



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ, ΑΜΠΕΛΟΥ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Δυναμική πληθυσμών και εξάπλωση της Ευδεμίδας (*Lobesia botrana*) και της Κοχυλίδας (*Eupoecilia ambiguella*) στον παγκόσμιο αμπελώνα και αντιμετώπιση τους με μικροβιακούς παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης

**Ντέα Τσάτσα
ΑΜ: 18685008**

Επιβλέπων καθηγητής: Δρ. Ευάγγελος Μπερής

ΑΘΗΝΑ, ΙΟΥΝΙΟΣ – 2024



**UNIVERSITY OF WEST ATTICA
SCHOOL OF FOOD SCIENCE
DEPARTMENT OF WINE, VINE AND BEVERAGE SCIENCES**

BACHELOR THESIS

**Population dynamics and distribution of *Lobesia botrana*
and *Eupoecilia ambiguella* (Lepidoptera: Tortricidae) in
World's vineyards and their control using microbial bio-
control agents**

**Dea Caca
Registration Number: 18685008**

Supervisor: Dr. Evangelos Beris

ATHENS, JUNE – 2024



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ, ΑΜΠΕΛΟΥ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ**

ΔΗΛΩΣΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη διπλωματική εργασία με τίτλο:
« **Δυναμική πληθυσμών και εξάπλωση της Ευδεμίδας και της Κοχλίδας στον παγκόσμιο αμπελώνα και αντιμετώπισή τους με μικροβιακούς παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης** »
και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα Καθηγητή (1^ο Μέλους Επιτροπής)	
Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (2^ο Μέλους Επιτροπής)	
Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (3^ο Μέλους Επιτροπής)	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογραφούσα **Ντέα Τσάτσα** του **Κιαζίμ**, με αριθμό μητρώου **18685008** φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της **Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών**, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

*Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της εργασίας μου μέχρι και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή**

Η Δηλούσα



Ντέα Τσάτσα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι αμπελώνες παγκοσμίως αντιμετωπίζουν εχθρούς και ασθένειες που απειλούν την παραγωγή και την ποιότητα των σταφυλιών. Η ευδεμίδα (*Lobesia botrana*) και η κοχυλίδα (*Eupoecilia ambiguella*) της αμπέλου αποτελούν βασικά έντομα που πλήττουν τους ευρωπαϊκούς αμπελώνες, με την κλιματική αλλαγή να εντείνει το πρόβλημα. Η αύξηση της θερμοκρασίας έχει οδηγήσει στην εξάπλωση αυτών των εντόμων σε νέες περιοχές και στην αύξηση του αριθμού των γενεών τους, προκαλώντας σοβαρές επιπτώσεις στις καλλιέργειες. Παράλληλα, η εκτεταμένη χρήση χημικών φυτοφαρμάκων έχει οδηγήσει σε ανθεκτικότητα των εντόμων και έχει προκαλέσει αρνητικές συνέπειες για την ανθρώπινη υγεία, γεγονός που καθιστά αναγκαία την αναζήτηση βιώσιμων λύσεων. Στην παρούσα εργασία, εξετάστηκε η θνησιμότητα που μπορούν να επιφέρουν συγκεκριμένα στελέχη εντομοπαθογόνων μυκήτων των ειδών *Metarhizium robertsii* και *Beauveria bassiana* στις προνύμφες της ευδεμίδας και της κοχυλίδας. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε διάφορες θερμοκρασίες και χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις εναιωρημάτων μυκήτων, ενώ οι προνύμφες μολύνθηκαν έπειτα από βύθιση τους στα αντίστοιχα εναιωρήματα. Η στατιστική ανάλυση που διενεργήθηκε ως απόρροια των αποτελεσμάτων των πειραμάτων κατέδειξε σημαντική διαφορά μεταξύ των ποσοστών διορθωμένης θνησιμότητας της ευδεμίδας και της κοχυλίδας. Η ευδεμίδα συγκεκριμένα, παρουσίασε υψηλότερα ποσοστά διορθωμένης θνησιμότητας σε όλες τις περιπτώσεις σε σύγκριση με αυτά της κοχυλίδας. Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες που χρησιμοποιήθηκαν έδειξαν την προοπτική χρήσης τους για τη βιολογική καταπολέμηση της *Lobesia botrana*, ενώ τα αποτελέσματα για την *Eupoecilia ambiguella* ήταν λιγότερο ενθαρρυντικά. Συμπερασματικά, τονίζεται η ανάγκη για τη διενέργεια περισσότερων πειραμάτων για την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών μόλυνσης των δύο ειδών εντόμων και την επίτευξη υψηλότερης θνησιμότητας των εντομοπαθογόνων μυκήτων στα συγκεκριμένα είδη.

Λέξεις κλειδιά: Βιολογική καταπολέμηση, Εντομοπαθογόνοι μύκητες, έντομα-παράσιτα, Ευδεμίδα της Αμπέλου, Κοχυλίδα της Αμπέλου, Κλιματική αλλαγή, *M. robertsii*, *B. bassiana*, αμπελώνες

ABSTRACT

Vineyards worldwide face pests and diseases that threaten grape production and quality. The European grapevine moth (*Lobesia botrana*) and the grape berry moth (*Eupoecilia ambiguella*) are key insects affecting European vineyards, with climate change exacerbating the problem. The increase in temperature has led to the spread of these insects to new areas and an increase in their generations, causing serious impacts on crops. Simultaneously, the extensive use of chemical pesticides has resulted in insect resistance and negative consequences for human health, making the search for sustainable solutions necessary. This study examined the corrected mortality caused by specific strains of entomopathogenic fungi, *Metarhizium robertsii* and *Beauveria bassiana*, on the larvae of the European grapevine moth and the grape berry moth. The experiments were conducted at various temperatures and used different concentrations of fungal suspensions, with the larvae being infected through immersion in these suspensions. The statistical analysis derived from the experimental results showed a significant difference in corrected mortality rates between the European grapevine moth and the grape berry moth. Specifically, the European grapevine moth exhibited higher corrected mortality rates in all cases compared to the grape berry moth. The entomopathogenic fungi used demonstrated the potential for future use in the biological control of *Lobesia botrana*, while the results for *Eupoecilia ambiguella* were less encouraging. In conclusion, the need for further studies and experiments on these two insect species is emphasized to better understand their infection mechanisms and achieve higher mortality rates of entomopathogenic fungi in these specific species.

Keywords: Biological control, Entopathogenic fungi, insects-pests, *Lobesia botrana*, *Eupoecilia ambiguella*, Climate change, *M. robertsii*, *B. bassiana*, vineyards

Αφιέρωση

*Η παρούσα πτυχιακή εργασία
είναι αφιερωμένη σε όσους πίστεψαν στις δυνατότητες μου.*

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ πολύ τον επιβλέποντα καθηγητή Δρ. Ευάγγελο Μπερή για την πολύτιμη βοήθεια και τη δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω τα πειράματα της παρούσας πτυχιακής εργασίας στο Πανεπιστήμιο του Γκάιζενχάιμ στη Γερμανία. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην επιβλέπουσα εργαστηρίου Dr. Mathilde Ponchon για την καθοδήγηση και τη βοήθεια που μου παρείχε σε όλη τη διαδικασία των πειραμάτων. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης το τμήμα Φυτοπροστασίας του Hochschule Geisenheim University για την δυνατότητα πραγματοποίησης των πειραμάτων στους εργαστηριακούς χώρους και την υπεύθυνη του εργαστηρίου, Mrs. Mirjam Hauck. Ευχαριστώ πολύ την Αντιπρύτανη έρευνας και διευθύντρια του Ινστιτούτου Φυτοπροστασίας, Prof. Dr. Annette Reineke που υπήρξε παρούσα και έδωσε την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή της σε όλη τη διαδικασία της πτυχιακής εργασίας. Κλείνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, το σύντροφο μου και τις φίλες μου που μου στάθηκαν σε όλο αυτό το ταξίδι.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	i
Κατάλογος Πινάκων.....	vii
Κατάλογος Σχημάτων.....	viii
Ακρωνύμια.....	xii
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
Κεφάλαιο 1	2
1.1 Εισαγωγή στον ελληνικό αμπελώνα.....	2
1.2 Εισαγωγή στη φυτοπροστασία της αμπέλου	4
Κεφάλαιο 2. Βιβλιογραφική Επισκόπηση	9
2.1 Βιολογική αντιμετώπιση εχθρών της αμπέλου	9
2.2 Εντομοπαθογόνοι μύκητες	10
2.2.1 Βιολογία εντομοπαθογόνων μυκήτων	13
2.2.2 Μηχανισμοί δράσης	16
2.2.3 Εφαρμογή τους σε προγράμματα ολοκληρωμένης αντιμετώπισης	19
2.2.4 Ο μύκητας <i>Metarhizium robertsii</i>	22
2.2.5 Ο μύκητας <i>Beauveria bassiana</i>	27
2.3 Η ευδεμίδα της αμπέλου	31
2.3.1 Βιολογικός κύκλος	32
2.3.2 Τρόπος δράσης - Ζημιές	35
2.3.3 Αντιμετώπιση	36
2.4 Η κοχυλίδα της αμπέλου.....	39
2.4.1 Βιολογικός κύκλος	40
2.4.2 Τρόπος δράσης - Ζημιές	41
2.4.3 Αντιμετώπιση	42
Κεφάλαιο 3. Γεωγραφική εξάπλωση και δυναμική των πληθυσμών της ευδεμίδας (<i>Lobesia botrana</i>) και της κοχυλίδας (<i>Eupoecilia ambiguella</i>)	44
Κεφάλαιο 4. Πειραματικό μέρος.....	54
4.1 Εισαγωγή.....	54
4.2 Υλικά & Μέθοδοι 1 ^ο Πειράματος	54
4.2.1 Εκτροφή της Ευδεμίδας και της Κοχυλίδας της αμπέλου.....	55
4.2.2 Η καλλιέργεια των μυκήτων	58
4.2.3 Εναιωρήματα σπορίων στελεχών <i>Metarhizium robertsii</i>	61
4.2.4 Η μόλυνση των προνυμφών	64
4.3 Υλικά & Μέθοδοι 2 ^ο Πειράματος.....	66

4.4 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	70
4.5 Αποτελέσματα.....	71
4.5.1 Αποτελέσματα από το 1 ^ο πείραμα.....	71
4.5.2 Αποτελέσματα από το 2 ^ο πείραμα.....	72
4.6 Συζήτηση.....	76
4.7 Συμπεράσματα.....	80
Βιβλιογραφία.....	82

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Μυκητοκτόνα βασισμένα στους εντομοπαθογόνους μύκητες *Beauveria bassiana* και *B. brongniartii* που είναι εγγεγραμμένα ή βρίσκονται σε διαδικασία ανάπτυξης του προϊόντος για εμπορική χρήση.

Πηγή: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09583150701309006>

Πίνακας 2: Συστατικά συνθετικών υποστρωμάτων σε γραμμάρια ως προς τον τελικό όγκο νερού.

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1: Ποσοστά επί % διορθωμένης θνησιμότητας της Ευδεμίδας (*Lobesia botrana*) και της Κοχυλίδας (*Eupoecilia ambiguella*) 10 ημέρες έπειτα από τη μόλυνση τους από τέσσερα διαφορετικά στελέχη του μύκητα *M. robertsii* (MsoilAR-4.3, M224B, EF3.5(2), EF047) σε δύο διαφορετικούς κλιματικούς θαλάμους: 20.2°C και 24.2°C. Η χρήση των α και β δείχνουν τη σημαντική διαφορά μεταξύ των προνυμφών Ευδεμίδας και Κοχυλίδας αντίστοιχα.

Σχήμα 2: Ποσοστά επί % διορθωμένης θνησιμότητας της Ευδεμίδας (*Lobesia botrana*) 10 ημέρες έπειτα από τη μόλυνση των προνυμφών από τέσσερα διαφορετικά στελέχη του μύκητα *M. robertsii* (MsoilAR-4.3, M224B, EF3.5(2), EF047) και ένα στέλεχος *Beauveria bassiana* (ATCC 74040) ηλικίας 14 ημερών, στους 25°C.

Σχήμα 3: Ποσοστά επί % διορθωμένης θνησιμότητας της Ευδεμίδας (*Lobesia botrana*) 10 ημέρες έπειτα από τη μόλυνση των προνυμφών από τέσσερα διαφορετικά στελέχη του μύκητα *M. robertsii* (MsoilAR-4.3, M224B, EF3.5(2), EF047) και ένα στέλεχος *Beauveria bassiana* (ATCC 74040) ηλικίας 20 ημερών, στους 25°C.

Σχήμα 4: Ποσοστά επί % διορθωμένης θνησιμότητας της Κοχυλίδας (*Eupoecilia ambiguella*) 10 ημέρες έπειτα από τη μόλυνση των προνυμφών από τέσσερα διαφορετικά στελέχη του μύκητα *M. robertsii* (MsoilAR-4.3, M224B, EF3.5(2), EF047) και ένα στέλεχος *Beauveria bassiana* (ATCC 74040) ηλικίας 14 ημερών, στους 25°C.

Σχήμα 5: Ποσοστά επί % διορθωμένης θνησιμότητας της Κοχυλίδας (*Eupoecilia ambiguella*) 10 ημέρες έπειτα από τη μόλυνση των προνυμφών από τέσσερα διαφορετικά στελέχη του μύκητα *M. robertsii* (MsoilAR-4.3, M224B, EF3.5(2), EF047) και ένα στέλεχος *Beauveria bassiana* (ATCC 74040) ηλικίας 20 ημερών, στους 25°C.

Σχήμα 6: Σύμπτυξη των στατιστικών αποτελεσμάτων του δεύτερου πειράματος. Ποσοστά επί % διορθωμένης θνησιμότητας της Ευδεμίδας (*Lobesia botrana*) και της Κοχυλίδας (*Eupoecilia ambiguella*) 10 ημέρες έπειτα από τη μόλυνση των προνυμφών από τέσσερα διαφορετικά στελέχη του μύκητα *M. robertsii* (MsoilAR-4.3, M224B, EF3.5(2), EF047) και ένα στέλεχος *Beauveria bassiana* (ATCC 74040) στους 25°C. Η χρήση των α και β δείχνει τη σημαντική διαφορά των αποτελεσμάτων μεταξύ της Ευδεμίδας και της Κοχυλίδας.

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1: Αποικία 25 ημερών εντομοπαθογόνου μύκητα *Metarhizium robertsii* (EF047) σε συνθετικό υπόστρωμα BSM σε θερμοκρασία 25°C [Fläche Kellersgrube, Geisenheim].

Εικόνα 2: Βιολογικός κύκλος των ασκομυκήτων με εγγενή (σεξουαλική) και αγενή (ασεξουαλική) αναπαραγωγή

Πηγή: <https://sites.gsu.edu/alu6/2019/04/20/16/>

Εικόνα 3: Επισκόπηση του βασικού κύκλου μόλυνσης των ασπόνδυλων από το μύκητα *Beauveria bassiana*.

Πηγή: https://www.researchgate.net/publication/308172345_The_production_and_use_of_Beauveria_bassiana_as_a_microbial_insecticide

Εικόνα 4: Κατσαρίδα που έχει μολυνθεί από τον εντομοπαθογόνο μύκητα *M. anisopliae*.

Πηγή: https://en.wikipedia.org/wiki/Metarhizium_anisopliae

Εικόνα 5: Είδος εντόμου (spotted lanternfly) που ανήκει στα Ημίπτερα, μολυσμένο από το μύκητα *Beauveria bassiana*

Πηγή: <https://cals.cornell.edu/new-york-state-integrated-pest-management/outreach-education/fact-sheets/beauveria-bassiana>

Εικόνα 6: Ενήλικο αρσενικό άτομο (A & B) και ενήλικο θηλυκό άτομο (C & D) του είδους *Lobesia botrana* Πηγή: <https://www.semanticscholar.org/paper/Tra%C3%A7a-europeia-dos-cachos-da-videira-Lobesia-uma-em-Botton-Nondillo/22edf35417b754b1faa607e003a2bf1e8538e05a>

Εικόνα 7: Αβγό της ευδεμίδας προσκολλημένο σε ράγα σταφυλιού (αριστερά) και απεικόνιση του σε μεγεθυντικό φακό όπου διακρίνεται η προνύμφη (δεξιά).

Πηγή: <https://plantwiseplusknowledgebank.org/doi/10.1079/pwkb.species.42794>

Εικόνα 8: Προνύμφη της ευδεμίδας κινούμενη πάνω σε ράγες σταφυλιών

Πηγή: <https://worldofplants.ai/en/%D9%81%D8%B1%D8%A7%D8%B4%D8%A9-%D8%AB%D9%85%D8%A7%D8%B1-%D8%A7%D9%84%D8%B9%D9%86%D8%A8/>

Εικόνα 9: Χρυσαλλίδα της ευδεμίδας

Πηγή: <https://plantwiseplusknowledgebank.org/doi/10.1079/pwkb.species.42794>

Εικόνα 10: Ενήλικο έντομο (ακμαίο) της ευδεμίδας

Πηγή: <https://gd.eppo.int/taxon/POLYBO>

Εικόνα 11: Απεικόνιση προνύμφης της ευδεμίδας που τρέφεται από ώριμη ράγα σταφυλιού

Πηγή: <https://worldofplants.ai/en/%D9%81%D8%B1%D8%A7%D8%B4%D8%A9-%D8%AB%D9%85%D8%A7%D8%B1-%D8%A7%D9%84%D8%B9%D9%86%D8%A8/>

Εικόνα 12: Οι πιο συνηθισμένοι χειροποίητοι διανομείς φερομόνης που χρησιμοποιούνται στους ιταλικούς αμπελώνες: (a) ShinEtsu Isonet L, (b) Διανομέας BASF-RAK, (c) Διανομέας Isonet LE ShinEtsu
Πηγή: https://www.researchgate.net/publication/305344035_Semiochemical_Strategies_for_Tortricid_Moth_Control_in_Apple_Orchards_and_Vineyards_in_Italy

Εικόνα 13: Φυσιικοί εχθροί για τον έλεγχο της ευδεμίδας της αμπέλου: (A) ενήλικο *Phytomyza nigra* (Diptera:Tachinidae) που αναδύεται από τη χρυσαλίδα της ευδεμίδας. (B) *Trichogramma* sp., παρασιτικό αυγό. (C) Αβγά της ευδεμίδας παρασιτισμένα από *Trichogramma*. (D) ενήλικα *Ichneumonidae*. (E) ενήλικα *Ichneumonidae* που παρασιτούν τη χρυσαλίδα της *L. botrana*. (F) ενήλικο *Aranteles* sp.
Πηγή: <https://www.intechopen.com/chapters/77973>

Εικόνα 14: Ακμαίο αρσενικό έντομο της *Eupoecilia ambiguella* (αριστερά) και θηλυκό ακμαίο έντομο της *Eupoecilia ambiguella* (δεξιά)

Πηγή: https://idtools.org/id/leps/tortai/Eupoecilia_ambiguella.htm

Εικόνα 15: Προνύμφη της κοχυλίδας της αμπέλου (*Eupoecilia ambiguella*) σε ράγα σταφυλιού (Photo: Ric Bessin, University of Kentucky)
Πηγή: <https://fruitscout.ca.uky.edu/grape-berry-moth-grapes>

Εικόνα 16: Εξάπλωση πληθυσμών της ευδεμίδας (*Lobesia botrana*) στον παγκόσμιο χάρτη
Πηγή: EPPO Global Database (<https://gd.eppo.int/taxon/POLYBO/distribution>)

Εικόνα 17: Εξάπλωση πληθυσμών της κοχυλίδας (*Eupoecilia ambiguella*) στο παγκόσμιο χάρτη. [Με πορτοκαλί σημειώνεται η επιβεβαιωμένη παρουσία του είδους ενώ με κίτρινο σημειώνεται ο εντοπισμός του που μαίνεται να επιβεβαιωθεί]
Πηγή: EPPO Global Database <https://gd.eppo.int/taxon/CLYSAM/distribution>

Εικόνα 18: Παράδειγμα από Φυσιολογικά Βασισμένα Δημογραφικά Μοντέλα (PBDM) στην Ιταλία – a. Τα επίπεδα προσομοίωσης περιλαμβάνουν ένα άτομο, τον πληθυσμό του ατόμου, σε οικολογικές ζώνες και σε μεγάλες γεωγραφικές περιοχές. – b. Ανάλυση οικοσυστήματος PBDM/GIS με γνώμονα τις καιρικές συνθήκες, συμπεριλαμβανομένης της οριακής ανάλυσης.
Πηγή: <https://www.casasglobal.org/methodology-and-analysis/>

Εικόνα 19: Χώρος εκτροφή της *Eupoecilia ambiguella* στο στάδιο ενηλικίωσης. Σε αυτό το στάδιο τα θηλυκά ζευγαρώνουν με τα αρσενικά και εναποθέτουν τα αβγά τους στην επιφάνεια της πλαστικής μεμβράνης

Εικόνα 20: Αποικίες στελεχών *M. robertsii* σε υποστρώματα BSM, MPA, PDA

Εικόνα 21: Δοχεία με εναιωρήματα σπορίων τεσσάρων στελεχών του μύκητα *M. robertsii* που διατηρούνται σε πάγο πριν τη μόλυνση των εντόμων

Εικόνα 22: Παρατήρηση και καταμέτρηση των σπορίων από τα εναιωρήματα εντομοπαθογόνων μυκήτων σε εργαστηριακό μικροσκόπιο.

Εικόνα 23: Διαδικασία μόλυνσης τω προνυμφών της ευδεμίδας και της κοχυλίδας σε αποστειρωμένο εργαστηριακό πάγκο και έπειτα τοποθέτηση τους σε δοχεία Petri με τεχνητή τροφή.

Εικόνα 24: Ανάπτυξη μικκυλίου στελέχους του *M. robertsii* σε προνύμφη της *Lobesia botrana*

Ακρωνύμια

- ΒΠΕ** Βιολογικοί Παράγοντες Ελέγχου
ΕΠΜ Εντομοπαθογόνοι Μύκητες
PBDM Physiologically based demographic models
IPM Integrated Pest Management

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι αμπελώνες σε ολόκληρο τον κόσμο έρχονται συχνά αντιμέτωποι με εχθρούς και ασθένειες που βάζουν σε κίνδυνο την παραγωγή και την ποιότητα των σταφυλιών τους. Η ευδεμίδα (*Lobesia botrana*) και η κοχυλίδα (*Eupoecilia ambiguella*) της αμπέλου αποτελούν τα βασικότερα είδη εντόμων που προσβάλλουν τους ευρωπαϊκούς αμπελώνες και η γεωγραφική τους επέκταση ως απόρροια της κλιματικής αλλαγής έχει δημιουργήσει σημαντικά προβλήματα στον κλάδο της αμπελουργίας. Η εκτεταμένη χρήση χημικών φυτοφαρμάκων στις καλλιέργειες με σκοπό την αντιμετώπιση των εχθρών και των ασθενειών, έχει επιφέρει ένα κύμα ανθεκτικότητας των εντόμων η οποία σε συνδυασμό με την αρνητική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία έχει οδηγήσει στην εκτεταμένη αναζήτηση καινούριων, βιώσιμων μεθόδων αντιμετώπισης. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, έγινε μια αρχική ανασκόπηση των γενικών εχθρών και ασθενειών με τους οποίους έρχονται αντιμέτωποι οι ελληνικοί αμπελώνες αλλά και των μεθόδων φυτοπροστασίας που χρησιμοποιούνται. Σημειώθηκε η σημασία της υιοθέτησης καινούριων μεθόδων αντιμετώπισης των εχθρών των καλλιεργειών και έγινε ανάλυση στη βιολογική αντιμετώπιση με επίκεντρο τη χρήση των εντομοπαθογόνων μυκήτων. Έπειτα, αναλύθηκε η μορφολογία και η φυσιολογία των δύο ειδών εντόμου, η εξάπλωσής τους (ειδικότερα με την άνοδο των θερμοκρασιών) και ο αντίκτυπος των πληθυσμών τους στον παγκόσμιο αμπελώνα. Εφόσον το εργαστηριακό κομμάτι στηρίχθηκε στη χρήση διαφορετικών θερμοκρασιών, αναλύθηκε επιπρόσθετα το πρόβλημα της κλιματικής αλλαγής και των επιπτώσεων της στην εξάπλωση των εντόμων. Για την πειραματική έρευνα που διακρίθηκε σε δύο επιμέρους τμήματα, επιλέχθηκαν συγκεκριμένα στελέχη του εντομοπαθογόνου μύκητα *M. robertsii* και *B. bassiana*. Σκοπός ήταν ο έλεγχος της ικανότητας παρασιτισμού και θνησιμότητας που μπορούν να προκαλέσουν οι προαναφερόμενοι μύκητες στις προνύμφες των ειδών της ευδεμίδας και της κοχυλίδας κάτω από συγκεκριμένες κλιματικές συνθήκες. Στο πειραματικό μέρος της εργασίας έγινε καταγραφή των πρωτοκόλλων που ακολουθήθηκαν και στην πορεία τα αποτελέσματα των πειραμάτων μεταφράστηκαν σε στατιστικά διαγράμματα. Αυτά με τη σειρά τους, συζητήθηκαν και εκτιμήθηκαν τελικά ως προς τις δυνατότητες που έχουν οι συγκεκριμένοι εντομοπαθογόνοι μύκητες να συμπεριληφθούν στον τομέα βιολογικής αντιμετώπισης

της *Lobesia botrana* και *Euroecilia ambiguella* σε προγράμματα ολοκληρωμένης προστασίας αμπελώνων παγκοσμίως.

Κεφάλαιο 1

1.1 Εισαγωγή στον ελληνικό αμπελώνα

Η ιστορία της αμπέλου και του οίνου στην Ελλάδα ξεκινάει από την αρχαιότητα, με την οινοφόρο άμπελο να αναγνωρίζεται πλέον ως αυτοφυές είδος σε όλη την έκταση της (Λογοθέτης, 1970). Συγκεκριμένα, η αναφορά του υποείδους *sylvestris* του είδους *Vitis vinifera* έχει εντοπιστεί σε γραπτά ανά τα χρόνια, μεταξύ άλλων και σε αυτά του Ομήρου (Λογοθέτης, 1967). Η χρήση γηγενών ποικιλιών αλλά και το ενδιαφέρον του ελληνικού terroir με την παράλληλη διαμόρφωση συγκεκριμένων ζωνών αμπελοκαλλιέργειας και την εισαγωγή βασικών κατηγοριών οίνων, οδήγησαν σε μια διαδικασία εκσυγχρονισμού του ελληνικού αμπελώνα τα τελευταία 50 χρόνια (Παύλου, 2015).

Η έκταση του ελληνικού αμπελώνα για την παραγωγή οίνου ανέρχεται στα 640.000 στρέμματα για το 2023 και περίπου 415.000 στρέμματα σε όλη την Ελλάδα καταλαμβάνονται από καλλιέργειες σταφίδας (Σταύρακας, 2015). Έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 2020 κατατάσσει την Ελλάδα 7^η σε έκταση στην Ευρώπη (Eurostat, 2022). Τα τελευταία 10 χρόνια ωστόσο έχει παρατηρηθεί μεγάλη μείωση των καλλιεργειών αμπελιού παρά την ετήσια παραχώρηση νέων αδειών φύτευσης που αναλογούν σε 6.203 στρέμματα (1% αύξηση). Αυτή η εξέλιξη πιθανά οφείλεται και στην απόδοση των αμπελώνων σε σχέση με την τιμή του σταφυλιού στην αγορά, κάνοντας τη διατήρησή τους οικονομικά μη βιώσιμη. Αποτέλεσμα είναι η εγκατάλειψη των καλλιεργημένων εκτάσεων. Ο όγκος παραγωγής του ελληνικού οίνου για το 2022 έφτασε τα 2,1 εκατομμύρια εκατόλιτρα (mhl), 14% λιγότερο από την προηγούμενη χρονιά (2021) κατατάσσοντας την Ελλάδα 19^η στη παγκόσμια κλίμακα παραγωγής οίνου (International Organisation of Vine and Wine [OIV], 2022).

Η Ελλάδα πρόκειται για μικρή χώρα παραγωγής με περίπου 1200 οινοποιεία στην επικράτεια της ενώ το μεγαλύτερο μέρος των καλλιεργούμενων ποικιλιών απαρτίζεται από γηγενείς ποικιλίες. Η ιδιαιτερότητα του εύκρατου κλίματος που

διαθέτει, η εναλλαγή βουνού, θάλασσας, λιμνών και πεδιάδων χαρίζει στην Ελλάδα πληθώρα διαφορετικών τοπίων. Αυτά με τη σειρά τους δημιουργούν ξεχωριστές αμπελουργικές περιοχές στις οποίες πολλές γηγενείς ποικιλίες εκφράζουν αποκλειστικά τον αρωματικό και γευστικό τους χαρακτήρα (Σταύρακας, 2015). Ο ελληνικός αμπελώνας χωρίζεται σε 11 αμπελουργικά διαμερίσματα από την Θράκη μέχρι την Κρήτη με τις καλλιέργειες να διαμορφώνονται από 0 έως 1000 μέτρα υψόμετρο. Για την καλλιέργεια των ποικιλιών, τα επικρατέστερα σχήματα διαμόρφωσης είναι το αμφίπλευρο κορδόνι (Royat) και το κύπελλο, ενώ ο τρύγος συνήθως ξεκινάει τέλος Ιουλίου – αρχές Αυγούστου και τελειώνει αρχές Οκτωβρίου (Τσακίρης, 2016). Η παραγωγή του λευκού οίνου κυριαρχεί, με το Σαββατιανό και τον Ροδίτη να βρίσκονται υψηλά στην προτίμηση των αμπελουργών. Στις ερυθρές ποικιλίες παρατηρείται ιδιαίτερη χρήση του Αγιωργήτικου, του Λιάτικου, του Μοσχάτου Αμβούργου και του Ξινόμαυρου ενώ ξενικές ποικιλίες όπως το Merlot και το Cabernet Sauvignon είναι ευρέως διαδεδομένες στον ελληνικό χώρο.

Για την κατάταξη των παραγόμενων οίνων στην Ελλάδα χρησιμοποιούνται με βάση τη νομοθεσία οι όροι ‘Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης (ΠΟΠ)’ και ‘Προστατευόμενη Γεωγραφική Ένδειξη (ΠΓΕ)’. Οι συγκεκριμένες ορολογίες χρησιμοποιούνται για την ανάδειξη οίνων με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που οφείλονται σε περιβαλλοντικούς και ανθρώπινους παράγοντες. Στους οίνους ΠΟΠ περιλαμβάνονται και οι οίνοι ΟΠΑΠ και ΟΠΕ (αποκλειστικά γλυκείς οίνοι), ενώ στους οίνους ΠΓΕ υπάγονται και οι τοπικοί οίνοι με τους οίνους Ονομασίας Κατά Παράδοση (Βερντέα Ζακύνθου και Ρετσίνα). Μια επιπλέον κατηγορία είναι οι Επιτραπέζιοι Οίνοι που δεν έχουν ιδιαίτερους περιορισμούς ως προς τις ποικιλίες, τις τοποθεσίες των αμπελώνων κ.α. (Καρακατσάνη, 2018). Με βάση τους όρους που ακολουθούν οι παραγόμενοι οίνοι μπορούν να λάβουν αντίστοιχα τις ορολογίες ΠΟΠ και ΠΓΕ στις ετικέτες τους (Σταύρακας, 2015).

Η εισαγωγή της Φυλλοξήρας στην Ευρώπη και η διαπίστωση της από το 1898 στην βόρεια Ελλάδα άλλαξε την ιστορία της αμπελοκαλλιέργειας. Μέσα σε λίγα χρόνια εξαπλώθηκε σε όλη την Ελλάδα και κατέστρεψε ένα πολύ μεγάλο μέρος των ελληνικών αμπελώνων. Η κύρια μορφή της, *Vitis vitifoliae*, που εντοπίζεται στην ευρωπαϊκή άμπελο, είναι η ριζόβια, η οποία τρέφεται από τις ρίζες του φυτού δημιουργώντας ρωγμές σε αυτές και οι οποίες με τη σειρά τους οδηγούν σε σήψη των ριζών και ριζιδίων. Η διαδικασία αυτή λοιπόν είχε ως αποτέλεσμα την ολοκληρωτική καταστροφή του ριζικού συστήματος των περισσότερων αμπελώνων στην Ελλάδα και

στην Ευρώπη και στην εξαφάνιση πολλών γηγενών ποικιλιών. Τότε δημιουργήθηκε η ανάγκη χρήσης αμερικάνικων υποκειμένων που βρέθηκαν να είναι ανθεκτικά στην φυλλοξήρα και ο εμβολιασμός των επιθυμητών ποικιλιών σε αυτά (Ρούμπος, 2016). Μερικά από τα συνιστάμενα πλέον υποκείμενα στην Ελλάδα είναι: 110R, 41B, 1,103P, 140 Ru, SO4 (Τσακίρης, 2016). Ωστόσο μερικές περιοχές δεν προσβλήθηκαν από τη Φυλλοξήρα λόγω της σύστασης του εδάφους και ακόμη και σήμερα διατηρούν αυτόρριζα φυτά της αμπέλου. Μεγάλο παράδειγμα η Σαντορίνη, που λόγω της σύστασης του ηφαιστιογενούς εδάφους δεν επέτρεψε στη φυλλοξήρα να επιβιώσει και να καταστρέψει το ριζικό σύστημα των αμπελώνων. Επιπλέον, χάρη στο ιδιαίτερο terroir που διαθέτει, είναι και ένας από τους πιο σπουδαίους και σπάνιους τόπους στους οποίους καλλιεργείται το αμπέλι και παράγει διεθνώς αναγνωρισμένα μοναδικά κρασιά παγκοσμίως (Αγγέλου, 2015). Μεγάλος πρωταγωνιστής, το Ασύρτικο, που εκφράζει στο μέγιστο τον χαρακτήρα του στην ηφαιστιογενή Σαντορίνη.

1.2 Εισαγωγή στη φυτοπροστασία της αμπέλου

Από την αρχή της εγκατάστασης ενός αμπελώνα ή σε πιθανή επανεγκατάσταση, και για όλες τις καλλιεργητικές περιόδους που θα ακολουθήσουν πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν συγκεκριμένες οδηγίες. Σκοπός είναι να γίνεται σωστή προετοιμασία του ελληνικού αμπελώνα και να τίθενται τα θεμέλια της προστασίας του από ασθένειες και εχθρούς (ΥΠ.Α.Α.Τ., 2013).

Η διαδικασία της προστασίας ονομάζεται φυτοπροστασία και περιλαμβάνει κάθε προληπτικό και κατασταλτικό μέτρο με σκοπό τη διατήρηση της υγείας των φυτών από κάθε επιβλαβή παράγοντα με την ταυτόχρονη ποιοτική και ποσοτική απόδοση των φυτών. Παράλληλα, η διασφάλιση της φυτικής υγείας συνεισφέρει στην προστασία της ανθρώπινης υγείας ενώ πλέον παρέχονται και εναλλακτικές λύσεις με χαμηλό αρνητικό αντίκτυπο στο περιβάλλον.

Υπάρχουν τρεις βασικές κατηγορίες φυτοπροστασίας:

Χημική Φυτοπροστασία: Η διαδικασία χρήσης φυτοφαρμάκων (όπως εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα, ζιζανιοκτόνα κλπ.) με στόχο την εξάλειψη ασθενειών και εχθρών που δύναται να προκαλέσουν ζημιές στην καλλιέργεια.

Βιολογική Φυτοπροστασία: Η εκμετάλλευση ζωντανών παραγόντων (βακτηρίων, φυτών, ωφέλιμων ανταγωνιστικών οργανισμών) και ιών για τη διαχείριση και καταπολέμηση των επιβλαβών παρασίτων, ασθενειών και ζιζανίων στις καλλιέργειες με σκοπό την απώτερη προστασία του φυσικού περιβάλλοντος και της ανθρώπινης υγείας.

Ολοκληρωμένη Φυτοπροστασία: Αποτελεί το συνδυασμό της χημικής και της βιολογικής στρατηγικής με διατήρηση συγκεκριμένων επιπέδων παρασιτικών πληθυσμών. Γνώμονας είναι η αναγκαιότητα παρέμβασης στις καλλιέργειες με χημικά και βιολογικά σκευάσματα αλλά και η αρνητική επίπτωση μιας παρέμβασης στο περιβάλλον. Σε κάθε περίπτωση, στόχος είναι πάντα οι καλλιέργειες να αποδώσουν σωστά προϊόντα χωρίς επιβλαβείς ουσίες αλλά και να μην υπάρξει μείωση στην παραγωγή.

Στην αμπελοκαλλιέργεια, από τη φάση του λήθαργου του φυτού μέχρι και έπειτα από την ολοκλήρωση του τρύγου, η φυτοπροστασία που παρέχεται, για κάθε ασθένεια ή εχθρό και σε κάθε στάδιο ανάπτυξης του φυτού, είναι διαφορετική (ΥΠ.Α.Α.Τ., 2013). Η Ελλάδα ναι μια μεσογειακή χώρα με εύκρατο κλίμα και πληθώρα αμπελοκαλλιεργειών, στις οποίες βέβαια εντοπίζονται αρκετές ασθένειες και εχθροί που απειλούν την παραγωγή. Σύμφωνα με τις οδηγίες ολοκληρωμένης φυτοπροστασίας της αμπελοκαλλιέργειας (ΥΠ.Α.Α.Τ., 2013), αναφέρονται τρόποι αντιμετώπισης ενάντια σε:

Ασθένειες της αμπέλου:

Μυκητολογικές ασθένειες [Περονόσπορος (*Plasmopara viticola*), Ωίδιο (*Uncinula necator*), Βοτρύτης (*Botrytis cinerea*), Ευτυπίωση (*Eytypa lata*), Φόμοψη (*Phomopsis viticola*), Ίσκα (*Fomitiporia mediterranea*), Ασθένεια Petri (*Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Cylindrocarpon destructans*), Μελανή Νέκρωση Βραχιόνων (*Botryosphaeria dothidea*)]

Βακτηριολογικές ασθένειες [Βακτηριακή Νέκρωση της Αμπέλου (*Xanthomonas ampelina*), Όξινη Σήψη (Σακχαρομύκητες και βακτήρια)]

Φυσιολογικές (μη παρασιτικές) ασθένειες [Ξήρανση της Ράχης]

και εχθρούς:

Ακάρεα [Ακάρι Εσπεριδοειδών (*Brevipalpus lewisi*), Ερίνωση – Ακάρι ματιών (*Colomerus vitis*), Κοινός Τετράνυχος (*Tetranychus urticae*), Κόκκινος Τετράνυχος (*Panonychus ulmi*)]

Έντομα [Φυλλοξήρα (*Vitivirus vitifoliae*), Ευδεμίδα (*Lobesia botrana*), Ψευδόκοκκος (*Planococcus ficus*), Σκουλήκι των Ματιών (*Theresimima ampelophaga*), Ωτιόρρυγχος (*Otiorrhynchus spp.*), Πυραλίδα της Αμπέλου (*Sparganothis pilleriana*), Κοχυλίδα (*Euroecilia ambiguella*), Θρίπες της Αμπέλου (*Thripidae*)].

Παρά την εμφάνιση όλων των προαναφερόμενων στους ελληνικούς αμπελώνες, υπάρχουν ορισμένοι εχθροί και ασθένειες που προκαλούν μεγαλύτερο πρόβλημα για τους καλλιεργητές. Παρακάτω γίνεται σύντομη αναφορά σε αυτούς αλλά και ενδεδειγμένοι τρόποι αντιμετώπισης τους:

Φυλλοξήρα

Η φυλλοξήρα της αμπέλου [*Vitis vitifoliae* (Hemiptera: Phylloxeridae)] είναι γηγενές είδος εντόμου της Αμερικής (Wapshere and Helm, 1987) το οποίο εισέβαλλε στην Ευρώπη κατά τη δεκαετία του 1860 (Oinos, 2021) και αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους εχθρούς της αμπέλου (Powell, 2008). Το συγκεκριμένο έντομο μπορεί να προκαλέσει βλάβες στις ρίζες, όπου δημιουργεί νύγματα τα οποία οδηγούν σε χαμηλότερη προσρόφηση νερού από το φυτό, ενώ στα φύλλα, σχηματίζει οζίδια αφήνοντάς τα μόνιμα παραμορφωμένα (Stellwaag, 1927). Η συγκεκριμένη ασθένεια μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο το φυτό μέσα σε διάστημα 4 έως 7 χρόνων (Furkaliev, 1999). Στην ευρωπαϊκή άμπελο, το πρόβλημα επικρατεί στο ριζικό σύστημα ενώ δεν παρατηρείται κανένα πρόβλημα στο υπέργειο τμήμα των φυτών. Ο κύκλος του εντόμου ξεκινάει από κάποια αρχικά ενήλικα άτομα που ζευγαρώνουν στα φύλλα με την επόμενη εκκολαπτόμενη γενεά να μεταναστεύει στις ρίζες. Η μόνη αποτελεσματική θεραπεία είναι ο εμβολιασμός των επιθυμητών ευρωπαϊκών ποικιλιών σε ανθεκτικά αμερικάνικα υποκείμενα.

Ωίδιο της αμπέλου

Το ωίδιο [*Uncinola necator* (Ascomycota: Erysiphaceae)] πρόκειται για μυκητολογική ασθένεια που προκαλεί προβλήματα στους αμπελώνες παγκοσμίως και βρίσκεται ανάμεσα στις πιο σοβαρές ασθένειες της αμπέλου που προκαλεί ποιοτική και ποσοτική μείωση των αποδόσεων (Schulze-Lefert and Vogel, 2000) . Ο μύκητας

προσβάλλει όλα τα ευαίσθητα μέρη του φυτού (βλαστούς, φύλλα, τσαμπιά, κληματίδες, σταφύλια) τα οποία και καλύπτει με το μικκύλιο του αλλά μπορεί να δημιουργήσει και τις κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξη άλλων ασθενειών (π.χ. βοτρυτής) (Gadoury et al., 2011). Τα συμπτώματα της ασθένειας εμφανίζονται σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του φυτού με τη μορφή μια λευκής πούδρας, μέχρι και πριν το γυάλισμα των ραγών, ενώ η ανάπτυξη και η μετάδοση της ευνοείται σε θερμοκρασίες 25-30°C και συνθήκες υγρασίας. Η πρόληψη, καθιστά το μεγαλύτερο σύμμαχο για την αντιμετώπιση αυτής της ασθένειας ενώ στην περίπτωση της εξάπλωσης της η ορθή χρήση σκευασμάτων από θειούχες ενώσεις, αποτελεί πλέον τον οικονομικότερο και πιο αποτελεσματικό τρόπο αντιμετώπισης (Σμάλη, 2019).

Βοτρυτής - Τεφρά σήψη

Ο μύκητας *Botrytis cinerea* (Ascomycota: Sclerotiniaceae) αποτελεί από τους σημαντικότερους κινδύνους παραγωγής και υποβάθμισης της ποιότητας των σταφυλιών (Dean et al., 2012). Ενώ μπορεί να προσβάλλει όλα τα υπέργεια τμήματα του φυτού σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης, το μεγαλύτερο πρόβλημα διακρίνεται κυρίως πριν τον τρύγο αλλά και έπειτα από τη συγκομιδή και μεταφορά των ώριμων σταφυλιών. Τα συμπτώματα στις ράγες συγκεκριμένα, ξεκινούν με μια ωχρή κηλίδα στην επιφάνεια τους, η οποία εξαπλώνεται σταδιακά σε όλη την επιφάνεια και το εσωτερικό τους ώσπου οδηγούν σε μια υγρή σήψη και αποκόλληση της επιδερμίδας (Jarvis, 1962). Η διάδοση από ράγα σε ράγα οδηγεί σε ολοκληρωτική σήψη των τσαμπιών, φαινόμενο που ευνοείται ιδιαίτερα από υγρές και δροσερές περιόδους όπου δεν υφίσταται σωστός αερισμός των φυτών. Προληπτικές ή κατασταλτικές επεμβάσεις με τη χρήση χημικών (Steiger, 2007) αλλά και σωστές καλλιεργητικές φροντίδες σε συνδυασμό με χρήση ανθεκτικών ποικιλιών ως πρόληψη, αποτελούν τους βασικούς παράγοντες αντιμετώπισης.

Περονόσπορος

Ο περονόσπορος αποτελεί ίσως τη μεγαλύτερη μυκητολογική απειλή για τους αμπελώνες τόσο παγκοσμίως όσο και στην Ελλάδα και προκαλείται από τον μύκητα *Plasmopara viticola* (Oomycota: Peronosporaceae) (Schweinitz, 1837). Ευνοείται σε υγρές περιοχές με συχνές βροχοπτώσεις ενώ δρα κυρίως στα νεαρά τμήματα του φυτού (νεαροί βλαστοί, σταφύλια, φύλλα) κατά την περίοδο ανάπτυξης όπου το φυτό είναι πιο ευαίσθητο σε ασθένειες (Darriet et al., 2002; Stummer et al., 2005; Jermini et al.,

2010b; Gessler et al., 2011). Η εμφάνιση του μπορεί να παρατηρηθεί πρωτίστως στα φύλλα με την μορφή ωχρών κηλίδων, γνωστές και ως ‘κηλίδες ελαίου’ και εφόσον η ατμοσφαιρική υγρασία το επιτρέπει, αρχίζουν να εμφανίζονται λευκές εξανθήσεις στην κάτω επιφάνεια του ελάσματος (Σμάλη, 2019). Πρόκειται για τις καρποφορίες του μύκητα οι οποίες θα εξαπλωθούν σε όλα τα μέρη του φυτού και θα καταστρέψει την παραγωγή. Ανάμεσα στους τρόπους αντιμετώπισης, πέρα από τα προληπτικά μέτρα που μπορούν να παρθούν κατά την εγκατάσταση, τη συντήρηση και το κλάδεμα των αμπελώνων για την αποφυγή της δημιουργίας ιδανικών συνθηκών ανάπτυξης του μύκητα, προτείνεται και η προληπτική χρήση μυκητοκτόνων σκευασμάτων πριν την άνθηση (Plant protection, 2023).

Ψευδόκοκκος

Οι ψευδόκοκκοι είναι έντομα που ανήκουν στην οικογένεια Pseudococcidae (Hemiptera: Coccoidea) και πρόκειται για τα πιο σημαντικά παράσιτα της αμπέλου προκαλώντας τόσο άμεση καταστροφή και υποβάθμιση (μέσω της εξάπλωσης μούχλας αιθάλης), αλλά θέτει και τα θεμέλια για την μετάδοση ιών καθώς επιτίθενται σε όλα τα μέρη του φλοιώματος απορροφώντας φυτικά υγρά (McKenzie, 1967). Στην Ευρώπη εντοπίζονται τέσσερα είδη που αναπτύσσονται στα σταφύλια: *Planococcus ficus*, *Pl. citri*, *Helicococcus bohemicus* και *Phenacoccus aceris* (Sforza et al., 2003; Bertin et al., 2010; Cid et al., 2010). Μεταξύ διαφορετικών ειδών υπάρχουν μικρές διαφορές αλλά σε αυτά που πλήττουν τις αμπελοκαλλιέργειες παρατηρούνται τρία στάδια προνύμφης στα θηλυκά και τέσσερα στα αρσενικά (McKenzie, 1967; Ben-Dov, 1995; Wakgari and Giliomee, 2005). Συνολικά τα θηλυκά περνούν από μια ατελή μεταμόρφωση πέντε σταδίων ενώ τα αρσενικά περνούν από μια πλήρη μεταμόρφωση επτά σταδίων, με το τελικό να αποτελεί την ενήλικη μορφή που του επιτρέπει να πετάξει για τις ανάγκες της αναπαραγωγής (Vieux and Malan, 2013). Το είδος *Pl. ficus* φθάνει μέχρι επτά γενεές και κατά τη διάρκεια του χειμώνα διαχειμάζει κάτω από τον φλοιό του κορμού ή στις ρίζες του φυτού χωρίς ποτέ να υπάρχει κυριολεκτική διάπαυση. Πολλά άλλα παρασιτικά είδη (π.χ. *Leptomastidea abnormis*), έντομα, εχθροί και εντομοπαθογόνοι νηματοειδής μύκητες αποτελούν μια βιολογική αντιμετώπιση των ψευδόκοκκων ενώ προγράμματα διαταραχής ζευγαρώματος με τη χρήση φερομόνων έχουν αρχίσει να κερδίζουν δημοτικότητα τα τελευταία χρόνια (Walton et al., 2006).

Κεφάλαιο 2. Βιβλιογραφική Επισκόπηση

2.1 Βιολογική αντιμετώπιση εχθρών της αμπέλου

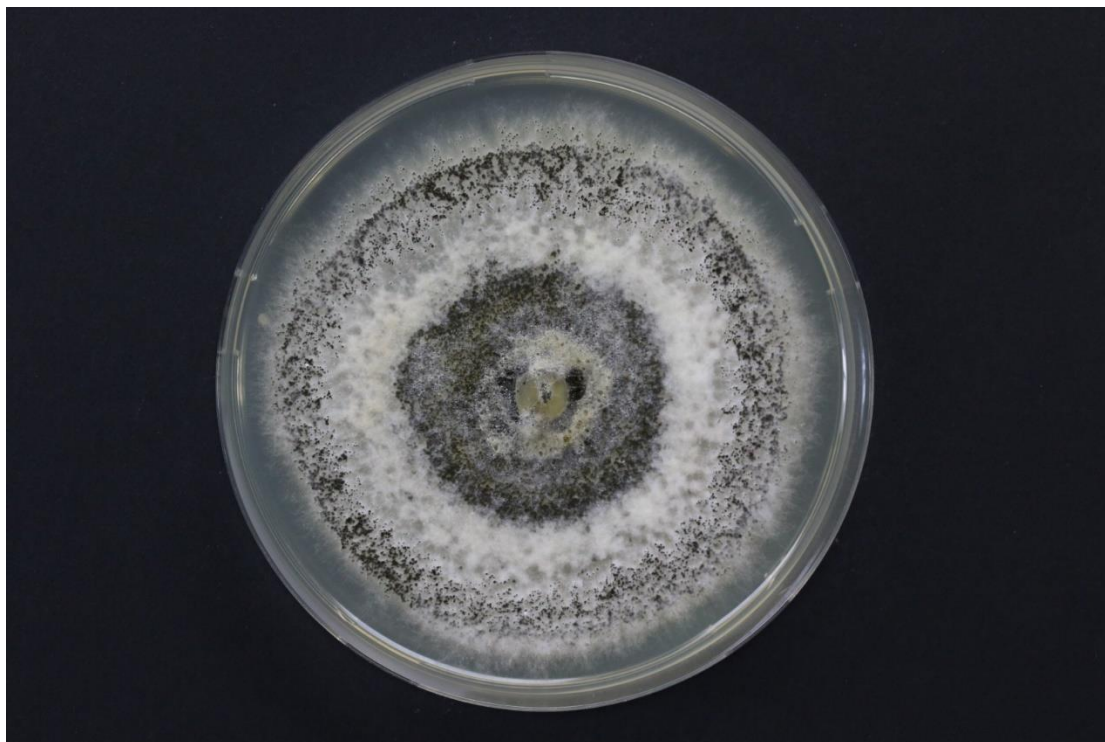
Οι αμπελώνες ανά τον κόσμο, μαζί με όλα τα υπόλοιπα φυτά και δένδρα, πλήττονται κάθε χρόνο από ασθένειες, επιβλαβή έντομα και παράσιτα, τα οποία οδηγούν σε απώλειες της παραγωγής ή/και υποβάθμιση της ποιότητας. Με την παγκόσμια αύξηση του πληθυσμού, τη συνεχή υποβάθμιση του περιβάλλοντος και τις έντονες ανησυχίες για τα συνθετικά παρασιτοκτόνα, τα τελευταία χρόνια, έχουν υιοθετηθεί καινούριες πρακτικές προστασίας ενάντια σε ασθένειες και εχθρούς των καλλιεργειών. Συγκεκριμένα, η οικολογική προσέγγιση της διαχείρισης αυτής της κρίσης με τη χρήση βιολογικών σκευασμάτων, αποτελεί μια υποσχόμενη εναλλακτική λύση έναντι των συνθετικών, που δρουν αρνητικά τόσο στο περιβάλλον, όσο και στην υγεία του ανθρώπου. Πρόκειται λοιπόν, για μια βιολογική μέθοδο καταπολέμησης εχθρών και ασθενειών με τη χρήση ζωντανών οργανισμών (Thakur et al., 2020). Τα βιοπαρασιτοκτόνα περιλαμβάνουν βιολογικούς, βιοχημικούς και προστατευτικούς παράγοντες που ενσωματώνονται στο φυτό. Οι βιολογικοί παράγοντες, ή αλλιώς τα μικροβιακά παρασιτοκτόνα, είναι προϊόντα που στηρίζονται σε ωφέλιμους οργανισμούς και δρουν κατά των φυτικών ασθενειών και επιβλαβών εντόμων.

Πράγματι, οι βιολογικοί παράγοντες ελέγχου (BΠΕ) προσδίδουν μια διαφορετική προσέγγιση στην βελτιστοποίηση των καλλιεργειών. Σε αυτή την κατηγορία, ανήκουν οι μικροοργανισμοί, τα φυτά και τα ζώα, με την βοήθεια των οποίων επιτυγχάνεται η διατήρηση των παράσιτων κάτω από τα επιτρεπτά όρια. Στους μικροοργανισμούς ανήκουν οι ιοί, τα βακτήρια, τα πρωτόζωα και οι μύκητες, ενώ τα δένδρα και πολλά είδη φυτών αποτελούν την ευρύτερη κατηγορία των φυτών (Thakur et al., 2020). Στην κατηγορία των ζώων περιλαμβάνονται αντίστοιχα οι νηματώδεις, τα ακάρεα, τα έντομα και οι αράχνες. Ο τρόπος δράσης όλων αυτών των παραγόντων διακρίνεται σε άμεσο, έμμεσο ή συνδυασμό και των δύο, με πιο αποτελεσματικό τον πρώτο. Σημείο καμπής, είναι ο τύπος της καλλιέργειας και η ασθένεια ή ο εχθρός που την βάζει σε κίνδυνο, ενώ πολλές φορές ο σωστός συνδυασμός και των δύο μεθόδων αντιμετώπισης μπορεί να επιφέρει το επιθυμητό αποτέλεσμα (Smagghe, 2023).

2.2 Εντομοπαθογόνοι μύκητες

Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες ανήκουν σε μια ομάδα φυλογενετικά ποικίλων, ετερότροφων, ευκαρυωτικών οργανισμών, είτε μονοκύτταρων είτε πολυκύτταρων (νημάτων), οι οποίοι αναπαράγονται μέσω σεξουαλικών ή ασεξουαλικών σπορίων, ή και των δύο. Αυτοί οι οργανισμοί διαθέτουν χιτινοποιημένα ακινητοποιημένα κύτταρα (Badii and Abreu, 2006). Ο όρος "εντομοπαθογόνος" αναφέρεται σε μικροοργανισμούς οι οποίοι επιτίθενται σε έντομα, χρησιμοποιώντας τα ως ξενιστές για την ανάπτυξη ενός μέρους του κύκλου ζωής τους (Delgado and Murcia, 2011). Αυτοί οι μύκητες μπορεί να μειώσουν τους πληθυσμούς εντόμων και παρασίτων σε επίπεδα που δεν προκαλούν οικονομική ζημιά στις καλλιέργειες (Tanzini et al., 2001) ή να λειτουργούν ως μέσο ελέγχου για τη μείωση των φορέων της αντίστοιχης νόσου (Scholte et al., 2004). Ορίζονται επίσης ως προαιρετικά ή υποχρεωτικά παράσιτα εντόμων, με υψηλή ικανότητα παραγωγής σπορίων και επιβίωσης (Delgado and Murcia, 2011). Αποτελούν μια ομάδα μεγάλου ενδιαφέροντος για τη βιολογική καταπολέμηση των εντόμων καθώς το 80% περίπου των ασθενειών που εμφανίζονται στα έντομα οφείλονται σε μύκητες οι οποίοι μπορούν να οδηγήσουν στο θάνατο τους (Batista, 1989).

Υπάρχουν μύκητες που μπορούν να εισβάλλουν σε νεκρά έντομα, οι οποίοι χαρακτηρίζονται ως σαπροφάγοι, και μύκητες που μολύνουν ζωντανούς οργανισμούς, γνωστοί ως εντομοφάγοι (Butt et al., 2006). Από τα εκτιμώμενα 1,5 έως 5,1 εκατομμύρια είδη μυκήτων σε όλο τον κόσμο (Hibbett et al., 2007), περίπου 750 έως 1.000 είναι εντομοπαθογόνοι και κατατάσσονται σε περισσότερα από 100 γένη (St. Leger and Wang, 2009). Επομένως, οι εντομοπαθογόνοι μύκητες αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα ταξινομημένων οργανισμών που προκαλούν ασθένειες στα έντομα (Ignoffo, 1973). Σύμφωνα με την έρευνα του De Faria και Wraight (2007), έχουν δημιουργηθεί 171 προϊόντα βιοελέγχου βασισμένα σε μύκητες από τη δεκαετία του 1960, με τα περισσότερα να βασίζονται σε είδη όπως: *B. bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Metarhizium anisopliae*, και *Isaria fumosorosea*.



Εικόνα 1: Αποικία 25 ημερών εντομοπαθογόνου μύκητα *Metarhizium robertsii* (EF047) σε συνθετικό υπόστρωμα BSM σε θερμοκρασία 25°C [Fläche Kellersgrube, Geisenheim].

Είναι ευρέως γνωστό ότι οι καλλιεργητές χρησιμοποιούν χημικά φυτοφάρμακα εδώ και δεκαετίες για τον έλεγχο των εντόμων. Παρά την αποτελεσματικότητα των χημικών εντομοκτόνων, τα οποία είναι ακριβά και παρέχουν προσωρινή ανακούφιση στους καλλιεργητές, η ανάπτυξη αντοχής των εντόμων μαζί με τις αρνητικές επιπτώσεις στις καλλιέργειες και στην ανθρώπινη υγεία, οδήγησαν ακόμα παραπάνω στην ανάγκη για ανάπτυξη μιας εναλλακτικής, βιολογικής λύσης. Η βιολογική φυτοπροστασία περιλαμβάνει τη χρήση μυκήτων για τη μείωση του πληθυσμιακού δυναμικού των εντόμων με απώτερο σκοπό τη μείωση της δραστηριότητάς τους και, κατ' επέκταση, των ζημιών ή την υποβάθμιση της ποιότητας στα καλλιεργούμενα φυτά. Ο βιολογικός έλεγχος αποτελεί έναν τομέα με ευρεία αναγνώριση που ξεκίνησε το 1762 για πρώτη φορά με την εισαγωγή του πτηνού 'mynah' (*Acridotheres tristis*) από την Ινδία στο Μαυρίκιο για τον έλεγχο της ερυθρής ακρίδας *Nomadacris septemfasciata*. Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες ανήκουν στους πρώτους οργανισμούς που επιλέχθηκαν για τον βιολογικό έλεγχο των εντόμων και διαδραματίζουν έναν κρίσιμο ρόλο στα προγράμματα βιώσιμης διαχείρισης των εντόμων.

Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες αποτελούν αναπτυσσόμενο πεδίο στον τομέα του βιολογικού ελέγχου, παρουσιάζοντας αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα

συμβατικά εντομοκτόνα. Σε αυτά περιλαμβάνονται το χαμηλό κόστος, η υψηλή αποτελεσματικότητα, η ασφάλεια ως προς τους ευεργετικούς οργανισμούς, η μείωση των υπολειμμάτων στο περιβάλλον και η αύξηση της βιοποικιλότητας στο οικοσύστημα (Beris et al., 2024; Lacey et al., 2001; Asi et al., 2013; Ortiz-Urquiza and Keyhani, 2013; Gul et al., 2014).

Οι συγκεκριμένοι ΒΠΕ διακρίνονται από ένα μοναδικό τρόπο μόλυνσης. Αντίθετα με τα βακτήρια και τους ιούς, οι εντομοπαθογόνοι μύκητες δεν απαιτούν την κατανάλωσή τους, αλλά έρχονται σε επαφή με την επιδερμίδα και εισβάλλουν απευθείας στους οργανισμούς 'ξενιστές'. Καλύπτουν λοιπόν ένα εξαιρετικά σημαντικό κενό στο μικροβιολογικό έλεγχο των εντόμων-εχθρών. Σχεδόν όλες οι τάξεις εντόμων είναι ευαίσθητες στις μυκητολογικές ασθένειες. Οι μύκητες είναι πιθανοί παράγοντες ελέγχου κυρίως λόγω των υψηλών αναπαραγωγικών τους ικανοτήτων, της ειδικής δραστηριότητας στόχου, του σύντομου χρόνου γενεών και της φάσης ανάπαυσης ή σαπροφυτικής φάσης παραγωγής, η οποία μπορεί να εξασφαλίσει την επιβίωσή τους για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα όταν δεν υπάρχει ξενιστής. Ωστόσο, ένας βασικός όρος για την εκτεταμένη χρήση ενός εντομοπαθογόνου μύκητα ως βιολογικού παράγοντα ελέγχου είναι η ευαισθησία του εντόμου σε αυτούς και η ικανότητα παρασιτισμού κάθε αυτή του μύκητα. Η δυνατότητα του μύκητα να προκαλέσει μόλυνση εξαρτάται από την επιλογή ενός σταθερού στελέχους με ειδική αποτελεσματικότητα για τον συγκεκριμένο ξενιστή στόχο. Η αναπαραγωγή των μυκήτων για τον έλεγχο των εντόμων μπορεί πλέον να επιτευχθεί με τη χρήση σύγχρονων βιοτεχνολογικών εργαλείων. Για να ενσωματωθεί ο βιολογικός έλεγχος στη σύγχρονη γεωργία, πρέπει να διαμορφωθούν ορισμένοι στόχοι, όπως η επιλογή και ανάπτυξη ενός συστήματος ζύμωσης για την παραγωγή βιομάζας και η δημιουργία ενός συστήματος διατύπωσης και παράδοσης που συμβαδίζει με τις απαιτήσεις του μικροοργανισμού, καθώς και με τις κοινές γεωργικές πρακτικές.

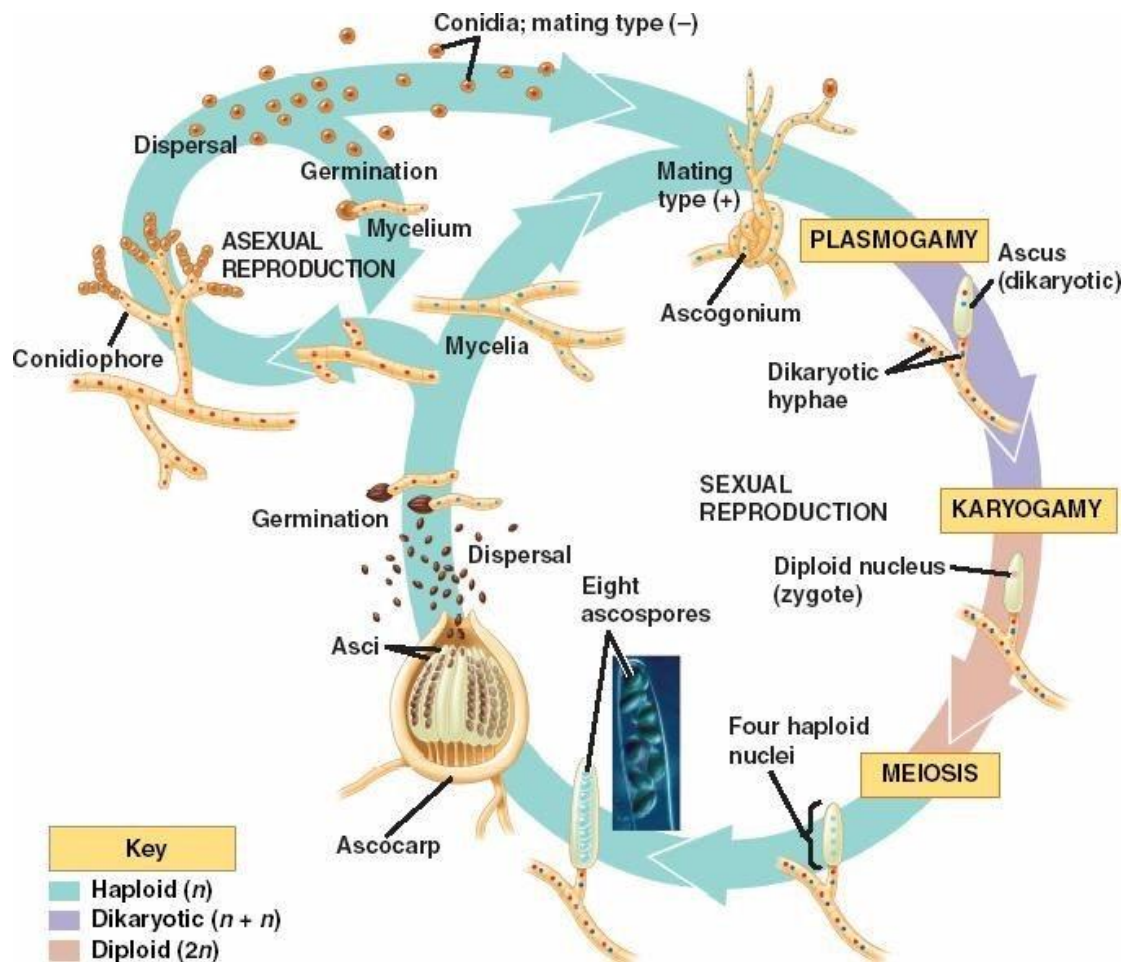
Πράγματι, η εφαρμογή των εντομοπαθογόνων μυκήτων στον βιολογικό έλεγχο των εντόμων αντιπροσωπεύει έναν θεμελιώδη πυλώνα λόγω των περιβαλλοντικών ανησυχιών και της ανησυχίας για την ασφάλεια των τροφίμων. Παρόλα αυτά, εντοπίζονται ορισμένοι περιορισμοί στη χρήση των μυκήτων ως εντομοκτόνα, όπως: α) η περιορισμένη διάρκεια ζωής τους σε μορφή προϊόντος, β) η απαίτηση 2-3 εβδομάδων για την εξάλειψη των εντόμων, γ) η ανάγκη για μια περίοδο παύσης των μυκητοκτόνων, δ) η αναγκαιότητα συγχρονισμού της εφαρμογής με υψηλά επίπεδα σχετικής υγρασίας και ε) το υψηλό κόστος παραγωγής (Sinha et al., 2016). Επιπλέον,

δεν είναι δυνατό να εξαιρεθούν οι πιθανότητες επιμόλυνσης των καλλιεργειών με μυκοτοξίνες (αφλατοξίνες, τριχοθεκένια, ζεαραλενόνη, φουμονισίνες, κιτρινίνη κ.λπ.) που παράγονται από διάφορους σαπροφυτικούς μύκητες.

2.2.1 Βιολογία εντομοπαθογόνων μυκήτων

Οι μύκητες ανήκουν στο βασίλειο των ευκαρυωτικών ετερότροφων οργανισμών. Ως ετερότροφοι οργανισμοί, απορροφούν τροφή από το περιβάλλον μέσω των τοιχωμάτων τους. Εκτός από τους καθιερωμένους μακροσκοπικούς μύκητες, όπως ταμανιτάρια και οι μούχλες, το βασίλειο περιλαμβάνει πολλούς μικροσκοπικούς οργανισμούς, όπως είναι οι ζυμομύκητες και τα σπόρια. Τα κυτταρικά τοιχώματα των μυκήτων περιέχουν κυρίως χιτίνη και γλυκάνες και είναι συνήθως άκαμπτα. Αν και ορισμένα είδη είναι μονοκύτταρα (π.χ. οι ζυμομύκητες), οι μύκητες κυρίως εμφανίζονται ως πολυκύτταροι και νηματώδεις, με σωληνοειδή μορφολογία και διαφραγματικό μικκύλιο ή δίχως χωρίσματα.

Η αναπαραγωγή των μυκήτων είναι πολύπλοκη. Εκτιμάται ότι το ένα τρίτο όλων των μυκήτων χρησιμοποιεί περισσότερες από μία μέθοδο πολλαπλασιασμού. Οι μύκητες μπορούν να αναπαραχθούν είτε σεξουαλικά είτε σεξουαλικά. Η σεξουαλική αναπαραγωγή συμβαίνει με τον σχηματισμό ειδικών αναπαραγωγικών κυττάρων, γνωστών ως σπόρια, μέσω μίτωσης στο γονικό κύτταρο (διαίρεση, εκβλάστηση και κατακερματισμός). Η σεξουαλική αναπαραγωγή λαμβάνει χώρα με τη σύζευξη γεννητικών οργάνων, κυττάρων ή πυρήνων, δημιουργώντας φυλετικά σπόρια και επανασυνδυάζοντας τις γενετικές τους πληροφορίες.



Εικόνα 2: Βιολογικός κύκλος των ασκομυκήτων με εγγενή (σεξουαλική) και αγενή (ασεξουαλική) αναπαραγωγή
 Πηγή: <https://sites.gsu.edu/alu6/2019/04/20/16/>

Υπολογίζεται ότι η πληθώρα των μυκήτων ανέρχεται σε 1,5 έως 5 εκατομμύρια είδη (Blackwell, 2011; Hawksworth and Rossman, 1997). Παρόλα αυτά, μόνο 100.000 έχουν περιγραφεί έως σήμερα (Kirk et al., 2001). Αυτά τα είδη ταξινομούνται σε επτά διαφορετές συνομοταξίες: Microsporidia, Neocallimastigomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Entomophthoromycota, Basidiomycota και Ascomycota. Ορισμένα είδη λόγω έλλειψης δεδομένων, δεν έχουν ανατεθεί ακόμη σε κάποια συνομοταξία (Hibbett et al., 2007). Ο πιο συνηθισμένος τρόπος που χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση ενός μύκητα σε μια δεδομένη ομάδα βασίζεται στα χαρακτηριστικά της σεξουαλικής αναπαραγωγής ή στη χρήση μοριακών δεδομένων. Πολλοί κοινοί και σημαντικοί εντομοπαθογόνοι μύκητες ανήκουν στην τάξη των Hyrocreales και Clavicipitales των Ascomycota. Οι ασκομύκητες ταξινομούνται σε τρεις ομοταξίες. Δύο από αυτές τις ομοταξίες δεν έχουν παθογόνο δράση έναντι των εντόμων.

Στην κατηγορία των εντομοπαθογόνων μυκήτων, υπάρχει μια προτίμηση στην ασεξουαλική μορφή αναπαραγωγής (Sung et al., 2006). Τα κονίδια (ασεξουαλικά σπόρια) που σχηματίζονται σε πτώματα εντόμων μπορούν να παραχθούν απευθείας από τους κονιδιοφόρους, όπως παρατηρείται στην περίπτωση των ειδών *Metarhizium* όταν μολύνουν ενήλικα έντομα και προνύμφες (Mora et al., 2018b).

Τα εντομοπαθογόνα είδη μυκήτων είναι γνωστά για την επίδρασή τους σε όλα τα φυτά, εκτός από αυτά που ανήκουν στα Neocallimastigomycota και τα Glomeromycota που αποτελούνται σχεδόν αποκλειστικά από μυκορριζικούς μύκητες, με μια μοναδική εξαίρεση, τον *Geosiphon pyrimeriii*, που σχηματίζει μια μορφή συμβίωσης με κυανοβακτήρια (Kutzing, 1849).

Τα Microsporidia μολύνουν 14 τάξεις εντόμων, ενώ τα Ascomycota (κυρίως είδη της τάξης Hygrocreales) και τα Entomophthoromycota μολύνουν 13 και 10 τάξεις, αντίστοιχα. Επιπλέον, τα Chytridiomycota μολύνουν 3 τάξεις και τα Basidiomycota μολύνουν 2 τάξεις.

Οι συνομοταξίες Entomophthoromycota και Ascomycota παρουσιάζουν την υψηλότερη ποικιλομορφία μεταξύ των εντομοπαθογόνων μυκήτων. Σε αυτές παρατηρείται μια πολύπλοκη στρατηγική μόλυνσης και μετάδοσης μέσω του χειρισμού της συμπεριφοράς του ξενιστή (Hughes et al., 2015). Η ευρεία αυτή αντιπροσώπευση σε ταξινομικά επίπεδα έχει οδηγήσει στη διαμόρφωση ετερογενών οικολογικών ομάδων από πολλές πλευρές. Ένα παράδειγμα αυτής της ετερογένειας είναι η ποικιλομορφία που παρατηρείται στη μορφολογία των μυκήτων. Όσον αφορά τους βιότοπους, χαρακτηρίζονται εξίσου από την εντυπωσιακή ποικιλομορφία. Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες έχουν εντοπιστεί και αναγνωριστεί τόσο σε αφρικανικές ερήμους (Evans & Shah, 2002) όσο και σε υδάτινα περιβάλλοντα, όπως λίμνες και ρυάκια (Frances et al., 1989). Παρόλα αυτά, η μεγαλύτερη ποικιλομορφία εντοπίζεται στα τροπικά δάση παγκοσμίως, όπου μύκητες μολύνουν από αρθρόποδα στο έδαφος (π.χ. αράχνες της καταπακτής) έως προνύμφες σκαθαριών και κάμπιες μέχρι μυρμήγκια, σφήκες, μέλισσες καθώς και ομόπτερα.

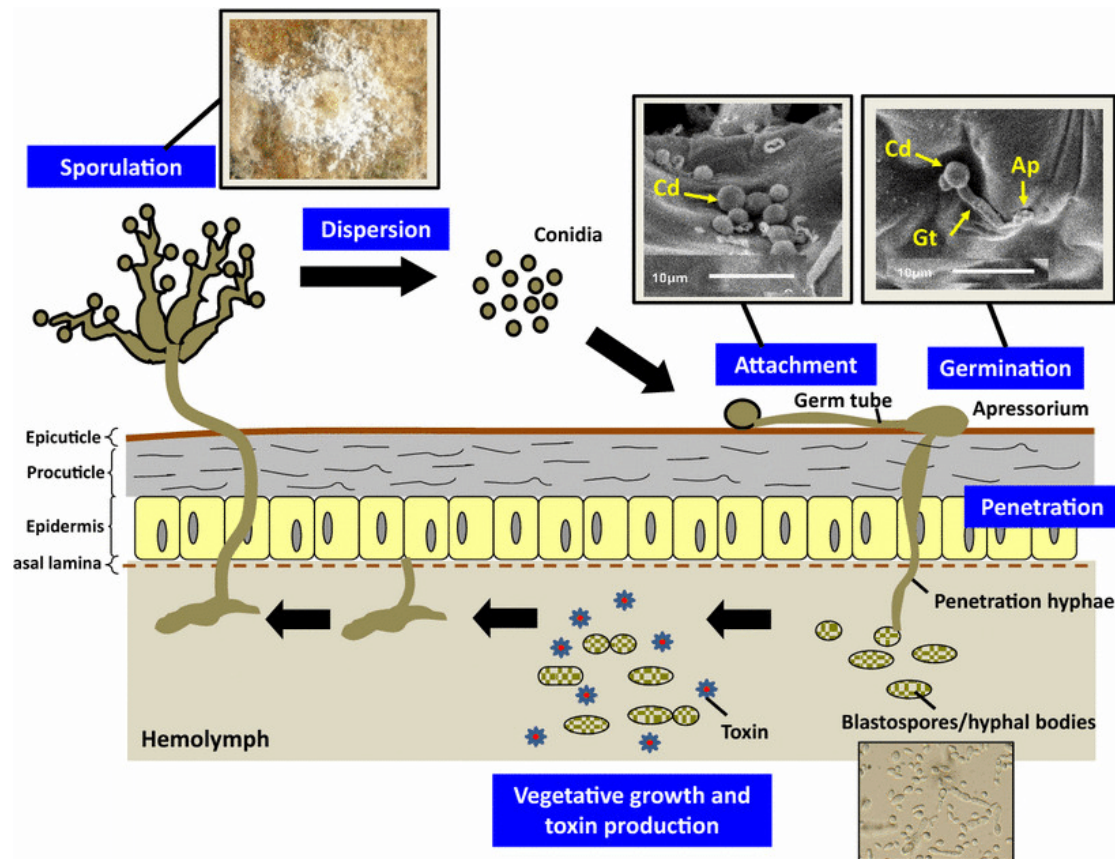
Ο ετερότροφος μεταβολισμός τους, τους επιβάλλει έναν τρόπο ζωής που εξαρτάται από έναν ξενιστή. Ανάλογα με το αν η σχέση είναι ουδέτερη, βλαβερή ή πλεονεκτική για τον οργανισμό ξενιστή, οι μύκητες διακρίνονται αντίστοιχα σε σαπρόφυτα, παράσιτα και συμβιωτικά. Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες βρίσκονται στο περιβάλλον κυρίως με τη μορφή σπορίων. Τα έντομα μολύνονται όταν έρθουν σε επαφή με τα σπόρια, τα οποία μπορεί να βρίσκονται στην επιφάνεια φυτών, στον αέρα

ως αερομεταφερόμενα σωματίδια, στο έδαφος ή σε σώματα ήδη νεκρών εντόμων. Τα περισσότερα είδη εντομοπαθογόνων μυκήτων παράγουν σπόρια που αντέχουν μια μόνο εποχή του χρόνου ή το πολύ ένα χρόνο. Λίγα είδη παράγουν σπόρια που μπορούν να παραμείνουν μολυσματικά στο έδαφος για πολλά χρόνια.

2.2.2 Μηχανισμοί δράσης

Μέχρι σήμερα έχουν εντοπιστεί περίπου 750 διαφορετικά είδη μυκήτων που προκαλούν μόλυνση σε έντομα και ακάρεα. Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες επιτίθονται σε ένα ευρύ φάσμα εντόμων και ακάρεων, ενώ τα είδη και τα στελέχη τους είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένα. Τα σπόριά τους μολύνουν τον ξενιστή τους, αρχικά αναπτυσσόμενα στην επιφάνειά τους και στη συνέχεια εξελισσόμενα μέσα στο σώμα τους. Ανάλογα με το είδος του μύκητα και τον αριθμό των σπορίων που παράγει, επέρχεται εν τέλει ο θάνατος του εντόμου-ξενιστή εντός 4-10 ημερών. Μετά το θάνατο, ο μύκητας παράγει χιλιάδες νέα σπόρια πάνω στο νεκρό σώμα του εντόμου, τα οποία διασπείρονται συντελώντας στην εξάπλωση της ασθένειας σε νέους ξενιστές. Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά των εντομοπαθογόνων μυκήτων είναι ότι για να μολύνουν τον ξενιστή τους δεν απαιτείται η είσοδος στο σώμα του εντόμου μέσω του πεπτικού συστήματος, όπως συμβαίνει με άλλα βιολογικά παθογόνα (π.χ. το *Bacillus thuringiensis*). Αυτό που συμβαίνει όμως είναι ότι η μόλυνση πραγματοποιείται εξωτερικά με την προσκόλληση των σπορίων (κονιδίων) στον εξωσκελετό του εντόμου (Νατσιόπουλος et al., 2020).

Η αρχική μόλυνση συνήθως προκύπτει μέσω της πλευρικής μεμβράνης της κοιλίας και των αναπνευστικών στομάτων του εντόμου-ξενιστή, καθώς εκεί η υγρασία είναι υψηλότερη, προάγοντας την ανάπτυξη των κονιδίων. Αντίθετα, η επιφάνεια του εξωσκελετού είναι λιγότερο ανθεκτική και πιο εύκολα διατρήσιμη.



Εικόνα 3: Επισκόπηση του βασικού κύκλου μόλυνσης των ασπόνδυλων από το μύκητα *Beauveria bassiana*.

Πηγή: <https://www.researchgate.net/publication/308172345> The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide

Ολόκληρη η διαδικασία δράσης του μύκητα κατά του εντόμου-ξενιστή μπορεί να απλουστευτεί σε τέσσερα (4) στάδια (Νατσιόπουλος et al., 2020):

Η προσκόλληση των κονιδίων

Το δέρμα του εντόμου αποτελείται από αρκετά επίπεδα προστασίας που συνεισφέρουν στην αντοχή κατά των χημικών εντομοκτόνων. Συγκεκριμένα, από την εξωτερικό επίπεδο προς το εσωτερικό, τα επίπεδα αυτά περιλαμβάνουν το επι-επιδέρμιο, το προεπιδέρμιο και την επιδερμίδα (Γκίικας, 2008). Τα κονίδια των ΕΠΜ διαθέτουν διάφορες κυλινδρικές δομές στην επιφάνειά τους, οι οποίες χρησιμοποιούνται για να προσκολληθούν σε υδροφοβικές επιφάνειες, όπως ο εξωσκελετός των εντόμων. Η προσκολλητική φύση αυτού του στρώματος παρέχει την αναγκαία μηχανική υποστήριξη κατά την αρχική διείσδυση του μύκητα. Βέβαια, τα υδρόφοβα κονίδια του μύκητα προσκολλώνται στο επί-επιδέρμιο αρχικά με μη ειδικό τρόπο, χωρίς να λαμβάνουν υπόψη την ανθεκτικότητα του εντόμου.

Η ανάπτυξη των κονιδίων

Ο εξωσκελετός του εντόμου καθώς και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που επικρατούν τη δεδομένη στιγμή της αρχικής προσβολής, επηρεάζουν άμεσα την ανάπτυξη των προσκολλημένων κονιδίων. Συνήθως, τα περισσότερα κονίδια αναπτύσσονται εντός 6-18 ωρών. Ο μύκητας μπορεί να μολύνει το έντομο διεισδύοντας είτε απευθείας μέσα στο δέρμα από το αναπτυσσόμενο κονίδιο, είτε με περιφερειακή ανάπτυξη στην επιφάνεια του. Συνήθως, η διείσδυση πραγματοποιείται μέσα από την κοιλία ή το θώρακα και ποτέ από το κεφάλι ή άλλα μέρη του σώματος ενώ η δημιουργία διεισδυτικού βλαστικού σωλήνα δεν εκδηλώνεται σε έντομα που είναι ανθεκτικά.

Η διείσδυση

Κατά τη διάρκεια της διείσδυσης οι εντομοπαθογόνοι μύκητες τρέφονται συνεχώς από τα θρεπτικά στοιχεία που υπάρχουν στο δέρμα του ξενιστή. Η διείσδυση είναι ταυτόχρονα μηχανική και ενζυματική διαδικασία και συνήθως συμβαίνει μεταξύ 24 και 48 ωρών, κάτω υπό ιδανικές συνθήκες. Το επιδέρμιο ως το τελευταίο επίπεδο προστασίας του εντόμου, περιλαμβάνει μηχανισμούς δράσης εναντίον των μυκήτων καθώς παράγουν μυκητοστατικές ενώσεις οι οποίες εμποδίζουν την ανάπτυξη των υφών των μυκήτων. Τα υδρολυτικά ένζυμα των μυκήτων ωστόσο ενδέχεται να απελευθερώσουν μόρια σήματος και να καταστρέψουν αυτές τις μυκητοστατικές ενώσεις. Το συγκεκριμένο στάδιο της μόλυνσης μπορεί να καθορίσει τη συμβατότητα μεταξύ μύκητα και ξενιστή αλλά και την ταχύτητα με την οποία οι εντομοπαθογόνοι μύκητες θα εισβάλλουν στον αιμόκοιλο και θα προκαλέσουν το θάνατο του εντόμου. Αξίζει να σημειωθεί μια διαφορετική προσέγγιση ορισμένων μυκήτων. Στις περιπτώσεις που τα κονίδια του μύκητα προσκολλώνται σε φτωχές, σκληρές και υδρόφοβες επιφάνειες των εντόμων, μπορεί να παρατηρηθεί η διαφοροποίησή τους σε απρεσσόρια. Τα απρεσσόρια των περισσότερων μυκήτων παράγουν ένα πλούσιο παράγοντα βλέννας που διευκολύνει την προσκόλληση του μύκητα κατά τη διείσδυση.

Ανάπτυξη - Σποροποίηση.

Μετά την είσοδο στο σώμα του ξενιστή, ο μύκητας αναπτύσσει μικκύλιο που εξαπλώνεται εντός του εντόμου. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, ο μύκητας παράγει τοξίνες ή μεταβολίτες που αυξάνουν την παθογένειά του εναντίον του ξενιστή. Με την είσοδο του μύκητα στον αιμόκοιλο, αναπτύσσονται παράλληλα λεπτότοιχες μονο - ή

πολυκυτταρικές υφές. Ορισμένες φορές αυτά τα σφαιρικά-ωοειδή εκβλαστήματα αναφέρονται σε βλαστοσπόρια. Ο θάνατος του εντόμου συνήθως προκύπτει από την απορρόφηση θρεπτικών στοιχείων του ξενιστή, από μηχανική ζημιά στους ιστούς που επηρεάζει τη φυσιολογία του, καθώς και από την ασιτία που προκαλείται από τον μύκητα.

Όπως στα παθογόνα που προσβάλλουν τα φυτά, έτσι και στους εντομοπαθογόνους μύκητες, συμμετέχουν γονίδια και προϊόντα εξειδικευμένων γονιδίων παθογένειας του μύκητα, καθώς και γονίδια ανθεκτικότητας του ξενιστή, για την προαγωγή της μόλυνσης. Όταν ο παθογόνος μύκητας ανιχνεύσει το αρχικό σήμα, προκαλείται η ανάπτυξη και η διαφοροποίησή του, ενώ ταυτόχρονα οι τοξικές ουσίες που παράγονται οδηγούν στον θάνατο του εντόμου-ξενιστή (Charnley, 1984). Κατά τη διάρκεια της φάσης του εγκατάστασης, ο μύκητας αντιμετωπίζει την ανοσολογική απόκριση του εντόμου-ξενιστή, και γι' αυτό παράγει δευτερογενείς μεταβολίτες που φαίνεται να καταστέλλουν την κυτταρική και χημική άμυνα του εντόμου (Vilkinskas et al., 1997; Gillespie et al., 2000; Vey et al., 2001). Πρόκειται συνολικά για ένα πολύπλοκο σύστημα σηματοδότησης που περιλαμβάνει G πρωτεΐνες, υποδοχείς, κινάσες και δευτερογενείς μηνύτορες και έχει ως στόχο την αναγνώριση του ξενιστή και την προαγωγή της σύνθεσης των κατάλληλων αποικοδομητικών ενζύμων (Butt, 2002).

2.2.3 Εφαρμογή τους σε προγράμματα ολοκληρωμένης αντιμετώπισης

Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες έχουν χρησιμοποιηθεί σε προγράμματα ολοκληρωμένης διαχείρισης και εξάλειψης παρασίτων για τουλάχιστον 150 χρόνια. Κατά κανόνα αυτοί οι μύκητες ανήκουν στη τάξη των Hypocreales και τα πιο συνηθισμένα είδη που στοχεύουν στα αρθρόποδα είναι τα *Beauveria bassiana*, *Cordyceps fumosorosea* (πρώην *Isaria fumosorosea*), *Akanthomyces muscarius* (πρώην *Lecanicillium musocarium*) και το σύμπλεγμα ειδών *Metarhizium anisopliae* (συμπεριλαμβανομένων των *M. robertsii* και *M. brunneum*) (Inglis et al., 2001; Khachatourians and Qazi, 2008).

Η έκθεση των εντόμων-παράσιτων σε αυτούς τους μύκητες γίνεται μέσω μια κατακλυσμαίας προσέγγισης που παράλληλα εκθέτει και τους μύκητες σε δυσμενείς συνθήκες ανάπτυξης (θερμοκρασία, φως του ήλιου και υγρασία) και μειώνει την λοιμογόνο δράση των μυκητιακών σπορίων (Burges, 1998; Sutanto et al., 2022). Ωστόσο, παρά την αρνητική επίδραση ορισμένων αβιοτικών παραγόντων, τουλάχιστον 170 στελέχη έχουν χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία μυκοπαρσιτοκτόνων και παρέχουν καλύτερα αποτελέσματα και οφέλη από άλλα συμβατικά χημικά παρασιτοκτόνα που διατίθενται στην αγορά (Bamisile et al., 2021). Παράλληλα, έχουν δημιουργηθεί αρκετά σκευάσματα με στόχο την αύξηση της διάρκειας ζωής και την αντοχή του εντομοπαθογόνου μύκητα στις υπεριώδεις ακτινοβολίες UV (Batista et al., 2017; Litwin et al., 2020; Mazza et al., 2014) και συνεχίζονται να διερευνούνται εντατικά για την ενσωμάτωση τους σε προγράμματα ολοκληρωμένης αντιμετώπισης. Τα περισσότερα παρασιτοκτόνα χρησιμοποιούν *M. anisopliae* (33,9%), *B. bassiana* (33,9%), *I. fumosorosea* (5,8%) και *B. brongniartii* (4,1%) ως το βασικό δραστικό συστατικό (Islam et al., 2021) και έχουν περάσει τα απαιτούμενα στάδια καταχώρησης για να διατεθούν στην αγορά (Wraight et al., 2001; De Faria and Wraight, 2007). Μια σημαντική παρατήρηση είναι ότι ορισμένοι εντομοπαθογόνοι μύκητες όπως οι *B. bassiana* και *M. anisopliae* μπορούν να μολύνουν ένα ευρύ φάσμα ξενιστών ενώ άλλοι (π.χ. *Aschersonia spp.*) μπορούν να εμφανίσουν ένα πολύ στενό εύρος αντίστοιχα.

Αρθρόποδα - παράσιτα όπως ακρίδες, θρίπες και αφίδες (Gulzar et al., 2021) , σκώροι (Ali et al., 2015; Tahir et al., 2019), κάμπιες, ακάρεα κ.α. αποτελούν στόχους αυτών των εντομοπαθογόνων μυκήτων και έχουν παρατηρηθεί υψηλά επίπεδα θνησιμότητας. Ακόμη, έχουν πραγματοποιηθεί επιτυχώς προγράμματα αντιμετώπισης ενάντια σε λευκές μύγες, κουνούπια, τεφριτιδικές μύγες (Dong et al., 2016; Bamisile et al., 2020; Canassa et al., 2020; Usman et al., 2020) ακόμη και ενάντια σε φυτοπαθογόνους μύκητες και άλλα παράσιτα του εδάφους (Pocasangre et al., 2000). Συγκεκριμένα, ο πρώτος μύκητας που χρησιμοποιήθηκε ως μυκοεντομοκτόνο ενάντια σε αφίδες και έντομα για χρήση σε καλλιέργειες θερμοκηπίων μικρής και μεσαίας κλίμακας ήταν ο *L. lecanii* (Shah and Pell, 2003).

Στη Ρωσία (πρώην ΕΣΣΔ) του 1980 χρησιμοποιήθηκε ένα μυκοπαρσιτοκτόνο από τον μύκητα *B. bassiana* ονόματι 'Boverin' για τη ρύθμιση του σκαθαριού πατάτας του Κολοράντο (*Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae) και του σκόρου της μηλιάς (*Cydia pomonella* Linnaeus (Lepidoptera:

Tortricidae) σε μεγάλες εκτάσεις καλλιέργειας. Ο ίδιος μύκητας χρησιμοποιήθηκε ξανά για τη δημιουργία του μυκοεντομοκτόνου ‘Mycotrol’ και καταχωρήθηκε επίσημα για χρήση το 1999 κατά των εντόμων που επηρεάζουν δέντρα και καλλιέργειες αγρών. Ένα άλλο μυκοπαρασιτοκτόνο ‘Green muscle’ που κατασκευάστηκε βασισμένο σε αποξηραμένα κονίδια του μύκητα *Metarhizium anisopliae* var. *Acridum* στην Αφρική μεταξύ 1985-1989, στόχευε στον έλεγχο της επιδημίας της ακρίδας της ερήμου (*Schistocerca gregaria* Forskal (Orthoptera: Acrididae) (Bateman et al., 1998). Τα αποτελέσματα ήταν εξαιρετικά ενθαρρυντικά καθώς μέσα σε 2-3 εβδομάδες από την χορήγηση του προϊόντος παρουσιάστηκε έως και 90% θνησιμότητα στις ακρίδες και τα παρεμφερή είδη χωρίς ταυτόχρονα να σημειωθούν παρενέργειες σε άλλους ωφέλιμους οργανισμούς (Lomer et al., 2001).

Γενικά, η χρήση και η παραγωγή μυκοπαρασιτοκτόνων που συνήθως συναντώνται στην Βόρεια και Νότια Αμερική, την Ευρώπη και την Ασία, και βασίζονται σε ΕΠΜ, διαφέρει σημαντικά ανά τον κόσμο. Συγκεκριμένα, η Ινδία έχει τουλάχιστον 188 εγγεγραμμένα μυκοεντομοκτόνα (Kumar et al., 2017) και η Βραζιλία έχει 88 μικροβιακά παρασιτοκτόνα εκ των οποίων περίπου τα μισά αποτελούν τα μυκοεντομοκτόνα (Mascarin et al., 2019). Στην Κίνα υπάρχουν μόνο 16 εγγεγραμμένα στελέχη μυκήτων με τα περισσότερα να ανήκουν στην κατηγορία των εντομοπαθογόνων (Jiang and Wang, 2023) ενώ οι ΗΠΑ διαθέτουν 11 εγγεγραμμένα στελέχη νηματοφάγων και εντομοπαθογόνων μυκήτων. Τέλος, στην Ευρώπη χρησιμοποιούνται 11 προϊόντα βασισμένα σε εντομοπαθογόνους μύκητες. Στα προϊόντα όλων των προαναφερόμενων χωρών παραμένει ο πιο διαδεδομένος στη χρήση ο μύκητας *B. bassiana*.

Έχει παρατηρηθεί ότι ο μύκητας *B. bassiana* παρέχει μεγαλύτερη προστασία στο φυτό όταν υφίσταται εδνοφυτικά σε αυτό. Επιπλέον μελέτες έχουν υποδείξει ότι η επεξεργασία ενός συγκεκριμένου οργάνου ή μέρους του φυτού (φύλλο, κορμός ή ρίζα) ανεξάρτητα από τη μέθοδο τεχνητού εμβολιασμού που χρησιμοποιείται, μπορεί να οδηγήσει σε ενδοφυτικό αποικισμό ολόκληρου του φυτού και να προσδώσει συστηματική αντίσταση στο φυτό ξενιστή έναντι των φυτοφάγων (Mantzoukas et. al., 2014; Jaber and Enkerli, 2016; Dash et al., 2018). Μέσω του ενδοφυτικού αποικισμού υπάρχουν και πολυάριθμα οφέλη, όπως η προαγωγή της ανάπτυξης των φυτών, η προστασία από τα έντομα, η συστηματική αντοχή του φυτικού οργανισμού, ο ανταγωνισμός φυτοπαθογόνων μυκήτων, βακτηρίων και νηματωδών και καταστολή των αρνητικών επιπτώσεων των αβιοτικών παραγόντων στρες στα φυτά ξενιστές

(Kabaluk and Ericsson, 2007; Kim et al., 2008; Vega et al., 2009; Ownley et al., 2009; Elena et al., 2011; Sasan and Bidochka, 2012; Liao et al., 2014; Vega, 2018).

Υπάρχουν ωστόσο κάποια εύλογα ερωτήματα γύρω από τη δράση των εντομοπαθογόνων μυκήτων και των δευτερογενών μεταβολιτών τους που έχουν οδηγήσει σε παραπάνω επιστημονικά πειράματα για τη διασφάλιση τόσο της ανθρώπινης υγείας όσο και των ωφέλιμων οργανισμών στη φύση. Συγκεκριμένα, με βάση τον Zimmermann (2007a) που ανέλυσε τα θέματα ασφάλειας γύρω από τη χρήση του μύκητα *Bauveria bassiana* spp. ως μυκοφάρμακο, επισημάνθηκε ότι μέχρι σήμερα δεν έχουν παρατηρηθεί σημαντικές παρενέργειες κατά τη χρήση του *B. bassiana* και *B. brongniartii*. Σε μετέπειτα μελέτη (Zimmermann, 2007a,b) τόνισε την καταλληλότητα των μυκοεντομοκτόνων για τον έλεγχο των γεωργικών παρασίτων και φορέων ασθενειών έναντι των συμβατικών χημικών σκευασμάτων.

Οι έρευνες για τη συστηματική βελτίωση ορισμένων οπισθοδρομήσεων σχετικά με τη χρήση των εντομοπαθογόνων μυκήτων ενάντια σε νηματώδη, έντομα και παράσιτα συνεχίζουν να υφίστανται κάθε χρόνο και βοηθούν στην εξέλιξη των προϊόντων και της δράσης τους.

2.2.4 Ο μύκητας *Metarhizium robertsii*

Ο μύκητας *Metarhizium robertsii*, γνωστός παλαιότερα και ως *Metarhizium anisopliae*, είναι ένας διμορφικός εντομοπαθογόνος και ενδοφυτικός μύκητας ο οποίος ανήκει στο γένος *Metarhizium* (Ascomycota: Clavicipitaceae). Εντοπίζεται σε όλες τις ηπείρους με εξαίρεση την Ανταρκτική ενώ έχει εντοπιστεί κοντά και στον Αρκτικό κύκλο (Roddam and Rath, 1997). Οι μύκητες του γένους *Metarhizium* είναι γνωστοί παράγοντες βιολογικού ελέγχου που έχουν χρησιμοποιηθεί για έντομα που κατοικούν στο έδαφος (Mascarin et al., 2013; Patel, 2020) και ήταν οι πρώτοι παγκοσμίως που χρησιμοποιήθηκαν μαζικά για τον έλεγχο των εντόμων (Roberts and Humber, 1981; McCoy et al., 1988; St. Leger, 1992(a,b),1993; Driver et al., 2000). Έχουν εντοπιστεί παραπάνω από 200 είδη *Metarhizium* που καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα ξενιστών από επτά τάξεις εντόμων με έμφαση στα Κολεόπτερα (134 είδη), κυρίως, από τις οικογένειες Curculionidae, Elateridae και Scarabaeidae μέχρι και τα αραχνοειδή,

ενώ τα Δίπτερα και τα Υμενόπτερα δεν ανήκουν συνήθως στους προτιμώμενους ξενιστές (Veen, 1968).

Η ανακάλυψη ήρθε τη δεκαετία του 1870 στην Ουκρανία, όπου στελέχη του γένους *Metarhizium* απομονώθηκαν για πρώτη φορά από μολυσμένα έντομα από το οποία πήρε και το αρχικό όνομα, *Anisoplia austriaca* (Metschnikoff, 1879). Μετέπειτα δόθηκε η ονομασία *Isaria destructor* (Metschnikoff, 1880) ενώ το 1883 δόθηκε η πλέον γνωστή και σωστή ονομασία *Metarhizium anisopliae* από τον Sorokin.



Εικόνα 4: Κατσαρίδα που έχει μολυνθεί από τον εντομοπαθογόνο μύκητα *M. anisopliae*.
Πηγή: https://en.wikipedia.org/wiki/Metarhizium_anisopliae

Στην πορεία μελετήθηκαν αρκετά είδη αυτού του γένους και υπήρξαν προσπάθειες κατηγοριοποίησης τους με την Tulloch (1976) να διατηρήσει μόνο τα είδη *Metarhizium anisopliae* και *Metarhizium flavoviride*. Τα υπόλοιπα είδη θεωρήθηκαν από την ίδια, συνώνυμα ή ποικιλίες αυτών των δύο και προχώρησε στον επιπλέον διαχωρισμό μεταξύ βραχέων και μακρών σπορίων αποικιών του είδους *M. anisopliae*. Ωστόσο, μετέπειτα διαπιστώθηκε ότι η διάκριση με βάση μόνο τα μορφολογικά χαρακτηριστικά θεωρήθηκε ανεπαρκής όταν όλο και περισσότερα στελέχη ανακαλύπτονταν παγκοσμίως. Εν τέλη, το γένος *Metarhizium* αναταξινομήθηκε σε εννέα κλάδους που πλέον υποδηλώνουν φυλογενετικά συγγενικές ομάδες του οργανισμού: *M. anisopliae*, *M. acridum*, *M. guizhouense*, *M. pingshaense*, *M. lepidiotae* και *M. majus*, *M. robertsii*, *M. brunneum* και *M. globosum* (Bischoff et al., 2009).

Αν και το γένος *Metarhizium* θεωρείται αδύναμος σαπροφυτικός μύκητας, έχει το πλεονέκτημα της μόλυνσης ζωντανών οργανισμών (π.χ. έντομα) συνήθως απαλλαγμένους από άλλους ανταγωνιστές και έτσι καταφέρνει να κυριαρχήσει. Ο κύριος βιότοπος στον οποίο εμφανίζεται σαν μύκητας ο *M. robertsii* μεταξύ και άλλων, είναι η ριζόσφαιρα όπου η αλληλεπίδραση των φυτών, των εντόμων και των

παθογόνων θα καθορίσουν την επιβίωση, την αποτελεσματικότητα και την ανακύκλωση του (Hu and St. Leger, 2002). Παραμένει ωστόσο άγνωστο το προτιμώμενο φυσικό περιβάλλον των μυκήτων που ανήκουν σε αυτό το γένος (Prior, 1992) καθώς δεν είναι σαφές εάν τα δείγματα που ανακτώνται παγκοσμίως από το έδαφος πρόκειται για κονίδια, μικκύλια προερχόμενα από υπολείμματα εντόμων ή μικκύλια που ζουν ανεξάρτητα σε υποστρώματα χωρίς την ανάγκη των εντόμων-ξενιστών. Παράλληλα, δεν έχει επιβεβαιωθεί ακόμη εάν το έδαφος είναι το κατάλληλο μέρος για να ευδοκιμήσει ο μύκητας ή εάν απλώς παραμένει αδρανής μέχρι την πιθανή εμφάνιση ενός ευαίσθητου κατάλληλου ξενιστή (Inglis et al., 2001; Prior, 1992). Μέχρι και σήμερα, τα περισσότερα είδη του γένους *Metarhizium* δεν μπορούν να μολύνουν τα θηλαστικά καθώς η εσωτερική θερμοκρασία των 35°C και άνω, είναι πέρα από το μέγιστο της θερμοκρασίας ανάπτυξης αυτών των μυκήτων.

Ο *Metarhizium robertsii* και οι περισσότεροι μύκητες αυτού του γένους ακολουθούν τον ίδιο κύκλο ζωής ως εντομοπαθογόνοι οργανισμοί. Η ανάπτυξη της θανατηφόρας ασθένειας σε έναν ξενιστή μπορεί να διακριθεί σε συγκεκριμένα βήματα και ξεκινάει με τα άφυλα κονίδια του μύκητα που έρχονται σε πρώτη επαφή με των εξωσκελετό του εντόμου- ξενιστή. Αυτά με τη σειρά τους δημιουργούν έναν βλαστικό σωλήνα που θα διεισδύσει εσωτερικά του εντόμου και καταλήγει στην άκρη ως ένα απρεσσόριο. Ένας 'πάσσαλος' διείσδυσης που αναπτύσσεται κάτω από το απρεσσόριο διαπερνά το περίβλημα και εισέρχεται στον αιμόκοιλο του εντόμου. Έπειτα, τα βλαστοσπόρια ως αποτέλεσμα του διεισδυτικού σωλήνα, πρόκειται για μεμονωμένα κύτταρα του μύκητα που θα κυκλοφορήσουν στον αιμόκοιλο του εντόμου πολλαπλασιάζοντας και εξαντλώντας όλα τα θρεπτικά συστατικά του. Συνήθως το έντομο μπορεί να επιβιώσει από 5 έως 15 μέρες από την μόλυνση (Chanfley, 2003).

Όταν πλέον πεθάνει, ο μύκητας εξέρχεται προς τα έξω όπου και αναπτύσσει τους κονιδιοφόρους του. Πάνω σε αυτούς θα αναπτυχθούν περιβαλλοντικά σταθερά εναέρια κονίδια που θα διαχυθούν στο περιβάλλον και θα μολύνουν καινούριους ξενιστές διατηρώντας έτσι τον κύκλο ζωής του μύκητα (Small and Bidochka, 2005). Ολόκληρη η διαδικασία διείσδυσης σε πρώτο βαθμό, απαιτεί την ταυτόχρονη παραγωγή και δράση μιας σειράς υδρολυτικών ενζύμων (πρωτεάσες (π.χ. η subtilisin Pr1 (Butt et al., 1998), χιτινάσες, λιπάσες), τοξινών και μηχανικής πίεσης (Roberts and St. Leger, 2004; Butt, 2002). Επίσης έχει διαπιστωθεί ότι μια άλλη μεγάλη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών, οι δεστρουξίνες, που παράγονται κατά τη διάρκεια της μόλυνσης θεωρούνται σημαντικοί παράγοντες της παθογένειας. Η δεστρουξίνη E

συγκεκριμένα, είναι μια από τις τοξικότερες ενώσεις που καταστέλλει την ανοσοποιητική ανταπόκριση του εντόμου-ξενιστή και μπορεί να αποκρούσει τυχόν λοιπούς μικροβιακούς ανταγωνιστές του μύκητα (Thomsen and Eilenberg, 2000). Βέβαια, πολύ σημαντικό ρόλο παίζουν και οι συνθήκες υγρασίας, ηλιακής ακτινοβολίας και η μορφολογία του εντόμου για την επιτυχή μόλυνση (Bidochka et al., 2001b; Braga et al., 2001c; Amritha De Croos and Bidochka, 1999; Fargues et al., 1992, 1996; Rath et al., 1995; Thomas and Jenkins, 1997; Yip et al., 1992).

Η μόλυνση από τα είδη του *Metarhizium* μπορεί να γίνει εύκολα διακριτή λίγες μέρες έπειτα από το θάνατο του εντόμου με τον μύκητα να εμφανίζεται υπό τη μορφή μιας λευκής υφής που στη πορεία της ανάπτυξης των κονιδίων, θα μετασχηματιστεί σε ένα χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα. Εξαιτίας αυτού του χρώματος, η μυκητίαση αυτή είναι γνωστή και ως η ασθένεια της πράσινης μουσκαρδίνης (Tanada and Kaya, 1992). Εμπορικά σκευάσματα βασισμένα στο γένος *Metarhizium* είναι ήδη σε χρήση παγκοσμίως, με τη Βραζιλία ως παράδειγμα, να χρησιμοποιεί το είδος *M. anisopliae* για την καταπολέμηση των παρασίτων που στοχεύουν τις καλλιέργειες ζαχαροκάλαμου (π.χ. τα κερκοποιειδή) (De Faria and Wraight, 2007). Παράλληλα, μύκητες του γένους *Metarhizium* χρησιμοποιούνται και για τον έλεγχο διαφόρων παρασίτων και εντόμων καλλιεργειών ή/και για μύγες και κουνούπια που είναι φορείς ασθενειών (π.χ. Μαλάρια) (Roberts and Humber, 1981; McNeil, 2005; Robertson et al., 2007; Thomas and Read 2007 a,b; Fang et al., 2011). Ακόμη μπορεί να χρησιμοποιηθούν και ενδοφυτικά σε φυτικούς ιστούς.

Για τη μαζική παραγωγή ενός εμπορικού σκευάσματος βασισμένο σε επιλεγμένο στέλεχος του γένους *Metarhizium*, πολύ σημαντικό κομμάτι είναι οι συνθήκες παραγωγής (π.χ. υπόστρωμα, θερμοκρασία, υγρασία, κατάλληλη χρονική περίοδος συγκομιδής σπορίων) αλλά και οι συνθήκες συντήρησης και διατήρησης του προϊόντος μετέπειτα. Συνήθως τα προϊόντα είναι βασισμένα σε μικκύλια, κονίδια ή βλαστοσπόρια του μύκητα, με τα εναέρια κονίδια να προτιμώνται ιδιαίτερα για την ευρεία εφαρμογή τους ως προς τον έλεγχο των εντόμων και παρασίτων (Wraight et al., 2000). Αυτή η προτίμηση είναι απόρροια της υψηλής μολυσματικότητας τους ενάντια στους εχθρούς των καλλιεργειών αλλά και της ευκολίας παραγωγής σε στερεά υποστρώματα ρυζιού και σιταριού με ιδιαίτερα χαμηλό κόστος. Βέβαια, τα κονίδια είναι αρκετά επιρρεπή στις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν κατά την εφαρμογή τους αφού έντονη ηλιακή ακτινοβολία ή θερμότητα σε συνδυασμό με ξηρασία μπορούν κάλλιστα να επηρεάσουν την εντομοκτόνο δράση τους (Braga et al.,

2001; Rangel et al., 2005; Fernandes et al., 2007; Jackson and Jaronski, 2009; Rangel et al., 2015; Song, 2018; Villamizar et al., 2018). Διάφορα είδη ελαίων, όπως φυτικά ή ακόμη και ορυκτέλαιο χρησιμοποιούνται ως μέσο για τη σύνθεση μικροβιακών σκευασμάτων εφόσον η αποθήκευση των κονιδίων σε έλαια μπορεί να μειώσει την επίδραση των περιβαλλοντικών συνθηκών ως προς την αντοχή του προϊόντος (Bateman et al., 1993). Σε πολλές καταστάσεις μικροβιακού ελέγχου, η σωστή σύνθεση του προϊόντος είναι ζωτικής σημασίας ενώ η συνιστώμενη δόση για την αντιμετώπιση των εχθρών στους αγρούς είναι μεταξύ 10^{12} έως 10^{14} κονίδια ανά εκτάριο (Wraight et al., 2000; Wraight et al., 2001).

Παράλληλα, η χρήση των μυκήτων του γένους *Metarhizium* ενδοφυτικά, μπορεί να περιορίσει την ικανότητα τροφοδοσίας, προτίμησης και φωτοκίας πολλών εντόμων ενώ ταυτόχρονα ενισχύει τους μηχανισμούς άμυνας του φυτού ενάντια σε εχθρούς και αβιοτικούς παράγοντες χωρίς να προκαλεί αρνητικά αποτελέσματα στο ίδιο το φυτό (McCormick et al., 2016; Hokkanen and Menzler-Hokkanen, 2017).

Υπάρχουν ωστόσο, ορισμένα εμπόδια για την παραγωγή μυκήτων ως μικροβιακά εντομοκτόνα και παρασιτοκτόνα, σε μεγάλη κλίμακα. Μεταξύ αυτών, η καθυστερημένη λοιμογόνος δράση τους (Alonso-Diaz et al., 2007), η γενετική αστάθεια τους, η δυσκολία διατήρησης της βιωσιμότητας και μολυσματικότητας τους στα εμπορικά σκευάσματα (Kamp and Bidochka, 2002; Ryan et al., 2002) και οι αυστηρά στείρες συνθήκες που πρέπει να τηρούνται για την παραγωγή αυτών. Λόγω αυτών, σε πολλές περιπτώσεις υψηλά ποσοστά θνησιμότητας που καταγράφονται σε εργαστηριακές μελέτες και πειράματα δε συνάδουν με τα αποτελέσματα από εφαρμογές στο φυσικό περιβάλλον (Bateman and Alves, 2000; Bateman and Chapple, 2001; Bateman et al., 2002; Batista-Filho et al., 1998; Bernhard et al., 1998; Burges and Jones, 1998c; Inglis et al., 2001; Jones, 1998; Jones and Burges, 1998; Moore and Caudwell, 1997; Wraight et al., 2001).

Η δυνατότητα των στελεχών *Metarhizium* ως παράγοντες βιολογικού ελέγχου και τα θετικά που παρέχουν αντίστοιχα στις καλλιέργειες είναι ένα πεδίο που συνεχώς αναπτύσσεται και περισσότερες έρευνες στοχεύουν στην μελλοντική βελτίωση και μαζική παραγωγή τους.

2.2.5 Ο μύκητας *Beauveria bassiana*

Ο εντομοπαθογόνος μύκητας *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Cordycipitaceae) εντοπίζεται σε εδάφη πολλών περιοχών του κόσμου, από τροπικά μέχρι αρκτικά κλίματα (Feng et al., 1994). Πρόκειται για ένα είδος που μολύνει περισσότερο από 1000 είδη εντόμων (Araújo et al., 2016) αλλά και θρίπες, αφίδες, ακάρεα αραχνών και άλλα γεωργικά παράσιτα που παρουσιάζουν υψηλή αντοχή σε κοινά χημικά εντομοκτόνα (Kliot et al., 2016). Ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά το 1835 από τον Ιταλό εντομολόγο Agostino Bassi σε προσβεβλημένους μεταξοσκώληκες και το 1972 ο De Hoog κατηγοριοποίησε το γένος *Beauveria Vuill* σε τρία είδη: *B. bassiana*, *B. brongniartii* και *B. alba*.



Εικόνα 5: Είδος εντόμου (spotted lanternfly) που ανήκει στα Ημίπτερα, μολυσμένο από το μύκητα *Beauveria bassiana*

Πηγή: <https://cals.cornell.edu/new-york-state-integrated-pest-management/outreach-education/fact-sheets/beauveria-bassiana>

Έχει βρεθεί ότι στελέχη του *B. bassiana* μπορούν και ζουν επιφυτικά ή ενδοφυτικά στους φυτικούς ιστούς πολλών διαφορετικών φυτών (π.χ. καλαμπόκι, ντομάτα, καφές, κακάο κ.α.) χωρίς να προκαλούν κάποιο σύμπτωμα σε αυτά (Posada and Vega, 2005; Quesada-Moraga et al., 2014; Klieber and Reineke, 2016; Jaber and Ownley, 2018; Nishi et al., 2020). Μάλιστα, είναι πιθανό στο παρελθόν η συμβίωση των μυκήτων του γένους *Beauveria* και *Metarhizium* με τα φυτά να κυριαρχούσε έναντι

της εντομοπαθογόνου δράση τους η οποία μπορεί να αποτελεί μια ευκαιριακή εξελικτική προσαρμογή τους (Ortiz-Urquiza et al., 2014). Ο συνδυασμός δε, κάθε στελέχους *B. bassiana* και φυτού αντίστοιχα, επηρεάζει σημαντικά την τελική τους συμβίωση. Η σημαντική διαφορά στην αλληλεπίδραση των στελεχών του μύκητα με τα φυτά και τα έντομα εντοπίζεται στο γεγονός ότι στην περίπτωση των φυτικών ειδών, ο μύκητας δεν σχηματίζει απρεσσόρια για να διεισδύσει σε αυτά (Iida et al., 2023).

Ο μύκητας *Beauveria bassiana* είναι ένα σαπρόφυτο είδος ενώ μερικά στελέχη του είναι αρκετά ανταγωνιστικά όταν συνυπάρχουν με άλλα εντομοπαθογόνα, όπως τα *Rhizoctonia solani*, *Gaeumannomyces graminis* var. *Tritici*, *Botrytis cinerea* και *Alternaria alternata* (Renwick et al., 1991; Ownley et al., 2008; Sinno et al., 2021).

Η εντομοπαθογόνος δράση του είναι υψηλής σημασίας και για αυτό το λόγο είναι από τα πιο μελετημένα είδη μύκητα και έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως μέχρι σήμερα για την καταπολέμηση τόσο ασθενειών όσο και εχθρών των καλλιεργειών. Ο τρόπος με τον οποίο προσβάλλει τα έντομα ακολουθεί σαν γενικό κανόνα αυτόν των εντομοπαθογόνων μυκήτων. Η διαδικασία μόλυνσης ξεκινάει με την αναγνώριση του πιθανού ξενιστή από τα σπόρια του μύκητα και την αρχική προσκόλληση τους στον εξωσκελετό του εντόμου (Holder and Keyhani, 2005; Holder et al., 2007). Έπειτα ακολουθεί μια διαδικασία ανταπόκρισης και καταπολέμησης των αμυντικών μηχανισμών του ξενιστή για το επόμενο στάδιο διείσδυσης (σχηματισμός απρεσσορίων) και αποικοδόμησης της επιδερμίδας από τον μύκητα. Όταν πλέον έχει εισχωρήσει στον αιμόκοιλλο του ξενιστή, τρέφεται από όλα τα θρεπτικά συστατικά που εντοπίζει οδηγώντας το έντομο σε θάνατο και έπειτα εξέρχεται για να συνεχίσει τον κύκλο του (Ortiz-Urquiza and Keyhani, 2013; Pedrini et al., 2013; Wang et al., 2013; Zhang et al., 2011b). Ο μύκητας χαρακτηρίζεται από λευκές - κιτρινωπές και σπανίως κοκκινωπές αποικίες και συχνά αναφέρεται ως η νόσος της μουσκραδίνης (Zimmermann, 2007).

Ένα από τα σημαντικότερα στάδια για μια επιτυχή μυκητίαση είναι η παραγωγή τοξικών δευτερογενών μεταβολιτών που δρουν είτε ως διευκόλυνση για τη διαδικασία (Altimira et al., 2022) ή ως ανοσοκατασταλτικές ενώσεις ενάντια στο ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή (Lu and Leger, 2016). Μελέτες στα γονιδιώματα μεταξύ των ειδών του γένους *Metarhizium* και *Beauveria* έχουν δείξει ότι παρά τις αρκετές ομοιότητες στη διαδικασία μόλυνσης των εντόμων υπάρχουν σημαντικές ανομοιότητες στους μοριακούς και βιοχημικούς μηχανισμούς που σχηματίζονται και δρουν κατά τη

διαδικασία (Ortiz-Urquiza et al., 2014). Τα είδη του γένους *Metarhizium* συνθέτουν κυρίως δεστρουζίνες ενώ τα είδη του γένους *Beauveria* παράγουν μμποβερισίνη, βασιανολίδη, μια ποικιλία μμποβερολιδίων, οσπορεΐνη, μπασιατίνη και τενελίνη.

Επί πολλά χρόνια, έχουν χρησιμοποιηθεί σκευάσματα βασισμένα στο μύκητα *Beauveria bassiana* για την αντιμετώπιση πληθώρας παρασίτων και εντόμων που πλήττουν καλλιέργειες ανά τον κόσμο και αποτελεί πλέον έναν από τους βασικούς παράγοντες βιοελέγχου (Sullivan et al., 2022). Τη δεκαετία του 1980 το προϊόν 'Boverin' συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε εκτεταμένα στην ΕΣΣΔ, για την καταπολέμηση του σκαθαριού πατάτας του Κολοράντο '*Leptinotarsa decemlineata*' και της Καρπόκαψας της μηλιάς '*Cydia pomonella*' (Zimmermann, 2007). Αντίστοιχα, στην Κίνα δημιουργήθηκε ένα προϊόν βασισμένο στον μύκητα *Beauveria bassiana* και εφαρμόστηκε για την αντιμετώπιση του *O. onibalis* στο καλαμπόκι, του *Dendrolimus punctatus* στα πεύκα και των *Nephotettix* 'leafhoppers' στο ρύζι και το τσάι (Hussey and Tinsley, 1981). Ακόμη, θετικά αποτελέσματα στη συνολική διαχείριση των εντόμων μπορεί να επιφέρει ο συνδυασμός του *B. bassiana* με άλλα εντομοπαθογόνα που έχουν διαφορετική δράση π.χ. με το βακτήριο *Bacillus thuringiensis* (Wraight and Ramos, 2005). Τα προϊόντα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ελεγχόμενους χώρους καλλιέργειας (π.χ. θερμοκήπια) αλλά και σε εξωτερικές καλλιέργειες υπό τη μορφή εναιωρημάτων ή σκόνης (Da Cunha, 2022). Η εφαρμογή γίνεται κάτω από υψηλές συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας (18 – 29°C), χαμηλή υπεριώδη ακτινοβολία και σύμφωνα με την αναγραφόμενη ένδειξη κάθε συσκευασίας καθορίζεται η ποσότητα προϊόντος αντίστοιχα. Η μορφή του προϊόντος είναι υγρή ή στερεά, γεγονός που καθορίζεται από τον τρόπο πολλαπλασιασμού του μύκητα (κονίδιο ή βλαστοσπόριο), τον τρόπο χορήγησης και τον επιλεγμένο ξενιστή (Mascarin and Jaronski, 2016). Για την αποτελεσματική εφαρμογή ωστόσο, είναι σημαντικός ο έλεγχος της συμβατότητας κάθε προϊόντος *Beauveria bassiana* με άλλα φυτοφάρμακα σε μικρότερη κλίμακα πριν την τελική εφαρμογή σε μεγάλες καλλιέργειες. Ανάλογα με τις προδιαγραφές του προϊόντος, συνήθως είναι συμβατά με άλλα εντομοκτόνα, βιολογικά παρασιτοκτόνα και ζιζανιοκτόνα, ενώ μερικές φορές δείχνουν συμβατότητα με ακαρεοκτόνα αλλά πολύ σπάνια με μυκητοκτόνα.

Πίνακας 1: Μυκητοκτόνα βασισμένα στους εντομοπαθογόνους μύκητες *Beauveria bassiana* και *B. brongniartii* που είναι εγγεγραμμένα ή βρίσκονται σε διαδικασία ανάπτυξης του προϊόντος για εμπορική χρήση.

Πηγή: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09583150701309006>

Fungus	Product/Trade name	Company/Producer	Country/Origin
<i>B. bassiana</i>	Bio-Power	Stanes	India
	BotaniGard ES	Laverlam International (formerly	USA
	BotaniGard 22WP	Emerald BioAgriculture)	
	Boverol	Fytovita	Czech Republic
	Conidia	LST	Columbia
	Mycotrol ES	Laverlam International	USA
	Mycotrol-O	(formerly Emerald BioAgriculture)	
	Naturalis	Intrachem	Italy
	Naturalis-L	Andermatt Biocontrol	Switzerland
		Troy Biosciences Inc.	USA
	Ostrinil	Arysta (formerly NPP, Calliope)	France
	Proecol	Probioagro	Venezuela
	Racer BB	SOM Phytopharma	India
	Trichobass-L	AMC Chemical/Trichodex	Spain
	Trichobass-P		

Παράλληλα με την εντομοπαθογόνο δράση, ο συγκεκριμένος μύκητας προωθεί την ανάπτυξη των φυτών, αυξάνει την άμυνα τους σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης ενώ έχει βρεθεί ότι μπορεί να καταστέλλει ασθένειες των φυτών (Nishi et al., 2020). Ακόμη, πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί στη Ν. Κορέα, έχουν δείξει την πιθανότητα προσθήκης του μύκητα στην ανθρώπινη τροφή με στόχο τη βελτίωση του ανοσοποιητικού συστήματος, παρουσιάζοντας μια νέα πτυχή του μύκητα *Beauveria bassiana* (Yoon et al., 2003b).

Η έκθεση των ανθρώπων στα σκευάσματα που περιέχουν τον συγκεκριμένο μύκητα και χρησιμοποιούνται στις καλλιέργειες μπορεί να επιφέρει παροδικό ερεθισμό στα μάτια ή μπορεί να αποβούν επιβλαβή στην περίπτωση κατάποσης ή απορρόφησης από το δέρμα (Da Cunha, 2022). Ωστόσο, περαιτέρω έρευνες για την ασφάλεια της χρήσης αυτού του μύκητα ως βιολογικό παράγοντα αντιμετώπισης εχθρών, δεν θέτουν σοβαρές ανησυχίες (Zimmermann, 2007).

Καταληκτικά, ο μύκητας *Beauveria bassiana* μεταξύ και άλλων εντομοπαθογόνων έχει τη δυνατότητα και μπορεί να εφαρμοστεί σε ολοκληρωμένα προγράμματα διαχείρισης για τον έλεγχο εχθρών και παρασίτων καλλιεργειών. Η βελτιστοποίηση ωστόσο των επιλεγμένων στελεχών του μύκητα και η ανάπτυξη ανθεκτικότητας τους σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες καταστολής της εντομοπαθογόνου δράσης τους, σε συνδυασμό με οικονομικά αξιόπιστες στρατηγικές

μαζικής παραγωγής, θα οδηγήσουν στη δημιουργία ασφαλών, αποδοτικών και αποτελεσματικών βιολογικών εντομοκτόνων (Mascarin and Jaronski, 2016).

2.3 Η ευδεμίδα της αμπέλου

Η ευδεμίδα της αμπέλου (*Lobesia botrana*, Lepidoptera: Tortricidae), γνωστή και ως σκώρος της αμπέλου πρόκειται για ένα από τα πιο επιβλαβή έντομα στην αμπελοκαλλιέργεια (Thiéry et al., 2018) και αποτελεί πολυβολτινικό είδος, με προαιρετική διάπαυση και πλήρη μεταμόρφωση (Aguirre-Zapata et al., 2023). Περιγράφηκε για πρώτη φορά στην Αυστρία το 1775 από τους Denis και Shiffermüller και είναι ένα ενδημικό είδος της Παλαιαρκτικής ζώνης (Cozzi et al., 2006; Delbac et al., 2010; Gutierrez et al., 2017) που πλέον εντοπίζεται στην Ασία και την Λατινική Αμερική. Αποτελεί πολυφάγο είδος, καθώς προσβάλλει και τρέφεται με περισσότερα από σαράντα διαφορετικά είδη φυτών, ενώ η δυνατότητα αυτή το βοηθάει στην άμεση προσαρμογή του σε καινούριες περιοχές (Altimira et al., 2021). Η ευδεμίδα της αμπέλου έχει τέσσερα στάδια ανάπτυξης : αβγό, προνύμφη, χρυσαλίδα και ενήλικη πεταλούδα, ενώ δεν σημειώνεται σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο φύλων παρά μόνο το ελαφρώς μεγαλύτερο μέγεθος των ενήλικων θηλυκών.



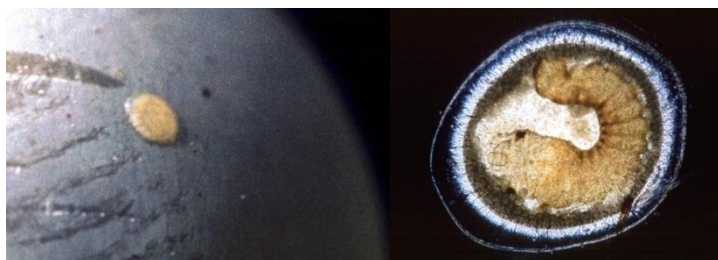
Εικόνα 6: Ενήλικο αρσενικό άτομο (A & B) και ενήλικο θηλυκό άτομο (C & D) του είδους *Lobesia botrana*

Πηγή: <https://www.semanticscholar.org/paper/Tra%C3%A7a-europeia-dos-cachos-da-videira-Lobesia-uma-em-Botton-Nondillo/22edf35417b754b1faa607e003a2bf1e8538e05a>

Είναι ένα είδος που προτιμάει τις ξηρές και θερμές περιοχές και δείχνει να έχει προσαρμοστεί στην κλιματική αλλαγή δημιουργώντας έλλειψη συγχρονισμού με τους φυσικούς του εχθρούς (Hufnagel and Kocsis, 2011). Η ευδεμίδα συμπληρώνει συνήθως τρεις έως τέσσερις γενεές κατά τους καλοκαιρινούς μήνες στην Ευρώπη ενώ σε περιοχές της κεντρικής Ασίας μπορεί να φθάσει μέχρι και τις πέντε (Gilligan and Epstein, 2014). Ο αριθμός των γενεών της εξαρτάται άμεσα από τις κλιματικές μεταβλητές (θερμοκρασία και υγρασία), το γεωγραφικό πλάτος, την τροφή και τη φωτοπερίοδο που υφίστανται σε μια περιοχή (Altimira et al., 2021; Rossini et al., 2015b). Ο τραυματισμός των καρπών από τις προνύμφες οδηγεί σε απώλεια απόδοσης των σταφυλιών και στη δημιουργία των κατάλληλων συνθηκών για την ανάπτυξη δευτερογενών ασθενειών (π.χ βοτρυτής) που οδηγούν σε υποβάθμιση της ποιότητας.

2.3.1 Βιολογικός κύκλος

Ο κύκλος της ευδεμίδας (*Lobesia botrana*) ξεκινάει την άνοιξη με τις πρώτες πτήσεις των ενήλικων ακμαίων που αναδύονται από τις νύμφες που έχουν διαχειμάσει κατά τους χειμερινούς μήνες. Αυτό συμβαίνει την ίδια περίοδο με το άνοιγμα των οφθαλμών του φυτού και διαρκεί για τέσσερις έως πέντε εβδομάδες. Οι ενήλικες πεταλούδες πετούν με τη δύση του ηλίου και ζουν από μία έως τρεις εβδομάδες, κατά τις οποίες ζευγαρώνουν και τα θηλυκά εναποθέτουν τα αυγά τους στους οφθαλμούς. Η επιλογή των φυτών που θα αφήσουν τα αυγά τους γίνεται ύστερα από προσεκτική αλληλεπίδραση της ευδεμίδας με τις χημικές ουσίες στην επιφάνεια των φυτών που θα διεγείρουν ή θα αποτρέψουν την ωτοκία. Ακόμη, έρευνες έχουν δείξει την ιδιαίτερη προτίμηση αυτού του εντόμου να εναποθέσει τα αυγά του στο ίδιο είδος φυτού που αναπτύχθηκε αρχικά ως προνύμφη (Moreau et al., 2007). Οι θηλυκές πεταλούδες ζευγαρώνουν μία φορά και μπορούν να γεννήσουν από 80 έως 160 μεμονωμένα αυγά (Varela et al., 2011).



Εικόνα 7: Αβγό της ευδεμίδας προσκολλημένο σε ράγα σταφυλιού (αριστερά) και απεικόνιση του σε μεγεθυντικό φακό όπου διακρίνεται η προνύμφη (δεξιά).

Πηγή: <https://plantwisepiusknowledgebank.org/doi/10.1079/pwkb.species.42794>

Τα αβγά της ευδεμίδας είναι ελλειπτικά και επίπεδα (0.6-0.8 mm) ενώ έχουν ένα κρεμώδες χρώμα που με την πάροδο των ημερών μετατρέπεται σε κίτρινο (**Εικόνα 7**). Ύστερα από 7 έως 10 ημέρες, αναδύονται οι εκκολαπτόμενες προνύμφες από τα αβγά και οι ίδιες έχουν πέντε στάδια ανάπτυξης: από L1 (0.9–1.0 mm) έως L5 (10.0–11.0 mm), με το τελευταίο στάδιο να είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό του μεταξωτού κουκουλιού και τη μετατροπή τους σε χρυσαλίδες (5-6 mm).



Εικόνα 8: Προνύμφη της ευδεμίδας κινούμενη πάνω σε ράγες σταφυλιών

Πηγή: <https://worldofplants.ai/en/%D9%81%D8%B1%D8%A7%D8%B4%D8%A9-%D8%AB%D9%85%D8%A7%D8%B1-%D8%A7%D9%84%D8%B9%D9%86%D8%A8/>

Μεταξύ των σταδίων ανάπτυξης της προνύμφης, εκτός από ανάπτυξη μεγέθους, παρατηρείται και αλλαγή χρώματος (από σκούρο πράσινο μέχρι και καφέ) ενώ η πλήρης ανάπτυξη πραγματοποιείται σε περίπου 20-30 ημέρες κάτω από τις κατάλληλες κλιματικές συνθήκες (Vitta, 2020a). Οι προνύμφες της πρώτης γενεάς εμφανίζονται κατά την περίοδο Μαΐου - Ιουνίου και καταστρέφουν τις νεοσύστατες ταξιανθίες του φυτού. Αργότερα μεταμορφώνονται σε χρυσαλίδες και έπειτα από 7-14 ημέρες σε ακμαία έντομα (πεταλούδες) που ζευγαρώνουν και εναποθέτουν τα αβγά τους στις πράσινες ράγες του τσαμπιού. Οι προνύμφες μπορούν να σχηματίσουν το κουκούλι ανάμεσα στις ταξιανθίες του φυτού ή κάτω από την επιφάνεια των φύλλων. Στη συνέχεια η δεύτερη γενεά προνυμφών εισέρχεται στις ράγες του φυτού για να τραφεί και θα εξέλθει εν τέλει για τη δημιουργία του κουκουλιού. Στις περιπτώσεις που οι συνθήκες το επιτρέπουν, δύναται να υπάρξει και τρίτη γενεά προνυμφών οι οποίες προσβάλλουν τα ώριμα σταφύλια κατά το μήνα Αύγουστο (Milonas et al., 2001; Thiéry et al., 2014).

Όταν πλέον το φθινόπωρο σημειώνονται χαμηλές θερμοκρασίες και η διάρκεια της νύχτας ξεπερνάει τις έντεκα ώρες, αρχίζει η διαδικασία διάπαυσης των γενεών και τα τελευταία κουκούλια που σχηματίζονται, διαχειμάζουν σε ρωγμές του εδάφους ή κάτω από τον φλοιό του φυτού και δεν μεταμορφώνονται μέχρι την επόμενη άνοιξη.



Εικόνα 9: Χρυσαλλίδα της ευδεμίδας

Πηγή: <https://plantwiseplusknowledgebank.org/doi/10.1079/pwkb.species.42794>

Ενώ κατά την περίοδο που οι νύμφες διαχειμάζουν, έρχονται αντιμέτωπες με αρκετά χαμηλές θερμοκρασίες χωρίς να διατρέχουν κίνδυνο, όταν ξεκινάει η ανάπτυξη μετά την διάπαυση του χειμώνα, θερμοκρασίες κάτω των 7°C μπορούν να αποβούν θανατηφόρες.



Εικόνα 10: Ενήλικο έντομο (ακμαίο) της ευδεμίδας

Πηγή: <https://gd.eppo.int/taxon/POLYBO>

2.3.2 Τρόπος δράσης - Ζημιές

Η ευδεμίδα της αμπέλου αποτελεί για την Παλαιαρκτική ζώνη ένα από τα πιο επιβλαβή έντομα-παράσιτα (Thiéry et al. 2018), με την Ελλάδα συγκεκριμένα να έχει καταγράψει σε βάθος τετραετία απώλειες μέχρι και 27% της συνολικής παραγωγής (Moschos, 2006). Οι ζημιές ωστόσο που μπορεί να προκαλέσει ανέρχονται τόσο σε ποιοτικό, όσο και σε ποσοτικό επίπεδο για τις καλλιέργειες.

Όπως προαναφέρθηκε, κατά τον κύκλο ζωής του εντόμου οι διάφορες γενεές που καταγράφονται από την άνοιξη μέχρι το φθινόπωρο, επιτίθενται σε διαφορετικά καρποφόρα όργανα του φυτού της αμπέλου. Για αρχή, οι προνύμφες τρεφόμενες από τις συστάδες λουλουδιών και αργότερα από τις ράγες του αμπελιού μέσα στο καλοκαίρι, οδηγούν σε σημαντική απώλεια ποσότητας της συνολικής παραγωγής. Συνήθως μια προνύμφη μπορεί να προσβάλλει από 2 μέχρι 10 ράγες ενώ σημαντική διαφοροποίηση είναι ότι προνύμφες που τρέφονται από ώριμα φρούτα (ή/και προβεβλημένα από Βοτρύτη) τείνουν να μετατρέπονται σε μακροβιότερα ακμαία έντομα που με τη σειρά τους θα αφήσουν περισσότερα αυγά. Παράλληλα, η διαδικασία κατά την οποία οι προνύμφες τρέφονται, εντείνει την έμμεση ζημιά των σταφυλιών καθιστώντας τα ευαίσθητα σε προσβολές από άλλους μυκητιακούς παράγοντες ασθενειών (π.χ *Botrytis cinerea*, *A. niger* και *Aspergillus carbonarius*) (Cozzi et al., 2006; Reineke and Thiéry, 2016). Ακόμη, αυξάνεται και ο κίνδυνος εμφάνισης της μύγας των φρούτων που μπορεί να παρατείνει την σήψη των σταφυλιών, στοιχεία που θα προκαλέσουν δυσάρεστες γεύσεις και αρώματα στον παραγόμενο οίνο (Aguirre-Zapata et al., 2023).

Σε μια τέτοια προσβολή από την *Lobesia botrana*, παρατηρούνται στο αμπέλι συρρικνωμένες ράγες, ιστοί που συνδέουν ράγες και τσαμπιά αντίστοιχα, ανασκαμμένες ράγες σταφυλιών από τις προνύμφες, ακόμη και ολόκληρα τσαμπιά σε σήψη, όταν το επιτρέπουν οι κλιματικές και περιβαλλοντικές συνθήκες (Varela et al., 2011).



Εικόνα 11: Απεικόνιση προνύμφης της ευδεμίδας που τρέφεται από ώριμη ράγα σταφυλιού

Πηγή: <https://worldofplants.ai/en/%D9%81%D8%B1%D8%A7%D8%B4%D8%A9-%D8%AB%D9%85%D8%A7%D8%B1-%D8%A7%D9%84%D8%B9%D9%86%D8%A8/>

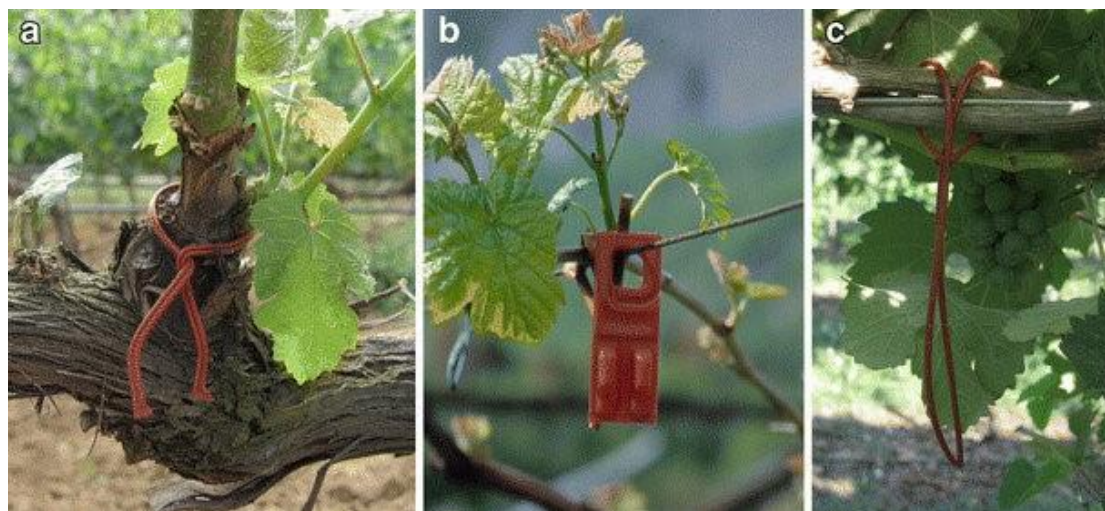
2.3.3 Αντιμετώπιση

Η ευδεμίδα της αμπέλου (*Lobesia botrana*) πρόκειται για ένα έντομο υψηλής σημασίας στον τομέα της αμπελουργίας και συγκεκριμένα για τις χώρες της Μεσογείου και της Λατινικής Αμερικής (Χιλή, Αργεντινή), όπου καταγράφονται οι περισσότερες ζημιές και απώλειες. Η εύκολη προσαρμογή του σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές, όντας πολυφάγο είδος, σε συνδυασμό με την προσαρμογή του στην κλιματική αλλαγή, δημιουργεί προβλήματα στις καλλιεργούμενες περιοχές αλλά και μια δυσλειτουργία στο συγχρονισμό του με τους φυσικούς του εχθρούς (Altimira et al., 2021).

Η ανάγκη για την αντιμετώπιση της *Lobesia botrana*, έχει οδηγήσει στον σχεδιασμό αρκετών μαθηματικών μοντέλων με στόχο την κατανόηση του βιολογικού του κύκλου, του βολτινισμού και γενικότερα τη δυναμική του πληθυσμού του σε διάφορες γεωγραφικές εκτάσεις, χρησιμοποιώντας συνήθως βιοκλιματικούς δείκτες (Bellia et al., 2007; Bonnefoy et al., 2010; Gallardo et al., 2009; Jones and Davis, 2000; Milonas et al., 2001; Murray, 2008; Santos et al., 2012). Μερικά από αυτά τα μοντέλα μπορούν να βοηθήσουν στη σωστή διαχείριση της ευδεμίδας και έχουν δείξει τη δυνατότητα ερμηνευτικότητας σε διαφορετικές περιοχές με αρκετά υψηλά ποσοστά επιτυχίας (89.6%) στην περιγραφή του βολτινισμού (Aguirre-Zapata et al., 2023). Αυτά

τα μοντέλα λειτουργούν ως μια καθοδήγηση των αμπελουργών για τη μετέπειτα επιλογή των κατάλληλων μεθόδων αντιμετώπισης της ευδεμίδας.

Ένας από τους πιο διαδεδομένους τρόπους που χρησιμοποιείται εδώ και αρκετά χρόνια είναι οι παγίδες φερομονών και η διαταραχή ζευγαρώματος που επιφέρουν (Εικόνα 12). Συγκεκριμένα, πρόκειται για ανθρώπινες κατασκευές που εκπέμπουν πτητικές χημικές ενώσεις παρόμοιες με αυτές που εκκρίνονται φυσιολογικά από τα άτομα της ευδεμίδας, με σκοπό τον αποπροσανατολισμό, τη διαταραχή στη σεξουαλική συμπεριφορά των ατόμων του εντόμου ή/και τον εγκλωβισμό τους (σε άλλα μοντέλα) (Schmitz et al., 1996). Πρόκειται για μια διαδικασία με εύκολη εφαρμογή που επιφέρει υψηλά ποσοστά επιτυχίας σε βάθος χρόνου ενώ ταυτόχρονα δε δημιουργεί απόβλητα και δεν αλλοιώνει το περιβάλλον (Silva-Moreno and Tapia, 2020). Βέβαια το ποσοστό επιτυχίας επηρεάζεται άμεσα από τη δυναμική του πληθυσμού της ευδεμίδας σε μια περιοχή καθώς σε υψηλότερη πυκνότητα πληθυσμού δε μπορεί να διαταραχθεί πλήρως το ζευγάρι και επομένως η αποτελεσματικότητα των φερομονών μειώνεται σημαντικά (Schmitz et al., 1996).

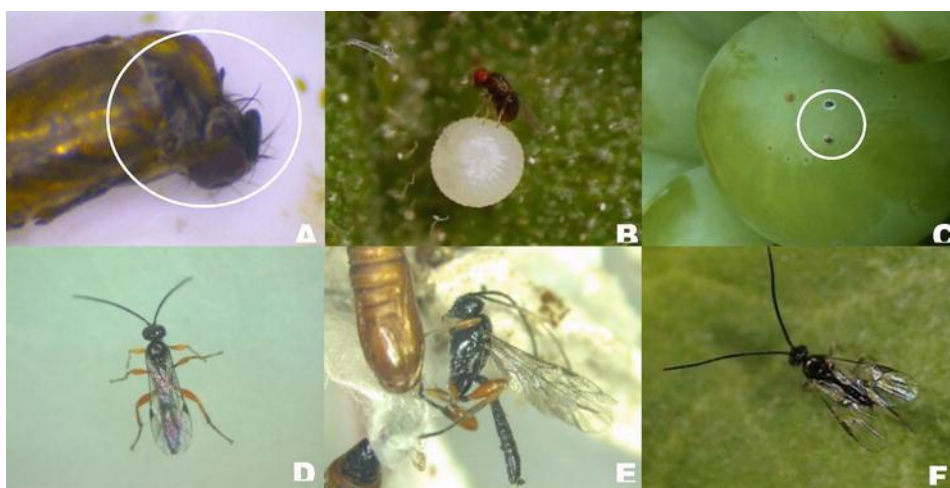


Εικόνα 12: Οι πιο συνηθισμένοι χειροποίητοι διανομείς φερομόνης που χρησιμοποιούνται στους ιταλικούς αμπελώνες: (a) ShinEtsu Isonet L, (b) Διανομέας BASF-RAK, (c) Διανομέας Isonet LE ShinEtsu

Πηγή: https://www.researchgate.net/publication/305344035_Semiochemical_Strategies_for_Tortricid_Moth_Control_in_Apple_Orchards_and_Vineyards_in_Italy

Με την εξέλιξη της τεχνολογίας και την επιτακτική ανάγκη για χρήση βιολογικών προϊόντων στις καλλιέργειες, η κατηγορία της χρήσης βιολογικών μεθόδων αντιμετώπισης της ευδεμίδας έχει εξελιχθεί ραγδαία. Ειδικότερα, η χρήση εντομοπαθογόνων μυκήτων, στοχεύει στον έλεγχο του πληθυσμού των εντόμων ως

εναλλακτική λύση έναντι των συμβατικών χημικών σκευασμάτων. Στη αγορά συγκεκριμένα, κυκλοφορούν σκευάσματα βασισμένα σε εντομοπαθογόνους μύκητες με ευρύ φάσμα σε ξενιστές και ευκολία στη μαζική παραγωγή, όπως είδη του γένους *Beauveria* και *Metarhizium* (Butt et al., 2016). Ανάλογα με τις ανάγκες της χρονιάς και τους κανονισμούς κάθε χώρας πραγματοποιούνται ψεκασμοί στις αμπελοκαλλιέργειες για την εξάλειψη της ευδεμίδας. Ταυτόχρονα η χρήση φυσικών εχθρών ως αρπακτικά ή παράσιτα, τα οποία τρέφονται από τα αβγά, τις προνύμφες και τις χρυσαλίδες της ευδεμίδας σημειώνουν σημαντικά αποτελέσματα και έχουν τη δυνατότητα δράσης πριν την καταστροφή που μπορεί να επιφέρει η ευδεμίδα στις καλλιέργειες (Silva-Moreno and Tapia, 2020).



Εικόνα 13: Φυσικοί εχθροί για τον έλεγχο της ευδεμίδας της αμπέλου: (Α) ενήλικο *Phytomyza nigrina* (Diptera:Tachinidae) που αναδύεται από τη χρυσαλίδα της ευδεμίδας. (Β) *Trichogramma* sp., παρασιτικό αυγό. (C) Αβγά της ευδεμίδας παρασιτισμένα από *Trichogramma*. (D) ενήλικο *Ichneumonidae*. (E) ενήλικο *Ichneumonidae* που παρασιτούν τη χρυσαλίδα της *L. botrana*. (F) ενήλικο *Aranteles* sp.

Πηγή: <https://www.intechopen.com/chapters/77973>

Επιπλέον, στην κατηγορία των βιολογικών μεθόδων αντιμετώπισης της ευδεμίδας κατατάσσονται και τα βιοπαρασιτοκτόνα με κύρια σκευάσματα αυτά που βασίζονται στο *Bacillus thuringiensis*, που εμφανίζουν υψηλά ποσοστά αποτελεσματικότητας, δεν βλάπτουν τα ωφέλιμα έντομα και δεν επηρεάζουν την ανθρώπινη υγεία.

Καταληκτικά, για τη σωστή διαχείριση του πληθυσμού της ευδεμίδας σε παγκόσμιο επίπεδο και για να αποφευχθεί η εξάπλωση της σε καινούριες καλλιεργούμενες περιοχές, είναι απαραίτητο να τηρούνται σωστά και οι κανόνες υγιεινής. Είναι σημαντικό, ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται σε καλλιεργούμενες

περιοχές κατά τη συγκομιδή ή το κλάδεμα, να αποστειρώνεται αυστηρά πριν και μετά από κάθε χρήση (Varela et al., 2011).

2.4 Η κοχυλίδα της αμπέλου

Η κοχυλίδα της αμπέλου (*Eupoecilia ambiguella*, Lepidoptera: Tortricidae) είναι ένα έντομο που περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1796 από τον Hübner υπό την ονομασία *Tinea ambiguella* (Ioriatti et al., 2012) και αποτελεί γηγενές είδος της Παλαιαρκτικής ζώνης. Ο κύριος ξενιστής της κοχυλίδας είναι το είδος *Vitis vinifera* αλλά μπορεί να προσβάλλει και άλλα φυτά, με τις προνύμφες συγκεκριμένα να μπορούν να αναπτυχθούν σε παραπάνω από 30 είδη θάμνων (Gilligan and Epstein, 2014; Reineke et al., 2021). Συνήθως η κοχυλίδα συγχέεται με την ευδεμίδα της αμπέλου διότι παρουσιάζουν παρόμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά και ίδιο κύκλο ζωής ενώ παράλληλα εντοπίζονται σε παρόμοιες γεωγραφικές περιοχές.



Εικόνα 14: Ακμαίο αρσενικό έντομο της *Eupoecilia ambiguella* (αριστερά) και θηλυκό ακμαίο έντομο της *Eupoecilia ambiguella* (δεξιά)

Πηγή: https://idtools.org/id/leps/tortai/Eupoecilia_ambiguella.htm

Ωστόσο, η *Eupoecilia ambiguella* εκφράζει μια προτίμηση σε ψυχρότερες, υγρές κλιματικές συνθήκες, γι' αυτό και κυριαρχεί στην βόρεια Ευρώπη όπου συνήθως πραγματοποιεί δύο μέχρι τρεις γενεές (Roehrlich and Boller, 1991; Ioriatti et al., 2012; Am et al., 1976). Τις περισσότερες χρονιές παρατηρούνται και τα δύο είδη εντόμων στις καλλιέργειες ενώ κάποιες φορές μπορεί το ένα είδος να κυριαρχήσει έναντι του άλλου ανάλογα με τις κλιματολογικές συνθήκες (Schmidt et al., 2003). Η εξέλιξη της κοχυλίδας διακρίνεται σε τέσσερα στάδια ανάπτυξης (αβγό, προνύμφη, χρυσαλίδα, ακμαίο έντομο) και περνάει από διαδικασία διάπαυσης κατά τους χειμερινούς μήνες. Η κοχυλίδα παρουσιάζει ομοιότητες με την ευδεμίδα στην ωοτοκία (Benelli et al., 2023a) με μικρές μορφολογικές διαφοροποιήσεις στα γεννητικά όργανα

ενώ παρομοίως με την ευδεμίδα, τα θηλυκά είναι συνήθως μεγαλύτερα από τα αρσενικά ακμαία έντομα.

Παρά τις αναφορές περί εμφάνισης της κοχυλίδας σε περιοχές της Βραζιλίας (Whittle, 1986) και της Ινδίας, δεν έχουν επαληθευτεί μέχρι σήμερα και δεν έχει υπάρξει άλλη αναφορά με αποτέλεσμα να μην είναι έγκυρα στοιχεία σύμφωνα με την EPPO (2022). Η κοχυλίδα επομένως θεωρείται είδος που είναι εγκατεστημένο και αποτελεί μέχρι στιγμής πρόβλημα για τις καλλιέργειες μόνο στην Ευρώπη και σε ορισμένες περιοχές της Ασίας (Gilligan and Epstein, 2014).

Από την ανακάλυψη της και την αναγνώριση των ζημιών που επιφέρει στις καλλιεργούμενες περιοχές και συγκεκριμένα στο αμπέλι, έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι αντιμετώπισης της, από παγίδες φερομονών, βιολογικούς τρόπους, αλλά και εντομοκτόνα.

2.4.1 Βιολογικός κύκλος

Όταν οι θερμοκρασίες αυξάνονται σταδιακά και ξεκινάει η περίοδος της άνοιξης, αρχίζουν τα πρώτα κουκούλια της κοχυλίδας που είχαν διαχειμάσει, να ανοίγουν και να απελευθερώνονται οι πρώτες ενήλικες πεταλούδες. Με τις πρώτες πτήσεις να πραγματοποιούνται, τα θηλυκά καλούν μέσω φερομονών τα αντίστοιχα αρσενικά ενήλικα έντομα καθιστώντας την έναρξη του ζευγαρώματος (Schmieder-Wenzel and Schruft, 1990). Αφού η διαδικασία ολοκληρωθεί επιτυχώς, τα θηλυκά εναποθέτουν ύστερα από λίγες ημέρες τα αυγά τους (έως και 100) μεμονωμένα σε μίσχους, μπουμπούκια και λουλούδια της αμπέλου. Τα αυγά (0.8mm μήκος x 0.6mm πλάτος) είναι καφέ-γκρι στην αρχή ενώ αργότερα εμφανίζουν πορτοκαλί στίγματα (Alford, 2007) και η ανάπτυξη τους διαρκεί από 7 έως 13 ημέρες ανάλογα με τις κλιματικές συνθήκες που επικρατούν (Frolov, 2010). Οι προνύμφες της πρώτης γενεάς έχουν πέντε στάδια ανάπτυξης, εξίσου με την ευδεμίδα (L1- L5). Μόλις εκκολαφθούν εισχωρούν και τρέφονται από τα μπουμπούκια, με τις μεταγενέστερα μεγαλύτερες προνύμφες να σχηματίζουν ιστούς μεταξύ των ταξιανθιών (Gilligan and Epstein, 2014). Η ανάπτυξη των προνυμφών ανάλογα με τα θερμοκρασιακά εύρη και τα επίπεδα υγρασίας διαρκεί από 15 έως 25 ημέρες. Έπειτα, οι προνύμφες της πρώτης γενεάς τυλίγονται σε ένα κουκούλι όπου μετατρέπονται σε χρυσαλίδες (5-8mm) και παραμένουν ανάμεσα στις ταξιανθίες ή στα φύλλα και τους βλαστούς μέχρι τη τελική

μεταμόρφωση τους σε ενήλικες πεταλούδες (Frolov, 2010). Η πτήση της δεύτερης γενιάς ακμαίων εντόμων πραγματοποιείται συνήθως κατά τον Αύγουστο-Σεπτέμβριο, όπου ζευγαρώνουν ξανά και τα θηλυκά εναποθέτουν τα αυγά τους στα πρώιμα σταφύλια. Με τη σειρά τους, οι προνύμφες της δεύτερης γενεάς προσβάλλουν τα σταφύλια για να μπορέσουν να τραφούν και να αναπτυχθούν. Όταν η δεύτερη γενεά προνυμφών αναπτυχθεί πλήρως εξέρχεται από τα σταφύλια και σχηματίζει τα κουκούλια κάτω από τον φλοιό του φυτού όπου θα παραμείνει σε κατάσταση διαχείμασης μέχρι την επόμενη άνοιξη (Gilligan and Epstein, 2014). Στις χώρες της βόρειας Ευρώπης που η κοχυλίδα κυριαρχεί, πραγματοποιεί συνήθως δύο ολόκληρες γενεές αλλά μπορεί να πραγματοποιήσει και μια ακόμη σε περιοχές όπως η βόρεια Ιταλία που καταγράφονται υψηλότερες θερμοκρασίες (Ricciardi et al., 2024).

Την επόμενη άνοιξη, εάν δεν ληφθούν μέτρα αντιμετώπισης και οι θερμοκρασίες επιτρέψουν τη διακοπή της διαχείμασης των χρυσαλίδων, θα αναπτυχθεί η νέα γενιά της κοχυλίδας.

2.4.2 Τρόπος δράσης - Ζημιές

Η κοχυλίδα της αμπέλου (*Eupoecilia ambiguella*) θεωρείται μαζί με την ευδεμίδα, από τα σημαντικότερα είδη που προσβάλλουν το καλλιεργούμενο αμπέλι στην Ευρώπη και δημιουργεί παρομοίως τεράστια προβλήματα τόσο στην παραγόμενη ποσότητα όσο και στη μετέπειτα ποιότητα του οίνου.

Οι βλάβες και οι ζημιές που προκαλούνται από τις προνύμφες της κοχυλίδας δεν διαφέρουν από τις προαναφερόμενες ζημιές που εντοπίζονται κατά τη δράση της ευδεμίδας (Molet and Mackesy, 2010). Το συγκεκριμένο είδος φαίνεται να δείχνει μια προτίμηση σε λευκές ποικιλίες σταφυλιών λόγω της παραπάνω ευαισθησίας των φυτών σε προσβολές σε αντίθεση με τις σκούρες κόκκινες ποικιλίες. Η πρώτη γενεά είναι ικανή να καταστρέψει τις ταξιανθίες και τα μπουμπούκια των φυτών της αμπέλου. Η δεύτερη γενεά προνυμφών που εκκολάπτεται αργότερα μέσα στο καλοκαίρι είναι υπεύθυνη για την καταστροφή των ραγών καταναλώνοντας τον εσωτερικό χυμό και τα άγουρα κουκούτσια (Gilligan and Epstein, 2012). Οι προνύμφες της δεύτερης γενεάς μπορούν να ζημιώσουν από 9 μέχρι και 12 ράγες σταφυλιών κατά την ανάπτυξη τους (Alford, 2007) ενώ παράλληλά συνδέουν με ιστούς τα προσβεβλημένα τσαμπιά μεταξύ τους μέχρι να δημιουργήσουν το κουκούλι τους.



Εικόνα 15: Προνύμφη της κοχυλίδας της αμπέλου (*Euroecilia ambiguella*) σε ράγα σταφυλιού (Photo: Ric Bessin, University of Kentucky)
Πηγή: <https://fruitscout.ca.uky.edu/grape-berry-moth-grapes>

Η δεύτερη γενεά προνυμφών είναι αυτή που δημιουργεί το μεγαλύτερο πρόβλημα στις καλλιέργειες καθώς από τις ζημιές που επιφέρει, από τις μεταξωτές δικτυώσεις που σχηματίζουν οι προνύμφες και από τις κολλώδεις εκκρίσεις τους, εδραιώνουν τις κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης δευτερογενών ασθενειών. Ασθένειες όπως ο *Botrytis cinerea* κάτω από υγρές, ευνοϊκές συνθήκες, μπορεί να μεταφερθεί σε όλη την καλλιέργεια και να δημιουργήσει μεγάλες απώλειες και αλλοιώσεις στην παραγωγή.

Όταν τα σταφύλια είναι προσβεβλημένα από τις προνύμφες, τείνουν να ελκύουν και μύγες φρούτων, οι οποίες με τη σειρά τους επιφέρουν την όξινη σήψη που επίσης δημιουργεί προβλήματα στην παραγωγή και την ποιότητα.

2.4.3 Αντιμετώπιση

Η παρουσία της κοχυλίδας (*Euroecilia ambiguella*) στους ευρωπαϊκούς αμπελώνες σε συνδυασμό με την ύπαρξη της ευδεμίδας (*Lobesia botrana*), δημιουργεί σημαντικά προβλήματα στους αμπελουργούς. Στην προσπάθεια λοιπόν να μειώσουν το επίπεδο των ζημιών στις καλλιέργειές τους, αρκετά προγράμματα παρακολούθησης του κύκλου ζωής και της δυναμικής των πληθυσμών της κοχυλίδας, όπως αντίστοιχα και με την ευδεμίδα, στοχεύουν στον έλεγχο αυτών των πληθυσμών (Comşa et al.,

2022). Πλέον, λόγω της υπερβολικής χρήσης εντομοκτόνων στις καλλιέργειες, η κοχυλίδα, μεταξύ άλλων εντόμων έχει αναπτύξει ανοχή σε αυτά και αυτό έχει οδηγήσει σε διαφορετική αντιμετώπιση της. Συγκεκριμένα, η αποτυχία αρκετών συμβατικών εντομοκτόνων να μειώσουν τον πληθυσμό της κοχυλίδας και ιδιαίτερα στα μετέπειτα στάδια ανάπτυξης της προνύμφης, έχουν δημιουργήσει συστήματα ολοκληρωμένης διαχείρισης που βασίζονται κατά βάση στην πρόληψη (Mirică, I. and Mirică, A., 1986; Markheiser et al., 2017). Τα αποτελέσματα από αυτά τα μοντέλα πρόληψης και καταγραφής των πληθυσμών κρίνουν την παρέμβαση των καλλιεργητών τη σωστή χρονική στιγμή, με το καταλληλότερο τρόπο αντιμετώπισης (Blümel et al., 2020; Sciarretta and Trematerra, 2014; Brenner et al., 1998). Λόγω των σημαντικών ομοιοτήτων που εμφανίζουν η *Euroecilia ambiguella* και η *Lobesia botrana*, οι μέθοδοι αντιμετώπισης της κοχυλίδας που αναλύονται παρακάτω είναι αρκετά συγκρίσιμοι με της ευδεμίδας (Ricciardi et al., 2024).

Η χρήση παγίδων φερομονών είναι από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές που προκαλούν διαταραχές στο ζευγάρι μεταξύ θηλυκών και αρσενικών ενήλικων εντόμων καθώς είναι εύκολα στη χρήση και με πολύ καλά αποτελέσματα (Ioriatti et al., 2012). Με την ταυτοποίηση της χημικής δομής της φερομόνης που εκπέμπουν φυσιολογικά τα θηλυκά της κοχυλίδας για να ελκύσουν τα αρσενικά και να ζευγαρώσουν, ενισχύθηκε ακόμη περισσότερο ο σχηματισμός των κατάλληλων παγίδων που πιάνουν τα αρσενικά ακμαία έντομα (Am et al., 1976).

Απεναντίας, σε αμπελώνες που λόγω ανάγλυφου και μικρής έκτασης δεν είναι δυνατή η χρήση παγίδων φερομονών, μοντέλα παρακολούθησης και καταγραφής των αβγών της κοχυλίδας μπορούν να προσδιορίσουν την χρήση χημικών εντομοκτόνων την κατάλληλη χρονική στιγμή (Gross and Gündermann, 2016).

Τα εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της κοχυλίδας είναι κυρίως συνθετικά (Thiéry et al., 2018) ή οργανοφωσφορικές ενώσεις (Ioriatti et al., 2012) ή προϊόντα οργανικής προέλευσης (Kos, 2001) που στοχεύουν σε αβγά και σε προνύμφες. Με βάση τα στοιχεία που συλλέγονται από τα μοντέλα παρακολούθησης των δυναμικών πληθυσμού σε κάθε περιοχή και με βάση την αναγκαιότητα παρέμβασης, γίνονται και οι αντίστοιχοι ψεκασμοί. Για παράδειγμα είναι αναγκαίος ένας ψεκασμός εάν παρατηρηθεί προσβολή στις ταξιανθίες από την πρώτη γενεά προνυμφών σε ποσοστό 50% και άνω. Αντίστοιχα, εάν στη δεύτερη γενεά προνυμφών παρατηρηθεί 5-15% προσβολή των τσαμπιών, λόγω της μεγαλύτερης ζημιάς που επιφέρει η συγκεκριμένη γενεά, είναι απαραίτητος ένας ακόμη ψεκασμός

(Whittle, 1986; Ioriatti et al., 2012). Συνήθως επιλέγονται εντομοκτόνα που παρουσιάζουν τα λιγότερα προβλήματα στο περιβάλλον ενώ δεν είναι τοξικά για τον άνθρωπο και τους φυσικούς εχθρούς της κοχυλίδας (Lucchi and Benelli, 2018).

Στις περιπτώσεις που δεν είναι δυνατή ή επιτυχής η χρήση εντομοκτόνων, υπάρχουν βιολογικοί μέθοδοι αντιμετώπισης της κοχυλίδας. Ένα παράδειγμα είναι η επιλεκτική χρήση των φυσικών εχθρών και παρασιτοειδών της κοχυλίδας που ανήκουν κυρίως στην κατηγορία των Υμενόπτερον (Braconidae, Chalcididae, Ichneumonidae, Elasmidae, Eulophidae, Pteromalidae, και Trichogrammatidae) και των Δίπτερον (Tachinidae) (Sentenac, 2011; Bărbuceanu and Andriescu, 2012; Thiéry et al., 2018). Βέβαια, η συγκεκριμένη μέθοδος δεν έχει συστηματικά αποτελέσματα (Ibrahim, 2004) και επομένως δεν θεωρείται κατάλληλη για τη χρήση σε μεγάλη κλίμακα (Thiéry et al., 2018). Παράλληλα, παρά την επιτυχία του *Bacillus thuringiensis* ως βιολογική μέθοδος αντιμετώπισης, δε χρησιμοποιείται ευρέως λόγω της σύντομης επιμονής του (Ioriatti et al., 2012). Μια υποσχόμενη μέθοδος που ανήκει στο βιολογικό έλεγχο της κοχυλίδας είναι η χρήση εντομοπαθογόνων μυκητών από σκευάσματα που βασίζονται σε στελέχη του *B. bassiana* και *M. robertsii* που μπορούν να προσβάλλουν τις προνύμφες της κοχυλίδας χωρίς να προκαλούν προβλήματα στο φυτό και στον άνθρωπο.

Ακόμη, όπως αναφέρθηκε και στην περίπτωση της ευδεμίδας (κεφ. 2.3.3) μια μέθοδος πρόληψης είναι η χρήση αποστειρωμένων εργαλείων στους αμπελώνες αλλά και η αποστείρωση μετά από κάθε χρήση για την αποφυγή επιμολύνσεων ή εισαγωγής του εντόμου σε καινούριες περιοχές.

Κεφάλαιο 3. Γεωγραφική εξάπλωση και δυναμική των πληθυσμών της ευδεμίδας (*Lobesia botrana*) και της κοχυλίδας (*Eupoecilia ambiguella*)

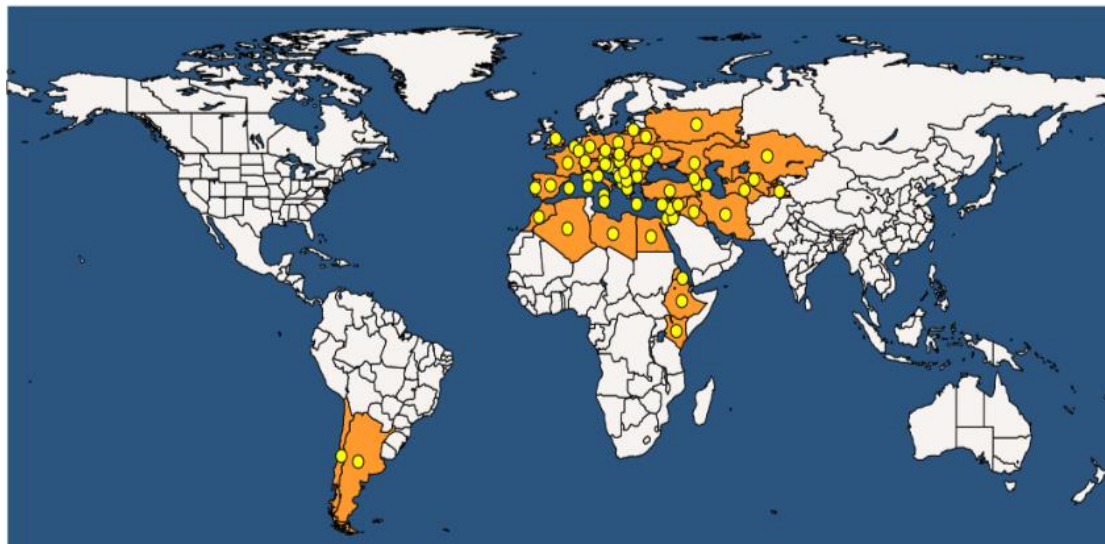
Το αμπέλι είναι ένα φυτό που ενώ ξεκίνησε ως ένα άγριο είδος, μπόρεσε με το πέρασμα των αιώνων να εξευγενιστεί και μέσα από τις καλλιέργειες του ανθρώπου, να μπορέσει να υπάρξει σε πολλές περιοχές ανά τον κόσμο είτε για την παραγωγή οίνου ή για την παραγωγή βρώσιμων σταφυλιών. Στη σύγχρονη εποχή, η οινική παραγωγή είναι μεγάλης οικονομικής σημασίας και γι' αυτό το λόγο κάθε ασθένεια ή εχθρός που

τη βάζει σε κίνδυνο, χρήζει άμεσης παρακολούθησης και αντιμετώπισης. Ήδη από την αρχαιότητα υπήρχαν αρκετές αναφορές στα προβλήματα που δημιουργούσαν οι προνύμφες διαφόρων σκώρων στο φυτό της αμπέλου οι οποίες οδηγούσαν σε ποσοτικές απώλειες των σταφυλιών ή σε υποβάθμιση του παραγόμενου οίνου (Ioriatti et al., 2023).

Πλέον, η ευδεμίδα (*Lobesia botrana*) και η κοχυλίδα (*Eupoecilia ambiguella*) της αμπέλου είναι από τα βασικότερα έντομα που προσβάλλουν το αμπέλι και δημιουργούν προβλήματα στην παραγωγή. Τα συγκεκριμένα είδη σκώρου παρουσιάζουν αρκετές βιολογικές και μορφολογικές ομοιότητες, ταυτόχρονα δρουν με τον ίδιο τρόπο, ενώ αρκετές φορές εντοπίζονται σε παρόμοιες περιοχές σε διαφορετικά πληθυσμιακά επίπεδα (Ioriatti et al., 2012). Μια σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ειδών, που αντικατοπτρίζεται και στη γεωγραφική τους εξάπλωση, είναι η προτίμηση τους σε διαφορετικές κλιματικές συνθήκες. Η κοχυλίδα της αμπέλου προτιμάει γενικότερα πιο ψυχρά κλίματα και υψηλά ποσοστά υγρασίας ενώ η ευδεμίδα επιλέγει ξηρές περιοχές με υψηλότερες θερμοκρασίες (Thiéry, 2005).

Το είδος *Lobesia botrana* χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά το 1775 και εντοπίστηκε σε καλλιέργειες αμπέλου στην Αυστρία περίπου το 1800 (Bovey, 1966). Θεωρείται γηγενές είδος της Δυτικής Παλαιαρκτικής ζώνης και συγκεκριμένα της Ν. Ιταλίας το οποίο συστηματικά εξαπλώθηκε στην κεντρική και δυτική Ευρώπη (Maher and Thiéry, 2006). Οι προνύμφες της ευδεμίδας δημιουργούν τα περισσότερα προβλήματα στις καλλιέργειες των χωρών της Νότιας Ευρώπης όπως: η Ελλάδα, η Γαλλία, η κεντρική και Νότια Ισπανία, η Πορτογαλία, η Ιταλία και γενικότερα τα νησιά στη λεκάνη της Μεσογείου όπου καταγράφονται υψηλότερες θερμοκρασίες (Thiéry, 2005). Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν υπάρξει αναφορές στο είδος της ευδεμίδας εκτός Ευρώπης, όπως στη Βόρεια και Νότια Αμερική με περιστατικά εμφάνισης να καταγράφονται στην Καλιφόρνια το 2009, τη Χιλή το 2008 και την Αργεντινή το 2010 (Gonzales, 2010; Varela et al., 2011). Αυτή η εμφάνιση της ευδεμίδας έχει αποδοθεί σε πιθανή μετάδοση από χώρες της Δυτικής Ευρώπης ύστερα από σύγκριση των ειδών που εντοπίστηκαν στις ζώνες της Αμερικής με αυτά της Γαλλίας και της Ισπανίας (Middleton, 2011). Ακόμη, πληθυσμοί της ευδεμίδας έχουν εντοπιστεί και ταυτοποιηθεί σε χώρες της Βόρειας και Δυτικής Αφρικής (π.χ. Ερυθραία, Κένυα, Αιθιοπία) (CABI/ EPPO, 2012; CABI, 2022) ενώ στίγματα που καταγράφηκαν στην Ιαπωνία (Bae and Komai, 1991) αποτέλεσαν απόρροια εσφαλμένης αναγνώρισης ενός άλλου είδους σκώρου (EPPO, 2022). Στην Καλιφόρνια, ύστερα από εκτεταμένες

προσπάθειες εξάλειψης, το 2016 (Simmons et al., 2021a) δηλώθηκε ότι η εκρίζωση του είδους ολοκληρώθηκε. Από το 2016 υφίσταται μια φάση παρακολούθησης για να επιβεβαιωθεί η εκρίζωση ή να εντοπιστεί η επανεισαγωγή της.

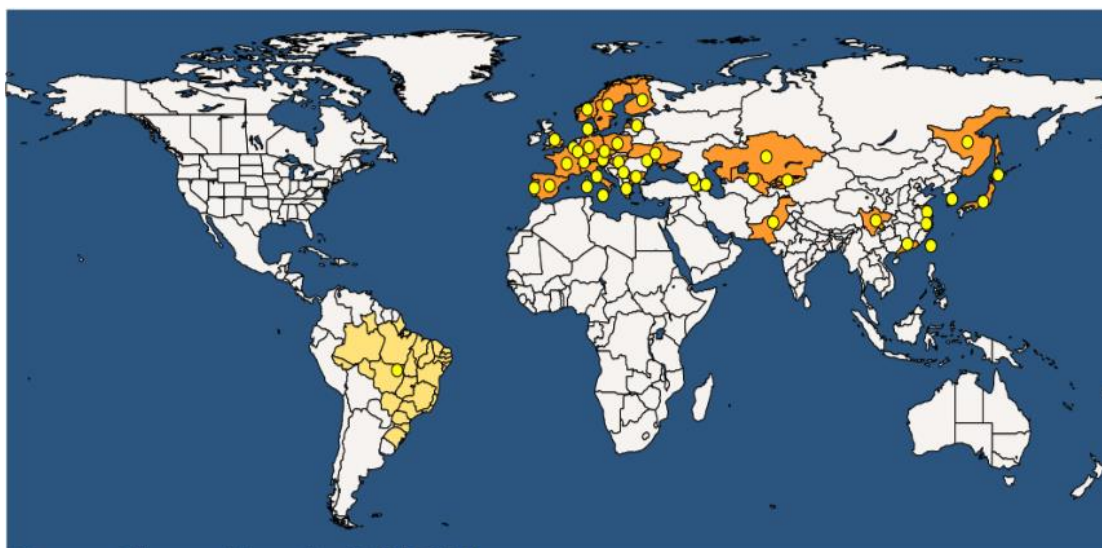


Εικόνα 16: Εξάπλωση πληθυσμών της ευδεμίδας (*Lobesia botrana*) στον παγκόσμιο χάρτη
Πηγή: EPPO Global Database (<https://gd.eppo.int/taxon/POLYBO/distribution>)

Ανάλογα με τις κλιματικές συνθήκες και τη γεωγραφική έκταση, η ευδεμίδα πραγματοποιεί από δύο μέχρι τέσσερις γενεές κατά τους καλοκαιρινούς μήνες στην Ευρώπη (Roditakis and Karandinos, 2001; Harari et al., 2007) μέχρι που έρχεται σε διάπαυση από το φθινόπωρο μέχρι και την επόμενη άνοιξη. Στην κεντρική Ευρώπη (Αυστρία, Βόρεια Γαλλία, Ελβετία και Γερμανία) λόγω χαμηλότερων θερμοκρασιών πραγματοποιεί 2 έως 3 γενιές το χρόνο, ενώ στα πιο ζεστά κλίματα της Νότιας Γαλλίας, της Ελλάδας, της Ισπανίας, της Πορτογαλίας της Ιταλίας και ορισμένων Βαλκανικών χωρών, μπορεί και πραγματοποιεί μια ακόμη τέταρτη, μερική ή ολοκληρωμένη γενιά (Amo-Salas et al., 2011). Στο Τουρκμενιστάν έχουν παρατηρηθεί μέχρι και πέντε γενεές του εντόμου. Ενώ είναι ένα είδος που περνάει από διάπαυση προκειμένου να ανταπεξέλθει τις ψυχρές θερμοκρασίες του χειμώνα, σε ορισμένες περιοχές (Κρήτη, Ισραήλ, Αίγυπτο) που οι συνθήκες το επιτρέπουν, η ευδεμίδα έχει την ικανότητα να παραμείνει στο στάδιο της προνύμφης μέχρι τη επόμενη άνοιξη (Ioriatti et al., 2012).

Η κοχυλίδα της αμπέλου είναι εξίσου γηγενές είδος της Παλαιαρκτικής ζώνης το οποίο εντοπίζεται στις περισσότερες χώρες της Ευρώπης (κυρίως κεντρική Ευρώπη), στην κεντρική Ασία, στη Νότιο-ανατολική Ρωσία, στη Μεγάλη Βρετανία και στις Σκανδιναβικές χώρες. Το είδος αυτό δεν έχει μετακινηθεί στην Βόρεια και Νότια Αμερική αν και υπάρχουν παρόμοια γηγενή είδη σε αυτές τις περιοχές (Gilligan et al.,

2014). Χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά το 1796 από τον Hübner υπό την αρχική ονομασία *Tinea ambiguella*, και μέχρι τα μέσα του 19ου αιώνα δημιουργούσε τεράστια προβλήματα σε αμπελώνες της Γαλλία και της Γερμανίας (Vivarelli, 1924). Στην Ιταλία του 19ου αιώνα η κοχυλίδα αποτελούσε το πιο επικίνδυνο είδος εντόμου που επιτίθονταν στο αμπέλι μετά την φυλλοξήρα (Lunardoni, 1889) ενώ δημιουργούσε τα μεγαλύτερα προβλήματα σε αμπελώνες που σημειώνονταν υψηλά επίπεδα υγρασίας (Ioriatti, et al., 2023). Η *Euroecilia ambiguella*, όπως είναι πλέον γνωστή, ολοκληρώνει συνήθως δύο γενεές το χρόνο, αν και τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί στη Βόρεια Ιταλία και τη Γαλλία μια τρίτη γενιά λόγω των υψηλότερων θερμοκρασιών (Marcelin, 1985; Varner and Mattedi, 2004). Γενικότερα, ο βολτινισμός και ο αριθμός των γενεών της ευδεμίδας και της κοχυλίδας σε κάθε περιοχή, ορίζεται από τη θερμοκρασία και τη διάρκεια της ημέρας που με τη σειρά τους επηρεάζουν τον ρυθμό ανάπτυξης και την έναρξη της διαχείμασης των δύο ειδών.



Εικόνα 17: Εξάπλωση πληθυσμών της κοχυλίδας (*Euroecilia ambiguella*) στον παγκόσμιο χάρτη. [Με πορτοκαλί σημειώνεται η επιβεβαιωμένη παρουσία του είδους ενώ με κίτρινο σημειώνεται ο εντοπισμός του που μείνεται να επιβεβαιωθεί]

Πηγή: EPPO Global Database <https://gd.eppo.int/taxon/CLYSAM/distribution>

Στις αρχές του 20ου αιώνα άρχισε να σημειώνεται μια διαφορά στους πληθυσμούς της ευδεμίδας και της κοχυλίδας καθώς παρατηρούνταν μια μετακίνηση των πληθυσμών της κοχυλίδας βορειότερα των Ευρωπαϊκών Άλπεων. Συγκεκριμένα, από έρευνες του Voglino (1914), είχε παρατηρηθεί ότι σε ορισμένους αμπελώνες τα δύο είδη συνυπήρχαν, με το ένα από τα δυο να κυριαρχεί ανάλογα τις κλιματικές συνθήκες. Σταδιακά, η ευδεμίδα αντικατέστησε την κοχυλίδα ως ο πιο επικίνδυνος εχθρός στη λεκάνη της Μεσογείου με τις προσβολές της στους αμπελώνες (Catoni and

Schwangart, 2009; Voglino, 1914). Αυτή η μετακίνηση των πληθυσμών και η αντικατάσταση της κοχυλίδας από την ευδεμίδα οφείλονταν στην κλιματική αλλαγή, σε συνδυασμό με τις τροποποιήσεις σε τεχνικές καλλιέργειας, τις διαφορετικές απαιτήσεις υγρασίας κάθε είδους (Bovey, 1966), αλλά και την αναδιαμόρφωση των πληθυσμών των φυσικών τους εχθρών (Ioriatti et al., 2023).

Τα τελευταία χρόνια, με τη συνεχόμενη αύξηση των θερμοκρασιών, υπάρχει μια μετατόπιση της ευδεμίδας σε περιοχές όπως η Ελβετία, η Αυστρία και η νότια Γερμανία όπου οι πληθυσμοί των δύο ειδών επικαλύπτονται (Ioriatti et al., 2012). Βέβαια αξίζει να σημειωθεί ότι στα μέσα του 20ου αιώνα, όπου σημειώθηκαν χαμηλές θερμοκρασίες και μια αύξηση της σχετικής υγρασίας, παρατηρήθηκε αύξηση στον πληθυσμό της κοχυλίδας στις ίδιες αμπελουργικές ζώνες που είχε αντικατασταθεί από την ευδεμίδα (Zangheri, 1959; Balachowsky, 1966; Lucchi, 2017).

Το είδος *Lobesia botrana* φαίνεται να πραγματοποιεί περισσότερες γενιές τα τελευταία χρόνια ως απόρροια της κλιματικής αλλαγής, με τις πρώτες πτήσεις των ακμαίων εντόμων να ξεκινούν τον Μάρτιο-Απρίλιο (Martín-Vertedor et al., 2010). Η κλιματική αλλαγή είναι μια γνωστή πραγματικότητα πλέον, η οποία πέρα από τα προβλήματα που δημιουργεί στις καλλιέργειες (Santos et al., 2020), έχει μεγάλο αντίκτυπο και στη βιολογία και την εξάπλωση μη ιθαγενών εντόμων σε καινούριες περιοχές (Bale et al., 2002). Αυτή η εισαγωγή των ειδών σε νέα περιβάλλοντα, ειδικότερα μετά τον 16ο αιώνα (Roques et al., 2010) και η ικανότητα τους να προσαρμόζονται εύκολα και άμεσα σε αυτά, οφείλεται εκτός από την ανάπτυξη του εμπορίου και των ελεύθερων συναλλαγών και στην αύξηση της θερμοκρασίας (Kenis et al., 2022). Επιπλέον, τα επίπεδα σχετικής υγρασίας, διοξειδίου του άνθρακα και των ακτινοβολιών UVB συνδέονται με την μετακίνηση και τη διασπορά διαφορετικών ξένων ειδών σε καινούριες γεωγραφικές εκτάσεις που βρίσκονται βορειότερα (Parmesan et al., 1999; Roques et al., 2014; Thiéry and Chuche, 2007).

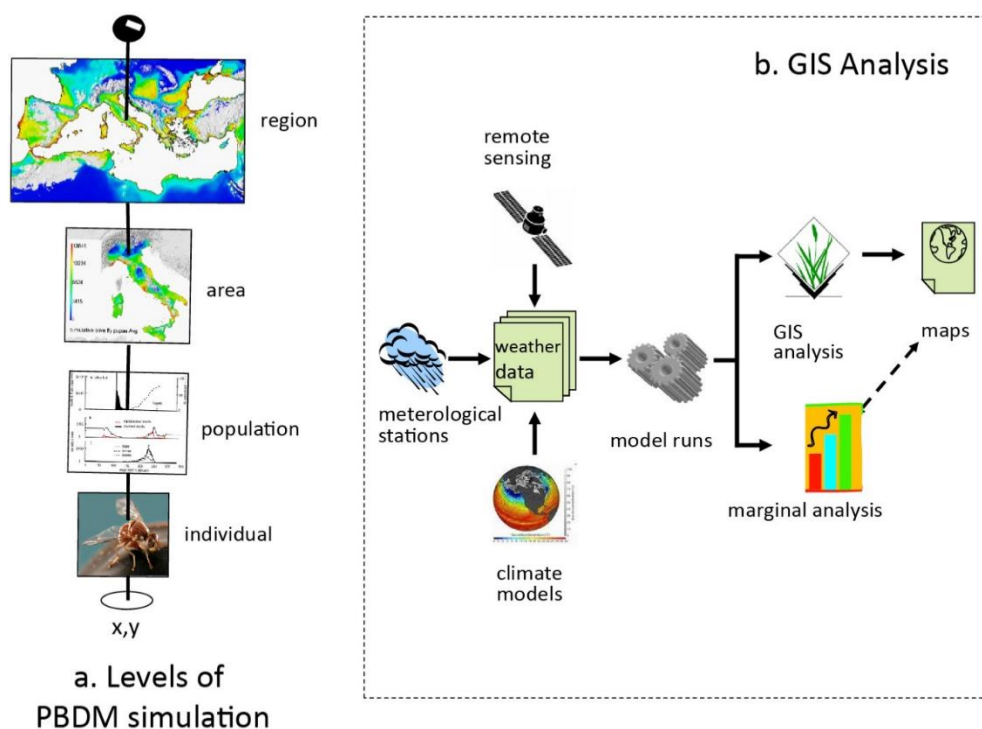
Πιστεύεται ότι η γενικότερη κλιματική ξηρασία ευνόησε περισσότερο την ανάπτυξη και τη διασπορά της ευδεμίδας έναντι της κοχυλίδας που είναι πιο υγρόφιλη. Εκτός της αύξησης των γενεών της *Lobesia botrana* και *Eupoecilia ambiguella* από δύο που ήταν αρχικά, έχει παρατηρηθεί και η μετατόπιση της χρονικής περιόδου που πραγματοποιούνται οι πτήσεις της δεύτερης γενεάς, από τα μέσα Ιουλίου (τον 20 αιώνα) στα τέλη Ιουνίου (Benelli et al., 2023a). Ακόμη, σε μια μελέτη που έγινε, η

αύξηση των θερμοκρασιών φαίνεται να μειώνει αναλογικά το προσδόκιμο ζωής της ευδεμίδας (Maleki et al., 2016).

Ένα πολύ σημαντικό κομμάτι για την κατανόηση της εξάπλωσης και του δυναμικού πληθυσμών, είναι η σχέση που έχει η ευδεμίδα και η κοχυλίδα αντίστοιχα, με το αμπέλι. Όπως έχει αναφερθεί στα προηγούμενα κεφάλαια, η ανάπτυξη των δύο ειδών συνδέεται άρρητα με την ανάπτυξη του φυτού και συμβαδίζει με τα στάδια φαινολογίας του προκειμένου να εξασφαλίζεται συνεχώς η απαραίτητη τροφή για τις προνύμφες (συστάδες λουλουδιών και ώριμα σταφύλια) (DeLucia et al., 2012; Guerenstein and Hildebrand, 2008; Reineke and Thiery, 2016; Thomson et al., 2010; Zavala and Gog, 2015). Επομένως, καθώς η κλιματική αλλαγή επηρεάζει τα φαινολογικά στάδια της αμπέλου και γενικότερα την ποιότητα και την ποσότητα των παραγόμενων σταφυλιών, με τη σειρά της θα επηρεάσει τη φυσιολογία και τα πληθυσμιακά επίπεδα των δύο ειδών στους αμπελώνες. Για να χαρακτηριστεί και να αναλυθεί προσεκτικά η δυναμική του πληθυσμού ενός παρασίτου, έχει μεγάλη σημασία να εξετάζονται συγκεκριμένοι παράγοντες: το κλίμα, η φαινολογία του φυτού και τα φυσικό-βιολογικά χαρακτηριστικά του περιβάλλοντος. Όλα αυτά είναι σημαντικά όσον αφορά τη βιολογία των ειδών και περιγράφονται μαθηματικά από βιοδημογραφικές συναρτήσεις (συναρτήσεις ανάπτυξης, θνησιμότητας και ρυθμού αναπαραγωγής).

Χρησιμοποιούνται μηχανιστικά μοντέλα που αντιπροσωπεύουν τη δυναμική του είδους και επιτρέπουν την περιγραφή της φυσιολογικής απόκρισης του είδους σε μεταβλητές που σχετίζονται με το περιβάλλον. Τα φυσιολογικά αυτά βασισμένα μοντέλα (PBDM) (Gutierrez, 1996) είναι υπεύθυνα για τη διερεύνηση της κατανομής και της αφθονίας ενός είδους υποθέτοντας ότι οι φυσιολογικές, φαινολογικές και δημογραφικές αποκρίσεις καθώς και οι οικολογικές θέσεις μπορούν να εκφραστούν ως συνάρτηση αβιοτικών και βιοτικών παραγόντων και με βάση το μοντέλο κατά κεφαλήν (Gilioli et al., 2016; Gutierrez and Baumgaertner, 1984). Σε αυτά τα μοντέλα το κάθε άτομο του πληθυσμού μπορεί να χαρακτηριστεί από μια φυσιολογική ηλικία η οποία γίνεται ο βιομετρικός περιγραφέας των εξελίξεών του. Τα PBDM ήταν σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες προκειμένου να περιγράψουν τη δυναμική του πληθυσμού διαφορετικών παρασίτων για πληθυσμούς με διαφορετικά στάδια ανάπτυξης (Ainseba et al., 2011; Blum et al., 2018; Ewing et al., 2016; Gilioli et al., 2016; Gilioli et al., 2017; Gilioli et al., 2014; Marini et al., 2016; Metz and Diekmann, 2014; Pasquali

et al.,2020; Rossini et al., 2020). Οι προγνωστικές πληροφορίες της χρονικής δυναμικής ενός πληθυσμού παρασίτων μπορούν να βοηθήσουν τους υπεύθυνους λήψης αποφάσεων στην επιλογή της καλύτερης στρατηγικής όσον αφορά την εφαρμογή φυτοϋγειονομικών θεραπειών. Αυτό είναι ένα θεμελιώδες καθήκον υπό το την οδηγία 2009/128/EK για την αειφόρο χρήση φυτοφαρμάκων στην Ευρώπη.



Εικόνα 18: Παράδειγμα από Φυσιολογικά Βασισμένα Δημογραφικά Μοντέλα (PBDM) στην Ιταλία – a. Τα επίπεδα προσομοίωσης περιλαμβάνουν ένα άτομο, τον πληθυσμό του ατόμου, σε οικολογικές ζώνες και σε μεγάλες γεωγραφικές περιοχές. – b. Ανάλυση οικοσυστήματος PBDM/GIS με γνώμονα τις καιρικές συνθήκες, συμπεριλαμβανομένης της οριακής ανάλυσης.
 Πηγή: <https://www.casaglobal.org/methodology-and-analysis/>

Στην περίπτωση της ευδεμίδας συγκεκριμένα, με τα καινούρια δεδομένα της υπερθέρμανσης του πλανήτη, οι προβλέψεις της πληθυσμιακής δυναμικής της, λαμβάνονται εξίσου από φυσιολογικά δημογραφικά μοντέλα. Μια μέθοδος που συνδέει καιρικά δεδομένα και διαφορετικά σενάρια κλιματικής αλλαγής για την επεξεργασία μιας μελλοντικής κατανομής του εντόμου σε καθορισμένη περιοχή επιτρέπει την πρόβλεψη της δυναμικής των πληθυσμών τόσο σε αφθονία όσο και στην φαινολογία τους (Gutierrez et al. 2012, 2017). Στο έργο του Gutierrez (2012) που βασίστηκε στη περιοχή της Καλιφόρνιας χρησιμοποιήθηκε ένα εκτεταμένο μοντέλο PBDM για τη φαινολογία και την ανάπτυξη της αμπέλου προκειμένου να ελεγχθεί η δυναμική πληθυσμού της *L. botrana* υπό ένα σενάριο αύξησης των θερμοκρασιών κατά δύο ή τρεις μονάδες Κελσίου.

Παράλληλα, μέσω της χρήσης των μοντέλων PBDM έχει γίνει και η πρόβλεψη ότι, ταυτόχρονα με την απόδοση των σταφυλιών, η αφθονία του είδους *L. botrana* θα αυξηθεί προς τα βόρεια και σε ψηλότερα υψόμετρα της Ευρώπης. Αντίθετα, στη Μεσόγειο οι καλοκαιρινές συνθήκες θα επηρεάσουν αρνητικά τις ζωτικές λειτουργίες του σκώρου ενώ παράλληλα θα υπάρξει μείωση στην απόδοση της παραγωγής σταφυλιών (Gutierrez et al., 2017).

Μια άλλη σημαντική επίδραση της κλιματικής αλλαγής, αφορά την αναπαραγωγή της *L. botrana* (Pitis et al., 2021). Η ποιότητα της θρεπτικής εκσπερμάτωσης είναι σημαντική για την επιτυχία της αναπαραγωγής και εκκόλαψης (Muller et al., 2015b). Καθώς η ποιότητα της εκσπερμάτωσης εξαρτάται από τη θερμοκρασία (Zeh et al., 2012; Vasudeva et al., 2014), η επίδραση της κλιματικής αλλαγής στα όργανα αναπαραγωγής και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της εκσπερμάτωσης των αρσενικών θα διαφοροποιήσει τη πληθυσμιακή δυναμική του εντόμου (Zeh et al., 2012; Vasudeva et al., 2014).

Για το μέλλον, ορισμένοι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι μια νωρίτερη έναρξη της άνοιξης λόγω υψηλότερων θερμοκρασιών μπορεί να επιτρέψει μια ταχύτερη ανάπτυξη και την εμφάνιση περισσότερων γενεών (Fraga et al., 2013; Pavan et al., 2006). Αλλαγές στη φαινολογία της *L. botrana* έχουν ήδη παρατηρηθεί στο πρόσφατο παρελθόν με την περίπτωση στη νοτιοδυτική Ισπανία. Όπου μια αύξηση κατά 0,9 °C και 3 °C στις μέσες ετήσιες και ανοιξιάτικες θερμοκρασίες (Martín-Vertedor et al., 2010) δημιούργησε τις προϋποθέσεις για μια αλλαγή στη φαινολογία της *L. botrana* περίπου 12 ημερών, επιτρέποντας μια τέταρτη γενιά το 2006 (Di Lena et al., 2013). Γνωρίζοντας το εύρος των μέσων θερμοκρασιών βέλτιστης ανάπτυξης της ευδεμίδας, οι συνθήκες θέρμανσης θα μπορούσαν να επηρεάσουν τις ανάγκες σε θερμικές μονάδες ανά γενιά και το συγχρονισμό μεταξύ των τροφικών επιπέδων, με τη 2η και 3η γενιά της *L. botrana* να έχουν τη δυνατότητα να αναπτυχθούν ταχύτερα (Pavan et al., 2006). Έρευνες πάνω στη συγκεκριμένη υπόθεση για τη *L. botrana* τείνουν να επιβεβαιώνουν βραχύτερους κύκλους ανάπτυξης λόγω των θερμότερων συνθηκών που με τη σειρά τους οδηγούν σε μια πρόωμη επαγωγή της διάπαυσης (Martín-Vertedor et al., 2010; Reineke and Thiery, 2016).

Οι υψηλότερες θερμοκρασίες το χειμώνα και την άνοιξη θα επηρεάσουν επίσης το ξεχειμώνιασμα των χρυσαλλίδων της ευδεμίδας και της κοχυλίδας ενώ θα αυξήσουν την επιβίωση των εντόμων κατά τη διαχείμαση και ανάλογα με το ποσοστό των θερμών

και κρύων ημερών, θα επηρεαστεί και ο μεταβολισμός τους (Bale et al., 2002; Moriondo and Leolini, 2015). Πειράματα επιλογής έδειξαν ότι σημαντικές αλλαγές τόσο στο ποσοστό των ατόμων σε έναν πληθυσμό που εισέρχονται σε διάπαυση όσο και στη μείωση της διάρκειας της ημέρας που απαιτείται για την ενεργοποίηση της διάπαυσης μπορεί να συμβούν εντός 3 ± 15 γενεών (Masaki, 1978; Delinger, 1986; Pullin, 1986).

Αναμένεται επιπλέον ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας, πολυφάγα έντομα όπως είναι η ευδεμίδα και η κοχυλίδα, να επεκταθούν σε νέα γεωγραφικά πλάτη και υψόμετρα (Svobodová et al., 2013a; Svobodová et al., 2013b) και να βελτιώσουν τα ποσοστά αφθονίας και επιβίωσης με την αύξηση του βολτινισμού τους (Bale et al., 2002; Caffarra and Eccel, 2011; Chuine, 2010; Régnière, 2009; Reineke and Thiery, 2016; De Sassi and Tylianakis, 2012; Thomson et al., 2010).

Ωστόσο, άλλες μελέτες υποδεικνύουν ότι η αύξηση του πληθυσμού στα τέλη του καλοκαιριού μπορεί να μην είναι επαρκής ώστε η τελευταία γενιά να επιτύχει την ανάπτυξη της λόγω πρώιμων συγκομιδών (Caffarra et al., 2012; Gallardo et al., 2009). Αποτελέσματα των Caffarra and Eccel (2011) και Caffarra et al. (2012) δείχνουν ότι μια αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένο ασυγχρονισμό, που παρέχεται από την έλλειψη ξενιστή και τροφής στο τέλος της καλλιεργητικής περιόδου (Thomson et al., 2010; Reineke and Thiery, 2016; Romo and Tylianakis, 2013). Οι νότιες περιοχές εξακολουθούν να επιτρέπουν την ανάπτυξη του *V. vinifera*, αλλά τα έντομα, που είναι πιο ευαίσθητα στις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας μπορεί να υποφέρουν περισσότερο σε αυτές τις περιοχές, επιτρέποντας ένα κενό στην καταλληλόλητα της συνεξέλιξης των *V. vinifera* και *L. botrana* με πιο ακραίες θερμοκρασίες.

Τέλος, μια άλλη πτυχή που πρέπει να εξεταστεί προσεκτικά για το μέλλον, είναι ο αντίκτυπος που μπορεί να έχει η κλιματική αλλαγή στην παρουσία και το ρόλο των φυσικών εχθρών των σκώρων της αμπέλου, που είναι μικροοργανισμοί ή άλλα αρθρόποδα, και κατά συνέπεια στις στρατηγικές βιολογικού ελέγχου που πρέπει να υιοθετηθούν (Reineke and Thiery, 2016; Benelli et al., 2023b). Τα χαρακτηριστικά του ιστορικού ζωής των πολυφάγων εντόμων και η κατανομή του πληθυσμού των φυσικών εχθρών πιθανότατα θα εξελιχθούν συγχρονισμένα ή ασύγχρονα με τη λεία τους (Colinet et al., 2015; Fraga et al., 2016; Maher et al., 2006; Price, 1980; Reineke and Thiery, 2016; Thiéry et al., 2014; Torres-Vila et al., 1999). Ορισμένοι παράγοντες

βιοελέγχου μπορεί να ευνοούνται και να εξαπλώνονται από ηπιότερους χειμώνες και υψηλότερες μέσες θερμοκρασίες.

Η ευδεμίδα της αμπέλου που εμφανίστηκε στη Νότια Αμερική το 2008, στη Χιλή και την Αργεντινή, επιτέθηκε τουλάχιστον στο 30% της παραγωγής, υποχρεώνοντας έκτοτε τις φυτοϋγειονομικές αρχές και τους καλλιεργητές να εφαρμόσουν αυστηρά προγράμματα ελέγχου και παρακολούθησης. Πράγματι, Το 2011 η Αργεντινή κήρυξε «φυτοϋγειονομική έκτακτη ανάγκη» προκειμένου να αποτρέψει την εξάπλωση του σκώρου της αμπέλου από τη Μεντόζα στην Παταγονία. Αυτή η σχετικά πρόσφατη εξάπλωση της *L. botrana* στην Αμερική, ειδικά σε περιοχές υψηλής οικονομικής σημασίας για την παραγωγή κρασιού, έχει τονίσει τη σημασία της πρόβλεψης πιθανών νέων περιοχών εξειδικευμένης εκμετάλλευσης από αυτό το παράσιτο, προκειμένου να οριοθετηθούν οι οδοί εισβολής (Corrêa et al., 2019).

Σε μια έρευνα (Rank et al., 2020) που μελετήθηκαν τοποθεσίες που παρουσιάζουν κίνδυνο για την εισαγωγή και εγκατάσταση της ευδεμίδας, σημειώθηκαν κατάλληλες περιοχές στο νότιο τμήμα της Νότιας Αμερικής, τη νότια Αφρική, την Ωκεανία, τις ΗΠΑ, την Ευρώπη, τη Μικρά Ασία, τον Καύκασο, την ανατολική Κίνα και την Ιαπωνία. Από αυτές τις τοποθεσίες, η *L. botrana* έχει αναφερθεί μόνο στη βόρεια Αφρική, την Ευρώπη, τη Μέση Ανατολή, την περιοχή του Καυκάσου, τη Χιλή, την Αργεντινή και τη δυτική ακτή των ΗΠΑ. Παράλληλα, οι περιοχές της Βόρειας και Νότιας Αμερικής, της Αυστραλίας και άλλων περιοχών με παρόμοια κλίματα που μπορούν να επιτρέψουν την ανάπτυξη της αμπέλου, κινδυνεύουν από την εισαγωγή της *Eupoecilia ambiguella*.

Κεφάλαιο 4. Πειραματικό μέρος

4.1 Εισαγωγή

Στην παρούσα εργασία θα εκτιμηθεί η ικανότητα επιλεγμένων στελεχών εντομοπαθογόνων μυκήτων να μολύνουν και να προκαλέσουν θνησιμότητα σε προνύμφες της ευδεμίδας (*Lobesia botrana*) και της κοχυλίδας (*Eupoecilia ambiguella*) της αμπέλου, καθώς και η επίδραση της θερμοκρασίας στη διαδικασία μόλυνσης, κάτω από εργαστηριακές συνθήκες.

Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα παρασιτισμού και ελέγχθηκε η θνησιμότητα στελεχών των εντομοπαθογόνων μυκήτων *Metarhizium robertsii* και *Beauveria bassiana*, κάτω από διαφορετικές θερμοκρασίες και κλιματικές συνθήκες, σε προνύμφες των εντόμων *Lobesia botrana* και *Eupoecilia ambiguella*. Η διαδικασία έλαβε μέρος στο τμήμα Φυτοπροστασίας του Hochschule Geisenheim University από όπου προμηθεύτηκαν οι αρχικές καλλιέργειες μυκήτων καθώς και τα έντομα για τις ανάγκες του πειράματος.

Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας μπορούν να συμβάλλουν στην μελλοντική χρήση των κατάλληλων εντομοπαθογόνων μυκήτων σε προγράμματα ολοκληρωμένης προστασίας των καλλιεργειών από εχθρούς και ασθένειες.

4.2 Υλικά & Μέθοδοι 1^ο Πειράματος

Στο 1^ο πείραμα ελέγχθηκε ο παρασιτισμός και η θνησιμότητα τεσσάρων στελεχών του μύκητα *M. robertsii*, στην ευδεμίδα (*L. botrana*) και την κοχυλίδα (*E. ambiguella*) της αμπέλου, κάτω από δύο διαφορετικές θερμοκρασίες:

- 1) Κλιματικός θάλαμος στους 20.3°C
- 2) Κλιματικός θάλαμος στους 24.2°C

Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα στελέχη του μύκητα *Metarhizium robertsii*:

- α) MsoilAR-4.3 [Pedriel, Province of Mendoza – Αργεντινή (Λατινική Αμερική)]
- β) M224B [Yara Valley, Victoria – Αυστραλία (Ωκεανία)]
- γ) EF3.5(2) [Villenave-d'Ornon – Ν. Γαλλία (Ευρώπη)]

δ) EF047 [Fläche Kellersgrube - Geisenheim, Γερμανία (Ευρώπη)]

και προνύμφες L3 σταδίου της Ευδεμίδας και της Κοχυλίδας της αμπέλου.

4.2.1 Εκτροφή της Ευδεμίδας και της Κοχυλίδας της αμπέλου

Από τους ειδικούς χώρους εκτροφής των πεταλούδων στο Πανεπιστήμιο του Γκάιζενχαϊμ, πάρθηκαν αβγά προκειμένου να συνεχιστεί η εκτροφή τους στους ειδικούς κλιματικούς θαλάμους. Τα δοχεία εκτροφής που περιείχαν τις ενήλικες πεταλούδες είχαν πλαστική μεμβράνη μίας χρήσεως εσωτερικά στις οποίες οι θηλυκές πεταλούδες τοποθετούσαν τα αβγά τους. Τα αβγά ήταν ελαφρώς κίτρινα σε χρώμα και διακριτά με γυμνό μάτι. Αφαιρώντας αυτήν την μεμβράνη και τεμαχίζοντας την σε μικρότερα κομμάτια, τα αβγά που ήταν πάνω σε αυτές τοποθετήθηκαν σε καινούριο διαφανές δοχείο με τεχνητή τροφή και πρόσβαση σε οξυγόνο. Η τροφή αποτελούνταν από: 3L νερό, 100g άγαρ, 467,5g φύτρο σιταριού, 95g μαγιά, 62,5g "Wesson's Salt", 6,25g "Nipagin", 1g Βιταμίνη C, 12,5ml Αιθανόλη 70%, 185g ζάχαρη, 6,25g χοληστερόλη, 50ml ηλιέλαιο, 220g καζεΐνη, 10g σορβικό οξύ, 14g πολυβιταμίνη. Μερικά από τα συστατικά μαγειρεύτηκαν σε χαμηλή φωτιά αναδεύοντας τακτικά μέχρι να έρθουν σε βρασμό ενώ άλλα συστατικά αναμείχθηκαν με την αιθανόλη και έπειτα προστέθηκαν στο μίγμα όπου μαγειρεύτηκαν μέχρι τους 50°C. Έπειτα το μίγμα προστέθηκε σε δοχεία για την στερεοποίηση του και την μετέπειτα χρήση του.

Τοποθετήθηκαν από δύο κουτιά με αβγά της ευδεμίδας και της κοχυλίδας, στους κλιματικούς θαλάμους αντίστοιχα. Σκοπός ήταν η ανερχόμενες γενιές να αναπτυχθούν κάτω από τις επιλεγμένες κλιματικές συνθήκες και να εγκλιματιστούν. Ύστερα από το πέρας μίας εβδομάδας τα αβγά άρχισαν να εκκολάπτονται και να διακρίνονται οι πολύ νεαρές προνύμφες. Όταν αυτές άρχισαν να μεγαλώνουν σε μέγεθος, τοποθετήθηκαν κομμάτια από χαρτόνι οντουλέ διπλής όψεως στα κουτιά. Οι προνύμφες κινούνταν ανάμεσα στα κενά μέχρι να βρουν το κατάλληλο μέρος για να δημιουργήσουν το κουκούλι και να μεταμορφωθούν σε χρυσαλίδες. Κάθε δύο μέρες τα χαρτόνια ανανεώνονταν και αυτά που είχαν κουκούλια τυλίγονταν ελαφρά και

τοποθετούνταν σε καινούρια κλειστά δοχεία χωρίς φαγητό και πάλι στους αντίστοιχους θαλάμους.

Εδώ ξεκινούσε η διαφοροποίηση της διαδικασίας μεταξύ των δύο ειδών πεταλούδας προκειμένου να αποφευχθεί η σύγχυση μεταξύ των δύο ειδών. Για την ευδεμίδα, τα τυλιγμένα κομμάτια χαρτονιού με κουκούλια τοποθετούνταν σε απλά κουτιά που είχαν επικάλυψη από χαρτόνι εσωτερικά και καλυπτόντουσαν με μια πλαστική μεμβράνη. Παρέχονταν ταυτόχρονα αποσταγμένο νερό στις εκκολαπτόμενες πεταλούδες μέσω μια πιπέτας. Μετά την έναρξη της εκκόλαψης, οι πεταλούδες ζευγάρωναν και εναποθέτανε τα αυγά τους στην πλαστική μεμβράνη. Από τη στιγμή που ξεκινούσε η διαδικασία αυτή, κάθε δύο μέρες ανανεωνόταν η πλαστική μεμβράνη. Η μεμβράνη με τα αυγά τεμαχιζόταν και τοποθετούνταν σε δοχείο με τεχνητό φαγητό για να συνεχιστεί ο κύκλος στον κλιματικό θάλαμο. Η διαδικασία επαναλαμβανόταν μέχρι να μην υπάρχουν ζωντανές πεταλούδες για να εναποθέσουν αυγά. Στο τέλος τα χαρτόνια με τα ανοιγμένα κουκούλια ή αυτά που δεν μεταμορφώθηκαν ποτέ, απορρίπτονταν.



Εικόνα 19: Χώρος εκτροφή της *Euroecilia ambiguella* στο στάδιο ενηλικίωσης. Σε αυτό το στάδιο τα θηλυκά ζευγαρώνουν με τα αρσενικά και εναποθέτουν τα αυγά τους στην επιφάνεια της πλαστικής μεμβράνης

Για την κοχυλίδα απεναντίας, τα χαρτόνια με τα κουκούλια τοποθετούνταν σε κλειστά διάφανα δοχεία με πρόσβαση σε αέρα. Μετά την εμφάνιση κάποιων

πεταλούδων μεταφερόντουσαν σε καινούριους διάφανους σωλήνες που είχαν πλαστική μεμβράνη ως εσωτερική επένδυση και ένα δοχείο με αποσταγμένο νερό για τις πεταλούδες. Η ελεύθερη επιφάνεια του σωλήνα, καλύπτονταν με υφασμάτινη μεμβράνη για παροχή οξυγόνου στις πεταλούδες χωρίς τη δυνατότητα διαφυγής τους. Προκειμένου να μεταφερθούν οι ενήλικες πεταλούδες από τα δοχεία στους σωλήνες, διοχετεύονταν σε αυτές υψηλή ποσότητα διοξειδίου του άνθρακα για μικρό χρονικό διάστημα. Αυτό αδρανοποιούσε για λίγα δευτερόλεπτα τις πεταλούδες και δεν τους επέτρεπε να πετάξουν, καθιστώντας πιο εύκολη και χωρίς απώλειες τη διαδικασία. Στους διάφανους σωλήνες πλέον, ενήλικα ακμαία της κοχυλίδας μπορούσαν να ζευγαρώσουν και τα θηλυκά να εναποθέσουν τα αυγά στις πλαστικές μεμβράνες.

Κάθε δύο με τρεις μέρες προκειμένου να αφαιρεθεί η μεμβράνη με τα αυγά, έπρεπε να μεταφερθούν εκ νέου οι πεταλούδες σε καινούριο σωλήνα με επένδυση πλαστικής μεμβράνης εσωτερικά και δοχείο με αποσταγμένο νερό. Οι νεκρές πεταλούδες στον σωλήνα απορρίπτονταν. Στον καινούριο σωλήνα περιέχονταν και οι καινούριες εκκολαπτόμενες πεταλούδες που είχαν μεταφερθεί από τα κουκούλια. Η μεμβράνη με τα αυγά, όπως και στην περίπτωση της ευδεμίδας, τεμαχιζόταν και έπειτα τοποθετούνταν σε καινούρια δοχεία με τεχνητή τροφή για να συνεχιστεί ο κύκλος. Η διαδικασία από τα κουκούλια μέχρι τους σωλήνες συνεχιζόταν μέχρι να μην υπάρχουν πια εκκολαπτόμενες πεταλούδες και έπειτα τα χαρτόνια απορρίπτονταν. Οι διαδικασίες μεταφοράς των πεταλούδων από σωλήνα σε σωλήνα επαναλαμβάνονταν μέχρι τον φυσικό θάνατο των πεταλούδων.

Σκοπός ήταν τα αυγά να εκκολαφθούν, να μεγαλώσουν οι προνύμφες, στη συνέχεια να δημιουργήσουν κουκούλι προκειμένου να μεταμορφωθούν σε πεταλούδες και τέλος να ζευγαρώσουν για δώσουν ξανά αυγά. Γι' αυτό το λόγο η όλη διαδικασία εκτροφής επαναλήφθηκε εωσότου ήταν δυνατή η παραλαβή 1^{ης} γενεάς προνυμφών της ευδεμίδας και της κοχυλίδας στους δύο κλιματικούς θαλάμους.

Για το πείραμα απομονώθηκαν 200 προνύμφες του είδους *Lobesia botrana* και 200 του είδους *Eupoecilia ambiguella* από τον κλιματικό θάλαμο στους 20.3°C. Αντίστοιχα, απομονώθηκαν 200 και 200 από τον κλιματικό θάλαμο στους 24.2°C. Συνολικά απομονώθηκαν 800 προνύμφες πρώτης γενεάς και L3 σταδίου ανάπτυξης. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε προτού υπάρξει επαφή με του μύκητες και οι προνύμφες παρέμειναν σε πλαστικά κουτιά στους κλιματικούς θαλάμους μέχρι τη στιγμή της μόλυνσης. Σκοπός ήταν να μην υπάρξει μετάδοση οποιουδήποτε παθογόνου μικροοργανισμού στον χώρο εκτροφής και στις ίδιες τις πεταλούδες.

4.2.2 Η καλλιέργεια των μυκήτων

Προκειμένου να επιλεγθεί το καλύτερο δυνατόν υπόστρωμα ανάπτυξης για τα στελέχη του μύκητα δοκιμάστηκαν τρία προτεινόμενα υποστρώματα. Συγκεκριμένα, το Potato Dextrose Agar, το Beauveria Selective Medium και το Malt Pepton Agar προετοιμάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των τεσσάρων στελεχών του μύκητα *Metarhizium robertsii*.

Παρακάτω, αναφέρονται τα συστατικά και τα εργαλεία για τη δημιουργία τους σε αντίστοιχο συνολικό όγκο και η μέθοδος που ακολουθήθηκε για κάθε άγαρ ξεχωριστά.

Πίνακας 2: Συστατικά συνθετικών υποστρωμάτων σε γραμμάρια ως προς τον τελικό όγκο νερού.

Beauveria Selective Medium (BSM)		
Agar - Agar (Bacto - Agar)	18,00	g
Glucose - Monohydrate	20,00	g
Soja - Pepton	10,00	g
Distilled water	1000,00	ml
Malt Pepton Agar		
Agar - Agar (Bacto - Agar)	15,00	g
Biomalt/Malt	10,00	g
Pepton from Casein	2,50	g
Distilled water	1000,00	ml
Potato Dextrose Agar		
PDA	39,00	g
Distilled water	1000,00	ml

Υλικά:

Μπάρα ανάδευσης

Μπουκάλι 'duran' 1000 mL

Μπάρα ανάδευσης

Πλαστικά πιάτα ζύγισης

Μεζούρες ζύγισης

Ζυγός ακριβείας

Χωνί

Ογκομετρικός κύλινδρος

Ταινία αεροστεγούς λέβητα
Αποστειρωμένο 'Dispensette'
Τρυβλία Petri
Ταινία παραφίλμ

Μέθοδος (Για κάθε υποστρώμα ξεχωριστά):

A) Ζυγίστηκαν όλα τα συστατικά σε πιάτα ζύγισης στο ζυγό ακριβείας και μεταφέρθηκαν σε εργαστηριακό μπουκάλι μέσω ενός χωνιού. Μέσα στο μπουκάλι τοποθετήθηκε μπάρα ανάδευσης. Χρησιμοποιήθηκε καινούριο πιάτο και κουτάλι για κάθε συστατικό.

B) Μετρήθηκε σε ογκομετρικό σωλήνα αποσταγμένο νερό και τοποθετήθηκε στο εργαστηριακό μπουκάλι. Αφέθηκε να αναδευτεί στον μαγνητικό αναδευτήρα.

Γ) Το μπουκάλι έπειτα, τοποθετήθηκε σε κλίβανο αφήνοντας ελαφρώς ανοιχτό το καπάκι (πρόγραμμα για υγρά αντικείμενα). Τοποθετήθηκε ταινία αεροστεγούς λέβητα βρασμού με την ονομασία του διαλύματος.

Δ) Μετά το τέλος του προγράμματος, το καπάκι σφραγίστηκε και το μπουκάλι τοποθετήθηκε στο μαγνητικό αναδευτήρα. Παρέμεινε να ψυχθεί στους 50°C.

E) Προστέθηκαν 15ml άγαρ σε κάθε τρυβλίο με τη βοήθεια του εργαλείου "Dispensette". Παρέμειναν ανοιχτά μέχρι το άγαρ να ψυχθεί εντελώς και να γίνει στερεό.

ΣΤ) Τα δοχεία Petri καλύφθηκαν με καπάκι σφραγίστηκαν σε πλαστική σακούλα και αποθηκεύτηκαν σε σωστές συνθήκες, έτοιμα για χρήση.

Αφού προετοιμάστηκαν ποσότητες από κάθε άγαρ, χρησιμοποιήθηκε ένα αριθμός τρυβλίων κάθε υποστρώματος για δημιουργία αποικιών με τα στελέχη του μύκητα *Metarhizium robertsii*.

Όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε κάτω από αυστηρά ασηπτικές συνθήκες. Η μέθοδος περιλάμβανε τη διαδικασία μεταφοράς του εμβολίου από την υπάρχουσα υγρή καλλιέργεια, που διέθετε το Πανεπιστήμιο του Γκάιζενχαιμ, στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού με τη χρήση βακτηριολογικού κρίκου, έπειτα από την πυράκτωση του. Παρήχθησαν συνολικά 24 τρυβλία (8 τρυβλία για κάθε άγαρ, εκ των οποίων 2 τρυβλία για κάθε στέλεχος). Έπειτα, κάθε δοχείο σφραγίστηκε με παραφίλμ και τοποθετήθηκε σε κλίβανο στους 25°C στο σκοτάδι. Μετά το πέρας μίας εβδομάδας παρατηρήθηκε η ανάπτυξη των μικυλίων.

Όλα τα δοχεία ήταν καθαρά από επιμολύνσεις και όλα παρουσίασαν ανάπτυξη του μύκητα. Τα στελέχη του μύκητα ωστόσο, είχαν μεγαλύτερη και καλύτερη, οπτικά, ανάπτυξη στο άγαρ BSM. Γι' αυτό το λόγο τα άλλα μέσα ανάπτυξης απορρίφθηκαν και όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας BSM.

Για τη δημιουργία εναιωρημάτων σπορίων από τα στελέχη του μύκητα *M. robertsii* έπρεπε πρώτα να δημιουργηθούν αρκετές αποικίες σε τρυβλία με BSM άγαρ. Τα τέσσερα στελέχη του μύκητα *Metarhizium robertsii* που χρησιμοποιήθηκαν, παραλήφθηκαν από υγρή μορφή από καλλιέργειες που διέθετε το πανεπιστήμιο σε ψυγεία πολύ χαμηλής θερμοκρασίας. Στη συνέχεια έγινε ανακαλλιέργεια για κάθε στέλεχος ξεχωριστά, κάτω από αυστηρά ασηπτικές συνθήκες, σε τρυβλία με BSM άγαρ. Για κάθε στέλεχος δημιουργήθηκαν από 6 καλλιέργειες με αποτέλεσμα να υπάρξουν συνολικά 24 τρυβλία. Τα τρυβλία σφραγίστηκαν άμεσα με παραφίλμ και έπειτα τοποθετήθηκαν σε κλίβανο στους 25°C στο σκοτάδι για 25 μέρες τουλάχιστον. Μετά το πέρας αυτών των ημερών και αφού όλες οι καλλιέργειες ήταν καθαρές από επιμολύνσεις, ήταν εφικτό να παραληφθούν τα σπόρια των στελεχών και να δημιουργηθούν τα αντίστοιχα διαλύματα μυκήτων.



Εικόνα 20: Αποικίες στελεχών *M. robertsii* σε υποστρώματα BSM, MPA, PDA

4.2.3 Εναιωρήματα σπορίων στελεχών *Metarhizium robertsii*

Ως διαλύτης για τη δημιουργία των εναιωρημάτων, χρησιμοποιήθηκε το μίγμα γνωστό ως 'Ringer's solution' και ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο παρασκευής του.

Υλικά:

Ταμπλέτες Ringer

Tween 80, 0.02%

Αποσταγμένο νερό

Μπουκάλι duran 1000mL

Ογκομετρικός κύλινδρος

Μπάρα ανάδευσης

Ταινία αεροστεγούς λέβητα βρασμού

Μέθοδος:

A) Προετοιμάστηκε Ringer's solution (διαλύτης) συγκέντρωσης 1/8.

B) Προστέθηκε μια ταμπλέτα "Ringer" σε εργαστηριακό μπουκάλι με 1 Λίτρο αποσταγμένο νερό.

Γ) Προστέθηκε μπάρα ανάδευσης στο μπουκάλι και τοποθετήθηκε στον μαγνητικό αναδευτήρα μέχρι την πλήρη διάλυση της ταμπλέτας.

Δ) Προστέθηκε 0.2 mL "Tween 80" 0.02% στο εργαστηριακό μπουκάλι με το διάλυμα Ringer. Παρέμεινε στον μαγνητικό αναδευτήρα μέχρι την ομογενοποίηση του διαλύματος και έπειτα αφαιρέθηκε η μπάρα.

E) Αφέθηκε ελαφρώς ανοιχτό το καπάκι και τοποθετήθηκε στον αεροστεγή λέβητα βρασμού με ταινία αεροστεγούς λέβητα. Μετά το τέλος του προγράμματος, το καπάκι σφραγίστηκε και το διάλυμα ήταν πλέον αποστειρωμένο και έτοιμο για χρήση για το επόμενο βήμα του πειράματος.

Για τη δημιουργία εναιωρήματος των σπορίων ακολουθήθηκε νέο πρωτόκολλο.

Υλικά:

Σποριογόνοι μύκητες

4 Σπάτουλες (μια για κάθε μύκητα)
Πιπέτα με μύτες (100μL - 1000μL)
Πιπέτα 'Ependorf' (1mL - 10 mL)
Μύτες των 10mL για την πιπέτα 'Ependorf'
Διαλύτης (Ringer's solution)
Ανοιχτοί σωλήνες φυγοκέντρησης με υαλοβάμβακα (για φιλτράρισμα)
Μπουκάλια duran των 100mL (για τα εναιωρήματα μυκήτων)
Πιπέτες παστέρ
Θάλαμος μέτρησης κυττάρων Thoma (Neubauer chamber)
500mL αποσταγμένου και αποστειρωμένου νερού (για αραιώσεις)
Δοκιμαστικοί σωλήνες (2*4) για αραιώσεις
Κιβώτιο με πάγο (για την διατήρηση των εναιωρημάτων σε χαμηλή θερμοκρασία)

Όλα τα εργαλεία αποστειρώθηκαν σε αεροστεγή λέβητα βρασμού πριν την έναρξη του πειράματος.

Μέθοδος:

A) Μεταφέρθηκαν 10mL από τον διαλύτη (Ringer's solution) στο μικκύλιο του σπορογόνου μύκητα που είχε αναπτυχθεί στο υπόστρωμα BSM.

B) Ακολούθησε συγκομιδή των σπόριων και του μικκυλίου με τη χρήση της σπάτουλας.

Γ) Τοποθετήθηκε ανοιχτός σωλήνας φυγοκέντρησης με τον υαλοβάμβακα σε ανοιχτό μπουκάλι duran των 100mL. Στη συνέχεια χρησιμοποιώντας πιπέτα παστέρ συλλέχθηκε το διάλυμα που περιείχε τα σπόρια και το μικκύλιο και μεταφέρθηκε στον σωλήνα φυγοκέντρησης. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 2-3 φορές. Ακολούθησαν περισσότερα τρυβλία που έχουν μύκητα. Χρησιμοποιήθηκαν 3-4 τρυβλία για κάθε εναιώρημα.

Δ) Εφόσον ολοκληρώθηκε το εναιώρημα σπόριων, αφαιρέθηκε ο σωλήνας με τον υαλοβάμβακα, απορρίφθηκε και το δοχείο σφραγίστηκε με καπάκι. Τοποθετήθηκε στο κουτί με τον πάγο μέχρι τη χρήση του. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για τα υπόλοιπα 3 στελέχη του μύκητα *Metarhizium robertsii*.

E) Για κάθε εναιώρημα σπόριων, απομονώθηκε μικρή ποσότητα με τη χρήση πιπέτας των 100μL - 1000μL και απελευθερώθηκε στο θάλαμο μέτρησης κυττάρων Thoma, για να υπολογιστεί ο αριθμός των σπόριων.

ΣΤ) Στις περιπτώσεις που χρειάστηκε, αραιώθηκε (1:10) ποσότητα από το εναιώρημα στους δοκιμαστικούς σωλήνες για ευκολία στον υπολογισμό των κυττάρων.

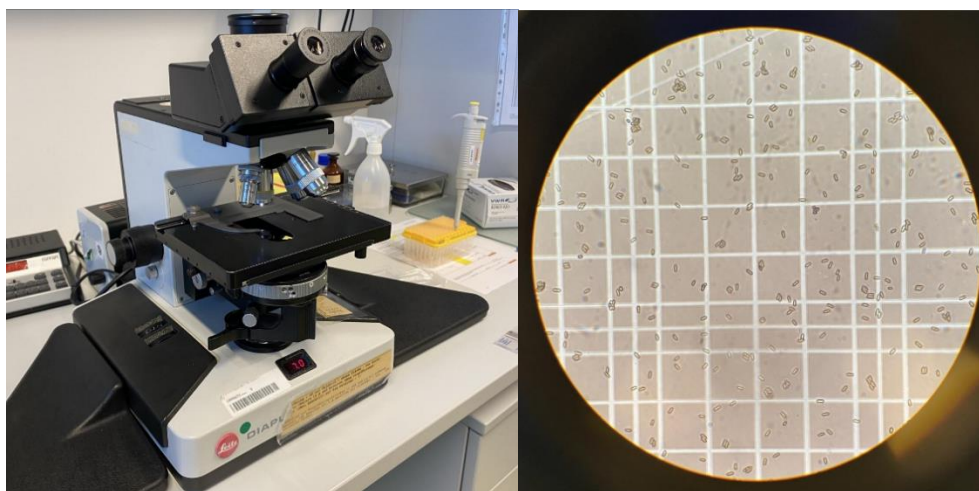
Ζ) Υπολογίστηκε ο αριθμός των спорίων σε τέσσερα τετράγωνα διαγωνίως, στους δύο διαφορετικούς χώρους μέτρησης του θαλάμου Thoma. Για κάθε εναιώρημα λήφθηκαν τρία δείγματα. Τα αποτελέσματα εισάχθηκαν σε υπολογιστικό φύλλο Excel.

Η) Η συγκέντρωση των εναιωρημάτων προσαρμόστηκε στην επιθυμητή συγκέντρωση των $1 \cdot 10^7$ σπόρια/mL. Στην περίπτωση που η συγκέντρωση ήταν μεγαλύτερη από την επιθυμητή, το εναιώρημα αραιώθηκε με αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό.

Θ) Τα εναιωρήματα спорίων ήταν έτοιμα για τη μόλυνση των προνυμφών. Η διαδικασία μόλυνσης πραγματοποιήθηκε άμεσα και γρήγορα για την διατήρηση της μολυσματικής ικανότητας των спорίων.



Εικόνα 21: Δοχεία με εναιωρήματα спорίων τεσσάρων στελεχών του μύκητα *M. robertsii* που διατηρούνται σε πάγο πριν τη μόλυνση των εντόμων



Εικόνα 22: Παρατήρηση και καταμέτρηση των σπορίων από τα εναιωρήματα εντομοπαθογόνων μυκήτων σε εργαστηριακό μικροσκόπιο.

4.2.4 Η μόλυνση των προνυμφών

Όταν τα εναιωρήματα των μυκήτων ήταν πλέον έτοιμα, προετοιμάστηκαν τα δοχεία πετρί στα οποία θα παρέμεναν οι προνύμφες μετά τη μόλυνση. Για κάθε στέλεχος μύκητα μολύνθηκαν 40 προνύμφες από κάθε είδος και από κάθε κλιματικό θάλαμο αντίστοιχα. Επιπλέον, 40 προνύμφες από κάθε είδος και κλιματικό θάλαμο χρησιμοποιήθηκαν ως μια μορφή ελέγχου καθώς θα ερχόντουσαν σε επαφή με το διάλυμα Ringer στο οποίο δεν περιέχονταν κανένας μύκητας. Το διάλυμα αυτό ονομάστηκε "Control". Χρησιμοποιήθηκαν 4 δοχεία πετρί με τεχνητή τροφή για κάθε είδος μύκητα και σε κάθε ένα από αυτά θα τοποθετούνταν τελικά 10 μολυσμένες προνύμφες από κάθε είδος εντόμου και από τον αντίστοιχο κλιματικό θάλαμο. Αντίστοιχα, για εκείνες που θα ερχόντουσαν σε επαφή με το διάλυμα "Control" δημιουργήθηκαν 4 δοχεία πετρί με τεχνητή τροφή για κάθε είδος εντόμου, από κάθε κλιματικό θάλαμο. Σε κάθε δοχείο πετρί, είχε αρχικά προστεθεί ένας μικρός κύβος τεχνητής τροφής ενώ στο πυθμένα τους πλαισιώθηκε απορροφητικό χαρτί το οποίο είχε εμπλουτιστεί με αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό. Εφόσον όλα ήταν έτοιμα, το επόμενο βήμα είναι η αποστείρωση των εργαλείων που θα χρησιμοποιούνταν και στη συνέχεια η μόλυνση.

Υλικά:

Λαβίδα ανατομική

Αιθανόλη 90% vol

Ηλεκτρική λυχνία φωτιάς
Μεταλλική βάση στήριξης λαβίδας
Ταινία παραφίλμ
Άδεια τρυβλία πετρί
Αυτόματη πιπέττα προσαρμοσμένου όγκου
Πιπέττες των 100μL - 1000μL

Μέθοδος:

A) Τοποθετήθηκε λαβίδα στο δοχείο της αιθανόλης και έπειτα καυτηριάστηκε στη φλόγα. Αφήθηκε να κρυώσει στη μεταλλική βάση.

B) Προστέθηκε μερική ποσότητα από το πρώτο εναιώρημα σε άδειο τρυβλίο πετρί το οποίο και τοποθετείται σε κλίση.

Γ) Με τη λαβίδα συγκρατήθηκε από μία προνύμφη τη φορά και βυθίστηκε στο εναιώρημα για 3 δευτερόλεπτα. Ύστερα τοποθετήθηκε στο έτοιμο τρυβλίο με την τροφή.

Δ) Μετά την μόλυνση 40 προνυμφών και τοποθετώντας τες σε τέσσερα διαφορετικά δοχεία ανά δέκα σε κάθε ένα, τα τρυβλία σφραγίστηκαν με παραφίλμ.

E) Η διαδικασία επαναλήφθηκε για τα υπόλοιπα 3 στελέχη και για το διάλυμα "control".

ΣΤ) Με την αυτόματη πιπέττα ο όγκος προσαρμόστηκε στα 200μL και λήφθηκε από το αρχικό εναιώρημα ποσότητα ώστε να δημιουργηθούν καινούριες αποικίες σε τρυβλία με BSM άγαρ. Σφραγίστηκαν επίσης με παραφίλμ. Σκοπός ήταν ο επιπλέον έλεγχος για να διαπιστωθεί ότι το εναιώρημα περιείχε σπόρια ικανά για την ανάπτυξη του μύκητα. Αντιθέτως η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για το 'Control' προκειμένου να ελεγχθεί για τυχόν επιμολύνσεις κατά τη διάρκεια του πειράματος με τους μύκητες.

Z) Όλα τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε κλειστά διαφανή κουτιά και παρέμειναν στους αντίστοιχους κλιματικούς θαλάμους στους οποίους είχαν προηγουμένως αναπτυχθεί οι προνύμφες.

H) Ο αριθμός των ζωντανών προνυμφών ελέγχθηκε την 3^η, την 6^η και την 10^η μέρα μετά τη μόλυνση. Οι νεκρές προνύμφες απομονώθηκαν σε καινούρια δοχεία πετρί στα οποία υπήρχε μόνο απορροφητικό χαρτί εμπλουτισμένο με αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό. Για κάθε στέλεχος, κάθε είδος προνύμφης και κάθε κλιματικό θάλαμο χρησιμοποιήθηκε διαφορετικό δοχείο πετρί. Ελέγχθηκε η ανάπτυξη μικκυλίου του μύκητα από τις νεκρές προνύμφες σε βάθος δεκαπέντε ημερών. Ήταν μια ένδειξη,

όχι όμως καθοριστική, ότι ο μύκητας ήταν η αιτία θανάτου της προνύμφης. Μετά το πέρας των 10 ημερών, όλα τα τρυβλία και όσες ζωντανές προνύμφες είχαν απομείνει, απορρίφθηκαν. Κατά τη διάρκεια των ημερών καταμετρήθηκε ο αριθμός των προνυμφών που παρέμειναν ζωντανές και χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία στατιστικού διαγράμματος.



Εικόνα 23: Διαδικασία μόλυνσης τω προνυμφών της ευδεμίδας και της κοχυλίδας σε αποστειρωμένο εργαστηριακό πάγκο και έπειτα τοποθέτηση τους σε δοχεία Petri με τεχνητή τροφή.

4.3 Υλικά & Μέθοδοι 2^ο Πειράματος

Στο 2^ο πείραμα ελέγχθηκε ο παρασιτισμός και η θνησιμότητα τεσσάρων στελεχών του μύκητα *M. robertsii* και ενός εμπορικού προϊόντος με βάση το μύκητα *B. bassiana*, στην ευδεμίδα και την κοχυλίδα της αμπέλου στους 25°C.

Τα στελέχη του μύκητα *M. robertsii* είναι:

A) MsoilAR-4.3 [Pedriel, Province of Mendoza – Αργεντινή (Λατινική Αμερική)]

B) M224B [Yara Valley, Victoria – Αυστραλία (Ωκεανία)]

Γ) EF3.5(2) [Villeneuve-d'Ornon – Ν. Γαλλία (Ευρώπη)]

Δ) EF047 [Fläche Kellersgrube - Geisenheim, Γερμανία (Ευρώπη)]

Το στέλεχος του μύκητα *B. bassiana* είναι:
ATCC 74040 (Προϊόν εμπορίου, NATURALIS).

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στους 25°C και χρησιμοποιήθηκαν προνύμφες L3 σταδίου της ευδεμίδας και της κοχυλίδας της αμπέλου, από το εργαστήριο εκτροφής του πανεπιστημίου στο Γκάζενχαϊμ της Γερμανίας.

Το πείραμα διαχωρίστηκε σε δύο χρονικές φάσεις:

- A) Μόλυνση των προνυμφών από καλλιέργειες μυκήτων ηλικίας 14 ημερών
- B) Μόλυνση των προνυμφών από καλλιέργειες μυκήτων ηλικίας 20 ημερών

Οι προνύμφες της ευδεμίδας που χρησιμοποιήθηκαν είχαν προηγουμένως εκτραφεί σε θερμοκρασία 24°C, ενώ της κοχυλίδας στους 20 - 21°C.

Χρησιμοποιήθηκαν καινούρια δοχεία (φυγοκέντρησης) γνωστά ως 'erpi tubes' και άλλου είδους τροφής για τις ανάγκες του πειράματος. Η τροφή αποτελούνταν από: 470ml νερό, 11,25g άγαρ, 18,56g φύτρο σιταριού, 20,47g μαγιά, 1,51g "Wesson's Salt", 38,08g αλεύρι καλαμποκιού, 1,19g ασκορβικό οξύ, 1,24g "Nipagin", 2,71g Βιταμίνη C και 2,25ml Αιθανόλη 70%. Τα συστατικά μαγειρεύτηκαν σε χαμηλή φωτιά αναδεύοντας τακτικά μέχρι να έρθουν σε θερμοκρασία 50°C. Έπειτα το μίγμα προστέθηκε στα 'erpi tubes' για τη στερεοποίηση του και την μετέπειτα χρήση του.

Σκοπός αυτής της αλλαγής ήταν η διευκόλυνση της διαδικασίας αλλά και η δημιουργία περισσότερων δειγμάτων περιορίζοντας επίσης και τον παράγοντα μετάδοσης του μύκητα από μια προνύμφη σε άλλη.

Όταν οι σωλήνες φυγοκέντρησης ήταν πλέον έτοιμοι με την τεχνητή τροφή, απομονώθηκε ο αριθμός που χρησιμοποιήθηκε και οι υπόλοιποι αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτη για μελλοντική χρήση.

Μέθοδος:

I. Δημιουργήθηκε ο διαλύτης "Ringer's solution" (με βάση τη μεθοδολογία που αναφέρθηκε στο 1^ο πείραμα, κεφάλαιο 4.2.3). Έπειτα αποστειρώθηκε σε αεροστεγή λέβητα βρασμού.

II. Απομονώθηκαν οι προνύμφες από τους χώρους εκτροφής. Για την 1^η φάση του πειράματος με τους μύκητες 14^{ων} ημερών, απομονώθηκαν 120

προνύμφες της ευδεμίδας και άλλες 120 της κοχυλίδας (20 pronύμφες για κάθε στέλεχος μύκητα και 20 ως 'control').

III. Αποστειρώθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν όλα τα εργαλεία για την δημιουργία των τεσσάρων εναιωρημάτων των στελεχών του μύκητα *M. robertsii* και το εναιώρημα του μύκητα *B. bassiana*. Ακολούθησε η ίδια διαδικασία του πρώτου πειράματος (κεφ. 4.2.3) για τη δημιουργία τους. Η συγκέντρωση των εναιωρημάτων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν $2,3 \cdot 10^7$ σπόρια/ml. Στα εναιωρήματα που κρίθηκε απαραίτητο έγιναν αραιώσεις με αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό ύστερα από τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων τους σε μικροσκόπιο ακριβείας.

IV. Στους σωλήνες φυγοκέντρησης που περιείχαν την τροφή δημιουργήθηκαν τρεις μικρές τρύπες σε κάθε καπάκι προκειμένου να παρέχεται οξυγόνο στις pronύμφες μετά την μόλυνση αλλά να μην μπορούν να διαφύγουν.

V. Οι pronύμφες μολύνθηκαν βυθίζοντας τες στα εναιωρήματα ξεχωριστά για 5 δευτερόλεπτα. Ακολούθησε η ίδια ασηπτική προετοιμασία και διαδικασία μόλυνσης με το 1^ο πείραμα (κεφ. 4.2.4).

VI. Μετά τη μόλυνση, κάθε pronύμφη τοποθετήθηκε σε ξεχωριστό σωλήνα φυγοκέντρησης που περιείχε τροφή και έπειτα το καπάκι σφραγίστηκε.

VII. Έτσι, κάθε pronύμφη αποτέλεσε και ένα δείγμα, συνολικά 120 δείγματα για κάθε είδος pronύμφης αντίστοιχα.

VIII. Τα διάφανα δοχεία έκλεισαν με καπάκι ελαφρά και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο με πρόσβαση σε φως, οξυγόνο και υγρασία στους 25°C.

IX. Έγινε μέτρηση των επιζώντων pronυμφών την 3^η, την 6^η και την 10^η μέρα και παρατηρήθηκαν οι αποικίες των μυκήτων καθώς και η καθαρότητα του 'control'.

X. Οι αριθμοί μεταφέρθηκαν σε φύλλο excel και ακολούθησε η διαδικασία των στατιστικών αποτελεσμάτων και του διαγράμματος.

XI. Μετά το τέλος του πειράματος, οι ζωντανές pronύμφες και οι σωλήνες φυγοκέντρησης απορρίφθηκαν ενώ τα δοχεία που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν για επόμενη χρήση.

Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για την 2^η φάση του πειράματος με του μύκητες των 20 ημερών. Χρησιμοποιήθηκαν 120 προνύμφες της ευδεμίδας και 120 της κοχυλίδας και όλα τα αποτελέσματα μεταφέρθηκαν εξίσου σε φύλλο excel για στατιστική ανάλυση.



Εικόνα 24: Ανάπτυξη μυκηλίου στελέχους του *M. robertsii* σε προνύμφη της *Lobesia botrana*

4.4 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Για την ανάλυση των δεδομένων που συλλέχθηκαν από τα πειράματα, χρησιμοποιήθηκε η αναβαθμισμένη εκδοχή RStudio του λογισμικού R, εκδοχή 2023.03.0 +386 (2022 RStudio©, PBC. All Rights Reserved). Ο υπολογισμός της ‘διορθωμένης’ θνησιμότητας των προνυμφών του είδους *L. botrana* και *E. ambiguella* αντίστοιχα, έγινε με βάση την εξίσωση Abbott (Abbott, 1925, Fleming and Retnakaran, 1985) που απεικονίζεται παρακάτω.

$$\text{Corrected mortality} = \frac{\text{Control alive} - \text{Treatment alive insect}}{\text{Control alive insect}}$$

Για το πρώτο πείραμα σχεδιάστηκε ένα μοντέλο ‘Three-way ANOVA’ που συμπεριέλαβε τα στελέχη μύκητα, τα είδη των προνυμφών που χρησιμοποιήθηκαν και τις θερμοκρασίες στις οποίες πραγματοποιήθηκε το πείραμα. Αυτοί οι παράγοντες χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να διευκρινιστεί εάν κάποιος από αυτούς ή η αλληλεπίδραση μεταξύ τους επηρέασαν σημαντικά τη ‘διορθωμένη’ θνησιμότητα των προνυμφών της ευδεμίδας και της κοχυλίδας αντίστοιχα.

Για το δεύτερο πείραμα, η στατιστική ανάλυση επαναλήφθηκε δύο φορές ενώ εκτελέστηκε και ένα ChiSq τεστ ώστε να εντοπιστεί εάν οι διορθωμένες θνησιμότητες των προνυμφών που παρουσιάστηκαν στις δύο επαναλήψεις, διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους.

Έπειτα, έγινε μια σύμπτυξη των δεδομένων που παραλήφθηκαν από τις δύο επαναλήψεις. Ένα μοντέλο ‘Two-way ANOVA’ σχεδιάστηκε με σκοπό να ερευνηθεί εάν κάποιος από τους παράγοντες ‘είδος εντόμου’ και ‘στέλεχος μύκητα’, ή η αλληλεπίδραση μεταξύ τους επηρέασαν σημαντικά τη διορθωμένη θνησιμότητα των προνυμφών *L. botrana* και *E. ambiguella*.

4.5 Αποτελέσματα

4.5.1 Αποτελέσματα από το 1^ο πείραμα

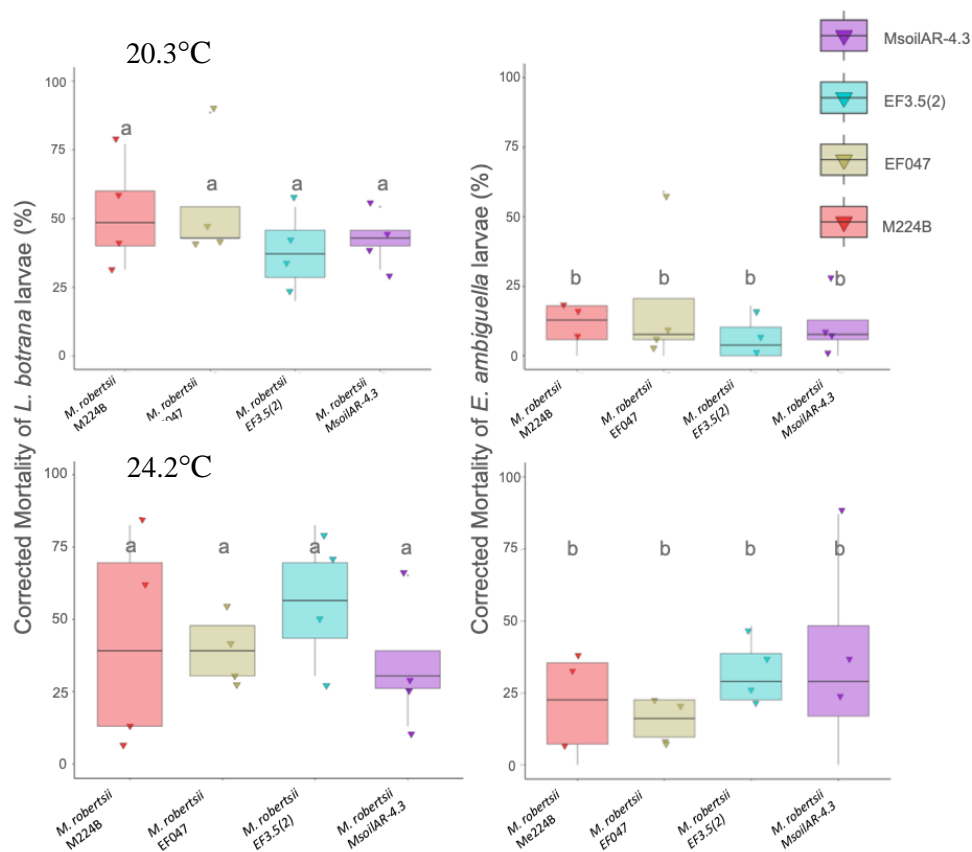
Η διορθωμένη θνησιμότητα που απεικονίζεται σε ποσοστά (%) στα παρακάτω διαγράμματα, είναι ένας δείκτης που δείχνει την ισχύ των εντομοπαθογόνων μυκήτων στη μόλυνση και τη θανάτωση των προνυμφών της ευδεμίδας και της κοχυλίδας σε σύγκριση με τις προνύμφες που αποτέλεσαν το δείγμα 'control'. Ποσοστά διορθωμένης θνησιμότητας πάνω από 50% σημαίνουν ότι οι μύκητες είναι αρκετά αποτελεσματικοί στη θανάτωση των προνυμφών.

Στο τεστ ANOVA που πραγματοποιείται, η ύπαρξη της τιμής $p < 0.05$ σημαίνει ότι υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών στελεχών μύκητα.

Στις προνύμφες της ευδεμίδας που μολύνθηκαν και παρέμειναν στους 20.3°C, παρατηρήθηκε ποσοστό διορθωμένης θνησιμότητας μεταξύ 25% και 55% για κάθε στέλεχος ξεχωριστά (Anova Test: Df=3, F=0.82, p=0.508). Στη περίπτωση των προνυμφών της ευδεμίδας που μολύνθηκαν και παρέμειναν στους 24.2°C, τα ποσοστά διορθωμένης θνησιμότητας αυξήθηκαν σε σύγκριση με αυτά που καταγράφηκαν στους 20.3°C (Anova Test: Df=3, F=0.596, p=0.63) με ποσοστά να φθάνουν μέχρι 75%. Στη περίπτωση παρασιτισμού των προνυμφών της κοχυλίδας στους 20.3°C, παρατηρήθηκαν χαμηλά ποσοστά διορθωμένης θνησιμότητας, (CM < 25%) για κάθε στέλεχος μύκητα ξεχωριστά (Anova Test: Df=3, F=0.396, p=0.758). Στο δεύτερο σκέλος του πειράματος, στους 24.2°C, παρατηρήθηκε αύξηση της διορθωμένης θνησιμότητας από τον παρασιτισμό των τεσσάρων στελεχών του μύκητα *M. robertsii* στις προνύμφες τις κοχυλίδας, μέχρι και 50% σε συγκεκριμένες περιπτώσεις (Anova Test: Df=3, F=0.776, p=0.529).

Μια σημαντική παρατήρηση είναι ότι σε όλες τις περιπτώσεις που ελέγχθηκε ο παρασιτισμός των τεσσάρων στελεχών του μύκητα *M. robertsii* στις προνύμφες της ευδεμίδας και της κοχυλίδας αντίστοιχα, δε σημειώθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των τεσσάρων στελεχών.

Μια επίσης σημαντική διαφορά που καταγράφηκε είναι μεταξύ των δύο ειδών εντόμου στα οποία ελέγχθηκε ο παρασιτισμός των τεσσάρων στελεχών του μύκητα *M. robertsii*, με την ευδεμίδα να παρουσιάζει υψηλότερα επίπεδα θνησιμότητας συγκριτικά με την κοχυλίδα.



Σχήμα 1: Πόσοστά επί % διορθωμένης θνησιμότητας της Ευδεμίδας (*Lobesia botrana*) και της Κοχυλίδας (*Euroecilia ambiguella*) 10 ημέρες έπειτα από τη μόλυνση τους από τέσσερα διαφορετικά στελέχη του μύκητα *M. robertsii* (MsoilAR-4.3, M224B, EF3.5(2), EF047) σε δύο διαφορετικούς κλιματικούς θαλάμους: 20.2°C και 24.2°C. Η χρήση των a και b δείχνουν τη σημαντική διαφορά μεταξύ των προνυμφών Ευδεμίδας και Κοχυλίδας αντίστοιχα.

4.5.2 Αποτελέσματα από το 2^ο πείραμα

Όλα τα στελέχη του μύκητα *M. robertsii* και το στέλεχος του μύκητα *Beauveria bassiana* (MsoilAR-4.3, M224B, EF3.5(2), EF047 και ATCC 74040) μπόρεσαν να μολύνουν και να επιφέρουν θάνατο στις προνύμφες της ευδεμίδας και στις δύο περιπτώσεις παρασιτισμού.

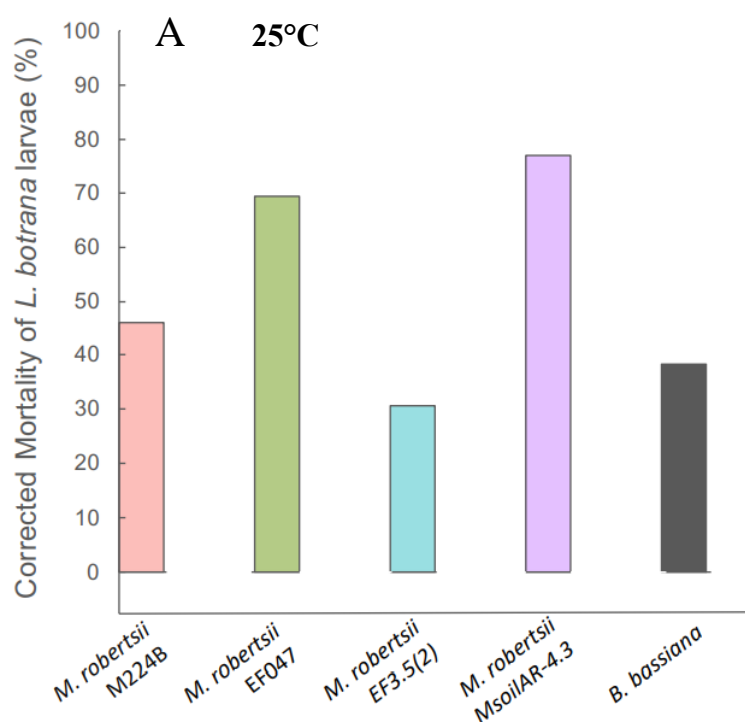
Στην πρώτη περίπτωση παρασιτισμού προνυμφών ευδεμίδας από μύκητες 14 ημερών, παρατηρήθηκε ποσοστό πάνω από 30% διορθωμένης θνησιμότητας για κάθε στέλεχος ξεχωριστά (Chisq Test : $X^2=1.5652$, Df=4, $p=0.815$).

Στο δεύτερο σκέλος του πειράματος, κατά τον παρασιτισμό των προνυμφών ευδεμίδας από τα πέντε στελέχη μύκητα ηλικίας 20 ημερών, σημειώθηκε αύξηση της

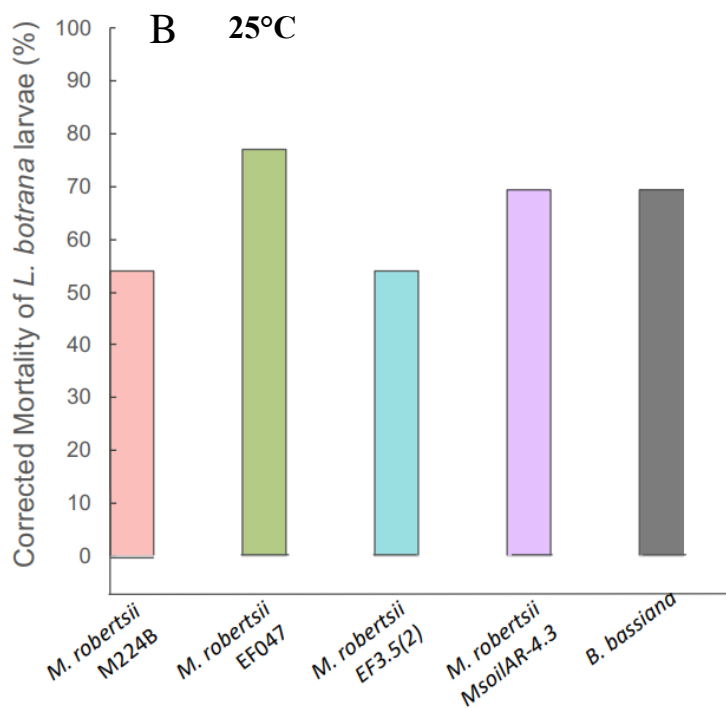
διορθωμένης θνησιμότητας, με ποσοστά πάνω από 50% να σημειώνονται για κάθε στέλεχος ξεχωριστά (Chisq Test : $X^2=4.3226$, $Df=4$, $p=0.3641$).

Στην περίπτωση παρασιτισμού της κοχλίδας από τα τέσσερα στελέχη *M. robertsii* και το στέλεχος του *B. bassiana* ηλικίας 14 ημερών, μόνο ένα στέλεχος (*M.robertsii* EF047) μπόρεσε να προκαλέσει θνησιμότητα ($X^2=1.5652$, $Df=4$, $p=0.815$).

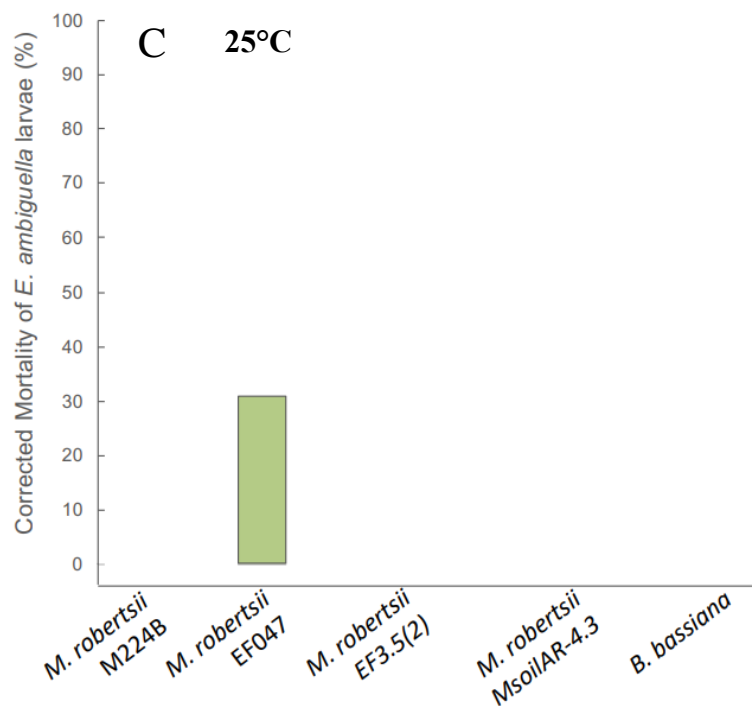
Στη δεύτερη περίπτωση του πειράματος που χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη των μυκητών ηλικίας 20 ημερών, δύο στελέχη (*Metarhizium robertsii* EF3.5(2) και *M. robertsii* EF047) επέφεραν θάνατο στις προνύμφες της κοχλίδας με ποσοστά διορθωμένης θνησιμότητας λιγότερο από 10% αντίστοιχα (Chisq Test : $X^2=0.83582$, $Df=4$, $p=0.9336$). Συνολικά σε όλες τις περιπτώσεις παρασιτισμού της ευδεμίδας και της κοχλίδας στου 25°C δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στα επίπεδα διορθωμένης θνησιμότητας μεταξύ των διαφορετικών στελεχών μύκητα. Σημαντική διαφορά παρατηρείται στα ποσοστά διορθωμένης θνησιμότητας μεταξύ ευδεμίδας και κοχλίδας από τον παρασιτισμό των μυκήτων, όπου η ευδεμίδα παρουσιάζει υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με την κοχλίδα.



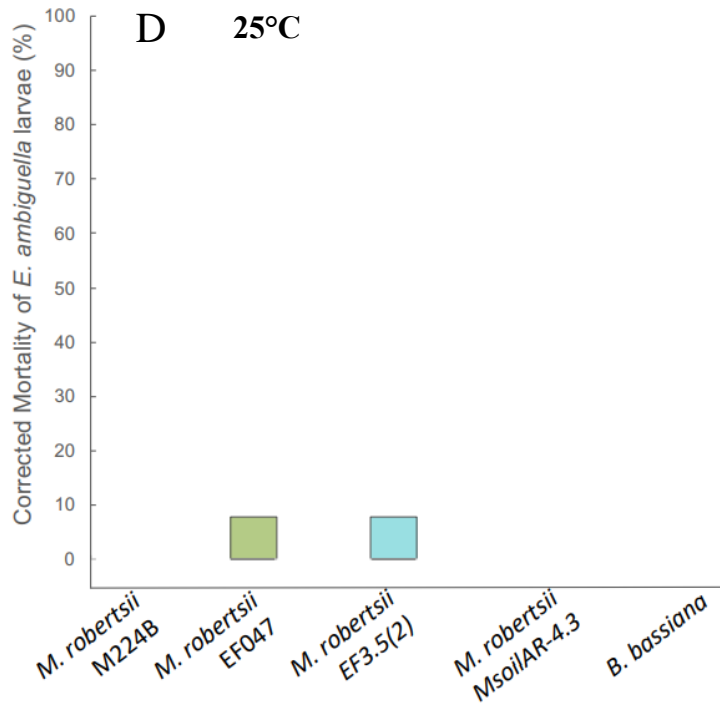
Σχήμα 2: Ποσοστά επί % διορθωμένης θνησιμότητας της Ευδεμίδας (*Lobesia botrana*) 10 ημέρες έπειτα από τη μόλυνση των προνυμφών από τέσσερα διαφορετικά στελέχη του μύκητα *M. robertsii* (MsoilAR-4.3, M224B, EF3.5(2), EF047) και ένα στέλεχος *Beauveria bassiana* (ATCC 74040) ηλικίας 14 ημερών, στους 25°C.



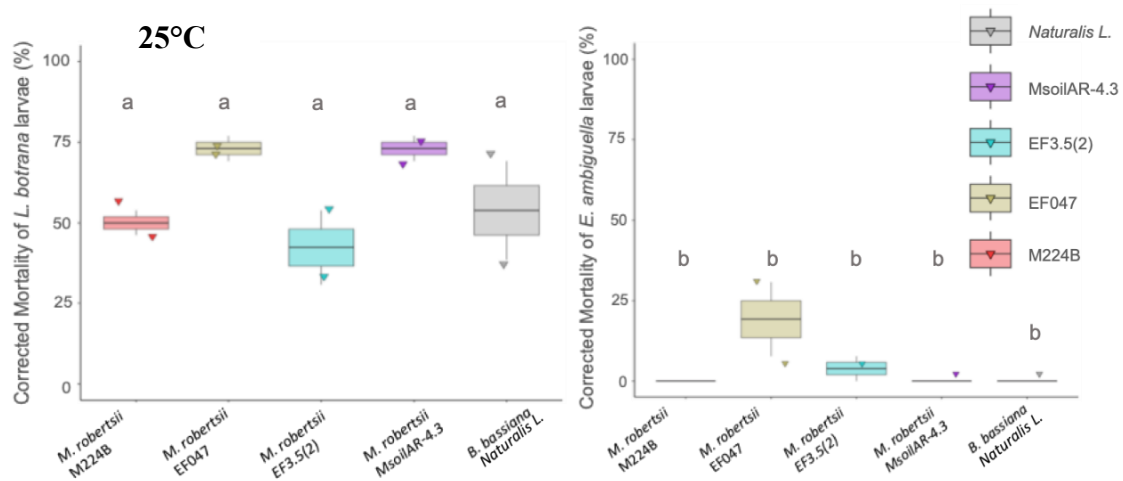
Σχήμα 3: Ποσοστά επί % διορθωμένης θνησιμότητας της Ευδεμίδας (*Lobesia botrana*) 10 ημέρες έπειτα από τη μόλυνση των προνυμφών από τέσσερα διαφορετικά στελέχη του μύκητα *M. robertsii* (MsoilAR-4.3, M224B, EF3.5(2), EF047) και ένα στέλεχος *Beauveria bassiana* (ATCC 74040) ηλικίας 20 ημερών, στους 25°C.



Σχήμα 4: Ποσοστά επί % διορθωμένης θνησιμότητας της Κοχλίδας (*Eupoecilia ambiguella*) 10 ημέρες έπειτα από τη μόλυνση των προνυμφών από τέσσερα διαφορετικά στελέχη του μύκητα *M. robertsii* (MsoilAR-4.3, M224B, EF3.5(2), EF047) και ένα στέλεχος *Beauveria bassiana* (ATCC 74040) ηλικίας 14 ημερών, στους 25°C.



Σχήμα 5: Ποσοστά επί % διορθωμένης θνησιμότητας της Κοχυλίδας (*Euroecilia ambigueuella*) 10 ημέρες έπειτα από τη μόλυνση των προνυμφών από τέσσερα διαφορετικά στελέχη του μύκητα *M. robertsii* (MsoilAR-4.3, M224B, EF3.5(2), EF047) και ένα στέλεχος *Beauveria bassiana* (ATCC 74040) ηλικίας 20 ημερών, στους 25°C.



Σχήμα 6: Σύμπτυξη των στατιστικών αποτελεσμάτων του δεύτερου πειράματος. Ποσοστά επί % διορθωμένης θνησιμότητας της ευδεμίδας (*Lobesia bofrana*) και της κοχυλίδας (*Euroecilia ambigueuella*) 10 ημέρες έπειτα από τη μόλυνση των προνυμφών από τέσσερα διαφορετικά στελέχη του μύκητα *M. robertsii* (MsoilAR-4.3, M224B, EF3.5(2), EF047) και ένα στέλεχος *Beauveria bassiana* (ATCC 74040) στους 25°C. Η χρήση των a και b δείχνει τη σημαντική διαφορά των αποτελεσμάτων μεταξύ της ευδεμίδας και της κοχυλίδας.

4.6 Συζήτηση

Με την εξέλιξη της καλλιέργειας της αμπέλου σε διαφορετικές περιοχές ανά τον κόσμο, είναι επιτακτική η ανάγκη για εξέλιξη της προστασίας της από εχθρούς και ασθένειες, με γνώμονα πάντα την διατήρηση και την προστασία του περιβάλλοντος. Η άνοδος των θερμοκρασιών στο πλαίσιο της κλιματικής αλλαγής έχει δημιουργήσει επιπρόσθετα προβλήματα με την εμφάνιση μη γηγενών οργανισμών σε νέες γεωγραφικές εκτάσεις, αλλά και αύξηση στο πληθυσμιακό δυναμικό τους. Ωστόσο, η ανάπτυξη και η εκτεταμένη χρήση φυτοφαρμάκων για την προστασία των αμπελώνων έχει οδηγήσει σε σοβαρά προβλήματα, από την ανθεκτικότητα που εμφανίζουν τα έντομα-παράσιτα σε αυτά (Vontas et al., 2011), έως και προβλήματα στην ανθρώπινη υγεία. Τις τελευταίες δεκαετίες, ανάμεσα σε καινούριες μεθόδους αντιμετώπισης των προβλημάτων που πλήττουν τις καλλιέργειες, η ανάπτυξη της βιολογικής καταπολέμησης εχθρών έχει φέρει σπουδαία αποτελέσματα (Hendrichs et al., 1983; Onvruski et al., 2004; Zenil et al., 2004; Ekesi et al., 2007; Martinez-Ferrer et al., 2011). Ένας σημαντικά ανερχόμενος κλάδος είναι η βιολογική καταπολέμηση των εντόμων που προσβάλλουν το αμπέλι με τη χρήση εντομοπαθογόνων μυκήτων (Lacey and Shapiro-Ilan, 2008). Στην περίπτωση της ευδεμίδας (*Lobesia botrana*) και της κοχυλίδας (*Eupoecilia ambiguella*) της αμπέλου που δημιουργούν προβλήματα στις καλλιέργειες, η χρήση εντομοπαθογόνων μυκήτων για τη διαχείριση των συνεχόμενα αυξανόμενων πληθυσμών τους, αποτελεί μια σπουδαία εναλλακτική σε σύγκριση με τα συμβατικά χημικά σκευάσματα.

Σκοπός των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν, ήταν η εκτίμηση διαφορετικών στελεχών και ειδών εντομοπαθογόνων μυκήτων ως προς την επίτευξη παρασιτισμού και τη θνησιμότητα που επιφέρουν στα είδη *Lobesia botrana* και *Eupoecilia ambiguella* κάτω από συγκεκριμένες κλιματικές συνθήκες, με στόχο τη πιθανή μελλοντική τους χρήση σε συστήματα ολοκληρωμένης προστασίας των αμπελώνων.

Υπήρξε ένας βασικός διαχωρισμός σε δύο πειράματα, τα οποία με τη σειρά τους διακρίθηκαν σε σκέλη και διέφεραν σε ορισμένα σημεία μεταξύ τους. Στο πρώτο πείραμα, ελέγχθηκε ο παρασιτισμός και η θνησιμότητα τεσσάρων στελεχών του εντομοπαθογόνου μύκητα *M. robertsii* στην ευδεμίδα και την κοχυλίδα κάτω από δύο διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες. Στο δεύτερο πείραμα, ελέγχθηκε ο παρασιτισμός και η θνησιμότητα των τεσσάρων στελεχών *M. robertsii* αλλά και ενός

στελέχους του είδους *B. bassiana* στην ευδεμίδα και την κοχυλίδα χρησιμοποιώντας υψηλότερη συγκέντρωση σπορίων για την μόλυνση και πραγματοποιώντας το πείραμα σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία. Επιπλέον, το δεύτερο πείραμα χωρίστηκε σε δύο μέρη αφού χρησιμοποιήθηκαν για τη μόλυνση των προνυμφών εναιωρήματα σπορίων από μύκητες 14 και 20 ημερών αντίστοιχα.

Για το πρώτο πείραμα, επιλέχθηκαν συγκεκριμένες θερμοκρασίες στις οποίες αναπτύχθηκαν τα δύο είδη εντόμου και στις οποίες παρέμειναν αντίστοιχα έπειτα από τη μόλυνση τους από τα στελέχη εντομοπαθογόνων μυκήτων. Η θερμοκρασία στους 20.3°C αντικατόπτριζε το μέσο θερμοκρασιακό εύρος στον οποίο τα συγκεκριμένα είδη πεταλούδας αναπτύσσονται συνήθως στο φυσικό τους περιβάλλον. Αντίθετα, η υψηλότερη θερμοκρασία στους 24.2°C αντιπροσώπευε την θερμοκρασιακή κατάσταση που θα επικρατεί σε βάθος χρόνου στους αμπελώνες της κεντρικής Ευρώπης λόγω της κλιματικής αλλαγής.

Τα εναιωρήματα σπορίων που δημιουργήθηκαν από τα διαφορετικά στελέχη του *M. robertsii* για τις ανάγκες του πρώτου πειράματος είχαν ενδεδειγμένη συγκέντρωση $1 \cdot 10^7$ σπόρια/mL και η μόλυνση των προνυμφών έγινε βυθίζοντας τες στα αντίστοιχα διαλύματα μια προς μία για μερικά δευτερόλεπτα (Muniz et al., 2021; Hamiduzzaman et al., 2012; Briggs et al., 2006).

Τα αποτελέσματα των στατιστικών αναλύσεων του πρώτου πειράματος έδειξαν ότι όλα τα στελέχη του *M. robertsii* μπόρεσαν να προκαλέσουν θνησιμότητα στις προνύμφες της ευδεμίδας και στις δύο θερμοκρασίες, με τα ποσοστά ‘διορθωμένης’ θνησιμότητας να είναι αυξημένα στην υψηλότερη θερμοκρασία (24.2°C). Παράλληλα, στην περίπτωση της κοχυλίδας υπήρξε θνησιμότητα και στα δύο θερμοκρασιακά εύρη αλλά παρατηρήθηκε επίσης μια μικρή άνοδος των ποσοστών ‘διορθωμένης’ θνησιμότητας στην υψηλότερη θερμοκρασία. Πιθανότατα αφού η βέλτιστη θερμοκρασία των περισσότερων εντομοπαθογόνων μυκήτων είναι γύρω στους 25°C (Bava et al., 2022), η θερμοκρασία των 24.2°C στο πείραμα να επέτρεψε την καλύτερη ανάπτυξη και δράση του μύκητα ενάντια στις προνύμφες των δύο ειδών και επομένως να προκάλεσε μεγαλύτερη θνησιμότητα. Ωστόσο, στατιστικά δε σημειώθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των θερμοκρασιών στα αποτελέσματα. Τα στελέχη του *M. robertsii* δεν εμφάνισαν σημαντική διαφορά μεταξύ τους σε καμία από τις περιπτώσεις αλλά υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ της ευδεμίδας και της κοχυλίδας και στις δύο θερμοκρασίες, με την ευδεμίδα να σημειώνει υψηλότερα ποσοστά ‘διορθωμένης’ θνησιμότητας.

Στο δεύτερο πείραμα επιλέχθηκε υψηλότερη συγκέντρωση για τα εναιωρήματα των σπορίων ($2.3 \cdot 10^7$ σπόρια/mL). Η συγκεκριμένη αύξηση σε σύγκριση με το πρώτο πείραμα έγινε προκειμένου να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα μιας υψηλότερης συγκέντρωσης στη θνησιμότητα των εντομοπαθογόνων μυκήτων στα έντομα. Επιπλέον, με τη χρήση του μύκητα *B. bassiana* ήταν εφικτός ο έλεγχος της ορθότητας του πειράματος όσον αφορά την λειτουργία και την αποτελεσματικότητα του ακόμη και με άλλους μύκητες πέρα από τα στελέχη του μύκητα *M. robertsii*. Ενώ η απόφαση για τη χρήση αποικιών μυκήτων, 14 και 20 ημερών, πάρθηκε με στόχο την κατανόηση και την επιλογή της κατάλληλης χρονικής περιόδου για τη συγκομιδή των σπορίων των εντομοπαθογόνων μυκήτων.

Στο πρώτο σκέλος του δεύτερου πειράματος που χρησιμοποιήθηκαν αποικίες των στελεχών ηλικίας 14 ημερών, παρατηρήθηκαν ποσοστά 'διορθωμένης' θνησιμότητας στην ευδεμίδα από όλα τα στελέχη. Αντίθετα, στην περίπτωση της κοχυλίδας, μόνο ένα στέλεχος *M. robertsii* (EF047) μπόρεσε να επιφέρει θνησιμότητα στις προνύμφες, σημειώνοντας μεγάλη και σημαντική διαφορά με τα αποτελέσματα της ευδεμίδας. Στο δεύτερο σκέλος του δεύτερου πειράματος, τα ποσοστά 'διορθωμένης' θνησιμότητας στην περίπτωση της ευδεμίδας αυξήθηκαν σημαντικά (σημειώθηκε πάνω από 50% διορθωμένη θνησιμότητα για κάθε στέλεχος ξεχωριστά) ενώ για την κοχυλίδα μόλις δύο στελέχη του μύκητα *M. robertsii* (EF3.5(2) και EF047) μπόρεσαν να προκαλέσουν σε πολύ μικρά ποσοστά 'διορθωμένη' θνησιμότητα (10% <).

Στο δεύτερο πείραμα δε παρατηρήθηκε εξίσου σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών στελεχών και μεταξύ των διαφορετικών ειδών μύκητα που χρησιμοποιήθηκαν. Η σημαντική διαφορά υπήρξε ξανά μεταξύ των δύο ειδών εντόμου όπου η ευδεμίδα σημείωσε υψηλότερα ποσοστά 'διορθωμένης' θνησιμότητας ενώ υπήρξε άνοδος της θνησιμότητας και για τα δύο είδη στην περίπτωση της χρήσης γηραιότερων αποικιών μύκητα (20 ημερών) χωρίς να σημειωθεί στατιστικά σημαντική διαφορά. Η μικρή αύξηση που σημειώθηκε στο σκέλος του πειράματος που χρησιμοποιήθηκαν αποικίες μυκήτων 20 ημερών είναι πιθανό να οφείλεται σε καλύτερη ανάπτυξη του μύκητα και την υψηλότερη μολυσματικότητα των σπορίων του. Η υπόθεση αυτή ωστόσο θα πρέπει να επαληθευτεί με περισσότερες επαναλήψεις του πειράματος. Για τις προνύμφες της κοχυλίδας και στα δύο σκέλη του δεύτερου πειράματος δεν σημειώθηκαν σημαντικά ποσοστά 'διορθωμένης' θνησιμότητας ενώ παρατηρήθηκε η ταχύτατη ανάπτυξη τους και ο σχηματισμός κουκουλιών. Σε

υψηλότερες θερμοκρασίες έχει καταγραφεί μείωση της διάρκειας του προνυμφικού σταδίου των περισσότερων εκτόθερων ζώων (Angilletta et al., 2004), με αποτέλεσμα να μειώνεται το χρονικό διάστημα εμφάνισης και δράσης του παρασιτισμού των εντομοπαθογόνων μυκήτων (Clancy and Price, 1987; Benrey and Denno, 1997; Vogelweith et al., 2013b). Λόγω της προαναφερόμενης προτίμησης της κοχυλίδας σε χαμηλές θερμοκρασίες σε σύγκριση με την ευδεμίδα, και εφόσον οι υψηλότερες θερμοκρασίες οδηγούν στη ταχύτερη ανάπτυξη της μπορεί να δικαιολογείται το γεγονός ότι στους 25°C να μην είναι είθισται τόσο ευάλωτη στον παρασιτισμό των εντομοπαθογόνων μυκήτων. Καθώς τα περισσότερα παρασιτοειδή ή εντομοπαθογόνα που προσβάλλουν την ευδεμίδα και την κοχυλίδα της αμπέλου επιτίθονται στην πιο ευάλωτη μορφή των εντόμων, η οποία είναι το προνυμφικό στάδιο ανάπτυξης τους, η συστολή αυτού του σταδίου περιορίζει την έκθεση των εντόμων στη δράση τους (Scaramozzino et al., 2017).

Συνήθως οι εντομοπαθογόνοι μύκητες μπορούν να επιφέρουν θάνατο από 3 έως και 5 ημέρες έπειτα από την εφαρμογή τους (Inglis et al., 2001). Η γρήγορη ανάπτυξη των προνυμφών της κοχυλίδας και ο άμεσος σχηματισμός κουκουλιού (παρατηρήθηκε σχηματισμός σε 2-3 μέρες) κάτω από 25° C είναι πιθανό να οδήγησε σε ασυγχρονισμό. Το αποτέλεσμα αυτού του ασυγχρονισμού μπορεί να μεταφράζονται σε μειωμένη αποτελεσματικότητα του παρασιτισμού των εντομοπαθογόνων μυκήτων στο είδος της κοχυλίδας και για αυτό το λόγο να υπήρξε σημαντική διαφορά σε σχέση με την ευδεμίδα.

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι στο πρώτο πείραμα, μικρή αύξηση της 'διορθωμένης' θνησιμότητας των προνυμφών της κοχυλίδας στην υψηλότερη θερμοκρασία (24.2°C), μπορεί να οφείλεται στην γηραιότερη ηλικία των εντομοπαθογόνων μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό με την βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξη και παρασιτισμού του μύκητα. Αυτή η μικρή αύξηση στη θερμοκρασία στους 25°C στο δεύτερο πείραμα μπορεί να οδηγεί σε αντίθετα αποτελέσματα όπως προαναφέρθηκε.

Καθώς δεν υπήρξε σημαντική στατιστική διαφορά στο δεύτερο πείραμα μεταξύ των στελεχών μύκητα και των διαφορετικών ηλικιακά αποικιών που χρησιμοποιήθηκαν, αλλά υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ειδών εντόμου τα αποτελέσματα συμπτύχθηκαν μέσω ενός στατιστικού τεστ και απεικονίζονται στο διάγραμμα (Σχήμα 6). Πράγματι το τεστ ανέδειξε ότι ο σημαντικότερος παράγοντας διαφοροποίησης μεταξύ των δύο επαναλήψεων του πειράματος ως προς την

‘διορθωμένη’ θνησιμότητα ήταν το είδος του εντόμου και η χρήση των όρων a και b στο διάγραμμα τονίζει τη σημαντική διαφορά των αποτελεσμάτων μεταξύ της ευδεμίδας και της κοχυλίδας.

Σε όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, απομονώθηκαν οι νεκρές προνύμφες και παρατηρήθηκαν μακροσκοπικά για ανάπτυξη μικκυλίου σε βάθος 15 ημερών. Πράγματι στις περισσότερες περιπτώσεις παρατηρήθηκε λευκό (στην περίπτωση της *B. bassiana*) ή πράσινο μικκύλιο (στελέχη του *M. robertsii*) που παραπέμπει στην επιτυχία παρασιτισμού των εντόμων αλλά δεν αποτελεί απόδειξη ότι ο θάνατος του εντόμου προήλθε από αυτό. Προκειμένου να ελεγχθεί εάν ο θάνατος των προνυμφών προήλθε από τον παρασιτισμό του μύκητα θα ήταν σωστό να υπάρξουν περαιτέρω ενέργειες για τις οποίες δεν υπήρχε χρόνος.

4.7 Συμπεράσματα

Καταληκτικά, ο στόχος των πειραμάτων ήταν να αναδείξουν τη δυνατότητα των εντομοπαθογόνων μυκήτων να μπορούν να μολύνουν και να μειώσουν τους πληθυσμούς της ευδεμίδας και της κοχυλίδας ως μια βιολογική μέθοδο καταπολέμησης στο πλαίσιο ενός προγράμματος ολοκληρωμένης προστασίας αμπελώνων. Η δράση των διαφορετικών στελεχών εντομοπαθογόνων μυκήτων στις προνύμφες της ευδεμίδας είχε θετικά αποτελέσματα σε όλες τις περιπτώσεις θερμοκρασιών. Συνεπώς, μπορούν να θεωρηθούν πιθανοί παράγοντες βιολογικού ελέγχου και να συμμετάσχουν μελλοντικά σε προγράμματα IPM πάνω σε αμπελώνες για την αντιμετώπιση της *Lobesia botrana*. Μάλιστα, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ταυτόχρονα με άλλα εντομοκτόνα για τη επίτευξη υψηλότερων ποσοστών θνησιμότητας όπως έχουν γίνει στη περίπτωση χρήσης του μύκητα *B. bassiana* και του βακτηρίου *B. thuringiensis* (Beris and Korkas, 2021; Wraight and Ramos, 2005). Αντιθέτως, στην περίπτωση της κοχυλίδας σημειώθηκαν χαμηλά ποσοστά θνησιμότητας που οδηγεί σε μια ένσταση της μελλοντικής χρήσης τους για την αντιμετώπιση του συγκεκριμένου είδους. Θα πρέπει να πραγματοποιηθούν περαιτέρω πειράματα πάνω στο είδος της *Eupoecilia ambiguella* για να επιβεβαιωθεί η ακριβής αιτία που οι συγκεκριμένοι εντομοπαθογόνοι μύκητες φαίνεται να μην μπορούν να την αντιμετωπίσουν. Βέβαια, η αποτελεσματικότητα των εντομοπαθογόνων μυκήτων υπό εργαστηριακές συνθήκες θα πρέπει πάντοτε να επιβεβαιώνεται και σε πειράματα πεδίου (αμπελώνες) προκειμένου

να αφομοιωθούν σε προγράμματα ολοκληρωμένης αντιμετώπισης εντόμων και παρασίτων.

Είναι σημαντικό να συνεχιστεί η μελέτη των εντομοπαθογόνων μυκήτων και να πραγματοποιηθούν περισσότερα πειράματα για να υπάρξει ευρύτερη κατανόηση των βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων που επηρεάζουν την δράση τους. Θα πρέπει ακόμη να υπάρξουν περαιτέρω έρευνες πάνω στην ευδεμίδα και την κοχυλίδα της αμπέλου που να στοχεύουν στην αλληλεπίδραση τους με εντομοπαθογόνους και μη οργανισμούς παράλληλα με τις αλλαγές στη δυναμική των πληθυσμών και την γεωγραφική τους εξάπλωση λόγω της κλιματικής αλλαγής.

Βιβλιογραφία

Ξένη:

- Aguirre-Zapata, E., Alvarez, H., Dagatti, C. V., Di Sciascio, F., & Amicarelli, A. N. (2023). Parametric interpretability of growth kinetics equations in a process model for the life cycle of *Lobesia botrana*. *Ecological Modelling*, 482, 110407. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2023.110407>
- Ainseba, B., Picart, D., & Thiéry, D. (2011). An innovative multistage, physiologically structured, population model to understand the European grapevine moth dynamics. *Journal of Mathematical Analysis and Applications*, 382(1), 34–46. <https://doi.org/10.1016/j.jmaa.2011.04.021>
- Alford, D. V. (2007). Pests of fruit crops. In *CRC Press eBooks*. <https://doi.org/10.1201/b15135>
- Ali, K., Wakil, W., Zia, K., & Sahi, S. T. (2015). Control of *Earias vittella* (Lepidoptera: Noctuidae) by *Beauveria bassiana* along with *Bacillus thuringiensis*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 17(4). DOI:10.17957/IJAB/14.0009
- Alonso-Díaz, M., García, L., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutierrez, R., Angel-Sahagún, C., Rodríguez-Vivas, R., & Fragoso-Sánchez, H. (2007). Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*, 147(3-4), 336-340. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.03.030>
- Altimira, F., Arias-Aravena, M., Jian, L., Real, N., Correa, P., González, C., Godoy, S., Castro, J. F., Zamora, O., Vergara, C., Vitta, N., & Tapia, E. (2022). Genomic and Experimental Analysis of the Insecticidal Factors Secreted by the Entomopathogenic Fungus *Beauveria pseudobassiana* RGM 2184. *Journal of Fungi*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/jof8030253>
- Altimira, F., Vitta, N., & Tapia, E. (2021). Integrated Pest Management of *Lobesia botrana* with Microorganism in Vineyards: An Alternative for Clean Grapes Production. In *IntechOpen eBooks*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.99153>
- Am, H., Rauscher, S., Buser, H., & Roelofs, W. L. (1976). Sex Pheromone of *Eupoecilia ambiguella*: cis-9-Dodecenyl Acetate as a Major Component. *Zeitschrift Für Naturforschung. C, a Journal of Biosciences*, 31(9–10), 499–503. <https://doi.org/10.1515/znc-1976-9-1004>
- Amo-Salas, M., Ortega-López, V., Harman, R., & Alonso-González, A. (2011). A new model for predicting the flight activity of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Crop Protection*, 30(12), 1586–1593. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.09.003>
- Angilletta, M. J., Steury, T. D., & Sears, M. W. (2004). Temperature, growth rate, and body size in ectotherms: fitting pieces of a Life-History puzzle. *Integrative and Comparative Biology*, 44(6), 498–509. <https://doi.org/10.1093/icb/44.6.498>

- Araújo, J., & Hughes, D. (2016). Diversity of entomopathogenic fungi. In *Advances in genetics* (pp. 1–39). <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2016.01.001>
- Asi, M.R., Bashir, M.H., Afzal, M., Zia, K., Akram, M., (2013). Potential of entomopathogenic fungi for biocontrol of *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Animal and Plant Sciences* 23 (3), 913–918.
- Badii MH, Abreu JL. (2006). Control biológico una forma sustentable de control de plagas (Biological control a sustainable way of pest control). *Daena: International Journal of Good Conscience* 1(1): 82-89. Bae, Y., & Komai, F. (1991). A Revision of the Japanese Species of the Genus *Lobesia* GUENEE (Lepidoptera, Tortricidae), with Description of a New Subgenus. *Lepidoptera Science*, 42(2), 115–141. https://doi.org/10.18984/lepid.42.2_115
- Balachowsky, A. S. (1966). *Lépidoptères. Entomologie appliquée à l'agriculture. Tome II.*
- Bale, J. S., Masters, G. J., Hodkinson, I. D., Awmack, C., Bezemer, T. M., Brown, V. K., Butterfield, J., Buse, A., Coulson, J. C., Farrar, J., Good, J. E. G., Harrington, R., Hartley, S., Jones, T. H., Lindroth, R. L., Press, M. C., Symrnioudis, I., Watt, A. D., & Whittaker, J. B. (2002). Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect herbivores. *Global Change Biology*, 8(1), 1–16. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2486.2002.00451.x>
- Bamisile, B. S., Akutse, K. S., Siddiqui, J. A., & Xu, Y. (2021). Model Application of entomopathogenic fungi as alternatives to chemical pesticides: Prospects, Challenges, and Insights for Next-Generation Sustainable Agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.741804>
- Bamisile, B. S., Akutse, K. S., Dash, C. K., Qasim, M., Aguila, L. C. R., Ashraf, H. J., Huang, W., Hussain, M., Chen, S., & Wang, L. (2020). Effects of Seedling Age on Colonization Patterns of Citrus limon Plants by Endophytic *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and Their Influence on Seedlings Growth. *Journal of Fungi*, 6(1), 29. <https://doi.org/10.3390/jof6010029>
- Bărbuceanu, D., & Ionel, A. (2012). THE PARASITOID COMPLEX OF *Eupoecilia ambiguella* (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) IN A VINEYARD OF SOUTHERN ROMANIA. *ResearchGate*. https://www.researchgate.net/publication/272490598_THE_PARASITOID_COMPLEX_OF_Eupoecilia_ambiguella_LEPIDOPTERA_TORTRICIDAE_IN_A_VINEYARD_OF_SOUTHERN_ROMANIA
- Bateman, R. (1997). Methods of application of microbial pesticide formulations for the control of grasshoppers and locusts. *The Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 129(S171), 69-81.
- Bateman, R., & Chapple, A. (2001). The spray application of mycopesticide formulations. In *CABI Publishing eBooks* (pp. 289–309). <https://doi.org/10.1079/9780851993560.0289>
- Bateman, R., Luke, B., & Alves, R. (2002). Observations on the application of oil-based formulations of mycopesticides. *Spray Oils Beyond 2000*, 321-329.

- Bateman, R. P., & Alves, R. T. (2000). Delivery systems for mycoinsecticides using oil-based formulations. *Aspects of Applied Biology*, 57, 163-170. *ResearchGate*. https://www.researchgate.net/publication/237791000_Delivery_systems_for_Mycoinsecticides_Using_Oil-based_Formulations
- Bateman, R. P., Neethling, D., & Oosthuizen, F. (1998). Green Muscle handbook for central and southern Africa. LUBILOSA. Biological Control Products SA.
- Bateman, R. P., Carey, M., Moore, D., & Prior, C. (1993). The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. *Annals of Applied Biology*, 122(1), 145-152. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1993.tb04022.x>
- Batista, D. P. C., De Oliveira, I. N., Ribeiro, A. R. B., Fonseca, E. J. S., Santos-Magalhães, N. S., De Sena-Filho, J. G., Teodoro, A. V., Grillo, L. a. M., De Almeida, R. S., & Dornelas, C. B. (2017). Encapsulation and release of *Beauveria bassiana* from alginate–bentonite nanocomposite. *RSC Advances*, 7(42), 26468–26477. <https://doi.org/10.1039/c7ra02185b>
- Batista Filho, A., Alves, S. B., Alves, L. F. A., Pereira, R. M., & Augusto, N. T. (1998). Formulacao de entomopatogênicos. Controle microbiano de insetos.
- Batista, F.A. (1989). Controle biológico e o manejo integrado de pragas. *Biológico*, v.55, p.36-39.
- Bava, R., Castagna, F., Piras, C., Musolino, V., Lupia, C., Palma, E., Britti, D., & Musella, V. (2022). Entomopathogenic Fungi for Pests and Predators Control in Beekeeping. *Veterinary Sciences*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/vetsci9020095>
- Bellia, S., Douguedroit, A., Seguin, B. (2007). Impact du réchauffement sur les étapes phénologiques du développement du Grenache et de la Syrah dans les Côtes du Rhône et les Côtes de Provence (1976–2000). Proceedings of the Conference ‘Global Warming, Which Potential Impacts on the Vineyards’.
- Ben-Dov Y (1995) A systematic catalogue of the mealybugs of the world (Insecta: Homoptera:Cocco Ben-Dov, Y. (1994) A Systematic Catalogue of the Mealybugs of the World (Insecta: Homoptera: Coccoidea: Pseudococcidae and Putoidae) with Data on Geographical Distribution, Host Plants, Biology and Economic Importance. Intercept Limited, Andover, UK, 686 pidea: Pseudococcidae, and Putoidae) with data on geographical distribution, host plants,biology, and economic importance. Intercept Ltd., Hampshire
- Benelli, G., Lucchi, A., Anfora, G., Bagnoli, B., Botton, M., Campos-Herrera, R., Carlos, C., Daugherty, M. P., Gemeno, C., Harari, A. R., Hoffmann, C., Ioriatti, C., Plantey, R. J. L., Reineke, A., Ricciardi, R., Roditakis, E., Simmons, G. S., Tay, W. T., Torres-Vila, L. M., . . . Thiéry, D. (2023a). European grapevine moth, *Lobesia botrana* Part I: Biology and ecology. *Entomologia Generalis*, 43(2), 261–280. <https://doi.org/10.1127/entomologia/2023/1837>
- Benrey, B., & Denno, R. F. (1997). The slow-growth–high-mortality hypothesis: a test using the cabbage butterfly. *Ecology*, 78(4), 987-999.

- Beris, E., & Korkas, E. (2021). Additive and synergistic interactions of entomopathogenic fungi with *Bacillus thuringiensis* for the control of the European grapevine moth *Lobesia botrana* (Denis and Schiffermüller) (Lepidoptera: Tortricidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1). <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00455-w>
- Beris, E., Papachristos, D., Ponchon, M., Caca, D., Kontodimas, D., & Reineke, A. (2024). The effects of temperature on pathogenicity of entomopathogenic fungi for controlling larval populations of the European grapevine moth (*Lobesia botrana*) (Lepidoptera: Tortricidae). *Crop Protection*, 177, 106542. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2023.106542>
- Bernhard, K., Holloway, P. J. and Burges, H. D. (1998). Appendix I: a catalogue of formulation additives: function, nomenclature, properties and suppliers. In “Formulation of Microbial Biopesticides, Beneficial Microorganisms, Nematodes and Seed Treatments” (H. D. Burges, Ed.), pp. 333–365. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Bertin S, Cavalieri V, Graziano C, Bosco D (2010) Survey of mealybug (Hemiptera: Pseudococcidae)vectors of Ampelovirus and Vitivirus in vineyards of northwestern Italy. *Phytoparasitica*38:401–409 doi: 10.1007/s12600-010-0109-5
- Bidochka, M. J., Kamp, A. M., Lavender, T. M., Dekoning, J., & De Croos, J. N. A. (2001). Habitat Association in Two Genetic Groups of the Insect-Pathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*: Uncovering Cryptic Species? *Applied and Environmental Microbiology*, 67(3), 1335–1342. <https://doi.org/10.1128/aem.67.3.1335-1342.2001>
- Bischoff, J. F., Rehner, S. A., & Humber, R. A. (2009). A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101(4), 512–530. <https://doi.org/10.3852/07-202>
- Blackwell, M. (2011). The Fungi: 1, 2, 3 . . . 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98(3), 426–438. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000298>
- Blum, M. & N. D. & C. Y. & G. E. & H. D. & L. I. M. (2018). Predicting *Heliothis* (*Helicoverpa armigera*) pest population dynamics with an age-structured insect population model driven by satellite data. *ideas.repec.org*. <https://ideas.repec.org/a/eee/ecomod/v369y2018icp1-12.html>
- Blümel, S., Eitzinger, J., Gruber, B., Gatterer, M., Altenburger, J., & Hausdorf, H. (2020). Influence of weather variables on the first seasonal occurrence of the grape berry moths *Eupoecilia ambiguella* (Lepidoptera: Tortricidae) and *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) in a case study region in Austria. <https://www.weinobst.at/dam/jcr:3d9d1dd2-dc60-437a-8528-618eaf66b585/115-2020.pdf>
- Bonnefoy, C., Quenol, H., Planchon, O., & Barbeau, G. (2010). Températures et indices bioclimatiques dans le vignoble du Val de Loire dans un contexte de changement climatique. *EchoGéO*, 14. <https://doi.org/10.4000/echogeo.12146>
- Bovey, P. (1966). Super-famille des Tortricoidea. *Entomologie appliquée à l’agriculture*, 2(1), 859-887.

- Braga, G. U., Flint, S. D., Messias, C. L., Anderson, A. J., & Roberts, D. W. (2001). Effects of UVB irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic Hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: a study of reciprocity and recovery. *Photochemistry and photobiology*, 73(2), 140–146. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2001\)073<0140:eouioc>2.0.co;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)073<0140:eouioc>2.0.co;2)
- Braga, G. U., Flint, S. D., Miller, C. D., Anderson, A. J., & Roberts, D. W. (2001c). Both solar UVA and UVB radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photochemistry and photobiology*, 74(5), 734–739. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2001\)074<0734:bsuaur>2.0.co;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)074<0734:bsuaur>2.0.co;2)
- Brenner, R. J., Focks, D. A., Arbogast, R. T., Weaver, D. K., & Shuman, D. (1998). Practical use of spatial analysis in precision targeting for integrated pest management. *American Entomologist*, 44(2), 79-102. doi:10.1093/ae/44.2.79
- Briggs, L. L., Colwell, D. D., & Wall, R. (2006). Control of the cattle louse *Bovicola bovis* with the fungal pathogen *Metarhizium anisopliae*. *Veterinary parasitology*, 142(3-4), 344–349. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.07.018>
- Burges, H. D. (1998). Formulation of mycoinsecticides. In *Formulation of microbial biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments* (pp. 131-185). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Burges, H. D., & Jones, K. A. (1998c). Trends in formulation of microorganisms and future research requirements. In *Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments* (pp. 311-332). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Butt T.M. (2002). Use of entomogenous fungi for the control of insect pests, In: Esser K., and Bennett J.W. (eds.), *Mycota*, Springer, Berlin, pp.111-134
- Butt T.M., Coates CJ, Dubovskiy IM, Ratcliffe NA. (2016). Chapter nine-entomopathogenic fungi: New insights into host-pathogen interactions. *Advances in Genetics*. 94:307-364. DOI: 10.1016/bs.adgen.2016.01.006
- Butt, T. M., Segers, R., Leal, S. C., & Kerry, B. R. (1998). Variation in the subtilisins of fungal pathogens of insects and nematodes.
- Butt, T.M.; Wang, C.; Shah, F.A.; Hall, R. (2006). Degeneration of entomogenous fungi. In: EILENBERG, J.; HOCKKANEN, H.M.T. (Eds.). *An Ecological and societal approach to Biological Control*, p.213-226.
- CABI (2022). *Lobesia botrana* (European grapevine moth). Wallingford, UK: CAB International.
- CABI/EPPO (2012). *Lobesia botrana* (Distribution maps of plant pests). Wallingford, UK: CAB International. Map 70 (2nd revision).
- Caffarra, A., & Donnelly, A. (2011). The ecological significance of phenology in four different tree species: effects of light and temperature on bud burst. *International journal of biometeorology*, 55(5), 711–721. <https://doi.org/10.1007/s00484-010-0386-1>

- Caffarra, A., Rinaldi, M., Eccel, E., Rossi, V., & Pertot, I. (2012). Modelling the impact of climate change on the interaction between grapevine and its pests and pathogens: European grapevine moth and powdery mildew. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 148, 89-101. DOI:10.1016/j.agee.2011.11.017
- Canassa, F., Esteca, F. C. N., Moral, R. A., Meyling, N. V., Klingen, I., & Delalibera, I. (2020). Root inoculation of strawberry with the entomopathogenic fungi *Metarhizium robertsii* and *Beauveria bassiana* reduces incidence of the twospotted spider mite and selected insect pests and plant diseases in the field. *Journal of Pest Science*, 93(1), 261-274. <https://doi.org/10.1007/s10340-019-01147-z>
- Catoni, C., & Schwangart, F. (2009). Die Traubenwickler (*Polychrosis botrana* Schiff. und *Conchyliis ambiguella* Hübn.) und ihre natürlichen Feinde in Südtirol. *Zeitschrift Für Angewandte Entomologie*, 1(2), 248–259. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1914.tb01129.x>
- Charnley, A. (1984). Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi: a speculative review.
<https://www.semanticscholar.org/paper/Physiological-aspects-of-destructive-pathogenesis-a-Charnley/b8fedf313baed2f0fbe0e59d7f15dd7d8c529993>
- Charnley, A. K. (2003). Fungal pathogens of insects: Cuticle degrading enzymes and toxins. In *Advances in botanical research* (pp. 241–321). [https://doi.org/10.1016/s0065-2296\(05\)40006-3](https://doi.org/10.1016/s0065-2296(05)40006-3)
- Chuine, I. (2010). Why does phenology drive species distribution? *Philosophical Transactions - Royal Society. Biological Sciences*, 365(1555), 3149–3160. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0142>
- Cid M, Pereira S, Cabaleiro C, Segura A. (2010). Citrus mealybug (Hemiptera: Pseudococcidae) movement and population dynamics in an arbor-trained vineyard. *J Econ Entomol* 103:619–630 DOI:10.1603/EC09234
- Clancy, K. M., & Price, P. W. (1987). Rapid herbivore growth enhances enemy attack: sublethal plant defenses remain a paradox. *Ecology*, 68(3), 733-737. <https://doi.org/10.2307/1938479>
- Colinet, H., Sinclair, B. J., Vernon, P., & Renault, D. (2015). Insects in fluctuating thermal environments. *Annual Review of Entomology*, 60(1), 123–140. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-021017>.
- Comşa, M., Tomoiagă, L. L., Muntean, M., Ivan, M. M., Orian, S. M., Popescu, D. M., & Chedea, V. S. (2022). The Effects of Climate Change on the Activity of the *Lobesia botrana* and *Eupoecilia ambiguella* Moths on the Grapevine Cultivars from the Târnavă Vineyard. *Sustainability*, 14(21), 14554. <https://doi.org/10.3390/su142114554>
- Corrêa, A. S., Cordeiro, E. M., & Omoto, C. (2019). Agricultural insect hybridization and implications for pest management. *Pest management science*, 75(11), 2857–2864. <https://doi.org/10.1002/ps.5495>

- Cozzi, G., Pascale, M., Perrone, G., Visconti, A., & Logrieco, A. (2006). Effect of *Lobesia botrana* damages on black aspergilli rot and ochratoxin A content in grapes. *International Journal of Food Microbiology*, *111*, S88–S92. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.03.012>
- Da Cunha, J. C. S., Swoboda, M. H., & Sword, G. A. (2022). Olfactometer Responses of Convergent Lady Beetles *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae) to Odor Cues from Aphid-Infested Cotton Plants Treated with Plant-Associated Fungi. *Insects*, *13*(2), 157. <https://doi.org/10.3390/insects13020157>
- Darriet, P., Pons, M., Henry, R., Dumont, O., Findeling, V., Cartolaro, P., Calonnec, A., & Dubourdieu, D. (2002). Impact odorants contributing to the fungus type aroma from grape berries contaminated by powdery mildew (*Uncinula necator*); incidence of enzymatic activities of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of agricultural and food chemistry*, *50*(11), 3277–3282. <https://doi.org/10.1021/jf011527d>
- Dash, C. K., Bamisile, B. S., Keppanan, R., Qasim, M., Lin, Y., Islam, S. U., Hussain, M., & Wang, L. (2018). Endophytic entomopathogenic fungi enhance the growth of *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae) and negatively affect the development and reproduction of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Microbial pathogenesis*, *125*, 385–392. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.09.044>
- Da Silva Pinto, F. G., Fungaro, M. H. P., Ferreira, J. M., Valadares-Inglis, M. C., & Furlaneto, M. C. (2002). Genetic variation in the cuticle-degrading protease activity of the entomopathogen *Metarhizium flavoviride*. *Genetics and Molecular Biology*, *25*(2), 231–234. <https://doi.org/10.1590/s1415-47572002000200018>
- Dean, R., L. Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Pietro, A. D., Spanu, P. D., Rudd J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, *13*(4), 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- De Croos, J. N. A., & Bidochka, M. J. (1999). Effects of low temperature on growth parameters in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Microbiology*, *45*(12), 1055–1061. <https://doi.org/10.1139/w99-098>
- De Faria, M. R., & Wraight, S. P. (2007). Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, *43*(3), 237–256. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.001>
- De Faria, M. R., & Wraight, S. P. (2007b). Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, *43*(3), 237–256. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.001>
- De Hoog GS. (1972). The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. *Studies in Mycology*, *1*:141.

- Delbac, L., Lecharpentier, P., & Thiery, D. (2010). Larval instars determination for the European Grapevine Moth (Lepidoptera: Tortricidae) based on the frequency distribution of head-capsule widths. *Crop Protection*, 29(6), 623–630. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.01.009>
- Delgado, P.A.M.; Murcia-Ordoñez, B. (2011). Hongos entomopatógenos: una alternativa para la obtención de Biopesticidas. *Ambi-Agua*, v.6, p.77-90, 2011. DOI:10.4136/ambi-agua.465
- Denlinger, D. L. (1986). Dormancy in tropical insects. *Annual Review of Entomology*, 31(1), 239–264. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.31.010186.001323>
- DeLucia, E. H., Nability, P. D., Zavala, J. A., & Berenbaum, M. R. (2012). Climate Change: Resetting Plant-Insect interactions. *Plant Physiology*, 160(4), 1677–1685. <https://doi.org/10.1104/pp.112.204750>
- De Sassi, C., & Tylianakis, J. M. (2012). Climate Change Disproportionately Increases Herbivore over Plant or Parasitoid Biomass. *PloS One*, 7(7), e40557. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040557>
- Di Lena, B., Giuliani, D., Zinni, A., & Eccel, E. (2013). A climatic perspective of the presence of the european grapevine moth (*Lobesia Botrana* Den. and Schiff) in.. *ResearchGate*. https://www.researchgate.net/publication/287022561_A_climatic_perspective_of_the_presence_of_the_european_grapevine_moth_Lobesia_Botrana_Den_and_Schiff_in_the_Abruzzo_region_Italy
- Dong, T., Zhang, B., Jiang, Y., & Hu, Q. (2016). Isolation and Classification of Fungal Whitefly Entomopathogens from Soils of Qinghai-Tibet Plateau and Gansu Corridor in China. *PloS One*, 11(5), e0156087. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156087>
- Driver, F., Milner, R. J., & Trueman, J. W. (2000). A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological research*, 104(2), 134-150. <https://doi.org/10.1017/s0953756299001756>
- Ekési, S., Dimbi, S., & Maniana, N. K. (2007). The role of entomopathogenic fungi in the integrated management of fruit flies (Diptera: Tephritidae) with emphasis on species occurring in Africa. https://www.researchgate.net/profile/Nguya-Maniana/publication/297758806_Use_of_Entomopathogenic_Fungi_in_Biological_Pest_Management_2007_ISBN_978-81-308-0192-6_Editors_The_role_of_entomopathogenic_fungi_in_the_integrated_management_of_fruit_flies_Diptera_Tephritidae_with_links/56e2eace08ae1c52fafda86a/Use-of-Entomopathogenic-Fungi-in-Biological-Pest-Management-2007-ISBN-978-81-308-0192-6-Editors-The-role-of-entomopathogenic-fungi-in-the-integrated-management-of-fruit-flies-Diptera-Tephritidae-with.pdf
- Elena, G. J., Beatriz, P. J., Alejandro, P., & Lecuona, R. E. (2011). *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin promotes growth and has endophytic activity in tomato plants. *Adv Biol Res*, 5(1), 22-27.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). (2022). EPPO global database. <https://gd.eppo.int/>

- Evans, H. C., & Shah, P. A. (2002). Taxonomic status of the genera *Sorospora* and *Syngliocladium* associated with grasshoppers and locusts (Orthoptera: Acridoidea) in Africa. *Mycological Research*, 106(6), 737–744. <https://doi.org/10.1017/s0953756202006056>
- Ewing, D., Cobbold, C., Purse, B., Nunn, M., & White, S. (2016). Modelling the effect of temperature on the seasonal population dynamics of temperate mosquitoes. *Journal of Theoretical Biology*, 400, 65–79. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2016.04.008>
- Fang, W., Vega-Rodríguez, J., Ghosh, A. K., Jacobs-Lorena, M., Kang, A., & St Leger, R. J. (2011). Development of transgenic fungi that kill human malaria parasites in mosquitoes. *Science*, 331(6020), 1074–1077. <https://doi.org/10.1126/science.1199115>
- Fargues, J., Goettel, M. S., Smits, N., Ouedraogo, A., Vidal, C., Lacey, L. A., Lomer, C. J., & Rougier, M. (1996). Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. *Mycopathologia*, 135(3), 171–181. <https://doi.org/10.1007/bf00632339>
- Fargues, J., Maniania, N. K., Delmas, J. C., & Smits, N. (1992). Influence of temperature on the in vitro growth of entomopathogenic hyphomycetes. DOI: [10.1051/agro:19920708](https://doi.org/10.1051/agro:19920708)
- Feng, M. G., Poprawski, T. J., & Khachatourians, G. G. (1994). Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Science and Technology*, 4(1), 3–34. <https://doi.org/10.1080/09583159409355309>
- Fernandes, É. K., Rangel, D. E., Moraes, Á. M., Bittencourt, V. R., & Roberts, D. W. (2007). Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96(3), 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.05.007>
- Fraga, H., De Cortázar Aauri, I. G., Malheiro, A. C., & Santos, J. A. (2016). Modelling climate change impacts on viticultural yield, phenology and stress conditions in Europe. *Global Change Biology*, 22(11), 3774–3788. <https://doi.org/10.1111/gcb.13382>
- Fraga, H., Malheiro, A. C., Moutinho-Pereira, J., & Santos, J. A. (2013). Future scenarios for viticultural zoning in Europe: ensemble projections and uncertainties. *International Journal of Biometeorology*, 57(6), 909–925. <https://doi.org/10.1007/s00484-012-0617-8>
- Frances, S., Sweeney, A., & Humber, R. (1989). *Crypticola clavulifera* gen. et sp. nov. and *Lagenidium giganteum*: Oomycetes pathogenic for dipterans infesting leaf axils in an Australian rain forest. *Journal of Invertebrate Pathology*, 54(1), 103–111. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(89\)90146-8](https://doi.org/10.1016/0022-2011(89)90146-8)

- Frolov, A. N. (2010). *Eupoecilia ambiguella* (Hubner): European grape berry moth, Grape berry moth, Grape bud moth, Vine moth, Grape moth. Interactive agricultural ecological atlas of Russia and neighbouring countries: Economic plants and their diseases, pests and weeds.
- Furkaliev, D. G. (1999). Wild grapevines used as phylloxera-resistant rootstocks. *AUSTRALIAN GRAPEGROWER AND WINEMAKER*, 28-31.
- Gadoury, D. M., Cadle-davidson, L., Wilcox, W. F., Dry, I. B., Seem, R. C., & Milgroom, M. G. (2011). Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*): a fascinating system for the study of the biology, ecology and epidemiology of an obligate biotroph. *Molecular Plant Pathology*, 13(1), 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00728.x>
- Gallardo, A., Ocete, R., López, M. A., Maistrello, L., Ortega, F., Semedo, A., & Soria, F. J. (2009). Forecasting the flight activity of *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera, Tortricidae) in Southwestern Spain. *Journal of Applied Entomology*, 133(8), 626–632. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2009.01417.x>
- Gessler, C., Pertot, I., & Perazzolli, M. (2011). *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(1), 3–44. <http://www.jstor.org/stable/26458675>
- Gilioli, G., Pasquali, S., & Marchesini, E. (2016). A modelling framework for pest population dynamics and management: An application to the grape berry moth. *Ecological Modelling*, 320, 348–357. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2015.10.018>
- Gilioli, G., Pasquali, S., Martín, P. R., Carlsson, N., & Mariani, L. (2017). A temperature-dependent physiologically based model for the invasive apple snail *Pomacea canaliculata*. *International Journal of Biometeorology*, 61(11), 1899–1911. <https://doi.org/10.1007/s00484-017-1376-3>
- Gilioli, G., Pasquali, S., Parisi, S., & Winter, S. (2014). Modelling the potential distribution of *Bemisia tabaci* in Europe in light of the climate change scenario. *Pest Management Science*, 70(10), 1611–1623. <https://doi.org/10.1002/ps.3734>
- Gillespie, J. P., Bailey, A. M., Cobb, B., & Vilcinskis, A. (2000). Fungi as elicitors of insect immune responses. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 44(2), 49-68. [https://doi.org/10.1002/1520-6327\(200006\)44:2<49::AID-ARCH1>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1520-6327(200006)44:2<49::AID-ARCH1>3.0.CO;2-F)
- Gilligan, T. M., & Epstein, M. E. (2014). Tortricids of agricultural importance. Interactive Keys developed in Lucid, 3.
- Gilligan, T. M. & M. E. Epstein. (2012). *Eupoecilia ambiguella* datasheet. Tortricids of Agricultural Importance. Accessed January 24, 2014 from: http://idtools.org/id/leps/tortai/Eupoecilia_ambiguella.htm.

Gilligan, T. M., Epstein, M. E., & Passoa, S. C. (2014). Screening aid: European grape berry moth, *Eupoecilia ambiguella* (Hübner). Identification Technology Program (ITP). USDA-APHIS-PPQ-S&T, Fort Collins, CO.

https://idtools.org/id/leps/tortai/Eupoecilia%20ambiguella_LoRes.pdf

González, M. (2010). *Lobesia botrana*: polilla de la uva. *Revista de Enología*, 2, 2-5.

Gross, J., & Gündermann, G. (2016). Principles of IPM in cultivated crops and implementation of innovative strategies for sustainable plant protection. In Springer eBooks (pp. 9–26). https://doi.org/10.1007/978-3-319-31800-4_2

Guerenstein, P. G., & Hildebrand, J. G. (2008). Roles and effects of environmental carbon dioxide in insect life. *Annual Review of Entomology*, 53(1), 161–178. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093402>

Gul, H.T., Saeed, S., Khan, F.Z.A. (2014). Entomopathogenic fungi as effective insect pest management tactic: a review. *Applied Sciences and Business Economics* 1, 10–18.

Gulzar, S., Wakil, W., & Shapiro-Ilan, D. I. (2021). Combined Effect of Entomopathogens against Thrips tabaci Lindeman (Thysanoptera: Thripidae): Laboratory, Greenhouse and Field Trials. *Insects*, 12(5), 456. <https://doi.org/10.3390/insects12050456>

Gutierrez, A. P. (1996). *Applied population ecology: a supply-demand approach*. John Wiley & Sons.

Gutierrez, A. P., & Baumgaertner, J. U. (1984). MULTITROPHIC MODELS OF PREDATOR–PREY ENERGETICS: II. A REALISTIC MODEL OF PLANT–HERBIVORE–PARASITOID–PREDATOR INTERACTIONS. the Canadian Entomologist/*Canadian Entomologist*, 116(7), 933–949. <https://doi.org/10.4039/ent116933-7>

Gutierrez, A. P., Ponti, L., Cooper, M. L., Gilioli, G., Baumgärtner, J., & Duso, C. (2012). Prospective analysis of the invasive potential of the European grapevine moth *Lobesia botrana* (Den. & Schiff.) in California. *Agricultural and Forest Entomology*, 14(3), 225–238. <https://doi.org/10.1111/j.1461-9563.2011.00566.x>

Gutierrez, A. P., Ponti, L., Gilioli, G., & Baumgärtner, J. (2017). Climate warming effects on grape and grapevine moth (*Lobesia botrana*) in the Palearctic region. *Agricultural and Forest Entomology*, 20(2), 255–271. <https://doi.org/10.1111/afe.12256>

Hamiduzzaman, M. M., Sinia, A., Guzman-Novoa, E., & Goodwin, P. H. (2012). Entomopathogenic fungi as potential biocontrol agents of the ecto-parasitic mite, *Varroa destructor*, and their effect on the immune response of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Invertebrate Pathology*, 111(3), 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.09.001>

Harari, A. R., Zahavi, T., Gordon, D., Anshelevich, L., Harel, M., Ovadia, S., & Dunkelblum, E. (2007). Pest management programmes in vineyards using male mating disruption. *Pest Management Science*, 63(8), 769–775. <https://doi.org/10.1002/ps.1365>

- Hawksworth, D. L., & Rossman, A. Y. (1997). Where are all the undescribed fungi? *Phytopathology*, 87(9), 888–891. <https://doi.org/10.1094/phyto.1997.87.9.888>
- Hendrichs, J., Ortiz, G., Liedo, P., & Schwarz, A. (1983). Six years of successful medfly program in Mexico and Guatemala. *Fruit Flies of Economic Importance*. AA Balkema, Rotterdam, The Netherlands, 353, 365.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lücking, R., Lumbsch, H. T., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., . . . Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111(5), 509–547. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.004>
- Hokkanen, H. M. T., & Menzler-Hokkanen, I. (2017). Use of entomopathogenic fungi in the insect pest management of Brassica oilseed crops. In *CABI eBooks* (pp. 373–382). <https://doi.org/10.1079/9781780648200.0373>
- Holder, D. J., Kirkland, B. H., Lewis, M. W., & Keyhani, N. O. (2007). Surface characteristics of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana*. *Microbiology*, 153(10), 3448–3457. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/008524-0>
- Holder, D. J., & Keyhani, N. O. (2005). Adhesion of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to Substrata. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5260–5266. <https://doi.org/10.1128/aem.71.9.5260-5266.2005>
- Hu, G., & St Leger, R. J. (2002). Field Studies Using a Recombinant Mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) Reveal that It Is Rhizosphere Competent. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 6383–6387. <https://doi.org/10.1128/aem.68.12.6383-6387.2002>
- Hufnagel, L., & Kocsis, M. (2011). Impacts of climate change on Lepidoptera species and communities. *Applied Ecology and Environmental Research*, 9(1), 43-72.
- Hughes, D., Araújo, J., Loreto, R., Quevillon, L., De Bekker, C., & Evans, H. (2015). From So Simple a Beginning: The Evolution of Behavioral Manipulation by Fungi. *Advances in Genetics*, 94, 437-469. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2016.01.004>
- Hussey NW, Tinsley TW. (1981). Impressions of insect pathology in the People's Republic of China. In: Burges HD, editor. *Microbial control of pests and plant diseases 1970 1980*. London: Academic Press. pp 785795.
- Ibrahim, R. a. E. A. (2004). Biological control of grape berry moths *Eupoecilia ambiguella* Hb. and *Lobesia botrana* Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae) by using egg parasitoids of the genus *Trichogramma*. <https://jpubub.uni-giessen.de/items/85a1c5c7-775c-4b95-b8bc-23628d6ec54a>
- Ignoffo, C. M. (1973). EFFECTS OF ENTOMOPATHOGENS ON VERTEBRATES. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 217(1), 141–164. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1973.tb32756.x>

- Iida, Y., Higashi, Y., Nishi, O., Kouda, M., Maeda, K., Yoshida, K., Asano, S., Kawakami, T., Nakajima, K., Kuroda, K., Tanaka, C., Sasaki, A., Kamiya, K., Yamagishi, N., Fujinaga, M., Terami, F., Yamanaka, S., & Kubota, M. (2023). Entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*-based bioinsecticide suppresses severity of powdery mildews of vegetables by inducing the plant defense responses. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1211825>
- Iltis, C., Moreau, J., Gamb, G., Manière, C., Boidin-Wichlacz, C., Tasiemski, A., ... Louâpre, P. (2021). Day/night variations of feeding and immune activities in larvae of the European grapevine moth, *Lobesia botrana*. *Entomologia Generalis*, 41(6), 601–614. <https://doi.org/10.1127/entomologia/2021/1208>
- Inglis, G. D., Goettel, M. S., Butt, T. M., & Strasser, H. (2001). Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In CABI Publishing eBooks (pp. 23–69). <https://doi.org/10.1079/9780851993560.0023>
- Ioriatti, C., Anfora, G., Bagnoli, B., Benelli, G., & Lucchi, A. (2023). A review of history and geographical distribution of grapevine moths in Italian vineyards in light of climate change: Looking backward to face the future. *Crop Protection*, 173, 106375. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2023.106375>
- Ioriatti, C., Lucchi, A., & Varela, L. G. (2012). Grape Berry Moths in Western European Vineyards and Their Recent Movement into the New World. In Springer eBooks (pp. 339–359). https://doi.org/10.1007/978-94-007-4032-7_14
- Islam, W., Adnan, M., Shabbir, A., Naveed, H., Abubakar, Y. S., Qasim, M., Tayyab, M., Noman, A., Nisar, M. S., Khan, K. A., & Ali, H. (2021). Insect-fungal-interactions: A detailed review on entomopathogenic fungi pathogenicity to combat insect pests. *Microbial Pathogenesis*, 159, 105122. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105122>
- Jaber, L. R., & Enkerli, J. (2016). Effect of seed treatment duration on growth and colonization of *Vicia faba* by endophytic *Beauveria bassiana* and *Metarhizium brunneum*. *Biological Control*, 103, 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.09.008>
- Jaber, L. R., & Ownley, B. H. (2018). Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? *Biological Control*, 116, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.01.018>
- Jackson, M. A., & Jaronski, S. T. (2009). Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. *Mycological Research*, 113(8), 842–850. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.03.004>
- Jarvis, W. R. (1962). The infection of strawberry and raspberry fruits by *Botrytis cinerea* Fr. *Annals of Applied Biology/Annals of Applied Biology*, 50(3), 569–575. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1962.tb06049.x>
- Jermini, M., Blaise, P., & Gessler, C. (2010). Quantification of the influence of the downy mildew (*Plasmopara viticola*) epidemics on the compensatory capacities of *Vitis vinifera* “Merlot” to limit the qualitative yield damage. *Vitis*, 49(4), 153–160.

- Jiang, Y., & Wang, J. (2023). The registration situation and use of mycopesticides in the world. *Journal of Fungi*, 9(9), 940. <https://doi.org/10.3390/jof9090940>
- Jones, G.V., Davis, R.E. (2000). Climate influences on grapevine phenology, grape composition, and wine production and quality for Bordeaux, France. *Am. J. Enol. Vitic.* 51, 249–261. DOI: 10.5344/ajev.2000.51.3.249
- Jones, K. A. (1998). Spray application criteria. *Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial Microorganisms, Nematodes, and Seed Treatments*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic, 367-375.
- Jones, K. A., & Burges, H. D. (1998). Technology of formulation and application. In *Springer eBooks* (pp. 7–30). https://doi.org/10.1007/978-94-011-4926-6_2
- Kabaluk, J. T., & Ericsson, J. D. (2007). *Metarhizium anisopliae* Seed Treatment Increases Yield of Field Corn When Applied for Wireworm Control. *Agronomy Journal*, 99(5), 1377–1381. <https://doi.org/10.2134/agronj2007.0017n>
- Kamp, A., & Bidochka, M. (2002). Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Letters in Applied Microbiology*, 35(1), 74–77. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2002.01128.x>
- Kenis, M., Benelli, G., Biondi, A., Calatayud, P.A., Day, R., Desneux, N., ... & Wu, K. (2022). Invasiveness, biology, ecology, and management of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Entomologia Generalis*, 1-55. DOI <https://doi.org/10.1127/entomologia/2022/1659>
- Khachatourians, G. G., and Qazi, S. S. (2008). “Entomopathogenic fungi: biochemistry and molecular biology,” in *Human and Animal Relationships*. eds. A. A. Brakhage and P. F. Zipfel (Berlin, Heidelberg: Springer), 33–61.
- Kim, J. J., Goettel, M. S., & Gillespie, D. R. (2008). Evaluation of *Lecanicillium longisporum*, Vertalec® for simultaneous suppression of cotton aphid, *Aphis gossypii*, and cucumber powdery mildew, *Sphaerotheca fuliginea*, on potted cucumbers. *Biological Control*, 45(3), 404–409. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.02.003>
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C., & Stalpers, J. A. (2001). *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20013144931>
- Klieber, J., & Reineke, A. (2016). The entomopathogen *Beauveria bassiana* has epiphytic and endophytic activity against the tomato leaf miner *Tuta absoluta*. *Journal of Applied Entomology*, 140(8), 580–589. <https://doi.org/10.1111/jen.12287>
- Kliot, A., Kontsedalov, S., Lebedev, G., & Ghanim, M. (2016). Advances in whiteflies and thrips management. In *Springer eBooks* (pp. 205–218). https://doi.org/10.1007/978-3-319-31800-4_11
- Kos, A. (2001). RUNNER-a new ROHM and HAAS insecticide from the group MAC for the control of broad range of Lepidoptera pests.
- Kützing, F. T. (1849). *Species Algarum.-Lipsiae*, Brockhaus 1849. FA Brockhaus.

- Kumar, M., Saxena, R., & Tomar, R. S. (2017). Endophytic microorganisms: Promising candidate as biofertilizer. In *Microorganisms for sustainability* (pp. 77–85). https://doi.org/10.1007/978-981-10-6241-4_4
- Lacey, L., Frutos, R., Kaya, H., & Vail, P. (2001). Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? *Biological Control*, 21(3), 230–248. <https://doi.org/10.1006/bcon.2001.0938>
- Lacey, L. A., & Shapiro-Ilan, D. I. (2008). Microbial Control of Insect Pests in Temperate Orchard Systems: Potential for Incorporation into IPM. *Annual Review of Entomology*, 53(1), 121–144. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093419>
- Liao, X., O'Brien, T. R., Fang, W., & St Leger, R. J. (2014). The plant beneficial effects of *Metarhizium* species correlate with their association with roots. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(16), 7089–7096. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5788-2>
- Litwin, A., Nowak, M., & Różalska, S. (2020). Entomopathogenic fungi: unconventional applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology/Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 19(1), 23–42. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09525-1>
- Lomer, C. J., Bateman, R. P., Johnson, D. L., Langewald, J., & Thomas, M. (2001). BIOLOGICAL CONTROL OF LOCUSTS AND GRASSHOPPERS. *Annual Review of Entomology*, 46(1), 667–702. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.46.1.667>
- Lu, H., & St Leger, R. (2016). Insect immunity to entomopathogenic fungi. In *Advances in genetics* (pp. 251–285). <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.11.002>
- Lucchi, A. (2017). *Note di Entomologia Viticola*. Pisa University Press - Torrossa. <https://www.torrossa.com/it/resources/an/4410647>
- Lucchi, A., & Benelli, G. (2018). Towards pesticide-free farming? Sharing needs and knowledge promotes Integrated Pest Management. *Environmental Science and Pollution Research International*, 25(14), 13439–13445. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1919-0>
- Lunardoni, A. (1889). *Gli insetti nocivi alla vite: loro vita, danni e modi per combatterli*. Botta, eredi.
- Maher, N., & Thiéry, D. (2006). *Daphne gnidium*, a possible native host plant of the European grapevine moth *Lobesia botrana*, stimulates its oviposition. Is a host shift relevant? *Chemoecology*, 16(3), 135–144. <https://doi.org/10.1007/s00049-006-0339-7>

- Maleki, F. M., Iranipour, S., Hejazi, M. J., & Saber, M. (2016). Temperature-dependent age-specific demography of grapevine moth (*Lobesia botrana*) (Lepidoptera: Tortricidae): jackknife vs. bootstrap techniques. *Archives of Phytopathology and Plant Protection/Archiv Für Phytopathologie Und Pflanzenschutz*, 49(11–12), 263–280. <https://doi.org/10.1080/03235408.2016.1140566>
- Mantzoukas, S., Chondrogiannis, C., & Grammatikopoulos, G. (2014). Effects of three endophytic entomopathogens on sweet sorghum and on the larvae of the stalk borer *Sesamia nonagrioides*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 154(1), 78–87. <https://doi.org/10.1111/eea.12262>
- Marcelin, H. (1985). Control of grape tortricids.
- Marini, G., Poletti, P., Giacobini, M., Pugliese, A., Merler, S., & Rosà, R. (2016). The Role of Climatic and Density Dependent Factors in Shaping Mosquito Population Dynamics: The Case of *Culex pipiens* in Northwestern Italy. *PloS One*, 11(4), e0154018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154018>
- Markheiser, A., Rid, M., Biancu, S., Gross, J., & Hoffmann, C. (2017). Physical factors influencing the oviposition behaviour of European grapevine moths *Lobesia botrana* and *Eupoecilia ambiguella*. *Journal of Applied Entomology*, 142(1–2), 201–210. <https://doi.org/10.1111/jen.12423>
- Martín-Vertedor, D., Ferrero-García, J. J., & Torres-Vila, L. M. (2010). Global warming affects phenology and voltinism of *Lobesia botrana* in Spain. *Agricultural and Forest Entomology*, 12(2), 169–176. <https://doi.org/10.1111/j.1461-9563.2009.00465.x>
- Martinez-Ferrer, M. T., Campos, J. M., & Fibla, J. M. (2011). Field efficacy of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) mass trapping technique on clementine groves in Spain. *Journal of Applied Entomology*, 136(3), 181–190. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2011.01628.x>
- Masaki, S. (1978). Seasonal and latitudinal adaptations in the life cycles of crickets. In *Proceedings in life sciences* (pp. 72–100). https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6941-1_4
- Mascarin, G. M., & Jaronski, S. T. (2016). The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology & Biotechnology Incorporating the MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology/World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 32(11). <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2131-3>
- Mascarin, G. M., Kobori, N. N., De Jesus Vital, R. C., Jackson, M. A., & Quintela, E. D. (2013). Production of microsclerotia by Brazilian strains of *Metarhizium* spp. using submerged liquid culture fermentation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology Incorporating the MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology/World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 30(5), 1583–1590. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1581-0>
- Mascarin, G. M., Lopes, R. B., Delalibera, Í., Fernandes, É. K. K., Luz, C., & Faria, M. (2019). Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology*, 165, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.01.001>

- Mazza, G., Francardi, V., Simoni, S., Benvenuti, C., Cervo, R., Faleiro, J. R., Llácer, E., Longo, S., Nannelli, R., Tarasco, E., & Roversi, P. F. (2014). An overview on the natural enemies of *Rhynchophorus palm weevils*, with focus on *R. ferrugineus*. *Biological Control*, 77, 83–92.
- <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.06.010>
- McCormick, A. C., Reinecke, A., Gershenson, J., & Unsicker, S. B. (2016). Feeding experience affects the behavioral response of polyphagous gypsy moth caterpillars to herbivore-induced poplar volatiles. *Journal of Chemical Ecology*, 42(5), 382–393. <https://doi.org/10.1007/s10886-016-0698-7>
- McKenzie HL (1967) Mealybugs of California with taxonomy, biology and control of North American species. University of California Press, Berkeley
- McCoy, C. W., Samson, R. A. and Boucias, D.G. (1988). Entomogenous fungi. In *Handbook of Natural Pesticides*, Boca, Raton, Fla: Mr ic Press. Microbial Insecticides, Part A, Entomogenous Protozoa and Fungi, C. M. Ignoffo and N. B. Mandava, eds. Vol. 5.
- McNeil, Donald G. Jr., Fungus Fatal to Mosquito May Aid Global War on Malaria, *The New York Times*, 10 June 2005 https://www.thereadgroup.net/wp-content/uploads/New_York_Times.pdf
- Metschnikoff, E. (1879). *Maladies des hannetons ble*. *Zapiski imperatorskogo obshchestva sel'ska Khozyaistra yuzhnoi rossii*, 17-50.
- Metchnikoff, E. (1880). *Zur lehre über Insektenkrankheiten*. *Zool. Anz*, 3, 44-47.
- Metz, J. A., & Diekmann, O. (Eds.). (2014). *The dynamics of physiologically structured populations* (Vol. 68). Springer.
- Middleton, M. C. (2011). *Locating the geographic origin of Lobesia botrana (Lepidoptera: Tortricidae): a recent invasive pest to the Americas*. PhD Thesis, California State University, Fresno.
- Milonas, P. G., Savopoulou-Soultani, M., & Stavridis, D. G. (2001). Day-degree models for predicting the generation time and flight activity of local populations of *Lobesia botrana* (Den. & Schiff.) (Lep., Tortricidae) in Greece. *Journal of Applied Entomology*, 125(9–10), 515–518. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0418.2001.00594.x>
- Mirică, I. I., & Mirică, A. I. (1986). *Protectia vitei de vie impotriva bolilor si daunatorilor*. <https://agris.fao.org/search/en/providers/123819/records/6473644553aa8c89630c153c>
- Molet, T., & Mackesy, D. (2010). CPHST pest datasheet for *Eupoecilia ambiguella*. USDA-APHIS-PPQ-CPHST. Revised November 2014. <http://download.ceris.purdue.edu/file/2592>.
- Mora, M. a. E., Castilho, A. M. C., & Fraga, M. E. (2018b). Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. *Arquivos Do Instituto Biológico/Arquivos Do Instituto Biológico*, 84(0). <https://doi.org/10.1590/1808-1657000552015>

- Moore, D., & Caudwell, R. (1997). FORMULATION OF ENTOMOPATHOGENS FOR THE CONTROL OF GRASSHOPPERS AND LOCUSTS. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 129(S171), 49–67. <https://doi.org/10.4039/entm129171049-1>
- Moreau, J., Rahme, J., Benrey, B., & Thiery, D. (2007). Larval host plant origin modifies the adult oviposition preference of the female European grapevine moth *Lobesia botrana*. *Naturwissenschaften*, 95(4), 317–324. <https://doi.org/10.1007/s00114-007-0332-1>
- Moriondo, M., & Leolini, L. (2015). Impacts of Extreme Events on Grapevine: Experimental and Modelling Activities. *Modextreme Agriculture facing extreme climatic events*, September, 10.
- Moschos, T. (2006). Yield loss quantification and economic injury level estimation for the carpophagous generations of the European grapevine moth *Lobesia botrana* Den. et Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae). *International Journal of Pest Management*, 52(2), 141–147. <https://doi.org/10.1080/09670870600639179>
- Muller, K., Thiéry, D., Moret, Y., & Moreau, J. (2015b). Male larval nutrition affects adult reproductive success in wild European grapevine moth (*Lobesia botrana*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 69(1), 39–47. <https://doi.org/10.1007/s00265-014-1815-7>
- Muniz, E. R., Ribeiro-Silva, C. S., Arruda, W., Keyhani, N. O., & Fernandes, É. K. K. (2021). The Msn2 Transcription Factor Regulates Acaricidal Virulence in the Fungal Pathogen *Beauveria bassiana*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.690731>
- Murray, M. (2008). *Using degree days to time treatments for insect pests*. DigitalCommons@USU. https://digitalcommons.usu.edu/extension_curall/978/
- Nishi, O., Sushida, H., Higashi, Y., & Iida, Y. (2020). Epiphytic and endophytic colonisation of tomato plants by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* strain GHA. *Mycology*, 12(1), 39–47. <https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1707723>
- Ortiz-Urquiza, A., & Keyhani, N. O. (2013). Action on the Surface: Entomopathogenic Fungi versus the Insect Cuticle. *Insects*, 4(3), 357–374. <https://doi.org/10.3390/insects4030357>
- Ortiz-Urquiza, A., & Keyhani, N. O. (2014). Stress response signaling and virulence: insights from entomopathogenic fungi. *Current Genetics*, 61(3), 239–249. <https://doi.org/10.1007/s00294-014-0439-9>
- Ortiz-Urquiza, A., Luo, Z., & Keyhani, N. O. (2014). Improving mycoinsecticides for insect biological control. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(3), 1057–1068. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6270-x>
- Ovruski, S. M., Schliserman, P., & Aluja, M. (2004). Indigenous parasitoids (Hymenoptera) attacking *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in native and exotic host plants in Northwestern Argentina. *Biological Control*, 29(1), 43–57. [https://doi.org/10.1016/s1049-9644\(03\)00127-0](https://doi.org/10.1016/s1049-9644(03)00127-0)

- Ownley, B. H., Griffin, M. R., Klingeman, W. E., Gwinn, K. D., Moulton, J. K., & Pereira, R. M. (2008). *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(3), 267–270. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.01.010>
- Ownley, B. H., Gwinn, K. D., & Vega, F. E. (2009). Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl*, 55(1), 113–128. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9241-x>
- Parmesan, C., Ryrholm, N., Stefanescu, C., Hill, J. K., Thomas, C. D., Descimon, H., Huntley, B., Kaila, L., Kullberg, J., Tammaru, T., Tennent, W. J., Thomas, J. A., & Warren, M. (1999). Poleward shifts in geographical ranges of butterfly species associated with regional warming. *Nature*, 399(6736), 579–583. <https://doi.org/10.1038/21181>
- Pasquali, S., Mariani, L., Calvitti, M., Moretti, R., Ponti, L., Chiari, M., Sperandio, G., & Gilioli, G. (2020). Development and calibration of a model for the potential establishment and impact of *Aedes albopictus* in Europe. *Acta Tropica*, 202, 105228. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105228>
- Patel, T. K. (2020). *Metarhizium*. In Elsevier eBooks (pp. 593–610). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-823414-3.00029-0>
- Pavan, F., Zandigiaco, P., & Dalla Monta, L. (2006). Influence of the grape-growing area on the phenology of *Lobesia botrana* second generation. *Bulletin of Insectology*, 59(2), 105.
- Pedrini, N., Ortiz-Urquiza, A., Huarte-Bonnet, C., Zhang, S., & Keyhani, N. O. (2013). Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction. *Frontiers in Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00024>
- Prior, C. (1992). Discovery and characterization of fungal pathogens for locust and grasshopper control. In *Biological control of locusts and grasshoppers: proceedings of a workshop held at the International Institute of Tropical Agriculture, Cotonou, Republic of Benin, 29 April-1 May 1991*. (pp. 159-180). CAB International.
- Pocasangre, L., Sikora, R. A., Vilich, V., & Schuster, R. P. (2000). Survey of banana endophytic fungi from central America and screening for biological control of the burrowing nematode (*Radopholus similis*).
- Posada, F., & Vega, F. E. (2005). Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*). *Mycologia*, 97(6), 1195–1200. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832729>
- Powell, K. S. (2008). Grape phylloxera: an overview. In *CABI eBooks* (pp. 96–114). <https://doi.org/10.1079/9781845934613.0096>

- Price, P. W., Bouton, C. E., Gross, P., McPheron, B. A., Thompson, J. N., & Weis, A. E. (1980). Interactions among three trophic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 11(1), 41–65.
<https://doi.org/10.1146/annurev.es.11.110180.000353>
- Pullin, A. S. (1986). Effect of photoperiod and temperature on the life-cycle of different populations of the peacock butterfly *Inachis io*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 41(3), 237–242. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1986.tb00534.x>
- Quesada-Moraga, E., López-Díaz, C., & Landa, B. B. (2014). The Hidden Habit of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*: First Demonstration of Vertical Plant Transmission. *PloS One*, 9(2), e89278.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089278>
- Rank, A., Ramos, R. S., Da Silva, R. S., Soares, J. R. S., Picanço, M. C., & Fidelis, E. G. (2020). Risk of the introduction of *Lobesia botrana* in suitable areas for *Vitis vinifera*. *Journal of Pest Science*, 93(4), 1167–1179.
<https://doi.org/10.1007/s10340-020-01246-2>
- Rath, A., Carr, C., & Graham, B. (1995). Characterization of *Metarhizium anisopliae* Strains by Carbohydrate Utilization (API50CH). *Journal of Invertebrate Pathology*, 65(2), 152–161. <https://doi.org/10.1006/jipa.1995.1023>
- Rangel, D. E., Braga, G. U., Anderson, A. J., & Roberts, D. W. (2005). Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 88(2), 116–125.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.11.007>
- Rangel, D. E. N., Braga, G. U. L., Fernandes, É. K. K., Keyser, C. A., Hallsworth, J. E., & Roberts, D. W. (2015). Stress tolerance and virulence of insect-pathogenic fungi are determined by environmental conditions during conidial formation. *Current Genetics*, 61(3), 383–404. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0477-y>
- Régnière, J. (2009). Predicting insect continental distributions from species physiology. *Unasylva*, 60(231), 37-42.
- Reineke, A., Pozzebon, A., Herczynski, O., & Duso, C. (2021). Insights in genetic diversity of German and Italian grape berry moth (*Eupoecilia ambiguella*) populations using novel microsatellite markers. *Scientific Reports*, 11(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-83855-0>
- Reineke, A., & Thiéry, D. (2016). Grapevine insect pests and their natural enemies in the age of global warming. *Journal of Pest Science*, 89(2), 313–328.
<https://doi.org/10.1007/s10340-016-0761-8>
- Renwick, A., Campbell, R., & Coe, S. (1991). Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Pathology*, 40(4), 524–532. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1991.tb02415.x>

- Ricciardi, R., Benelli, G., Di Giovanni, F., & Lucchi, A. (2024). The European grape berry moth, *Eupoecilia ambiguella* (Lepidoptera: Tortricidae): Current knowledge and management challenges. *Crop Protection*, 180, 106641. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2024.106641>
- Roberts, D.W., Humber, R.A. (1981). Entomogenous fungi. In: Cole, G.T., Kendrick, W.B. (Eds), vol. 2. Academic Press, New York, pp 201-236.
- Roberts, D. W., & St. Leger, R. J. (2003). *Metarhizium* spp., Cosmopolitan Insect-Pathogenic Fungi: Mycological Aspects. *Advances in Applied Microbiology*, 54, 1-70. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(04\)54001-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(04)54001-7)
- Robertson, G., Hirst, M., Bainbridge, M., Bilenky, M., Zhao, Y., Zeng, T., Euskirchen, G., Bernier, B., Varhol, R., Delaney, A., Thiessen, N., Griffith, O. L., He, A., Marra, M., Snyder, M., & Jones, S. (2007). Genome-wide profiles of STAT1 DNA association using chromatin immunoprecipitation and massively parallel sequencing. *Nature Methods*, 4(8), 651–657. <https://doi.org/10.1038/nmeth1068>
- Roddam, L. F., & Rath, A. C. (1997). Isolation and characterization of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* from subantarctic Macquarie Island.
- Roditakis, N. E., & Karandinos, M. G. (2001). Effects of photoperiod and temperature on pupal diapause induction of grape berry moth *Lobesia botrana*. *Physiological Entomology*, 26(4), 329–340. <https://doi.org/10.1046/j.0307-6962.2001.00253.x>
- Roehrich, R., & Boller, E. (1991). Tortricids in vineyards. <https://hal.science/hal-02847425/>
- Romo, C. M., & Tylanakis, J. M. (2013). Elevated temperature and drought interact to reduce parasitoid effectiveness in suppressing hosts. *PloS One*, 8(3), e58136. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058136>
- Roques, A., Kenis, M., Lees, D., Lopez-Vaamonde, C., Rabitsch, W., Rasplus, J. Y., & Roy, D. B. (2010). Alien terrestrial arthropods of Europe. *BIORISK-Biodiversity and Ecosystem Risk Assessment*, (4).
- Roques, A., Rousset, J., Avcı, M., Avtız, D. N., Basso, A., Battisti, A., Jamaa, M. L. B., Bensidi, A., Berardi, L., Berretima, W., Branco, M., Chakali, G., Çota, E., Dautbašić, M., Delb, H., Fels, M. a. E. a. E., Mercht, S. E., Mokhefi, M. E., Forster, B., . . . Robinet, C. (2014). Climate Warming and Past and Present Distribution of the Processionary Moths (*Thaumetopoea* spp.) in Europe, Asia Minor and North Africa. In Springer eBooks (pp. 81–161). https://doi.org/10.1007/978-94-017-9340-7_3
- Rossini, L., Speranza, S., & Contarini, M. (2020). Distributed Delay Model and Von Foerster's equation: Different points of view to describe insects' life cycles with chronological age and physiological time. *Ecological Informatics*, 59, 101117. <https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2020.101117>
- Rossini, M. N., Dummel, D. M., & Agostini, J. P. (2015b). Plagas cuarentenarias de frutales de la República Argentina: avances en los resultados. <https://repositorio.inta.gob.ar/handle/20.500.12123/517>

- Ryan, M., Bridge, P., Smith, D., & Jeffries, P. (2002). Phenotypic degeneration occurs during sector formation in *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Applied Microbiology*, 93(1), 163–168. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01682.x>
- Santos, J. A., Fraga, H., Malheiro, A. C., Moutinho-Pereira, J., Dinis, L., Correia, C., Moriondo, M., Leolini, L., Dibari, C., Costafreda-Aumedes, S., Kartschall, T., Menz, C., Molitor, D., Junk, J., Beyer, M., & Schultz, H. R. (2020). A review of the potential climate change impacts and adaptation options for European viticulture. *Applied Sciences*, 10(9), 3092. <https://doi.org/10.3390/app10093092>
- Santos, J., Malheiro, A., Pinto, J., & Jones, G. (2012). Macroclimate and viticultural zoning in Europe: observed trends and atmospheric forcing. *Climate Research*, 51(1), 89–103. <https://doi.org/10.3354/cr01056>
- Sasan, R. K., & Bidochka, M. J. (2012). The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *American Journal of Botany*, 99(1), 101–107. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100136>
- Scaramozzino, P. L., Loni, A., & Lucchi, A. (2017). A review of insect parasitoids associated with *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller, 1775) in Italy. 1. Diptera Tachinidae and Hymenoptera Braconidae (Lepidoptera, Tortricidae). *ZooKeys*, 647, 67–100. <https://doi.org/10.3897/zookeys.647.11098>
- Schmidt, K., Hoppmann, D., Holst, H., & Berkelmann-Löhnertz, B. (2003). Identifying weather-related covariates controlling grape berry moth dynamics*. *Bulletin OEPP*, 33(3), 517–524. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2003.00688.x>
- Schmitz, V., Roehrich, R., & Stockel, J. (1996). Dispersal of marked and released adults of *Lobesia botrana* in an isolated vineyard and the effect of synthetic sex pheromone on their movements. DOI:10.20870/oeno-one.1996.30.2.1110
- Scholte, E., Knols, B. G., Samson, R. A., & Takken, W. (2004). Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. *Journal of Insect Science*, 4(1). <https://doi.org/10.1093/jis/4.1.19>
- Schmieder-Wenzel, C., & Schruft, G. (1990). Courtship behaviour of the European Grape Berry Moth, *Eupoecilia ambiguella* Hb. (Lep., Tortricidae) in regard to pheromonal and tactile stimuli. *Journal of Applied Entomology*, 109(1–5), 341–346. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1990.tb00062.x>
- Schmitz V, Roehrich R, Stockel J. Dispersal of marked and released adults of *Lobesia botrana* in an isolated vineyard and the effect of synthetic sex pheromone on their movements. *J Int Sci Vigne Vin*. 1996;30: 67-72. DOI:10.20870/oeno-one.1996.30.2.1110
- Schulze-Lefert, P., & Vogel, J. (2000). Closing the ranks to attack by powdery mildew. *Trends in Plant Science*, 5(8), 343–348. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(00\)01683-6](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(00)01683-6)
- Schweinitz LD. (1837). In: *Synopsis Fungorum Am. Boreal*. 2663, no. 25.

- Sciarretta, A., & Trematerra, P. (2014). Geostatistical tools for the study of insect spatial distribution: practical implications in the integrated management of orchard and vineyard pests. *Plant Protection Science*, 50(2), 97–110. <https://doi.org/10.17221/40/2013-pps>
- Sentenac, G. (2011). *La Faune Auxiliaire Des Vignobles de France: Dans Le Secret de la Relation Homme/cheval-1e Edition*. Editions France Agricole.
- Sforza, R., Boudon-Padieu, E., & Greif, C. (2003). New Mealybug Species Vectoring Grapevine Leafroll-Associated Viruses-1 and -3 (GLRaV-1 and -3). *European Journal of Plant Pathology*, 109(9), 975–981. <https://doi.org/10.1023/b:ejpp.0000003750.34458.71>
- Shah, P. A., & Pell, J. K. (2003). Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(5–6), 413–423. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1240-8>
- Silva-Moreno, E., & Tapia, E. (2020). Plaguicidas microbianos para el manejo integrado de *Lobesia botrana* en vides.
- Simmons, G. S., Varela, L., Daugherty, M., Cooper, M., Lance, D., Mastro, V., ... Johnson, R. (2021a). Area-wide eradication of the invasive European grapevine moth, *Lobesia botrana* in California, USA. In J. Hendrichs, R. Pereira, & M. J. B. Vreysen (Eds.), *Area-wide integrated pest management. Development and field application* (pp. 581–596). Boca Raton: CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003169239-3>
- Sinno, M., Ranesi, M., Di Lelio, I., Iacomino, G., Becchimanzi, A., Barra, E., Molisso, D., Pennacchio, F., Digilio, M. C., Vitale, S., Turrà, D., Harizanova, V., Lorito, M., & Woo, S. L. (2021). Selection of Endophytic *Beauveria bassiana* as a Dual Biocontrol Agent of Tomato Pathogens and Pests. *Pathogens*, 10(10), 1242. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101242>
- Sinha, K. K., Choudhary, A. K., & Kumari, P. (2016). Entomopathogenic fungi. In Elsevier eBooks (pp. 475–505). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803265-7.00015-4>
- Smaghe, F., Spooner-Hart, R., Chen, Z., & Donovan-Mak, M. (2023). Biological control of arthropod pests in protected cropping by employing entomopathogens: Efficiency, production and safety. *Biological Control*, 186, 105337. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105337>
- Small, C. N., & Bidochka, M. J. (2005). Up-regulation of Pr1, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*, 109(3), 307–313. <https://doi.org/10.1017/s0953756204001856>
- Song, Z. (2018). Fungal microsclerotia development: essential prerequisites, influencing factors, and molecular mechanism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(23), 9873–9880. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9400-Z>

- Steiger, D. (2007) Global economic importance of Botrytis protection. In: Book of Abstracts, 14th International Botrytis Symposium, Cape Town, South Africa, 21–26 October 2007 (P. Fourie and M. Vivier, eds.), Cape Town, South Africa: AFRICAN SUN MeDIA Pty (Ltd.)
- Stellwaag, F. (1927). Die Weinbauinsekten der Kulturländer: Lehr-und Handbuch. P. Parey.
- St Leger, R., May, B., Allee, L., Frank, D., Staples, R., & Roberts, D. (1992a). Genetic differences in allozymes and in formation of infection structures among isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 60(1), 89–101. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(92\)90159-2](https://doi.org/10.1016/0022-2011(92)90159-2)
- St Leger, R. J., Staples, R. C., & Roberts, D. W. (1992b). Cloning and regulatory analysis of starvation-stress gene, *ssgA*, encoding a hydrophobin-like protein from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Gene*, 120(1), 119–124. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90019-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90019-1)
- St Leger, R. J., Staples, R. C., & Roberts, D. W. (1993). Entomopathogenic Isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, and *Aspergillus flavus* Produce Multiple Extracellular Chitinase Isozymes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 61(1), 81–84. <https://doi.org/10.1006/jipa.1993.1014>
- St Leger, R. J., & Wang, C. (2009). Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4), 901–907. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2306-z>
- Stummer, B. E., Francis, I. L., Zanker, T., Lattey, K. A., & Scott, E. S. (2005). Effects of powdery mildew on the sensory properties and composition of Chardonnay juice and wine when grape sugar ripeness is standardised. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(1), 66–76. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00280.x>
- Sullivan, C., Ghalehbolabbahani, A., Parker, B., & Skinner, M. (2022). Mortality of various-age larval winter ticks, *Dermacentor albipictus*, following surface contact with entomopathogenic fungi. *Experimental Parasitology*, 239, 108292. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2022.108292>
- Sung, G., Hywel-Jones, N. L., Sung, J., Luangsa-ard, J. J., Shrestha, B., & Spatafora, J. W. (2006). Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology*, 57, 5-59. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.57.01>
- Sutanto, K. D., Husain, M., Rasool, K. G., Malik, A. F., Al-Qahtani, W. H., & Aldawood, A. S. (2022). Persistency of Indigenous and Exotic Entomopathogenic Fungi Isolates under Ultraviolet B (UV-B) Irradiation to Enhance Field Application Efficacy and Obtain Sustainable Control of the Red Palm Weevil. *Insects*, 13(1), 103. <https://doi.org/10.3390/insects13010103>
- Svobodová, E., Trnka, M., Dubrovský, M., Semerádová, D., Eitzinger, J., Štěpánek, P., & Žalud, Z. (2013a). Determination of areas with the most significant shift in persistence of pests in Europe under climate change. *Pest Management Science*, 70(5), 708–715. <https://doi.org/10.1002/ps.3622>

- Svobodová, E., Trnka, M., Žalud, Z., Semerádová, D., Dubrovský, M., Eitzinger, J., Štěpánek, P., & Brázdil, R. (2013b). Climate variability and potential distribution of selected pest species in south Moravia and north-east Austria in the past 200 years – lessons for the future. *Journal of Agricultural Science*, 152(2), 225–237. <https://doi.org/10.1017/s0021859613000099>
- Tahir, M., Wakil, W., Ali, A., & Sahi, S. T. (2019). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates against larvae of the polyphagous pest *Helicoverpa armigera*. *Entomol. Gen*, 38, 225-242.
- Tanada Y. & Kaya H.K. (1992). *Insect Pathology*
- Tanzini, M., Alves, S., Setten, A., & Augusto, N. (2001). Compatibilidad de agentes tensoactivos con *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/5917>
- Thakur, N., Kaur, S., Tomar, P., Thakur, S., & Yadav, A. N. (2020). Microbial biopesticides: Current status and advancement for sustainable agriculture and environment. In Elsevier eBooks (pp. 243–282). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-820526-6.00016-6>
- Thiery, D. (2005). Vers de la grappe. Les connaître pour s'en protéger. <https://agris.fao.org/search/en/providers/122439/records/647472cb79cbb2c2c1b2bd44>
- Thiery, D., & Chuche, J. (2007). Réflexion sur le devenir d'insectes du vignoble dans le contexte d'un réchauffement climatique global. Acte de la 8e Journée Technique du CIVB, Bordeaux, 13(03), 2007. https://www.researchgate.net/profile/Denis-Thiery-2/publication/296847190_REFLEXION_SUR_LE_DEVENIR_D'INSECTES_DU_VIGNOBLE_DANS_LE_CONTEXTE_D'UN_RECHAUFFEMENT_CLIMATIQUE_GLOBAL/links/56db38d208aeb4638beecb7/REFLEXION-SUR-LE-DEVENIR-DINSECTES-DU-VIGNOBLE-DANS-LE-CONTEXTE-DUN-RECHAUFFEMENT-CLIMATIQUE-GLOBAL.pdf
- Thiéry, D., Louâpre, P., Muneret, L., Rusch, A., Sentenac, G., Vogelweith, F., Iltis, C., & Moreau, J. (2018). Biological protection against grape berry moths. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 38(2). <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0493-7>
- Thiéry, D., Monceau, K., & Moreau, J. (2014). Larval intraspecific competition for food in the European grapevine moth *Lobesia botrana*. *Bulletin of Entomological Research*, 104(4), 517–524. <https://doi.org/10.1017/s0007485314000273>
- Thomas, M. B., & Jenkins, N. E. (1997). Effects of temperature on growth of *Metarhizium flavoviride* and virulence to the variegated grasshopper, *Zonocerus variegatus*. *Mycological Research*, 101(12), 1469-1474. <https://doi.org/10.1017/S0953756297004401>
- Thomas, M. B., & Read, A. F. (2007a). Can fungal biopesticides control malaria? *Nature Reviews. Microbiology*, 5(5), 377–383. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1638>

- Thomas, M. B., & Read, A. F. (2007b). Fungal bioinsecticide with a sting. *Nature Biotechnology*, 25(12), 1367–1368. <https://doi.org/10.1038/nbt1207-1367>
- Thomsen, L., & Eilenberg, J. (2000). Time-Concentration Mortality of *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae) and *Agrotis segetum* (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae from Different Destruxins. *Environmental Entomology*, 29(5), 1041–1047. <https://doi.org/10.1603/0046-225x-29.5.1041>
- Thomson, L. J., Macfadyen, S., & Hoffmann, A. A. (2010). Predicting the effects of climate change on natural enemies of agricultural pests. *Biological Control*, 52(3), 296-306. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.01.022>
- Torres-Vila, L., Rodríguez-Molina, M., Roehrich, R., & Stockel, J. (1999). Vine phenological stage during larval feeding affects male and female reproductive output of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Bulletin of Entomological Research*, 89(6), 549–556. <https://doi.org/10.1017/s000748539900070x>
- Tulloch, M. (1976). The genus *Metarhizium*. *Transactions of the British Mycological Society*, 66(3), 407–411. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(76\)80209-4](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(76)80209-4)
- UK, C. (1988). Distribution Maps of Pests. *Distribution Maps of Pests*, (1, 57, 128, 406, 499, 500, 501, 502, 503).
<https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19901143546>
- Usman, M., Gulzar, S., Wakil, W., Wu, S., Piñero, J. C., Leskey, T. C., Nixon, L. J., Oliveira-Hofman, C., Toews, M. D., & Shapiro-Ilan, D. (2020). Virulence of Entomopathogenic Fungi to *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae) and Interactions With Entomopathogenic Nematodes. *Journal of Economic Entomology*, 113(6), 2627–2633. <https://doi.org/10.1093/jee/toaa209>
- Varela, S., Lobo, J. M., & Hortal, J. (2011). Using species distribution models in paleobiogeography: A matter of data, predictors and concepts. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 310(3-4), 451-463. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2011.07.021>
- Varner, M., & Mattedi, L. (2004). Le tignole nella Piana rotaliana. <https://openpub.fmach.it/handle/10449/18487>
- Vasudeva R, Deeming DC, Eady PE (2014) Developmental temperature affects the expression of ejaculatory traits and the outcome of sperm competition in *Callosobruchus maculatus*. *J Evol Biol* 27:1811–1818.
<https://doi.org/10.1111/jeb.12431>
- Veen, K. H. (1968). *Recherches Sur La Maladie, Due Al Metarrhizium Anisopliae Chez Le Criquet Pelerin* - ProQuest. <https://www.proquest.com/openview/d3d6e263d73586fb4ae03f31c1cc2d85/1?q-origsite=gscholar&cbl=2026366&diss=y>
- Vega, F. E. (2018). The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review. *Mycologia*, 110(1), 4–30. <https://doi.org/10.1080/00275514.2017.1418578>

- Vega, F. E., Goettel, M. S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M. A., Keller, S., Koike, M., Maniania, N. K., Monzón, A., Ownley, B. H., Pell, J. K., Rangel, D. E., & Roy, H. E. (2009). Fungal entomopathogens: New insights on their ecology. *Fungal Ecology*, 2(4), 149-159. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2009.05.001>
- Vey A., Hoagland R. & Butt T.M. (2001). Toxic metabolites of fungal biological control agents. In Butt T.M., Jackson C.W., Magan N. (eds). *Fungi as biological control agents: progress, problems and potential*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, pp 311-345.
- Vieux, P., A. Malan. (2013). "An Overview of the Vine Mealybug (*Planococcus ficus*) in South African Vineyards and the use of Entomopathogenic Nematodes as potential Biocontrol Agent" (On-line pdf). South African Society for Enology and Viticulture. Accessed March 12, 2014 <http://www.sasev.org/journal/list-of-journals/an-overview-of-the-vine-mealybug-planococcus-ficus-in-south-african-vineyards-and-the-use-of-entomopathogenic-nematodes-as-potential-biocontrol-agent/?id=14&entryId=177>
- Vilcinskas, A., Matha, V., & Götz, P. (1997). Inhibition of phagocytic activity of plasmatocytes isolated from *Galleria mellonella* by entomogenous fungi and their secondary metabolites. *Journal of Insect Physiology*, 43(5), 475-483. [https://doi.org/10.1016/s0022-1910\(96\)00120-5](https://doi.org/10.1016/s0022-1910(96)00120-5)
- Villamizar, L. F., Nelson, T. L., Jones, S. A., Jackson, T. A., Hurst, M. R. H., & Marshall, S. D. G. (2018). Formation of microsclerotia in three species of *Beauveria* and storage stability of a prototype granular formulation. *Biocontrol Science and Technology*, 28(12), 1097-1113. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1514584>
- Vitta N. (2020a). Antecedentes biológicos de *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera, Tortricidae). In: Moreno-Silva E, Tapia E, editors. *Plaguicidas microbianos para el manejo integrado de Lobesia botrana en vides*. Boletín INIA N° 419. p. 7-20
- Vivarelli, L. (1924). *Insetti nocivi alla vite*. Casa Editrice Fratelli Ottavi.
- Vogelweith, F., Dourneau, M., Thiéry, D., Moret, Y., & Moreau, J. (2013b). Geographical variation in parasitism shapes larval immune function in a phytophagous insect. *Naturwissenschaften*, 100(12), 1149-1161. <https://doi.org/10.1007/s00114-013-1119-1>
- Voglino, P. (1914). Osservazioni intorno alle tignole della vite nel 1913. *Économie Rurale* (Paris), 56(4), 81-88.
- Vontas, J., Hernández-Crespo, P., Margaritopoulos, J. T., Ortego, F., Feng, H., Mathiopoulos, K. D., & Hsu, J. (2011). Insecticide resistance in Tephritid flies. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100(3), 199-205. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.04.004>
- Wakgari WM, Giliomee JH. (2005). Description of adult and immature females of six mealy-bug species (Hemiptera: Pseudococcidae) found on citrus in South Africa. *Afr Entomol* 13:281-332

- Walton, V. M., Daane, K. M., Bentley, W. J., Millar, J. G., Larsen, T. E., & Malakar-Kuennen, R. (2006). Pheromone-Based Mating Disruption of *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae) in California Vineyards. *Journal of Economic Entomology*, 99(4), 1280–1290. <https://doi.org/10.1093/jee/99.4.1280>
- Wang, X., Ji, X., Li, J., Keyhani, N. O., Feng, M., & Ying, S. (2013). A putative α -glucoside transporter gene BbAGT1 contributes to carbohydrate utilization, growth, conidiation and virulence of filamentous entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Research in Microbiology*, 164(5), 480-489. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.02.008>
- Wapshere, A. J., & Helm, K. F. (1987). Phylloxera and *Vitis*: an experimentally testable coevolutionary hypothesis. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38(3), 216–222. <https://doi.org/10.5344/ajev.1987.38.3.216>
- Whittle, K. (1986). Pests not known to occur in the United States or of limited distribution. 72. Garden weevil. <https://agris.fao.org/search/en/providers/122376/records/6511a0975cd747645b1ac303>
- Wright, S. P., Jackson, M. A., & Kocic, S. D. (2001). Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents.
- Wright, S., Carruthers, R., Jaronski, S., Bradley, C., Garza, C., & Galaini-Wright, S. (2000). Evaluation of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for Microbial Control of the Silverleaf Whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Biological Control*, 17(3), 203-217. <https://doi.org/10.1006/bcon.1999.0799>
- Wright, S., & Ramos, M. (2005). Synergistic interaction between *Beauveria bassiana*- and *Bacillus thuringiensis tenebrionis*-based biopesticides applied against field populations of Colorado potato beetle larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 90(3), 139-150. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.09.005>
- Y. Tanada, H.K. Kaya (Eds.). (1993). *Insect Pathology*, Academic Press, Inc, San Diego
- Yip, H., Rath, A., & Koen, T. (1992). Characterization of *Metarhizium anisopliae* isolates from Tasmanian pasture soils and their pathogenicity to redheaded cockchafer (Coleoptera: Scarabaeidae: *Adoryphorus couloni*). *Mycological Research*, 96(2), 92-96. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80921-0](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80921-0)
- Yoon, C. K. S. H. H. C. (2003b). Chemical Properties and Physiological Activities of Synnemata of *Beauveria bassiana*. <https://koreascience.kr/article/JAKO200311921574063.page>
- Zangheri S. (1959). Le “tignole dell’uva” (*Clysia ambiguella* Hb. e *Polychrosis botrana* Schiff.) nel Veneto e nel Trentino. *Rivista di Viticoltura e di Enologia di Conegliano*, 12 (2): 3-39.
- Zavala, J. A., & Gog, L. (2015). Impacts of anthropogenic carbon dioxide emissions on Plant-Insect interactions. In *Springer eBooks* (pp. 205–221). https://doi.org/10.1007/978-81-322-2662-8_10

- Zeh, J. A., Bonilla, M. M., Su, E. J., Padua, M. V., Anderson, R. V., Kaur, D., Yang, D., & Zeh, D. W. (2012). Degrees of disruption: projected temperature increase has catastrophic consequences for reproduction in a tropical ectotherm. *Global Change Biology*, 18(6), 1833–1842. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2012.02640.x>
- Zenil, M., Liedo, P., Williams, T., Valle, J., Cancino, J., & Montoya, P. (2004). Reproductive biology of *Fopius arisanus* (Hymenoptera: Braconidae) on *Ceratitis capitata* and *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae). *Biological Control*, 29(2), 169–178. [https://doi.org/10.1016/S1049-9644\(03\)00140-3](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(03)00140-3)
- Zhang, S., Xia, Y. X., Kim, B., & Keyhani, N. O. (2011b). Two hydrophobins are involved in fungal spore coat rodlet layer assembly and each play distinct roles in surface interactions, development and pathogenesis in the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Molecular Microbiology*, 80(3), 811–826. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07613.x>
- Zimmermann, G. (2007a). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(6), 553–596. <https://doi.org/10.1080/09583150701309006>
- Zimmermann, G. (2007b). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(9), 879–920. <https://doi.org/10.1080/09583150701593963>

Ελληνική:

- Αγγέλου, Ε. (2015). Αγροτική ανάπτυξη-Αγροτική πολιτική : Το παράδειγμα του παραδοσιακού αμπελώνα της Σαντορίνης [Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ] https://dspace.lib.ntua.gr/xmlui/bitstream/handle/123456789/41327/AGROTIK_H_ANAPTYXH_SANTORINH.pdf
- Γκίκας, Δ. (2008). Μελέτη μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων εντομοπαθογόνων μυκήτων. [Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Αθηνών (Τμήμα Βιολογίας)] <https://thesis.ekt.gr/thesisBookReader/id/18552?lang=el#page/2/mode/2up>
- Καρακατσάνη, Δ. (2018). Ανάλυση του κλάδου της οινοποιίας- Προοπτικές ανάπτυξης του ελληνικού κρασιού στην εγχώρια και διεθνή αγορά [Διατριβή επιπέδου Μάστερ, Σχολή Οικονομικών Επιστημών και Διοίκησης] <https://kypseli.ouc.ac.cy/bitstream/handle/11128/3335/MBA-2018-00581.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Λογοθέτης, Β. (1967). Αμπελουργία Β' έκδοση. Θεσσαλονίκη: 489 σελ.
- Λογοθέτης, Β. (1970). Η εξέλιξη της αμπέλου και της αμπελουργίας εις την Ελλάδα κατά τα αρχαιολογικά ευρήματα. Επιστημονική Επετηρίς της Γεωπονικής και Δασολογικής Σχολής του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, ΙΓ': 167-249

Νατσιόπουλος, Δ., Mantzoukas, S., Eliopoulos, P., & Ανοσολογίας, Ε. Μ. Β. Κ. (2020). Εντομοπαθογόνοι μύκητες ως μέσο της ολοκληρωμένης αντιμετώπισης εντόμων-εχθρών των καλλιεργειών.

https://www.researchgate.net/publication/343501939_Entomopathogonoi_myketes_os_meso_tes_olokleromenes_antimetopises_entomon-echthron_ton_kalliergeion#fullTextFileContent

Παύλου, Ε. (2015). Η γεωγραφία των ΠΟΠ (Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης) στην Ευρώπη και στην Ελλάδα: Ανάλυση και Χαρτογράφηση. [Πτυχιακή εργασία, Σχολή Κοινωνικών Επιστημών]
<https://hellanicus.lib.aegean.gr/handle/11610/17406>

Ρούμπος, Ι. Χ. (2016). Ασθένειες και εχθροί της Αμπέλου. Εκδόσεις Σταμούλης, ΣΤ' έκδοση.

Σμάλη, Σ. (2019). Η βιολογική Καλλιέργεια της Αμπέλου. [Πτυχιακή εργασία, ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ (ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ)]
<http://eureka.teithe.gr/jspui/bitstream/123456789/15033/1/Smali.pdf>

Σταύρακας, Δ. (2015). Αμπελογραφία. Εκδόσεις Ζήτη, Β' έκδοση.

Τσακίρης, Α. (2016). Αμπελουργία, ΨΥΧΑΛΟΣ

Ιστοσελίδες:

<https://b3.net.nz/gerda/refs/413.pdf>

<https://cals.cornell.edu/new-york-state-integrated-pest-management/outreach-education/fact-sheets/beauveria-bassiana>

<https://www.ot.gr/2022/12/04/agro/ampelones-i-ellada-exase-65-000-stremata-sta-teleytaia-10-xronia/#:~:text=%CE%A4%CE%B7%CE%BD%20%CF%84%CE%B5%CE%BB%CE%B5%CF%85%CF%84%CE%B1%CE%AF%CE%B1%20%CE%B4%CE%B5%CE%BA%CE%B1%CE%B5%CF%84%CE%AF%CE%B1%20%CE%B7%20%CE%AD%CE%BA%CF%84%CE%B1%CF%83%CE%B7,%CE%AD%CF%86%CF%84%CE%B1%CE%BD%CE%B1%CE%BD%20%CF%84%CE%B1%20636.965%2C3%20%CF%83%CF%84%CF%81%CE%AD%CE%BC%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%B1>

<https://www.oiv.int/>

https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Vineyards_in_the_EU_-_statistics#million_hectares_of_vineyards_in_the_EU

<http://www.opengov.gr/ypaat/wp-content/uploads/downloads/2013/07/ambeli.pdf>

<https://www.krasiagr.com/ti-einai-i-filoxera/>

<https://plantpro.gr/post/379>