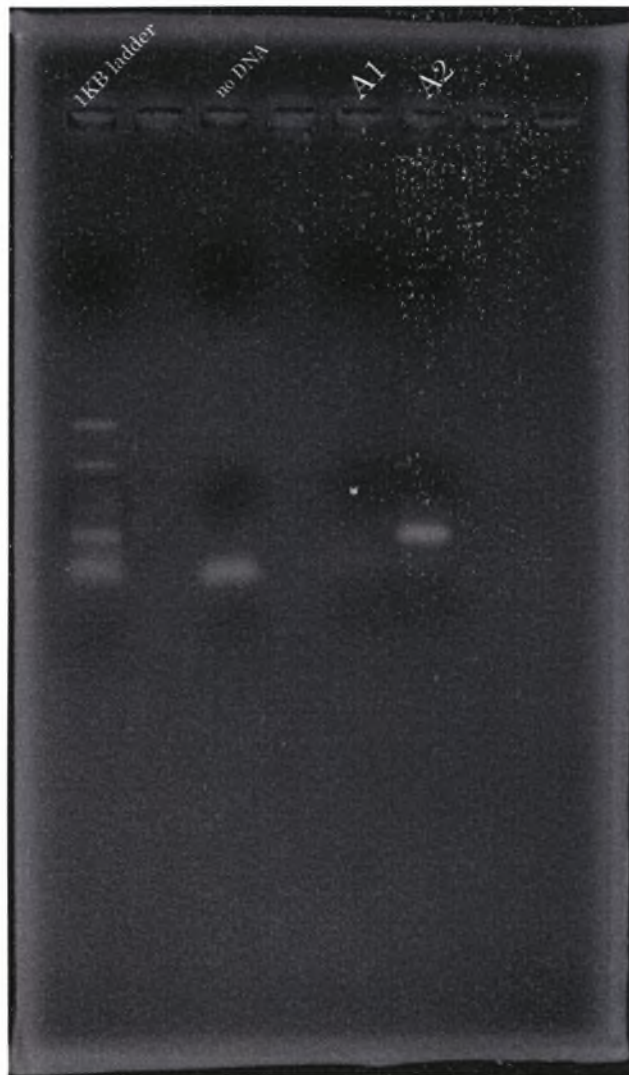


Εικ 15: αποτελέσματα φωτογράφισης της πηκτής με τις ανάλογες θέσεις δειγμάτων: marker 1kb ladder , κενή θέση, θέση χωρίς DNA , 1/1 , 1/10 , 1/100 , 1/1000

3.2 . DNA extraction από βιολογικά cornflakes(A1) και αλεύρι επιμολυσμένο τεχνητά με τμήματα εντόμου *T.confusum*(A2).

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση του γενετικού υλικού από είδος cornflakes που υπάρχουν στο εμπόριο και από αλεύρι τεχνητής επιμόλυνσης με διάφορα τμήματα εντόμου *T. confusum*.

	ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑ	DNA ng/μl
A1(cornflakes)	1.79	26.7
A2(fragments in wheat)	1.98	23.8



Εικ 16: Θέσεις δειγμάτων : 1kb ladder , κενή θέση, no dna , κενή θέση, A1 , A2

3.3. Έλεγχος διαφόρων δειγμάτων για misspriming

Πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος για misspriming στην πηκτική αγαρόζης, πάνω σε διάφορα είδη.

Δείγματα:

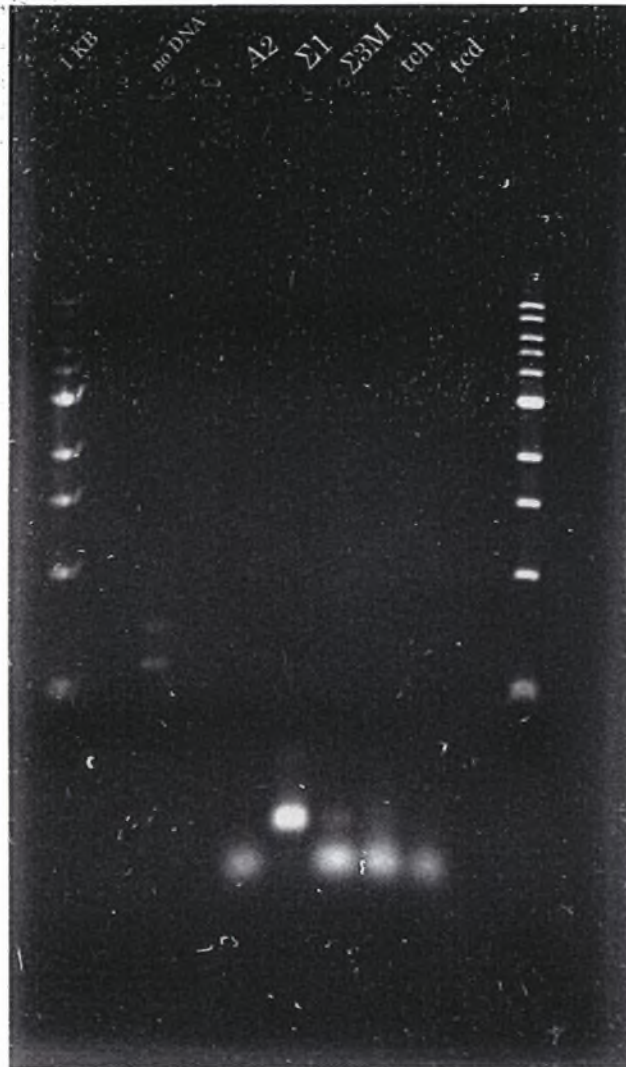
Αλεύρι (A2)

Σκληρό σιτάρι (Σ1)

Μαλακό σιτάρι (Σ3M)

T. Confusum + HPLC WATER

T. Confusum + DEPC WATER



Εικ 17: θέσεις δειγμάτων: 1KB ladder , κενή θέση, θέση χωρίς dna , κενή θέση , A2 , Σ1 , Σ3M , tch , ted

3.4 Ποσοστά από μίγμα εντόμων *T.confusum* 1%, 0.1%, 0.01%.

Πραγματοποιήθηκε η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων από τη χρήση της μεθόδου με αυτή του (et. Al. White 2007).

Μέθοδος δημιουργίας μιγμάτων:

Από 0.5gr αλεύρι έγινε DNA extraction σε 4ml CTAB

+

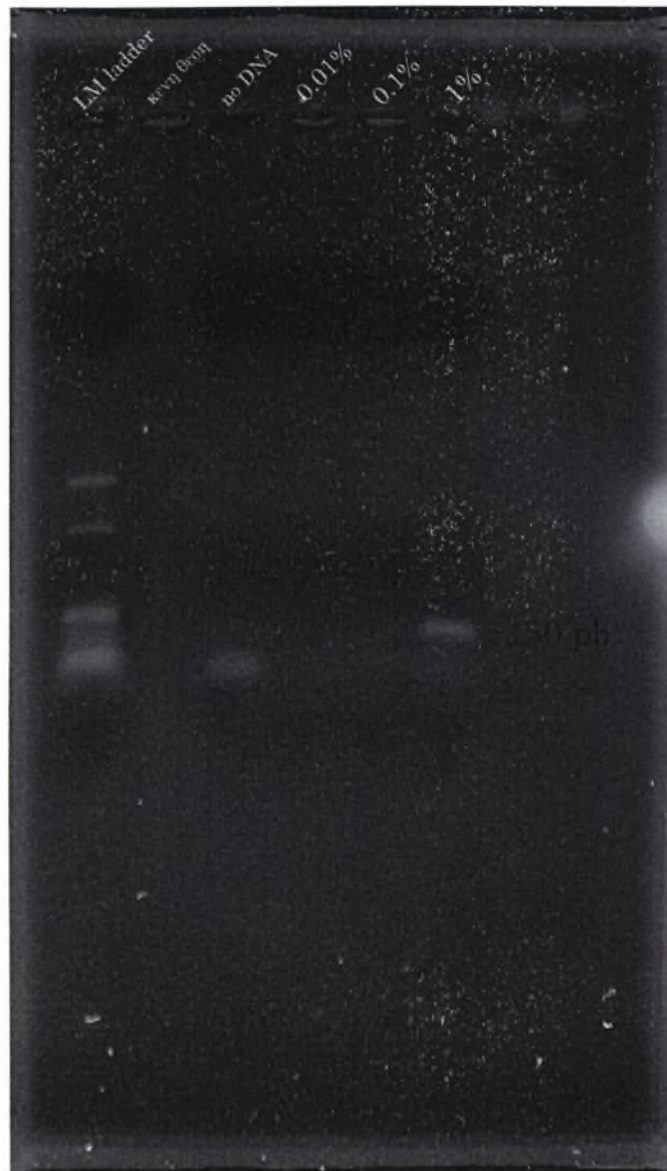
Από 10 έντομα *T.confusum* DNA extraction σε 600μl CTAB

= 4ml αλεύρι + 120μl έντομα για το 1%

= 4ml αλεύρι + 12μl έντομα για το 0.1%

= 4ml αλεύρι + 1.2μl έντομα για το 0.01%

	ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑ	DNA ng/μl
0.01%	1.35	46
0.1%	1.39	46
1%	1.32	33



Εικ 18: Θέσεις δειγμάτων :LM ladder, κενή θέση, θέση χωρίς dna , 00.1% , 0.1% , 1%

3.5. Έλεγχος τυχαίων δειγμάτων συσκευασμένου αλεύρου εμπορίου

Ελέγχθηκαν 8 δείγματα από συμβατικά άλευρα γνωστής εταιρίας που κυκλοφορούν στο εμπόριο με την αναπτυσσόμενη μέθοδο και αξιολογήθηκαν τα αποτελέσματά τους.

Δείγματα:

ΜΑΓ1 (αλεύρι ολικής πετρόμυλου για μαύρο ψωμί ολικής αλέσεως)

ΜΑΓ2 (αλεύρι μαλακό)

ΜΑΓ3 (smart mix έτοιμο μείγμα για ψωμί)

ΜΑΓ4 (αλεύρι ζυμωτό για παραδοσιακό ψωμί και πίτες)

ΜΑΓ5 (βιολογικό αλεύρι για όλες τις χρήσεις)

ΜΑΓ6 (φαριν απ)

ΜΑΓ7 (αλεύρι καλαμποκιού ιδανικό για ψωμί καλαμποκιού)

ΜΑΓ8 (αλεύρι για όλες τις χρήσεις)

	ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑ	DNA ng/μl
ΜΑΓ1	1.88	115
ΜΑΓ2	1.79	70
ΜΑΓ3	2.7	109
ΜΑΓ4	2.1	74
ΜΑΓ5	1.96	59
ΜΑΓ6	2.3	28
ΜΑΓ7	2.0	56
ΜΑΓ8	1.31	63



Εικ 19: Θέσεις δειγμάτων :LM ladder, θέση χωρίς dna , 1/10, 1/100, ΜΑΓ1, ΜΑΓ2, ΜΑΓ3, ΜΑΓ4, ΜΑΓ5, ΜΑΓ6, ΜΑΓ7, ΜΑΓ8

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η απλή PCR εξορισμού δεν μπορεί να δώσει αποτελέσματα για ποσότητα DNA. Με την μέθοδο αυτή, χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους εκκινητές ήταν δυνατόν να ανιχνευθεί η παρουσία DNA εντόμου σε άλευρα και συγκεκριμένα του *T.confusum*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται είναι εξειδικευμένοι και μπορούν να αναγνωρίσουν μοναδικά το είδος αυτό (White 2007). Η απόσταση των περιοχών που υβριδίζουν είναι περίπου στις 150 βάσεις.

Στο πείραμα αυτό, έγινε η ανίχνευση DNA εντόμου αραιωμένο έως και 10 φορές, ενώ δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση τους σε αραιώση έως 100 φορές. Δεδομένου ότι τα έντομα ζύγιζαν 0,0125 gr και η συγκέντρωση του DNA ήταν 400 ng/μl συμπεραίνουμε ότι μπορούμε να ανιχνεύσουμε έως και σε πολύ μικρή ποσότητα 23.8 ng/μl. Σε αντίθεση με άλλες μεθόδους οι οποίες δεν μας δίνουν μόνο την απλή ανίχνευση του εντόμου αλλά και την ποσοτικοποίηση του ή ακόμα και τον προσδιορισμό του είδους του εντόμου της προσβολής εάν αυτό δεν είναι γνωστό όπως η NIR (Dowell et al.. 1999) και η LFM (P.Trematerra et all.. 2011) αντίστοιχα.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα, αν και αποτελεσματική δεν μπορεί να μας δώσει αξιόλογα αποτελέσματα για την ποσότητα της προσβολής μέσα στο άλευρο. Πιθανώς, μια άλλη διαδικασία όπως η q-PCR, να μας δώσει την ακριβή ποσοτικοποίηση του εντόμου αυτού. Η ποσότητα θα παίζει σημαντικό ρόλο ως προς την ακαταλληλότητα του προϊόντος και τη διάθεσή του στην αγορά. Η q-PCR, από τα στοιχεία της βιβλιογραφίας είναι πιο ευαίσθητη στην ανίχνευση γενετικού υλικού εντόμου στόχου από την απλή PCR. Επομένως μελλοντικά θα μπορούσε να συνεχιστεί η έρευνα για την ανίχνευση του DNA του *T.confusum* με τη βοήθεια της συγκεκριμένης μεθόδου.

Ακόμα, η μέθοδος της απλής PCR φάνηκε να είναι αρκετά ευέλικτη όσον αφορά την καθαρότητα του DNA που χρησιμοποιήθηκε. Συγκεκριμένα, DNA με χαμηλή καθαρότητα (1.32 μονάδες), έδειξαν θετική ένδειξη όταν το μέγιστο βρίσκεται μεταξύ 1.8-2.0 (Maniatis et. Al.).

Τέλος, μετά από την επεξεργασία 8 δειγμάτων αλεύρων που κυκλοφορούν στην αγορά, διαπιστώθηκε ότι απαιτείται η δοκιμή της μεθόδου σε περισσότερα προϊόντα του

εμπορίου ώστε να διεξαχθεί μια επιστημονικά αποδεκτή επισκόπηση των αλεύρων που κυκλοφορούν στην ελληνική αγορά και να διαπιστωθεί εάν τηρείται ο κανονισμός του αμερικάνικου οργανισμού τροφίμων και φαρμάκων (FDA), σύμφωνα με τον οποίο σε 50gr άλευρου πρέπει να υπάρχουν το ανώτερο 75 τμήματα εντόμου.

Με αυτόν τον τρόπο, θα αξιολογηθεί σε ποιο επίπεδο εμφανίζεται η προσβολή των εντόμων στα αποθηκευμένα προϊόντα, σε ποιες περιπτώσεις αποθήκευσης, κάτω από ποιες συνθήκες επεξεργασίας και συντήρησης του προϊόντος και σε ποια είδη αλεύρων εμφανίζεται μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης του εντόμου εχθρού. Με τα παραπάνω, μπορεί να γίνει γνωστό το μέγεθος του προβλήματος που μπορεί να προκληθεί από το επίπεδο της προσβολής, να βρεθεί κατάλληλη μέθοδος πρόληψής του , και έτσι να αυξηθεί η ποιότητα των προϊόντων που καταναλώνονται πιο συχνά, αλλά επιπλέον να αυξηθεί και το κέρδος του παραγωγού και του διαχειριστή του προϊόντος.

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε βρίσκεται ακόμα σε πρωταρχικό στάδιο και χρειάζεται μεγαλύτερη και περαιτέρω επεξεργασία και ανάλυση και ίσως και μικρές μετατροπές ως προς τη διαδικασία εφαρμογής για καλύτερα αποτελέσματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

Athur F.H., (1996). Grain protectans: Current status and prospects for the future. *J. Stored Prod. Res.*, 32: 293-302.

Arthur, F.H., (1992). Recidual efficacy of chlorpyriphos methyl + bioresmethrin and chlorpyriphos methyl + resmethrin for controlling lesser grain borers (Coleoptera: Bostrychidae), rice weevils (Coleoptera: Curculionidae) in stored wheat. *J. Econ. Entomol.* 85: 570-575.

Athanasiou, C.G., N.G. Kvallieratos, J.B. Tsakiri, S.N. Xyrafidis and B.J. Vayias, (2006). Effect of temperature and Humidity on Insctidical Effect of SilicoSec against *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) Lrvae. *J. Econ. Entomol.* 99: 1520-1524.

Athanasiou, C.G., B.J. Vayias, C.B. Dimizas, N.G. Kavalieratos, A.S. Papagregoriou and C. Th. Buchelos, (2004). Insecticidal efficacy of diatomaceous earth against *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium confusum* Jacquelin du Val (Coleoptera: Tenebrionidae) on stored wheat: influence of dose rate, temperature and exposure interval. *J. Stored Prod. Res.* 41: 47-55.

Phillips, T. W., Cogan, P. M., and H. Y. Fadamino, (2000). Pheromones. Bh. Subramanyam, and D. W. Hagstrum, *Alternativies to Pesticides in Stored Products IPM*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 273-307.

Chittenden, F. H. (1896). Insects affecting cereals and other dry vegetable foods. Chapter 8, in *The principal household insects of the United states*. U.S. Dept. Agr. Div. Ent. Bull. (n.s.), 4 : 112-131.

Evans, N.J.(1985). The effectiveness of various insecticides on some resistant beetle pests of stored products from Uganda. *J. Stored Prod. Res.* 21: 105-109.

Oberlander , H., D. L., Silhaek, E. Shayya and Isyya, I., (1997). Current status and future perspectives of the use of insect growth regulators for the control of stored product insects. *Journal of Stored Products Pest. Research* Volume 33 No 1: 1-6.

Chittenden, F. H. (1897). Some insects injurious to stored grain. U.S. Dept. Agr. Div. Ent. Bull. (n.s.), 45 : 11-12.

K. Nowaczyk, A. Obrepalska-Stepiowska, M. Gawlak, J. E. Throne, P. Olejarski, J. Nawrot (2009). Molecular techniques for detection of *Tribolium confusum* infestations in stored products. *J. Econ. Entomol.* 102(4): 1691-1695.

Park Thomas 1934. Observations on the general biology of the flour beetle *Tribolium confusum*. *Quarterly Review of Biology*, Volume 9, Issue 1, 3: 36-54.

A. Balasubramanian, D. S. Jayas, W.G.D. Fernando, G. Li and N.D.G. White (2007). Sensitivity analysis of DNA fingerprinting technique for detecting insect fragments in wheat flour. *Canadian Biosystems Engineering*, 49: 41-45.

G.S. Shephard, G. Thiel, S. Stockenstrom, E.W. Sydenham, J. (1996). *AOAC Int.* 79: 671.

Fields, P. G. (1992). The control of stored products insects and mites with extreme temperatures, *J. Stored Prod. Res.*, 28:89-118.

Jay, E. G., R. T. Arbocast and G.C. Pearman, (1971). Relative humidity: its importance in the control of stored products insects with modified atmospheric gas concentrations. *J. Stored Prod. Res.* 7:325-329.

JECFA Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 53rd Report, 2000. Safety evaluation of certain food additives. WHO Food Additives. Series 44.

J. Perez-Mendoza, J.E.Throne, F.E.Dowell, J.E. Baker, (2003). Detection of insect fragments in wheat flour by near-infrared spectroscopy. *Journal of stored products research.* 39: 305-312.

Frank A. Quinn, Wendell Burkholder, G. Barrie Kitto, (1992). Immunological technique for measuring insect contamination of grain. Journal of economic entomology, 85(4): 1463-1470.

P.Trematerra, V. Stejskal, J.Hubert , (2011). The monitoring of semolina contamination by insect fragments using the light filth method in an Italian mill. Food control. 22: 1021-1026.

K. Bhuvanewari, Paul. G. Fields, Noel D.G.White, Ashok K. Sarkar, Chandra. B. Singth, Digvir S. Jayas , (2011). Image analysis for detecting insect fragments in semolina. Journal of stored products research. 47: 20-24.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Μίνως Ε. Τζανακάκης 1995. ENTOMΟΛΟΓΙΑ. University studio press.

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ

Σύνδεσμος Ελλήνων Αλευροβιομηχάνων 2008. Οδηγός ορθής πρακτικής για την αλευροβιομηχανία. Αθήνα

Η ΟΔΗΓΙΑ 96/61/ΕΚ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗ ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΡΥΠΑΝΣΗΣ (IPPC) ΚΑΙ ΟΙ ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΙΣ ΒΕΛΤΙΣΤΕΣ ΔΙΑΘΕΣΙΜΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΑΘΗΝΑ 2001

ΠΤΥΧΙΑΚΕΣ-ΔΙΑΤΡΙΒΕΣ

Παπαδάκη- Μπουρναζάκη Μαρία, Αθανασιάδης Χρήστο. Έντομα αποθηκών και μέθοδοι αντιμετώπισής τους. Α.Τ.Ε.Ι. ΚΡΗΤΗΣ ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ, Ηράκλειο , Ιούνιος 2007

Αειβαδάρας Ιωάννης, Πλατύραγχος Αντώνιος. Διατροφικές προτιμήσεις του *Tribolium* sp. σε τρεις διαφορετικούς ξενιστές σε συνθήκες εργαστηρίου. Α.Τ.Ε.Ι. ΚΡΗΤΗΣ ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ, Ηράκλειο, Σεπτέμβριος 2010

Αθανασίου Γ. Χρήστος. Αξιολόγηση διαφόρων εντομοκτόνων για την αντιμετώπιση του *Ephestia kuhniella* και του *Prostephanus truncatus* σε αποθηκευμένα δημητριακά. ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ, ΑΘΗΝΑ 2011

Μαρία Μπουκουβάλα. Μελέτη της εντομοκτόνου δράσεως του chlorantraniliprole κατά των *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera : Bostrychidae), *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera : Tenebrionidae), *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), *Liposcelis bostrychophylla* Badonnel (Psocoptera: Liposcelididae): Επίδραση της δόσεως , του διαστήματος εκθέσεως και του είδους δημητριακού. ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΙΩΑΝΝΙΝΑ, ΜΑΡΤΙΟΣ 2013

Νεκτάριος Αποστολόπουλος. Μελέτη της επίδρασης των φυσικοχημικών παραμέτρων ανάπτυξης της μυκοτοξίνης Ζεαραλενονης (ZON) σε δημητριακά. ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ, ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΠΑΤΡΑ 2011

ΕΙΚΟΝΕΣ: www.google.com



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



004000118522

