



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Παραδοτέο έργου Π1.2. Έκθεση-κατηγοριοποίηση των κυριότερων ευρεθέντων ειδών,
και εκτροφή τους σε εργαστηριακές συνθήκες

Τύπος: Έκθεση

Υπο-παραδοτέο Π1.2.3. «Σχεδιασμός των βέλτιστων πρακτικών εκτροφής των ειδών
εντόμων και μυκήτων»



DiatomiteThem

DiatomiteThem

Τίτλος Έργου:

**Προστασία των αποθηκευμένων δημητριακών με τη
χρήση γης διατόμων**

«Το έργο αυτό υλοποιείται στο πλαίσιο της Δράσης ΕΡΕΥΝΩ-ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ-ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ και συγχρηματοδοτήθηκε από το Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης (ΕΤΠΑ) της Ευρωπαϊκής Ένωσης και εθνικούς πόρους μέσω του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα & Καινοτομία (ΕΠΑνΕΚ) (κωδικός έργου: Τ2ΕΔΚ-03532)»



ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΤΑΜΕΙΟ
ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

ΕΠΑνΕΚ 2014-2020
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Έντομα	3
2. Μύκητες	15
3. Βιβλιογραφία	29



1. Έντομα

Πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφική ανασκόπηση των συνθηκών και μεθόδων εκτροφής (θερμοκρασία, υγρασία, υπόστρωμα εκτροφής κα.) πάντα με γνώμονα το γένος - είδος του εκάστοτε εντόμου με σκοπό τον σχεδιασμό των βέλτιστων πρακτικών εκτροφής αυτών. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η μετέπειτα εκτροφή των ειδών πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά για κάθε είδος εντόμου και αποθήκης, έχοντας δηλαδή ξεχωριστές εκτροφές του ίδιου είδους το οποίο όμως συλλέχθηκε από διαφορετικούς αποθηκευτικούς χώρους. Το ίδιο έγινε και με τα συλλεχθέντα δείγματα σπόρων (διαφορετικά δείγματα ανά αποθήκη) (Εικ. 1), τα οποία τοποθετήθηκαν σε ειδικούς θαλάμους ελεγχόμενων συνθηκών του Εργαστηρίου Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας (ΕΕΓΖ) του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και παρατηρούνταν σε τακτά χρονικά διαστήματα, με σκοπό την συλλογή τυχόν απογόνων των εντόμων. Τα έντομα που εξέρχονταν αναγνωρίζονταν ανά είδος, καταγράφονταν και εκτρέφονταν σε ξεχωριστά βάζα εκτροφών ανά είδος και αποθήκη συλλογής.

Ο προσδιορισμός των διαφόρων ειδών έλαβε χώρα με βάση την κριτική επισκόπηση της σχετικής βιβλιογραφίας, ως προς τις κλειδές προσδιορισμού (Gorham, 1987). Όπου κρίθηκε αναγκαίο, άτομα των υπό εξέταση πληθυσμών και ειδών συγκρίθηκαν με άτομα από αντίστοιχες συλλογές αναφοράς του ΕΕΓΖ, τα οποία έχουν προσδιοριστεί και χρησιμοποιούνται ως «πρότυπα» άτομα ως προς τα μορφολογικά χαρακτηριστικά εντόμων αποθηκευμένων γεωργικών προϊόντων και τροφίμων.



Εικόνα 1: Βάζα εκτροφών εντόμων ανά είδος και αποθήκη συλλογής. (Πηγή: Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας)

Κατά γενικό κανόνα πρέπει πάντα να λαμβάνεται υπόψη ότι όλα τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται στις εκτροφές παραλαμβάνονται από ειδικά πρατήρια σπόρων και μόνο έπειτα από συνεννόηση-παραγγελία με το Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας. Σκοπός είναι η διασφάλιση της παραλαβής και χρήσης προϊόντων-υποστρωμάτων με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, όπως αναφέρονται παρακάτω. Ειδικότερα, τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για τις εργαστηριακές εκτροφές θα πρέπει να είναι καθαρά από έντομα και παθογόνα, να τηρείται συγκεκριμένο πρωτόκολλο αποθήκευσης ή να μην έχουν αποθηκευτεί για μεγάλο χρονικό διάστημα (δεδομένου ότι υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να έχουν επιμολυνθεί με έντομα ή παθογόνα ή να έχουν αλλοιωθεί τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους εξαιτίας λανθασμένων πρακτικών αποθήκευσης), δεν θα πρέπει να έχει γίνει εφαρμογή εντομοκτόνων και άλλων



προστατευτικών προϊόντων (μυκητοκτόνα, ζιζανιοκτόνα κ.α.), να είναι καθαρά από ξένες ύλες και να είναι γνωστό το είδος-υβρίδιο/ποικιλία των πρωτογενών υλών, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση χρήσης δημητριακών. Παράλληλα, θα πρέπει να υπάρχει η δυνατότητα της συνεχούς προμήθειας τέτοιων προϊόντων με δεδομένα τα παραπάνω χαρακτηριστικά καθ' όλη την διάρκεια του χρόνου. Έπειτα την παραλαβή τους από το Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας, όλα τα υποστρώματα τοποθετούνται για τουλάχιστον επτά ημέρες στους -20°C , για την θανάτωση τυχόν εντόμων που βρίσκονται στο προϊόν. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα σε ειδικά ψυκτικά μηχανήματα στο ΕΕΓΖ, στα οποία υπάρχει η δυνατότητα ρύθμισης σταθερής θερμοκρασίας (Crystal S.A., Nea Santa 611 00, Greece) (Εικ. 2). Για την μετέπειτα αποθήκευση στο εργαστήριο, τα υποστρώματα κρατούνται σε θερμοκρασία 5°C , σε ειδικούς θαλάμους και μακριά από οσμές, υγρασία ή σκευάσματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων ή άλλων χημικών (π.χ. καθαριστικά) (Εικ. 3). Σε κάθε περίπτωση, το χρονικό διάστημα αποθήκευσης στο εργαστήριο δεν θα πρέπει να ξεπερνάει τους έξι μήνες. Για την χρήση τους στις εκτροφές, τα υποστρώματα αφήνονται για δυο ημέρες σε συνθήκες δωματίου, με σκοπό την «απόψυξη», η οποία απαιτείται για την έναρξη της διαδικασίας.



Εικόνα 2: Ψύξη υποστρωμάτων για τουλάχιστον 1 εβδομάδα στους -20°C , για την θανάτωση τυχόν εντόμων που βρίσκονται στο προϊόν (Πηγή: Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας)



Εικόνα 3: Ειδικοί θάλαμοι αποθήκευσης των υποστρωμάτων σε θερμοκρασία 5°C (Πηγή: Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας)

Όσον αφορά τα δοχεία που χρησιμοποιήθηκαν για τις εκτροφές των κολεοπτέρων είναι απαραίτητο να είναι γυάλινα (Εικ. 4) για την καλύτερη απολύμανση αυτών και να υπάρχει αντίστοιχο καπάκι που να κουμπώνει καλά, χωρίς να αφήνει περιθώρια εισόδου-εξόδου εντόμων ή ακάρεων. Ταυτόχρονα, το καπάκι φέρει σύστημα εξαερισμού (οπή στο κέντρο και τοποθέτηση μεταλλικής σίτας μικρής διατομής) για τον σωστό και επαρκή αερισμό της εκτροφής. Η σίτα προσαρμόζεται στο καπάκι με ηλεκτροκόλληση, και στεγανοποιείται περαιτέρω με σιλικόνη, αν κριθεί αναγκαίο (Εικ. 5).

Στην περίπτωση των εκτροφών ακάρεων και ψωκόπττερων, διηθητικό χαρτί τοποθετείται με χρήση κόλας στην άνω πλευρά του βάζου, για να μην υπάρχουν άτομα που εξέρχονται του βάζου (Εικ. 6). Στην περίπτωση της εκτροφής λεπιδοπτέρων, οι εκτροφές διατηρούνται σε οριζόντια πλαστικά δοχεία με αντίστοιχα καπάκια με σίτα, με επαρκή χώρο για την πτήση των ακμαίων στον υπερκείμενο του υποστρώματος χώρο (Εικ. 7).



Εικόνα 4: Γυάλινα δοχεία για τις εκτροφές των κολεοπτέρων, των ακάρεων και των ψωκόπτρων (Πηγή: Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας)



Εικόνα 5: Ειδικά σχεδιασμένο καπάκι με μεταλλική σίτα για τις εργαστηριακές εκτροφές κολεοπτέρων (Πηγή: Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας)



Εικόνα 6: Εργαστηριακές εκτροφές ακάρεων και ψωκόπτερων (αριστερά) και χρήση διηθητικού χαρτιού για την αποφυγή εξόδου των ακμαίων από το δοχείο εκτροφής (Πηγή: Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας)



Εικόνα 7: Εργαστηριακές εκτροφές λεπιδοπτέρων σε πλαστικά δοχεία (Πηγή: Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας)

Σε καμία περίπτωση δεν θα πρέπει στα δοχεία εκτροφών να έχει πρωτίστως χρησιμοποιηθεί για πειραματισμό ή να έχει τοποθετηθεί προϊόν στο οποίο έχει εφαρμοστεί κάποιο φυτοπροστατευτικό προϊόν (εντομοκτόνο, μυκητοκτόνο, ζιζανιοκτόνο κ.α.). Πριν την εισαγωγή του υποστρώματος εκτροφής, τα γυάλινα δοχεία καθαρίστηκαν-πλυθήκαν επιμελώς και τοποθετήθηκαν για 3 ώρες στους 100°C για λόγους απολύμανσης (Εικ. 8).

Για την αποφυγή εξόδου των εντόμων-ακάρων-ψωκόπτρων από τα δοχεία εκτροφής, έπειτα τον καθαρισμό και την εξαγωγή των γυάλινων δοχείων από τον φούρνο, εφαρμόζεται εσωτερικά του «λαιμού» αυτών ειδικό σκεύασμα, το λεγόμενο fluon (polytetrafluoroethylene, Northern Products, Woonsocket, RI) με χρήση μπατονέτας (Εικ. 9). Με αυτό τον τρόπο, στην περίπτωση όπου ακμαία ή προνύμφες 'σκαρφαλώσουν' μέχρι τον λαιμό του δοχείου, θα γλιστράνε στην περιοχή όπου έχει εφαρμοστεί το σκεύασμα, δυσχεραίνοντας την κίνησή τους προς το καπάκι του δοχείου και άρα την πιθανή εξαγωγή τους από αυτό.

Για κάθε ομάδα ειδών χρησιμοποιούνται και βάζα με διαφορετικά χαρακτηριστικά. Έτσι, για την εκτροφή των κολεοπτέρων χρησιμοποιούνται γυάλινα βάζα του ενός λίτρου, ενώ για



τα ακάρεα και τα ψυκόπτερα χρησιμοποιούνται γυάλινα βάζα του μισού λίτρου (Bormioli Rocco, Fidenza, Italy) (Εικ. 4). Για τα λεπιδόπτερα χρησιμοποιούνται πλαστικά δοχεία των 24 λίτρων (48 εκ. μήκος x 28 εκ. πλάτος 10 εκ. ύψος, Bora Plastik SAN.VE TIC.A.S., Petrol Ofisi Cad. Istanbul, Turkey) (Εικ. 7). Για την εκτροφή του *Tenebrio molitor*, χρησιμοποιούνται τα ίδια δοχεία εκτροφής με τα λεπιδόπτερα. Η διαδικασία προετοιμασίας των βάζων λαμβάνει χώρα σε τακτά χρονικά διαστήματα, για να υπάρχει συνεχής διαθεσιμότητα.



Εικόνα 8: Τοποθέτηση δοχείων για απολύμανση (Πηγή: Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας)



Εικόνα 9: Εφαρμογή polytetrafluoroethylene με χρήση μπατονέτας στον λαιμό του δοχείου (Πηγή: Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας)

Όλες οι εκτροφές τοποθετούνται σε ειδικούς θαλάμους ελεγχόμενων συνθηκών θερμοκρασίας, υγρασίας και φωτοπεριόδου (όπου απαιτείται), ανάλογα με τις απαιτήσεις του εκάστοτε είδους (Εικ. 10). Πριν την τοποθέτηση των καινούριων εκτροφών γίνεται ενδελεχής καθαρισμός όλων των χώρων. Η καθαριότητα πραγματοποιείται για την διασφάλιση της απουσίας εντόμων, ακάρεων, ψωκόπτρων ή παθογόνων που τυχόν υπάρχουν στους χώρους από προηγούμενες εκτροφές και δύναται να επιμολύνουν τις καινούριες εκτροφές. Η καθαριότητα γίνεται μόνο με καθαρή αιθυλική αλκοόλη (Εικ. 12). Στην περίπτωση των εκτροφών των ακάρεων και των ψωκόπτρων, τα γυάλινα βάζα δεν τοποθετούνται απευθείας πάνω στα ράφια, αλλά σε δοχεία γεμισμένα με γλυκερίνη (Εικ. 13). Σκοπός είναι να αποφευχθεί η μετακίνηση ατόμων σε άλλες εκτροφές ή στον χώρο, σε περίπτωση που καταφέρουν να εξέλθουν του βάζου εκτροφής τους.

Όλοι οι θάλαμοι ελέγχονται σε καθημερινή βάση για την σωστή λειτουργία τους. Ειδικά μηχανήματα (Onset Computer Corporation, 470 MacArthur Blvd. Bourne, MA 02532) χρησιμοποιούνται επίσης για την καταγραφή τόσο των διακυμάνσεων όσο και τυχόν αποκλίσεων στις συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας σε διάφορα σημεία των χώρων όπου βρίσκονται οι εκτροφές (Εικ. 11). Ομοίως, στους θαλάμους υπάρχουν και ειδικοί αισθητήρες, οι οποίοι παρέχουν σε πραγματικό χρόνο τις συνθήκες θερμοκρασίας και



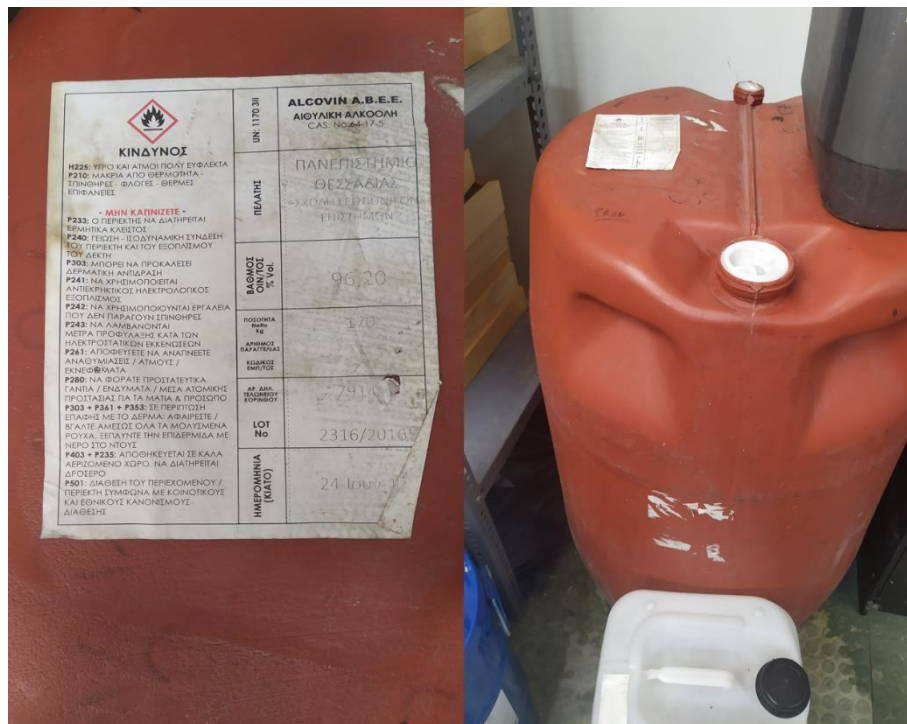
σχετικής υγρασίας και προειδοποιούν μέσω εφαρμογής (app) για τυχόν σημαντικές αποκλίσεις.



Εικόνα 10: Ειδικόι θάλαμοι ελεγχόμενων συνθηκών θερμοκρασίας, υγρασίας και φωτοπεριόδου (Πηγή: Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας)



Εικόνα 11: Ειδικά μηχανήματα για την καταγραφή των διακυμάνσεων και τυχόν αποκλίσεων των συνθηκών θερμοκρασίας και υγρασίας (Πηγή: Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας)



Εικόνα 12: Αιθυλική αλκοόλη για την καθαριότητα των χώρων πριν την τοποθέτηση των εργαστηριακών εκτροφών (Πηγή: Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας)



Εικόνα 13: Τοποθέτηση των εκτροφών των ακάρεων και των ψυκόπτερων σε δοχεία γεμισμένα με γλυκερίνη (Πηγή: Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας)



Μόνο ακμαία άτομα των ειδών που αναγνωρίστηκαν από τις δειγματοληψίες χρησιμοποιήθηκαν για τις εκτροφές. Τα ακμαία τοποθετούνταν στα εκάστοτε βάζα εκτροφών και με το πέρας δυο εβδομάδων αφαιρούνταν με χρήση κόσκινων με σπές συγκεκριμένης διαμέτρου (Endecotts Ltd, London SW19 3UP, England). Τα βάζα μαζί με το υπόστρωμα εκτροφής τοποθετούνταν πάλι στους ίδιους θαλάμους και ελέγχονταν τακτικά για την εμφάνιση των απογόνων. Το διάστημα αναμονής για την παραγωγή των απογόνων ήταν αντίστοιχο, με πολύ μικρές αποκλίσεις, για όλα τα είδη. Στην περίπτωση που τα ακμαία (απόγονοι) δεν χρησιμοποιούνταν για την διεξαγωγή πειραμάτων, απομακρύνονταν από το βάζο και τοποθετούνταν σε καινούριο βάζο με υπόστρωμα για την παραγωγή καινούριων απογόνων. Με αυτή την διαδικασία διασφαλίστηκε ότι όλα τα ακμαία που χρησιμοποιήθηκαν στις βιοδοκιμές ήταν νεαρά και παρόμοιας ηλικίας (όχι πάνω από δυο εβδομάδες).

Για την επιλογή των βέλτιστων υποστρωμάτων καθώς και των βέλτιστων συνθηκών εκτροφής των εντόμων, ακάρεων, ψωκόπτρων και μυκήτων, πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφική επισκόπηση με σκοπό τον σχεδιασμό των βέλτιστων πρακτικών εκτροφής πάντα με γνώμονα το γένος - είδος του εκάστοτε οργανισμού, όπως παρατίθεται στον Πίνακα 1.

Τα διάφορα προϊόντα αντιστοιχούν στις εκάστοτε βέλτιστες τροφικές προτιμήσεις των υπό εκτροφή ειδών, ποικίλλοντας από ολόκληρους σπόρους δημητριακών και οσπρίων για τα πρωτεύοντα είδη, ως επεξεργασμένα προϊόντα για τα δευτερεύοντα είδη. Ομοίως, όπου απαιτήθηκε, τοποθετήθηκαν και διάφορα πρόσθετα, όπως μαγιά μύρας κτλ., που ευνοούν περαιτέρω την πληθυσμιακή ανάπτυξη ορισμένων ειδών. Να σημειωθεί ότι η βελτιστοποίηση των συνθηκών για τις εκτροφές είναι μια διαδικασία η οποία διήρκεσε αρκετά χρόνια ως την οριστικοποίησή της στο ΕΕΓΖ, και σήμερα αποτελεί ένα παγκοσμίως αποδεκτό πρωτόκολλο εκτροφής σε μεγάλο αριθμό μονάδων του εξωτερικού, πέραν δηλ. του ΕΕΓΖ.

**Πίνακας 1:** Βέλτιστες πρακτικές εκτροφής των συλληφθέντων εντόμων – ακάρεων με βάση την βιβλιογραφία.

Παράγοντες	Βέλτιστο υπόστρωμα εκτροφής	Υποστρ. (γρ) / δοχείο	Ακμαία / δοχείο εκτροφής	Θερμοκρασία (°C)	Σχετ. Υγρ. (%)	Κόσκινα (mm)	Περίοδος (ημέρες) για F ₁ ακμαία
<i>Rhyzopertha dominica</i>	Ολόκληροι σπόροι μαλακού σιταριού	380	600	32 ± 2	55 ± 2	1.0	49-56
	Ξηρή μαγιά	5					
<i>Acanthoscelides obtectus</i>	Φασόλια (αποξηραμένα)	500	50	28 ± 2	55 ± 2	2.0	28 - 35
<i>Cryptolestes ferrugineus</i>	Νιφάδες βρώμης	200	1200	32 ± 2	75 ± 2	0.50	30 - 40
	Σπασμένοι σπόροι μαλακού σιταριού	200					
	Ξηρή μαγιά	20					
<i>Sitophilus granarius</i>	Ολόκληροι σπόροι μαλακού σιταριού	380	300	27 ± 1	75 ± 2	1.0	30 - 35
	Ξηρή μαγιά	5					
<i>Sitophilus oryzae</i>	Ολόκληροι σπόροι μαλακού σιταριού	380	300	28 ± 2	75 ± 2	1.0	28 - 35
	Ξηρή μαγιά	5					
<i>Sitophilus zeamais</i>	Ολόκληροι σπόροι καλαμποκιού	190	300	28 ± 2	75 ± 2	1.0	28 - 35
	Ξηρή μαγιά	5					
<i>Oryzaephilus surinamensis</i>	Βρώμη	90	750	32 ± 2	70 ± 2	0.85	30 - 37
	Ξηρή μαγιά	10					
<i>Tribolium confusum</i>	Λευκό αλεύρι	150	300	28 ± 2	75 ± 2	0.85	35 - 49
	Καλαμποκάλευρο	150					
	Ξηρή μαγιά	2					
<i>Tribolium castaneum</i>	Λευκό αλεύρι	150	300	28 ± 2	75 ± 2	0.85	28 - 35
	Καλαμποκάλευρο	150					
	Ξηρή μαγιά	2					
<i>Latheticus oryzae</i>	Λευκό αλεύρι	150	500	32 ± 2	80 ± 5	0.60	30-35
	Καλαμποκάλευρο	150					
	Ξηρή μαγιά	2					
<i>Tenebrio molitor</i>	Πίτουρο	500	50	28 ± 2	55 ± 2	2.0	120-150
<i>Plodia interpunctella</i>	Πίτουρο σιταριού	600	20 – 25 (1:1 θηλ. : αρσ.)	30 ± 2	55 ± 2	-	28 - 35
	Λευκό αλεύρι	250					
	Ξηρή μαγιά	50					

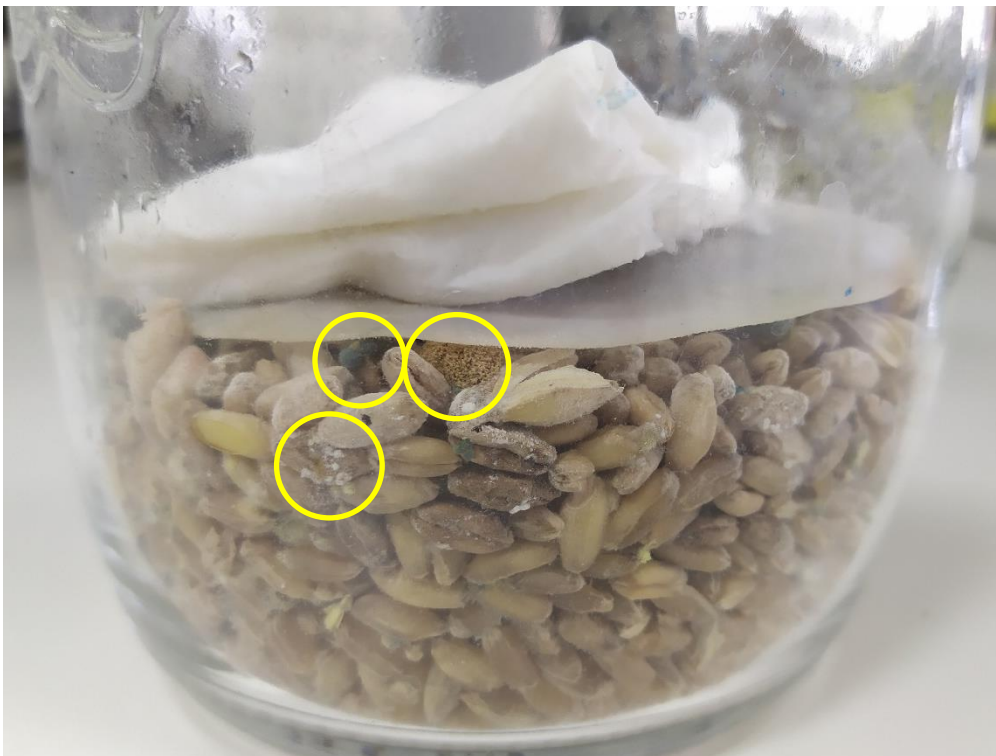


	Γλυκερίνη	100					
<i>Acarus siro</i>	Πίτουρο σιταριού	80	50	32 ± 2	80 ± 5	-	28 - 35
	Ξηρή μαγιά	5					
<i>Liposcelis spp.</i>	Πίτουρο σιταριού	80	100	25 ± 2	80 ± 5	-	28 - 35
	Ξηρή μαγιά	5					



2. Μύκητες

Δυο μέθοδοι υπάρχουν για την εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου στα τρόφιμα, οι έμμεσες και οι άμεσες. Με τις έμμεσες ελέγχονται οι χρωστικές, καταμετράται η ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη) και οι βακτηριακοί μεταβολίτες, οι μοριακοί δείκτες κ.α., ενώ οι άμεσες αναφέρονται σε μικροσκοπικές μεθόδους εκτίμησης της μικροβιακής ανάπτυξης μετά από επώαση του δείγματος κάτω από εργαστηριακές συνθήκες. Η επώαση των παθογόνων είναι περίπλοκη διαδικασία και απαιτεί εξειδικευμένες και πολύ προσεκτικές μεταχειρίσεις των δειγμάτων για την λήψη ορθών αποτελεσμάτων. Πιο συγκεκριμένα, θα πρέπει να λάβουμε υπόψη ότι τα διάφορα είδη μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων και των μυκήτων και βακτηρίων, βρίσκονται στην φύση σε μικτούς πληθυσμούς (Εικ. 14 και 15). Συνεπώς, η ασφαλής ταυτοποίησή τους και γενικότερα η μελέτη τους *in vitro* απαιτεί την απομόνωση αυτών ανά είδος με την δημιουργία καθαρής καλλιέργειας (Εικ. 16).



Εικόνα 14: Μυκηλιακές υφές διαφορετικών ειδών μυκήτων σε ποσότητα σκληρού σιταριού (Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)



Εικόνα 15: Μυκηλιακές υφές διαφορετικών ειδών μυκήτων σε ποσότητα καλαμποκιού
(Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)

Ως καθαρή εννοούμε την μικροβιακή καλλιέργεια που προκύπτει από την ανάπτυξη ενός μοναδικού είδους μικροοργανισμού, αποτελούμενη δηλαδή από κύτταρα που προέρχονται από ένα μοναδικό μικροβιακό στέλεχος. Για να επιτευχθεί αυτό θα πρέπει να διασφαλιστεί ότι όλοι οι χειρισμοί θα πραγματοποιηθούν κάτω από ασηπτικές συνθήκες, για την αποφυγή τυχόν επιμολύνσεων της καλλιέργειας με άλλα είδη μικροοργανισμών. Έπειτα ακολουθεί η απομόνωση του παθογόνου (εμβόλιο) από τον οργανισμό-ξενιστή (πχ. φυτό) και η εισαγωγή του σε ένα φρέσκο, αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό (εμβολιασμός). Εδώ θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι τα διάφορα είδη που πιθανώς να υπάρχουν στο δείγμα προϊόντος (που χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα) απαιτούν διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης και άρα μπορεί να παρατηρηθούν αποκλίσεις κατά την καλλιέργειά τους κάτω από διαφορετικά υποστρώματα και αβιοτικές συνθήκες. Για παράδειγμα, είδη παθογόνων μπορεί να μην σχηματίσουν αποικίες λόγω θρεπτικών ελλείψεων από το υπόστρωμα που θα χρησιμοποιηθεί, ή οι αποικίες των ειδών μικροβίων που θα προκύψουν να είναι συνενωμένες δυσχεραίνοντας τον διαχωρισμό μεμονωμένων ειδών. Με βάση όλα τα



ανωτέρω, παρακάτω περιγράφονται λεπτομερώς οι βέλτιστες διαδικασίες απομόνωσης, καλλιέργειας και αναγνώρισης των ειδών μυκήτων από τα δημητριακά.



Εικόνα 16: Καθαρή καλλιέργεια που προέκυψε από την ανάπτυξη ενός μοναδικού είδους μύκητα (Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)

Ασηπτικές συνθήκες κατά τον εμβολιασμό

Όλα τα υλικά και εργαλεία που χρησιμοποιούνται πρέπει να έχουν αποστειρωθεί. Ο σκοπός της αποστείρωσης είναι να καταστρέφει όλους τους μικροοργανισμούς από μια επιφάνεια ή ένα υλικό. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι αποστείρωσης, οι οποίες χωρίζονται σε τρεις γενικές κατηγορίες, αποστείρωση με θέρμανση, με διήθηση και με ακτινοβολία. Η αποστείρωση με θέρμανση επιτυγχάνεται με την χρήση του αυτόκαυστου, συσκευή που χρησιμοποιεί ατμό υπό πίεση θερμοκρασίας 121°C και πίεσης 15 psi για 15 λεπτά (Εικ. 17). Αποστείρωση με θέρμανση μπορεί να επιτευχθεί και με την χρήση κλασσικού φούρνου, όπου θερμός αέρας 160-170 °C διοχετεύεται για 2-4 ώρες ή με φλόγα του λύχνου Bunsen (Εικ. 18), που χρησιμοποιείται κυρίως για απολύμανση κατά την διαδικασία εμβολιασμού ή άλλων μεταχειρίσεων της μικροβιακής καλλιέργειας. Στις περιπτώσεις όπου το θρεπτικό υλικό περιέχει συστατικά ευαίσθητα στην θερμοκρασία, χρησιμοποιείται η μέθοδος της διήθησης, όπου το υγρό θρεπτικό διηθείται μέσω φίλτρου με πόρους 0,45μm και συλλέγεται σε αποστειρωμένη φιάλη. Τέλος, η αποστείρωση με υπεριώδη ακτινοβολία χρησιμοποιείται κυρίως για την αποστείρωση των εργαστηριακών εργαλείων (π.χ. τρυβλία, ράβδοι κ.α.).



Εικόνα 17: Συσκευή αποστείρωσης με θέρμανση (αυτόκαυστο). (Πηγή: https://www.analytika.gr/uploads/resources/11418/16a84e6d-8948-4a3c-9aae-adbb830aae86_1_2030395812_34377-huge.jpg)

Όλες οι διαδικασίες που πραγματοποιούνται κατά τον εμβολιασμό πρέπει να γίνονται στον θάλαμο νηματικής ροής, εξασφαλίζοντας έτσι τις απαιτούμενες ασηπτικές συνθήκες με την χρήση λαμπών υπεριώδους ακτινοβολίας και μικροβιολογικού φίλτρου που κατακρατεί τα μικροβιακά κύτταρα του αέρα. Όλες οι επιφάνειες όπου εργαζόμαστε πρέπει να έχουν πρωτίστως απολυμανθεί ενδελεχώς με διάλυμα αιθανόλης 75%. Κατά τον εμβολιασμό δουλεύουμε πάντα δίπλα από την φλόγα του λύχνου Bunsen, δεδομένου ότι η φλόγα αποστειρώνει στοιχειωδώς τον περιβάλλοντα χώρο σε περίμετρο λίγων εκατοστών. Η φλόγα του λύχνου Bunsen χρησιμοποιείται για την ταχύτερη δυνατή αποστείρωση των εργαλείων που έρχονται σε επαφή, δεδομένης της ξηρής θερμότητας που εκπέμπει. Η βακτηριολογική βελόνα για τον εμβολιασμό πρέπει να πυρακτώνεται με την φλόγα σε όλο το μήκος της, λαμβάνοντας ερυθρό χρώμα (Εικ. 18). Έτσι είμαστε σίγουροι για την ασφάλεια χρήσης της βελόνας στον εμβολιασμό καθότι έχουν θανατωθεί όλοι οι μικροοργανισμοί που βρίσκονται σε αυτήν μετά την πυράκτωση. Όλα τα πόματα των εργαλείων (φιάλες, σωλήνες κ.α.) δεν πρέπει σε καμία περίπτωση να τοποθετούνται πάνω στον πάγκο αλλά πάντα κοντά στην φλόγα Bunsen για την αποφυγή επιμόλυνσης με άλλα παθογόνα του χώρου. Προσοχή στα εύφλεκτα πόματα όπως βαμβάκι, διηθητικό χαρτί κ.α. Παράλληλα, πριν την επανατοποθέτησή τους στο εκάστοτε δοχείο, πρέπει να έχουν απολυμανθεί με την φλόγα Bunsen για την αποτροπή επιμόλυνσης. Η απολύμανση της γυάλινης ράβδου απαιτεί την



εμβάπτιση σε καθαρό οινόπνευμα και την άμεση καύση της στην φλόγα Bunsen πριν την χρήση της στην τοποθέτηση του υποστρώματος της καλλιέργειας στο τρυβλίο.



Εικόνα 18: Φλόγα του λύχνου Bunsen για την αποστείρωση των εργαλείων (Πηγή: <https://www.sciencephoto.com/media/657248/view/microbiology-culture-preparation>)

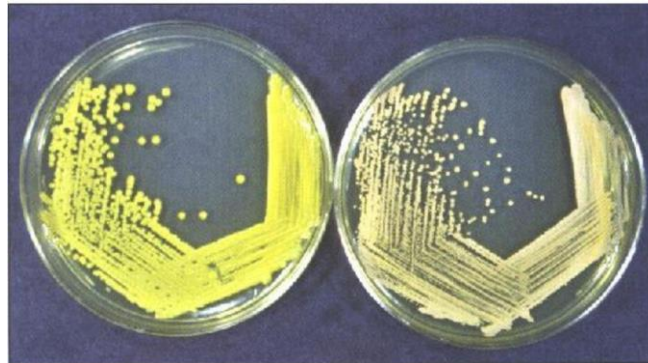
Μέθοδοι εμβολιασμού

Διαφορετικές μέθοδοι εμβολιασμού ακολουθούνται ανάλογα με την προέλευση του εμβολίου πάνω σε θρεπτικό υλικό σε τρυβλίο. Αν το εμβόλιο προέρχεται από υγρή καλλιέργεια ή δείγμα τότε ο εμβολιασμός θα πραγματοποιηθεί με την επίστρωση του εμβολίου με παράλληλες γραμμές στο θρεπτικό υλικό ή την επίστρωση του εμβολίου με ράβδο στο θρεπτικό υλικό, ή την ενσωμάτωση του εμβολίου στο θρεπτικό υπόστρωμα. Αν όμως το εμβόλιο προέρχεται από στερεή καλλιέργεια ή δείγμα τότε ο εμβολιασμός επιτυγχάνεται μόνο με την επίστρωση του εμβολίου με παράλληλες γραμμές στο θρεπτικό υλικό ή την εναπόθεση του εμβολίου στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού. Ωστόσο και άλλες μέθοδοι υπάρχουν για τον εμβολιασμό εμβολίου που προέρχεται είτε από υγρή είτε από στερεή καλλιέργεια όπως ο εμβολιασμός στερεού θρεπτικού υλικού σε δοκιμαστικό σωλήνα αντί για τρυβλίο ή ο εμβολιασμός υγρού θρεπτικού υλικού.

Η μέθοδος επίστρωσης του εμβολίου με παράλληλες γραμμές στο θρεπτικό υλικό χρησιμοποιείται για την δημιουργία μιας καθαρής καλλιέργειας ειδών βακτηρίων και ζυμών (Εικ. 19). Παράλληλες γραμμές με βακτηριολογικό κρίκο που φέρει το εμβόλιο, διαγράφονται προς διάφορες κατευθύνσεις στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού στο



τρυβλίο, με σκοπό να αραιωθούν σταδιακά και μεμονωμένα τα παθογόνα στην επιφάνεια. Η επώαση των μεμονωμένων μικροβιακών κυττάρων θα δημιουργήσει και μια αποικία για περαιτέρω ανάπτυξης της σε καθαρή καλλιέργεια.

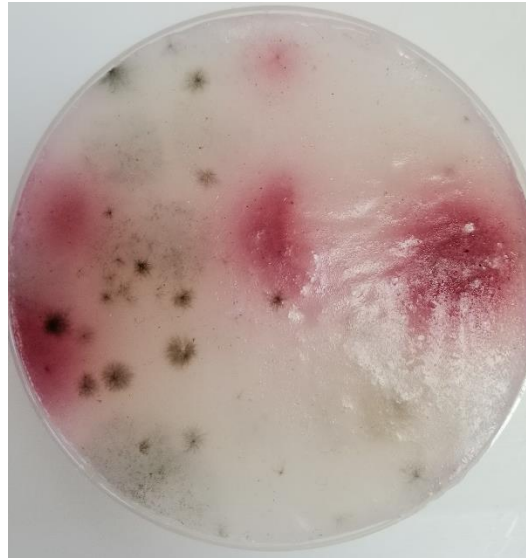


Εικόνα 19: Επώαση μικροβιακών κυττάρων με την μέθοδος επίστρωσης του εμβολίου με παράλληλες γραμμές

(Πηγή:

[https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fdocplayer.gr%2F6271120-Ergastiriaki-kalliergeia-mikroorganismon.html&psig=AOvVaw1LtlGsOqSjVC71dByIU6HA&ust=1646395136455000&source=images&cd=vfe&ved=0CAgQjRxqFwoTCLial_vxqfYCFQAAAAAdAAAAABAr\)](https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fdocplayer.gr%2F6271120-Ergastiriaki-kalliergeia-mikroorganismon.html&psig=AOvVaw1LtlGsOqSjVC71dByIU6HA&ust=1646395136455000&source=images&cd=vfe&ved=0CAgQjRxqFwoTCLial_vxqfYCFQAAAAAdAAAAABAr)

Για την δεύτερη μέθοδο εμβολιασμού, ποσότητα από την υγρή καλλιέργεια των παθογόνων μεταφέρεται κάτω από ασηπτικές πάντα συνθήκες στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού. Για την επίστρωση του υγρού που φέρει τα κύτταρα βακτηρίων και ζυμών πάνω στο θρεπτικό υλικό χρησιμοποιείται γυάλινη ράβδος. Έπειτα το τρυβλίο αφήνεται σε ελεγχόμενες συνθήκες για να επωαστούν τα παθογόνα. Αν έχει αραιωθεί σωστά το εμβόλιο τότε θα μπορούμε να λάβουμε μεμονωμένες αποικίες από την επιφάνεια του θρεπτικού υλικού (Εικ. 20).



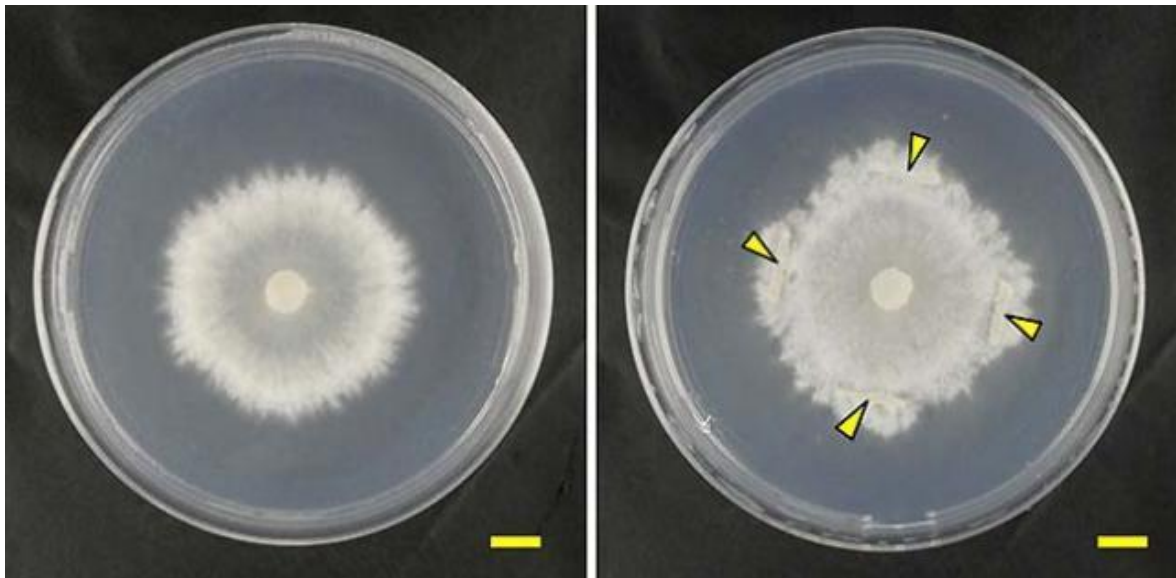
Εικόνα 20: Μεμονωμένες αποικίες στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού σε τρυβλίο
(Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)

Για την ενσωμάτωση του εμβολίου στο θρεπτικό υπόστρωμα απαιτείται το τελευταίο να είναι σε υγρή μορφή και αποστειρωμένο μέσα σε κωνική φιάλη. Στην ίδια κωνική φιάλη εισάγεται ασηπτικά και η ποσότητα του υγρού εμβολίου με τα κύτταρα των παθογόνων, με την χρήση σιφωνίου. Η κωνική φιάλη ανακινείται καλά για την καλύτερη ανάμειξη των υγρών διαλυμάτων. Το μείγμα έπειτα μεταφέρεται κάτω από ασηπτικές συνθήκες με τρυβλία και αφήνεται για να στερεοποιηθεί και να επωαστούν τα κύτταρα.

Τέλος, για την εναπόθεση του εμβολίου όταν αυτό προέρχεται από στερεή καλλιέργεια, τεμάχιο του ξενιστή που φέρει το μυκήλιο του μύκητα (εμβόλιο) (Εικ. 21) τοποθετείται με την χρήση βακτηριακής βελόνας στην επιφάνεια του καινούριου θρεπτικού υποστρώματος στο κέντρο του τρυβλίου. Το τρυβλίο αφήνεται να επωαστούν οι μύκητες (Εικ. 22).



Εικόνα 21: Τεμάχιο του ξενιστή (μήλο) που φέρει το μυκήλιο του μύκητα (εμβόλιο)
(Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)



Εικόνα 22: Επώση μυκήτων από εναπόθεση του εμβολίου στο κέντρο του τρυβλίου
(Πηγή: <https://www.ffpri.affrc.go.jp/ffpri/en/research/results/2019/20190607-01.html>)



Επώαση μυκήτων

Για την σωστή ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των μυκήτων πρέπει το θρεπτικό υλικό να καλύπτει τις θρεπτικές απαιτήσεις του παθογόνου και οι συνθήκες επώασης (θερμοκρασία, υγρασία, αερισμός κ.α.) να πληρούν τις απαιτήσεις βέλτιστης ανάπτυξης του εκάστοτε είδους μύκητα. Μόνο έτσι μπορεί να δημιουργηθεί πληθυσμός με ικανοποιητικό αριθμό κυττάρων για την περαιτέρω εργαστηριακή μεταχείρισή τους. Πιο συγκεκριμένα, το μικροβιολογικό θρεπτικό υλικό πρέπει να είναι κατάλληλη πηγή άνθρακα (π.χ. μονο- και δι-σακχαρίτες), αζώτου (π.χ. αμωνιακά άλατα, πεπτόνη, τρυπτόνη κ.α.), βιταμινών (π.χ. βιοτίνη, νιασίνη, πανθθενικό οξύ, ριβοφλαμίνη, θειαμίνη κ.α.), ιχνοστοιχείων (π.χ. σίδηρο, μαγνήσιο, ψευδάργυρος, χαλκός κ.α.) και ανόργανων αλάτων (π.χ. φωσφορικά άλατα, άλατα ασβεστίου κ.α.) για την ενίσχυση της ανάπτυξης της καλλιέργειας.



Εικόνα 23: Εμπορικά διαθέσιμα συνθετικά θρεπτικά υλικά για την εργαστηριακή επώαση των παθογόνων (Πηγή: <https://www.carlroth.com/medias/HP61-03-1000Wx1000H?context=bWFzdGVyfGltYWdlc3w0MDUyNHxpbWFnZS9qcGVnfGltYWdlcy9oYmMvaDNILzkwMDgyMDE1MzE0MjJUANBnfDhhYWFhOGYyZTRjNDg1MTIxMWUwNGY3NDUzNDE2NGE0ZjVmYzZM3NGM3ZDBjNjk1YjI4MzNkNzIxN2U0ZTY2Yjk>)

Υπάρχουν διάφορα διαθέσιμα θρεπτικά υλικά για την επώαση των μυκήτων (Εικ. 23). Σε γενικές γραμμές χωρίζονται σε δυο κατηγορίες, τα υγρά και τα στερεά. Για την πήξη των στερεών θρεπτικών υλικών χρησιμοποιείται συνήθως άγαρ ως πηκτικός παράγοντας,



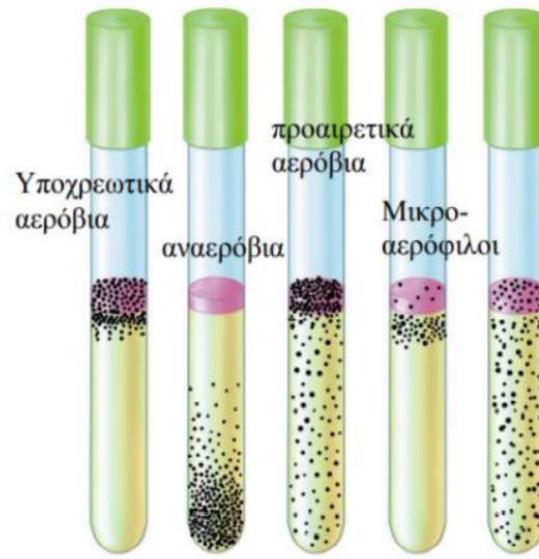
εξαιτίας των πλεονεκτημάτων που προσφέρει (Εικ. 24). Πιο συγκεκριμένα, η φυσιολογία του οργανισμού δεν επηρεάζεται από την ύπαρξη του άγαρ, ο μικροοργανισμός δεν μπορεί να το υδρολύσει, χρησιμοποιείται σε μικρές ποσότητες, ρευστοποιείται εύκολα σε βραστό νερό, είναι εύκολο να βρεθεί στην αγορά και δεν είναι ιδιαίτερα ακριβό. Άλλα υλικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πτητικοί παράγοντες, όπως για παράδειγμα η ζελατίνη, αλλά μειονεκτούν σε σχέση με το άγαρ στις περισσότερες των περιπτώσεων. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι πτητικοί παράγοντες δεν χρησιμοποιούνται ως τροφή των οργανισμών και άρα δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν χωρίς την προσθήκη άλλων θρεπτικών συστατικών. Για την εργαστηριακή επώαση των παθογόνων χρησιμοποιούνται συνθετικά θρεπτικά υλικά, η σύσταση των οποίων είναι πλήρως γνωστή, όπως για παράδειγμα το broth, που αποτελείται από εκχύλισμα κρέατος και πεπτόνης. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και φυσικά θρεπτικά υλικά, όπως χυμός τομάτας, εκχυλίσματα φρούτων κ.α., ωστόσο συνήθως δεν προτιμώνται εξαιτίας της άγνωστης και μεταβαλλόμενης (ανά παρτίδα υλικού) χημικής τους σύστασης. Κατά γενικό κανόνα, Potato Dextrose Agar (PDA) χρησιμοποιείται ως θρεπτικό υπόστρωμα για μύκητες και ζύμες, Malt Extract Agar (MEA) για ζύμες και Nutrient Agar (NA) ή Nutrinet Broth (NB) για βακτήρια. Η παρασκευή των παραπάνω θρεπτικών υλικών περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

Για την παρασκευή ενός λίτρου PDA τοποθετούνται 40 γρ. έτοιμης αφυδατωμένης σκόνης από το εμπόριο σε κωνική φιάλη των δυο λίτρων, ανακατεύεται καλά για να ομογενοποιηθεί πλήρως και έπειτα τοποθετείται στο αυτόκαυστο για απολύμανση (121°C, 1.2 atm, 15 λεπτά). Έπειτα την αποστείρωση το θρεπτικό υλικό αφήνεται να κρυώσει σε καμπίνα νηματικής ροής (για αποφυγή επιμόλυνσης με άλλους μικροοργανισμούς του αέρα) και τοποθετείται στα τρυβλία όπου θα εμβολιαστεί με τα παθογόνα. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για την παρασκευή MEA και NA, όπου 24 γρ. από το έτοιμο εμπορικό σκεύασμα MEA ή 11,4 γρ από το αντίστοιχο NA και 500 ml απιονισμένου νερού ανακατεύονται σε ποτήρι ζέσεως. Για την παρασκευή NB ζυγίζονται 6 γρ NB στην κωνική φιάλη και 500 ml νερού και το μίγμα αναδεύεται με απουσία θέρμανσης έως κορεσμού. Έπειτα αποστειρώνεται και είναι έτοιμο σε υγρή πάντα μορφή (δεν εμπεριέχει πτητικούς παράγοντες όπως το άγαρ) να χρησιμοποιηθεί για την καλλιέργεια βακτηρίων.



Εικόνα 24: Παρασκευή άγαρ για την πήξη των στερεών θρεπτικών υλικών (Πηγή: Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας)

Για την βέλτιστη ανάπτυξη των παθογόνων πρέπει να προβλέπονται και οι φυσικές – αβιοτικές απαιτήσεις αυτών, όπως η θερμοκρασία, η υγρασία, το pH, η ωσμωτική πίεση και το οξυγόνο. Με βάση τους παραπάνω παράγοντες, τα παθογόνα διαχωρίζονται σε υποχρεωτικά αερόβια (η ανάπτυξη αναστέλλεται με απουσία οξυγόνου), υποχρεωτικά αναερόβια (η ανάπτυξη αναστέλλεται με παρουσία οξυγόνου), προαιρετικά αναερόβια (ικανά να αναπαραχθούν και με τις δυο προαναφερθέντες περιπτώσεις), μέτριας ευαισθησίας στο οξυγόνο και μικροαερόφιλα όπου αναπτύσσονται με μικρές μόνο ποσότητες οξυγόνου (Εικ. 25). Παράλληλα, τα παθογόνα διακρίνονται και με βάση το θερμοκρασιακό εύρος για την ανάπτυξή τους σε ψυχρόφιλους (-5 έως 20°C), μεσόφιλους (20 έως 50°C), θερμόφιλους (>50°C) και υπερθερμόφιλους (>80°C). Ο διαχωρισμός είναι σημαντικός για τα επόμενα βήματα χαρακτηρισμού και επιλογής μεθόδου πολλαπλασιασμού.



Εικόνα 25: Αερόβια, αναερόβια, προαιρετικά αερόβια, μικροαερόφιλη και αερανεντική αναερόβια αύξηση όπως φαίνεται από την θέση των μικροβιακών αποικιών (μαύρες βούλες) (Πηγή:

https://oeclass.aua.gr/openeaclass/modules/document/file.php/PREDCS100/EFP_1280_04_a.pdf)

Ειδικοί επωαστικοί κλίβανοι χρησιμοποιούνται για την επώαση του εμβολιασμένου θρεπτικού υλικού ακολουθώντας όλες τις διαδικασίες απολύμανσης. Οι κλίβανοι είναι κατάλληλα ρυθμισμένοι ώστε να παρέχουν σταθερά επίπεδα θερμοκρασίας και οξυγόνου στο εσωτερικό τους, επίπεδα που αντιστοιχούν στην άριστη για την ανάπτυξη του εκάστοτε παθογόνου. Σε άλλη περίπτωση η επώαση πραγματοποιείται με αργό ρυθμό ή ενίοτε και καθόλου.



3. Βιβλιογραφία

Miller A., Phillips R., Cline L.D. (1969). Rearing manual for stored-product insects. USDA Stored-Product Insects Research and Development Laboratory, Savannah, Georgia, USA.

Amadi J.E., Adeniyi D.O. (2009). Mycotoxin production by fungi isolated from stored grains. *African Journal of Biotechnology*, 8: 1219–1221.

Athanassiou C.G., Opit G.P., Throne J.E. (2010). Effect of commodity characteristics on population growth of four stored-grain psocid pests (Psocoptera: Liposcelididae). *Journal of Economic Entomology*, 103: 985–990.

Athanassiou C.G., Kavallieratos N.G., Throne J.E., Nakas C.T. (2014). Competition among species of stored product psocids in stored grains (Psocoptera). *PLoS ONE* 9, e102867

Broadhead E. (1954). The infestation of warehouses and ships' holds by psocids in Britain. *Entomological Magazine*, 90: 103-105.

Baskarathevan J., Jaspers M.V., Jones E.E., Ridgway H.J. (2009). Evaluation of different storage methods for rapid and cost-effective preservation of *Botryosphaeria* species. *Plant Protection*, 62: 234-237

Dobhal S., Blazheva D., Arif M., Garrido P., Ochoa-Corona F.M., Opit G., Garzon C. (2010). PCR detection of aflatoxin producing strains of *Aspergillus* spp. from corn and red flour beetle. *Phytopathology*, 100: 30.

Eugenia Ş.T., Catalin T., Ciprian B. (2009). Importance of fungal collections for mycology in the frame of biological teaching. *Journal of Plant Development*, 16: 109-123.

Kucerova Z. (2002). Weight losses of wheat grains caused by psocid infestation (*Liposcelis bostrychophila*: Liposcelididae: Psocoptera). *Plant Protection Science*, 38: 103-107.

Kumari R., Ghosh A. (2016). Molecular characterization of fungi present in stored food grains. *International Conference on Emerging Technologies in Agricultural and Food Engineering (ETAE 2016)*. At: IIT Kharagpur Volume: Excel India Publisher, ISBN:978-93-86256-30-0.



Leong E.C.W., Ho S.H. (1995). Life cycle of *Liposcelis entomophila* (Psocoptera: Liposcelidae) and a culturing regime for liposcelids. *Bulletin of Entomological Research*, 85: 501-506. doi: 10.1017/S0007485300032983

Levinson H.Z., Levinson A.R., Offenberger M. (1992). Effect of dietary antagonists and corresponding nutrients on growth and reproduction of the flour mite (*Acarus siro* L.). *Experientia*, 48: 721-729. doi: 10.1007/BF02124287

Mashaya N. (1999). Population dynamics of *Liposcelis entomophila* (Enderlein)(Psocoptera: Liposcelidae) in farm tobacco processing buildings. *Journal of Stored Products Research*, 35: 355-368. doi: 10.1016/S0022-474X(99)00018-1

Mathlein R. (1971). Rearing experiments with *Oryzaephilus surinamensis* L. and *Cryptolestes ferrugineus* Steph. on grain. *Statens Växtskyddsanstalt*, 15: 187-203.

Miller J.D. (1995). Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. *Journal of Stored Product Research*, 31: 1–16.

Nayak M.K. (2006). Psocid and mite pests of stored commodities: small but formidable enemies. In I. Lorini, B. Bacaltchuk, H. Beckel, D. Deckers, E. Sundfeld, J.P. dosSantos, J.D. Biagi, J.C. Celaro, L.R.D'A. Faroni, L. de O. F. Bortolini, et al. (eds.), *Proceedings of the 9th International Working Conference on Stored Product Protection*, 15-18 October 2006, pp. 1061–1073. Brazilian Post-harvest Association -ABRAPOS, Campinas, Sao Paulo, Brazil.

Nakasone K.K., Peterson S.W., Jong S.C. (2004). Preservation and distribution fungal cultures. In: Mueller GM, Bills GF & Foster MS (eds.) *Biodiversity of Fungi*, pp. 37-47. Amsterdam: Elsevier Academic Press

Miller J.D. (1995). Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. *Journal of Stored Product Research*, 31: 1–16.

Mills J.T., Sinha R.N., Demianyk C.J. (1992). Feeding and multiplication of a psocid, *Liposcelis bostrychophilus* Badonnel (Psocoptera: Liposcelidae) on wheat, grain screenings, and fungi. *Journal of Economic Entomology* 85: 1453-1462.



Twiddy D.R. (1994). Volatiles as indicators of fungal growth on cereal grains. *Tropical Science*, 34: 416–428.

Nayak M.K., Collins P.J., Throne J.E., Wang J.J. (2014). Biology and management of psocids infesting stored products. *Annual Review of Entomology*, 59: 279–297.

Nayak M.K., Collins P.J. (2001). An improved method for mass rearing of three liposcelid psocids (Psocoptera: Liposcelidae) infesting stored commodities. *Journal of Stored Products Research*, 37: 323-328. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00029-1

Rajendran S. (1994). Psocids in food commodities and their control. *Pestology*, 28: 14–19.

Throne J.E., Culik M.P. (1989). Progeny production and duration of development of rusty grain beetles, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) (Coleoptera: Cucujidae), on cracked and whole corn. *Journal of Entomologic Science*, 24: 150-155.

Vinaixa M., Marín S., Brezmes J., Llobet E., Vilanova X., Correig X., Sanchis V. (2004). Early detection of fungal growth in bakery products by use of an electronic nose based on mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 6068-6074.

Voyron S., Roussel S., Munaut F., Varese G.C., Ginepro M., Declerck S., Filipello Marchisio V. (2009). Vitality and genetic fidelity of white-rot fungi mycelia following different methods of preservation. *Mycology Research*, 113: 1027-1038

Ζωάκη-Μαλισιόβα Δ. (1995). Εργαστήρια Φυτοπροστασίας Ι. Εκδόσεις ΤΕΙ Ηπείρου.

Ηλιόπουλος Α.Γ., (2004). Γενική Φυτοπαθολογία. εκδόσεις Έμβρυο.

Τζάμος Ε.Κ. (2007). Φυτοπαθολογία, Εκδόσεις Σταμούλης.

Ζωάκη - Μαλισιόβα Δ. (2015). Γενική φυτοπαθολογία εργαστήριο. Μέθοδοι εμβολιασμού-ασηπτικές συνθήκες. Εκδόσεις ΤΕΙ Ηπείρου.