



ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
(πρώην Τμήμα Τεχνολόγων Γεωπόνων, ΤΕΙ Δυτικής Ελλάδας)

***"ΑΝΕΥΡΕΣΗ ΕΝΤΟΜΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ
ΕΝΤΟΜΩΝ ΠΑΓΙΔΩΝ ΣΕ ΔΑΣΙΚΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ"***

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ του ΣΑΚΕΛΙΑ ΒΑΣΙΛΕΙΟΥ
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΡ. ΚΑΡΑΝΑΣΤΑΣΗ ΕΙΡΗΝΗ

ΑΜΑΛΙΑΔΑ 2019

Πίνακας Περιεχομένων

Πίνακας Περιεχομένων.....	2
Πρόλογος	3
Περίληψη	4
Κεφάλαιο 1 – Εισαγωγή	5
1.1 Παθολογία Εντόμων	5
1.2 Εντομοπαθογόνοι Μύκητες	9
1.2.1. Αναγνώριση ξενιστή	12
1.2.2 Προσκόλληση – Βλάστηση – Διείσδυση.....	13
1.3 Τρόποι παγίδευσης/ανεύρεσης εντομοπαθογόνων μυκήτων.....	18
1.4 Σκοπός της εργασίας.....	20
Κεφάλαιο 2 – Υλικά και Μέθοδοι	21
2.1. Έντομα	21
2.2. Δειγματοληψία - Παγίδευση εντομοπαθογόνων μυκήτων	22
2.3 Θρεπτικό υλικό Sabouraud Dextrose Agar (SDA)	25
2.4 Απομόνωση εντομοπαθογόνων μυκήτων	26
2.5 Αλληλούχιση DNA (DNA sequencing).....	27
2.5.1 Απομόνωση DNA (DNA extraction).....	28
2.5.2 Έλεγχος του DNA.....	29
2.5.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction = PCR)	30
2.5.4 Η PCR στην παρούσα μελέτη	31
Κεφάλαιο 3 – Αποτελέσματα.....	33
3.1 – Ποσοστά θνησιμότητας επί των νεκρών ατόμων	33
3.2 – Μύκητες που ανιχνεύθηκαν μέσω της τεχνικής παγίδευσής τους με έντομα.....	33
Κεφάλαιο 4 - Συζήτηση	36
Κεφάλαιο 5 - Βιβλιογραφία	38

Πρόλογος

Για την επιτυχή πραγματοποίηση αυτής της μελέτης θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους συνέβαλαν και με βοήθησαν με οποιοδήποτε τρόπο, πιο συγκεκριμένα:

Την Δρα. **Ειρήνη Καραναστάση** για τη σημαντική βοήθεια που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Τον ερευνητή Δρ. **Σπυρίδωνα Δ. Μαντζούκα**, για την καθοδήγηση που μου παρείχε καθ' όλη την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας καθώς και τις πολύτιμες γνώσεις του για τον κόσμο των εντόμων.

Τον αγαπητό **Ιωάννη Λαγωγιάννη**, ερευνητή του Ινστιτούτου Προστασίας Φυτών Πάτρας, για την άψογη συμπεριφορά του και την βοήθεια του στο μοριακό κομμάτι της εργασίας μου.

Δεν πρέπει να παραλείψω τον μεταπτυχιακό φοιτητή **Ιωάννη Πέττα**, ο οποίος βοήθησε ιδιαίτερα στην επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων και την εξαγωγή των τελικών συμπερασμάτων παρέχοντας πληροφορίες μέσω εξειδικευμένων μοριακών μεθόδων.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον προϊστάμενο του Ινστιτούτου Προστασίας Φυτών Πάτρας, εντεταλμένο ερευνητή Δρ. **Ιωάννη Μανουσόπουλο**, ο οποίος έδειξε μεγάλη αφοσίωση για το πείραμα και ήταν αυτός που βοήθησε στην ανάλυση των αποτελεσμάτων προς εξαγωγή ωφέλιμων συμπερασμάτων.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του Ινστιτούτου Προστασίας Φυτών Πάτρας τόσο για τη διάθεση του χώρου και του εργαστηριακού εξοπλισμού όσο και για την εξαιρετική συμπεριφορά τους κατά την διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο.

Περίληψη

Το πειραματικό μέρος της μελέτης πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με το Ινστιτούτο Προστασίας Φυτών Πάτρας και έχει ως αντικείμενο την ανίχνευση εντομοπαθογόνων μυκήτων σε εδάφη του νομού Αχαΐας μέσω διαφόρων τεχνικών παγίδευσής τους με έντομα.

Αρχικά συλλέχθηκαν δείγματα χώματος από δύο περιοχές οι οποίες είναι οι ανεμογεννήτριες και περιοχή Πανόπουλου-Φολόη. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε τρυβλία τύπου Petri όπου και εισάχθηκαν, αναλόγως μεγέθους, προνύμφες 3^{ης} και 4^{ης} ηλικίας καθώς και νεαρά ακμαία από έξι διαφορετικά έντομα: *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrychidae), *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae), *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) και *sitophilus granaries* (Coleoptera: Curculionidae).

Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην ήδη γνωστή μέθοδο παγίδευσης εντομοπαθογόνων μυκήτων, την Galleria bait method, χρησιμοποιώντας όμως στην παρούσα μελέτη έξι διαφορετικά έντομα.

Οι προνύμφες και τα νεαρά ακμαία τοποθετήθηκαν ανά δέκα σε τρυβλία τύπου Petri, τα οποία περιείχαν χώματα από τις παραπάνω δασικές περιοχές. Κάθε επτά ημέρες γίνονταν μετρήσεις για νεκρές προνύμφες ή ακμαία. Οι μετρήσεις κράτησαν 21 ημέρες. Έπειτα τα νεκρά άτομα τοποθετήθηκαν σε υγρασία, ώστε να επικρατούν βέλτιστες συνθήκες για την επάνθιση του μυκηλίου των εντομοπαθογόνων μυκήτων.

Στη συνέχεια, οι επανθίσεις των μυκηλίων απομονώθηκαν και εμβολιάστηκαν σε θρεπτικό υλικό για την ανάπτυξη καθαρών καλλιέργειών. Ορισμένες από αυτές τις καθарές καλλιέργειες ταυτοποιήθηκαν γονιδιακά για τον πλήρη προσδιορισμό του γένους και είδους του μύκητα ενώ οι υπόλοιπες αναγνωρίστηκαν μέσω μικροσκοπικής εξέτασης.

Το σημαντικότερο αποτέλεσμα αυτής της μελέτης ήταν η επιτυχής απομόνωση των εντομοπαθογόνων μυκήτων *Beauveria bassiana* και *Metarhizium* sp. με διαφορετικά είδη εντόμων από το μέχρι τώρα χρησιμοποιούμενο *Galleria melonella*.

Απώτερος σκοπός της εργασίας είναι να επεκταθεί σε επιστημονική βάση η τεχνική παγίδευσης (bait method) των εντομοπαθογόνων μυκήτων μέσω των εντόμων, ενισχύοντας τους χειρισμούς που υπήρχαν έως τώρα και συμβάλλοντας κατά αυτόν τον τρόπο στην βελτίωση των γενικότερων αρχών της Βιολογικής Αντιμετώπισης.

Κεφάλαιο 1 – Εισαγωγή

1.1 Παθολογία Εντόμων

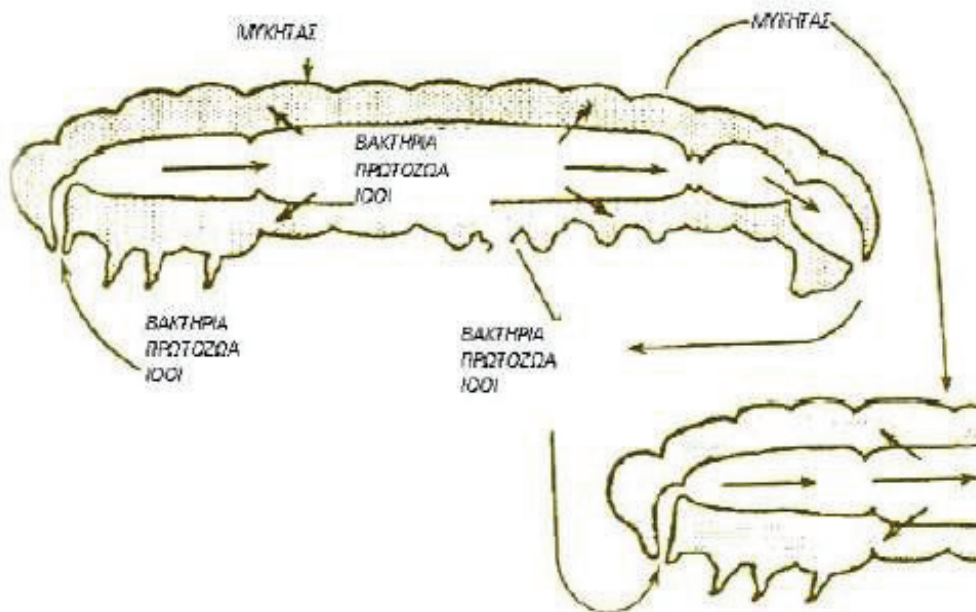
Παθογόνοι μικροοργανισμοί χαρακτηρίζονται οι μικροοργανισμοί που μπορούν να εισχωρήσουν στο σώμα ενός άλλου οργανισμού, ξενιστή, και να προκαλούν νόσο και ενίοτε το θάνατο του ξενιστή. Ένας μικροοργανισμός για να θεωρηθεί παθογόνος θα πρέπει να πληροί τους κανόνες του Koch, δηλαδή κάποιες συγκεκριμένες προϋποθέσεις που διατυπώθηκαν το 1882 από τον Robert Koch, έπειτα από τη μελέτη που έκανε σχετικά με τον τρόπο μετάδοσης της φυματίωσης. Σύμφωνα λοιπόν με αυτούς τους κανόνες που έχουν εφαρμογή και στη φυτοπαθολογία, μια ασθένεια θεωρείται ότι οφείλεται σε έναν παθογόνο μικροοργανισμό, όταν, πρώτον, ο μικροοργανισμός αυτός ανιχνεύεται στους ιστούς ή τα υγρά του εντόμου που εμφανίζει συμπτώματα της ασθένειας ή στον οργανισμό εντόμου που πέθανε από αυτή την ασθένεια. Δεύτερον, ο μικροοργανισμός θα πρέπει να μπορεί να απομονωθεί και να καλλιεργηθεί στο εργαστήριο, τρίτον, τα συμπτώματα της ασθένειας θα πρέπει να αναπαράγονται σε άλλα έντομα τεχνητά προσβεβλημένα από τον υπό εξέταση μικροοργανισμό, και τέταρτον, θα πρέπει να απομονώνεται εκ νέου από αυτά (Madigan *et al.*, 2007). Ωστόσο πρακτικά, η διάγνωση μιας ασθένειας που οφείλεται σε κάποιον παθογόνο μικροοργανισμό από τους εντομολόγους, δεν γίνεται πάντα με τον παραπάνω τρόπο, καθώς η διαδικασία εργαστηριακής καλλιέργειας των μικροοργανισμών είναι αρκετά δύσκολη, σε ορισμένες δε περιπτώσεις, ανέφικτη.

Τα αρθρόποδα προσβάλλονται από διάφορους μικροοργανισμούς, οι οποίοι προκαλούν υψηλά ποσοστά θνησιμότητας και προέρχονται από τα ίδια ταξινομικά αθροίσματα μικροοργανισμών που είναι υπεύθυνοι για ασθένειες ανώτερων ζώων κυρίως βακτήρια, μύκητες, ιούς, πρωτόζωα και νηματώδεις σκώληκες. Οι μικροοργανισμοί αυτοί χρησιμοποιούνται στην βιολογική αντιμετώπιση ως περιοριστικοί παράγοντες επιβλαβών οργανισμών. Από τα πιο γνωστά παραδείγματα αυτής της μορφής χρήσης εντομοπαθογόνων μικροοργανισμών είναι το βακτήριο *Bacillus thuringiensis* που χρησιμοποιείται για τον περιορισμό λεπιδοπτέρων, διπτέρων και κολεοπτέρων (Λυκουρέσης, 1995).

Στην εποχή μας, δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στα έντομα και τις ασθένειες των εντόμων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία του επιστημονικού κλάδου της Παθολογίας Εντόμων. Εκτός από το προφανές ενδιαφέρον για την κατανόηση του ρόλου των ασθενειών σε σχέση με το φυσικό έλεγχο των πληθυσμών των εντόμων, η μελέτη της παθολογίας των εντόμων έχει συντελέσει στην εξέλιξη των μεθόδων αντιμετώπισης φυτοφάγων εντόμων μέσω του

χειρισμού εντομοπαθογόνων μικροοργανισμών, στο πλαίσιο της βιολογικής καταπολέμησης. Η επιλογή του κατάλληλου φυσικού εχθρού που θα χρησιμοποιηθεί σε μια καλλιέργεια εναντίον κάποιου επιβλαβούς εντόμου, προϋποθέτει άριστη γνώση της βιολογίας και του βιολογικού κύκλου του φυσικού εχθρού, αλλά και του εντόμου-στόχου, καθώς οι προκαλούμενες αλληλεπιδράσεις δεν είναι ίδιες για όλα τα έντομα. Διαφοροποιήσεις μπορεί να παρατηρηθούν επίσης ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης και τις περιβαλλοντικές συνθήκες που βρίσκεται το έντομο. Συνήθως ο βαθμός παθογένειας είναι υψηλότερος στα νεαρά στάδια ανάπτυξης των εντόμων, και ιδιαίτερα στις προνύμφες (Steinhaus, 1949; Obornik, 2009).

Σχετικά με τους τρόπους, τα σημεία εισόδου και την ανάπτυξη των παθογόνων στους ιστούς των ξενιστών τους, αυτά μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με το παθογόνο, τον ξενιστή ή και τον συνδυασμό παθογόνου-ξενιστή. Η πιο συνηθισμένη οδός εισόδου των εντομοπαθογόνων μικροοργανισμών είναι η στοματική οδός. Κάποιοι άλλοι μικροοργανισμοί όπως ορισμένοι μύκητες, πρώτα εγκαθίστανται στην εξωτερική επιφάνεια του εντόμου και στη συνέχεια τη διαπερνούν και εισχωρούν στο εσωτερικό του σώματός του (Κοντοδήμας και Μεντή, 2006; Obornik, 2009). Στην εικόνα 1 απεικονίζονται οι συνηθέστεροι τρόποι εισόδου των εντομοπαθογόνων μικροοργανισμών στο σώμα των ξενιστών τους. Αντίθετα, τα συνηθέστερα σημεία εξόδου είναι η απεκκριτική οδός και ο εξωσκελετός συνεπεία της διάρρηξής του (Steinhaus, 1949; Κοντοδήμας και Μεντή, 2006; Obornik, 2009).



Εικόνα 1: Οδοί εισόδου παθογόνων σε ένα έντομο-ξενιστή.

Η παθολογία των εντόμων αποτελεί ένα σημαντικό κλάδο με εφαρμογή στη βιολογική διαχείριση (ή αντιμετώπιση) των καλλιεργειών. Ο όρος Βιολογική Αντιμετώπιση περιγράφει τη δράση ζωντανών οργανισμών (παρασιτοειδή έντομα, αρπακτικά, παθογόνοι μικροοργανισμοί) ως φυσικών εχθρών επιβλαβών για τις καλλιέργειες εντόμων, με στόχο τον περιορισμό των πληθυσμών τους. Στη βιολογική αντιμετώπιση περιλαμβάνεται και η χρήση σαπροφυτικών μικροοργανισμών που καταστέλλουν την δραστηριότητα φυτοπαρασίτων, παρεμποδίζουν τη μόλυνση ή περιορίζουν την εκδήλωση μιας ασθένειας, με στόχο την καλή φυτοϋγεία. Η βιολογική αντιμετώπιση αφορά στις αλληλεπιδράσεις των φυτών με τους παθογόνους παράγοντες και το φυσικό περιβάλλον και στηρίζεται στις αρχές της μικροβιολογίας, φυτοπαθολογίας, εδαφολογίας, κυτταρολογίας, καθώς και της φυσιολογίας και βιοχημείας των φυτών, ενώ παράλληλα (Τζάμος, 2007).

Η Βιολογική Αντιμετώπιση διακρίνεται σε Φυσική και σε Εφαρμοσμένη. Η πρώτη αναφέρεται στη φυσική δράση των φυσικών εχθρών των επιβλαβών εντόμων χωρίς την παρέμβαση του ανθρώπου, ενώ η δεύτερη στη δράση των φυσικών εχθρών μετά την παρέμβαση του ανθρώπου.

Η Εφαρμοσμένη Βιολογική Αντιμετώπιση χωρίζεται στη Διαχείριση των Πληθυσμών και την Κλασική Βιολογική Αντιμετώπιση. Η πρώτη αφορά στην εκτροφή, τον πολλαπλασιασμό και την εξαπόλυση ιθαγενών φυσικών εχθρών, και η δεύτερη στην εισαγωγή και διαχείριση πληθυσμών εξωτικών φυσικών εχθρών και χρήση μικροβιακών σκευασμάτων (Katsoyannos, 1996; Kontodimas *et al.*, 2004). Στην εικόνα 2 συνοψίζονται οι κατηγορίες της βιολογικής αντιμετώπισης, όπως περιγράφηκαν από τους Κοντοδήμα και Ανάγνου (2003).

Η βιολογική αντιμετώπιση αποτελεί έναν από τους βασικούς άξονες της ολοκληρωμένης διαχείρισης καλλιεργειών. Σημειωτέον, η ολοκληρωμένη διαχείριση (ή ολοκληρωμένη φυτοπροστασία) στο σύστημα διαχείρισης των εχθρών και ασθενειών των καλλιεργειών με συνδυασμό καλλιεργητικών, βιολογικών, βιοτεχνολογικών και χημικών (εκλεκτικών) φυτοπροστατευτικών μέσων, με τέτοιο τρόπο ώστε να επιτυγχάνεται έλεγχος των φυτοπαρασίτων. Η επιλογή της κατάλληλης ή των κατάλληλων κάθε φορά μεθόδων, γίνεται σε συνάρτηση με τις περιβαλλοντικές συνθήκες και τη δυναμική των πληθυσμών των εντόμων που είναι παρόντα σε μια καλλιέργεια. Επίσης, σημαντικοί παράγοντες στην επιλογή μεθόδου είναι ταυτόχρονα, η παραγωγικότητα του μέσου που θα χρησιμοποιηθεί, το κόστος εφαρμογής του, η ποιότητα του αποτελέσματος και η ασφάλεια του χρήστη, του καταναλωτή και του περιβάλλοντος (Λυκουρέσης, 1995).

Βιολογική Καταπολέμηση
(η δράση των φυσικών εχθρών των επιβλαβών εντόμων)

ΦΥΣΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ
(Φυσική Βιολογική
Καταπολέμηση):
(δράση των φυσικών
εχθρών χωρίς παρέμβαση
του ανθρώπου)

ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ
Βιολογική Καταπολέμηση:
(δράση των φυσικών εχθρών μετά
την ενεργό παρέμβαση του ανθρώπου)

ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ
ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ:
εκτροφή, πολλαπλασιασμός και
εξαπόλυση **ιθαγενών** φυσικών
εχθρών

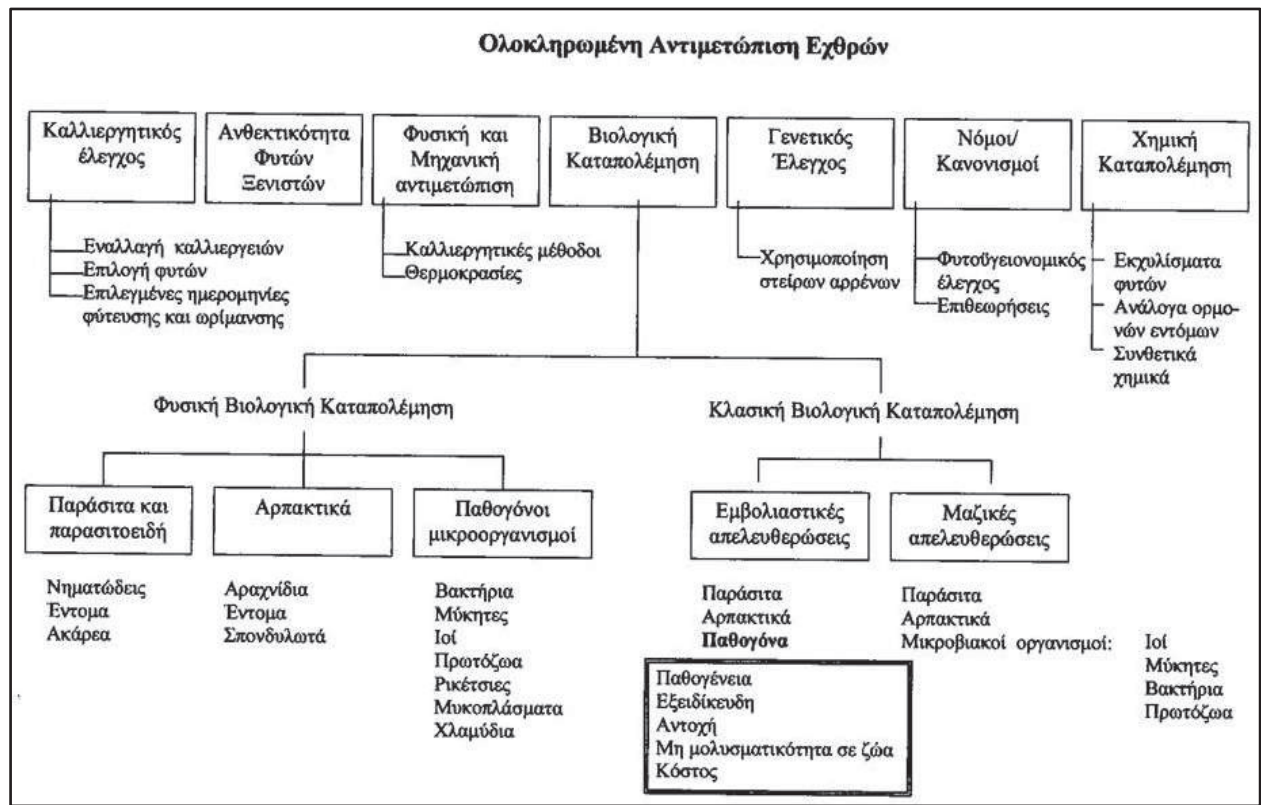
ΚΛΑΣΙΚΗ Βιολογική
Καταπολέμηση:
εισαγωγή και διαχείριση
πληθυσμών (εκτροφή,
πολλαπλασιασμός,
εξαπόλυση) **εξωτικών**
φυσικών εχθρών και
χρήση **μικροβιακών**
σκευασμάτων

Στόχος της ολοκληρωμένης φυτοπροστασίας είναι η διατήρηση των πληθυσμών των εχθρών σε χαμηλά επίπεδα ώστε να μη είναι σημαντικά επιζήμιοι για την καλλιέργεια και η αποφυγή οικονομικής ζημιάς, η προστασία της δημόσιας υγείας και του περιβάλλοντος, η παραγωγή προϊόντων ανώτερης ποιότητας και υψηλής προστιθέμενης αξίας με μείωση του κόστους παραγωγής (Λυκουρέσης, 1995).

Βέβαια η αντιμετώπιση ασθενειών ήδη εγκατεστημένων σε μια καλλιέργεια αυξάνει σημαντικά το κόστος, ενώ ο περιορισμός των φυτοπαρασίτων με ολοκληρωμένα προγράμματα φυτοπροστασίας δεν έχει πρακτική σημασία, σε αρκετές δε περιπτώσεις είναι ανέφικτος. Για το λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια δίνεται ιδιαίτερη έμφαση και προτεραιότητα στην έννοια της πρόληψης. Συνδυάζοντας λοιπόν σύγχρονες πληροφορίες και νέα πειραματικά δεδομένα με παραδοσιακά στοιχεία αντιμετώπισης των φυτοπαρασίτων, δημιουργούνται σύγχρονες προσεγγίσεις με υψηλότερη αποτελεσματικότητα (Τζάμος, 2007).

Συνεπώς, οι γενικές αρχές της ολοκληρωμένης φυτοπροστασίας έχουν βάση τις παραδοσιακές μεθόδους και έννοιες που έχουν διαχρονική ισχύ. Πρωταρχικό ρόλο στην επιτυχία ενός προγράμματος ολοκληρωμένης αντιμετώπισης παίζει η αποφυγή πρόκλησης μιας ασθένειας μέσω ορθής επιλογής τοποθεσίας και εποχής σποράς, αποφεύγοντας δηλαδή τοποθεσίες και περιόδους όπου επικρατούν ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη κάποιου φυτοπαρασίτου. Επιπλέον, ιδιαίτερη σημασία έχει η παρεμπόδιση της εκ νέου εισαγωγής

ενός φυτοπαθογόνου σε μια περιοχή και η μείωση του αρχικού μολύσματος με καταστροφή των προσβεβλημένων φυτών της προηγούμενης ή της τρέχουσας καλλιεργητικής περιόδου. (Τζάμος, 2007). Στην εικόνα 3 που ακολουθεί, παρουσιάζονται αναλυτικά όλες οι πρακτικές και οι μέθοδοι που εφαρμόζονται ή μπορεί να συμπεριλαμβάνονται σε ένα πρόγραμμα ολοκληρωμένης φυτοπροστασίας καλλιεργούμενων φυτών.



Εικόνα 3: Η ολοκληρωμένη αντιμετώπιση εχθρών (Κοντοδήμας και Ανάγνου 2003).

1.2 Εντομοπαθογόνοι Μύκητες

Όσο αφορά στη βιολογική αντιμετώπιση, οι μύκητες είναι πολλά υποσχόμενοι μικροοργανισμοί μιας και μέχρι τώρα έχουν ταυτοποιηθεί και απομονωθεί πάνω από 700 εντομοπαθογόνα είδη. Οι μυκητολογικές ασθένειες είναι κοινές και ευρέως διαδεδομένες μεταξύ των εντόμων, ενώ το φαινόμενο κατά το οποίο εντομολογικοί πληθυσμοί αποδεκατίζονται θεαματικά από επιζωοτίες¹ είναι πολύ συχνό.

¹ **Επιζωοτία.** Επιζωοτία είναι η ευρεία και ταχεία εξάπλωση ενός λοιμώδους νοσήματος και προσβολή ενός ή και περισσότερων ζωικών ειδών σε μια μεγάλη περιοχή. Αντίστοιχος όρος προκειμένου για τον ανθρώπινο πληθυσμό είναι η επιδημία.

Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες και επιδεικνύουν μεγάλη εξάρτηση από υψηλή σχετική υγρασία στο περιβάλλον (>85-90%), γεγονός που δικαιολογεί την παρουσία τους σε ζώντα έντομα σε διαφορετικά περιβάλλοντα όπως φρέσκο νερό, έδαφος, επιφάνεια εδάφους και εναέριες τοποθεσίες (Lacey and Brooks, 1997).

Εντομοπαθογόνοι μύκητες κατανέμονται σε όλες τις ταξινομικές κατηγορίες, εκτός από τους ανώτερους Βασιδιομύκητες και ορισμένους Hyphomycetes, συγκεκριμένα της οικογένειας Dematiaceae. Μεταξύ τους υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση στο βαθμό μολυσματικότητας. Μπορεί να αποτελούν υποχρεωτικά παράσιτα, ευκαιριακά παθογόνα που προσβάλλουν εξασθενημένους ξενιστές, ή ακόμα συμβιωτικούς μικροοργανισμούς. Η πλειονότητα τους κατατάσσεται στην Τάξη Entomophthorales (Κλάση Zygomycetes), και μερικοί στους Hyphomycetes. Οι Entomophthorales χαρακτηρίζονται από υψηλή εξειδίκευση προς τον ξενιστή και μεγάλες πιθανότητες επιζωοτίας. Οι Hyphomycetes έχουν μεγαλύτερα φάσμα ξενιστών και αναπτύσσονται ευκολότερα in vitro (Lacey and Brooks, 1997; Obernik, 2009). Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται οι βασικές τάξεις των μυκήτων που έχει διαπιστωθεί ότι προκαλούν κάποια ασθένεια σε έντομα.

Κατηγορίες Εντομοπαθογόνων Μυκήτων	Τάξη	Είδος
Φυτομύκητες	Entomophthorales	Entomophthora spp
		Zoophthora spp.
		Erynia spp.
		Massospora cicadina
		Conidiobolus spp.
Ασκομύκητες	Blastocladales	Coelomomyces spp.
	Lagenidiales	Lagenidium giganteum
	Ascopherales	Bettsia spp.
		Ascophaera apis
	Myriangiales	Myriangium spp. Cordyceps spp.
Ατελείς Μύκητες	Sphaeriales	Torrubiella spp.
		Hypocrella spp.
		Beauveria bassiana
		Metarrhizium anisopliae
		Spicaria (=Nomuraea) rileyi
		Paecilomyces spp.
		Hirsutella thompsonii
Sphaeropsidales	Culicomycetes clavosporus	
	Verticillium lecanii	
	Tolyposcladium cylindrosporum	
		Aschersonia aleurodis

Πίνακας 1: Σημαντικότερες τάξεις και είδη εντομοπαθογόνων μυκήτων (Lacey and Brooks, 1997).

Γενικά, όλες οι τάξεις των εντόμων είναι ευαίσθητες σε μυκητολογικές ασθένειες (Lacey and Brooks, 1997). Ειδικά όσον αφορά στα μυζητικά έντομα και λόγω του μυζητικού τρόπου λήψης της τροφής τους, οι μύκητες αποτελούν τους σημαντικότερους παθογόνους μικροοργανισμούς τους. Αντιθέτως τα βακτήρια δεν μπορούν να εισαχθούν εύκολα στον οργανισμό των εντόμων και να προκαλέσουν προβλήματα σε αυτά.

Έτσι, οι μύκητες προσβάλλουν σε σημαντικό ποσοστό τα Κολεόπτερα, σε αντίθεση με ιολογικές και βακτηριολογικές ασθένειες που είναι σπάνιες μεταξύ των ειδών αυτής της τάξης. Επίσης, πολύ ευπαθή σε μυκητολογικές μολύνσεις είναι όλα τα Λεπιδόπτερα (προνύμφες), από τα Ημίπτερα (και ειδικότερα από τα Homoptera) οι αφίδες και είδη που ανήκουν στις Οικογένειες Cicadidae και Coccidae, από τα Υμενόπτερα τα Vespoidea, από τα Κολεόπτερα ορισμένα είδη της οικογένειας Scarabeidae και από τα Δίπτερα είδη του γένους *Hylemyia* και τα κουνούπια (Lacey and Brooks, 1997; Obernik, 2009).

Η εξειδίκευση ως προς το έντομο-ξενιστή ποικίλει σημαντικά μεταξύ των εντομοπαθογόνων μυκήτων, καθώς είναι πιθανό να σχετίζεται με την φυσιολογική κατάσταση στην οποία βρίσκεται ο ξενιστής, με τις ιδιότητες του εξωσκελετού του, τις διατροφικές απαιτήσεις του μύκητα καθώς και με τους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή (Tanada, 1993). Παράλληλα, υπάρχουν μύκητες που μπορούν να μολύνουν ένα μεγάλο φάσμα ξενιστών, ενώ άλλοι χαρακτηρίζονται από εξειδίκευση και περιορίζονται σε λίγα ή ακόμη σε ένα μόνο είδος εντόμου. Στους εντομοπαθογόνους αυτούς μύκητες, χαρακτηριστικό είναι ότι τα έντομα προσβάλλονται, όχι μόνο στο στάδιο της προνύμφης ή νύμφης, αλλά και στο στάδιο του ακμαίου.

Η είσοδος ενός μύκητα στο σώμα του εντόμου μπορεί να επιτευχθεί δια της στοματικής οδού ή από τον εξωσκελετό του, σε οποιοδήποτε μέρος του σώματος, αρκεί να επικρατεί κατάλληλη υγρασία έτσι ώστε το σπόριο του μύκητα να μπορέσει να βλαστήσει (Lacey and Brooks, 1997).

Για την προσβολή ενός εντόμου από έναν παθογόνο μύκητα, τα κονίδια του μύκητα πρέπει να προσκολληθούν στον εξωσκελετό του εντόμου, να βλαστήσουν και στη συνέχεια να διεισδύσουν στο εσωτερικό του σώματος του εντόμου μέσω εξωσκελετού. Αφού ο μύκητας διαπεράσει την επιδερμίδα, εγκαθίσταται με αποτέλεσμα να αναπτύσσεται σιγά-σιγά στην αιμολέμφο και στο εσωτερικό του εντόμου. Σταδιακά το μυκήλιο του μύκητα κατακλύζει όλους τους ιστούς του ξενιστή του, ενώ ταυτόχρονα παράγονται τοξίνες που επιφέρουν το θάνατο του ξενιστή. Εν συνεχεία, το μυκήλιο του μύκητα διαπερνά τον εξωσκελετό του ξενιστή του προς το εξωτερικό περιβάλλον και είναι πλέον εμφανές στην εξωτερική επιφάνεια σε συνδυασμό με επανθίσεις (τους κονιδιοφόροι του μύκητα) από τους

οποίους θα γίνει η διασπορά του παθογόνου. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι μύκητες μπορεί να εντοπίζονται σε συγκεκριμένα όργανα του ξενιστή, όπως για παράδειγμα τα είδη *Massospora cicadina* και *Strongwellsea castrans* που απαντώνται μόνο στην κοιλιακή χώρα ενήλικων ακρίδων και διπτέρων Anthomyidae αντίστοιχα (Poinar, 1978).

Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν πολλά εντομοπαθογόνα είδη μυκήτων, μόνο 10 από αυτά χρησιμοποιούνται σήμερα για την αντιμετώπιση επιβλαβών εντόμων. Αυτό συμβαίνει κυρίως γιατί η αποτελεσματικότητά τους εξαρτάται από πολύ συγκεκριμένες συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας. Αφετέρου πολλά εντομοπαθογόνα είδη είναι πολύ απαιτητικά ως προς τις συνθήκες καλλιέργειά τους στο εργαστήριο με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν δυσκολίες στη μαζική παραγωγή τους, ενώ άλλοι που είναι πιο εύκολο να καλλιεργηθούν, εμφανίζουν εξασθένηση της παθογόνου δράσης τους ύστερα από μακροχρόνια καλλιέργεια σε τεχνητά υποστρώματα. Σημαντικό παράγοντα αποτελεί και η έλλειψη γνώσης σχετικά με τους παράγοντες που επηρεάζουν την τοξικότητά τους, αφού το ενδεχόμενο οι τοξίνες που παράγουν να είναι επιβλαβείς για τον άνθρωπο και τα ζώα δεν έχει απορριφθεί (Lacey and Brooks, 1997; Obernik, 2009).

1.2.1. Αναγνώριση ξενιστή

Ο τρόπος αναγνώρισης των ξενιστών από τους εντομοπαθογόνους μύκητες δεν είναι ξεκάθαρος. Για την περίπτωση των φυτοπαθογόνων μυκήτων αναφέρεται ότι παράγεται ένα ειδικό μόριο (elicitor) που ανιχνεύει υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης στον ξενιστή, στη συνέχεια ενεργοποιείται η σύνθεση ειδικών προϊόντων που με την σειρά τους επάγουν την σύνθεση ενζύμων από το παθογόνο που στοχεύουν το κυτταρικό τοίχωμα του φυτού (Butt, 2002). Εικάζεται ότι παρόμοιος είναι και ο τρόπος δράσης που υιοθετούν οι εντομοπαθογόνοι μύκητες.

Στην διαδικασία αναγνώρισης του ξενιστή συμμετέχουν, από την πλευρά του παθογόνου, εξειδικευμένα γονίδια παθογένειας και τα προϊόντα τους, και από την πλευρά του ξενιστή, εξειδικευμένα γονίδια ανθεκτικότητας. Όταν ο παθογόνος μύκητας αναγνωρίσει το σήμα που προέρχεται από τον ξενιστή, επάγεται η ανάπτυξή του ενώ ταυτόχρονα αρχίζει η παραγωγή τοξικών ουσιών που οδηγούν το έντομο – ξενιστή στο (Hajek et al. 2007).

Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες διαθέτουν ένα πολύπλοκο σύστημα σηματοδότησης, το οποίο περιλαμβάνει πρωτεΐνες G, κατάλληλους υποδοχείς, κινάσες και δευτερογενείς μηνύτορες, ο ρόλος των οποίων είναι η αναγνώριση του ξενιστή και η επαγωγή της σύνθεσης

των καταλλήλων αποικοδομητικών ενζύμων (Butt, 2002).

1.2.2 Προσκόλληση – Βλάστηση – Διείσδυση

Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες προσβάλλουν τον ξενιστή τους με τα σπόρια αγενούς αναπαραγωγής (κονίδια). Για την επιτυχή βλάστηση και ανάπτυξη των σπορίων είναι απαραίτητη η επικράτηση ευνοϊκών συνθηκών θερμοκρασίας, υγρασίας και παρουσία νερού. Η βλάστηση του κονιδίου οδηγεί είτε στη δημιουργία ενός η περισσότερων βλαστικών σωλήνων, είτε στη δημιουργία δευτερογενών κονιδίων. Οι βλαστικοί σωλήνες (germtubes) διατρύπουν απευθείας τον εξωσκελετό των εντόμων, μια πολυσύνθετη δομή που αποτελείται από πρωτεΐνες, χιτίνη και λιπίδια, υδρόφοβη και ανθεκτική στην ενζυμική αποδόμηση, γεγονός που δυσχεραίνει τη μόλυνση από τον εντομοπαθογόνο μύκητα (Hackmann, 1974). Για τη βλάστηση των κονιδίων του εντομοπαθογόνου μύκητα, απαιτούνται συνήθως 12-24 ώρες από την προσκόλλησή τους στον εξωσκελετό του ξενιστή. Στη συνέχεια, μέσα στο σώμα του ξενιστή, το παθογόνο αναπαράγεται με βλαστοσπόρια (τμήματα εξειδικευμένων υφών). Τα βλαστοσπόρια αποτελούν και αυτά σπότια αγενούς αναπαραγωγής και ποικίλλουν σε μέγεθος και σε σχήμα (Phasenton και Tanada, 1968).

Ο μολυσματικός κύκλος των μυκήτων γενικότερα περιλαμβάνει τέσσερα στάδια:

- α) προσκόλληση
- β) βλάστηση
- γ) διαφοροποίηση και
- δ) διείσδυση.

Κάθε ένα από τα παραπάνω βήματα επηρεάζεται από συγκεκριμένους ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες που τελικά χαρακτηρίζουν την παθογένεια. Όσον αφορά στους εντομοπαθογόνους μύκητες, το φαινόμενο είναι μοναδικό αφού η είσοδος στο σώμα του εντόμου-ξενιστή γίνεται από τον εξωσκελετό και όχι από το πεπτικό σύστημα όπως συμβαίνει με άλλους εντομοπαθογόνους μικροοργανισμούς, όπως τα βακτήρια (Hajek et al., 2007).

Η μόλυνση του εντόμου καθορίζεται από την προσκόλληση των κονιδίων του μύκητα στο έντομο-ξενιστή, η οποία είναι αναγκαία και συνήθως επιτυγχάνεται με τη βοήθεια μιας κολλώδους ουσίας (βλέννας) που εκκρίνεται από τον ίδιο τον μύκητα. Σημαντικό ρόλο στην εγκατάσταση του παθογόνου παίζουν και ορισμένες λεκτίνες καθώς και υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές δυνάμεις (Boucias et al., 1998). Για την συνέχιση του μολυσματικού κύκλου, σημαντικός παράγοντας είναι η παραγωγή ενζύμων (λιπάσες, πρωτεάσες, χιτινάσες)

από το παθογόνο, τα οποία επιτυγχάνουν την λύση του εξωσκελετού του εντόμου-ξενιστή (Smith et al., 1981).

Η διαδικασία της βλάστησης των σπορίων επηρεάζεται από ένα ευρύ φάσμα παραγόντων όπως η παρουσία νερού στη επιφάνεια του εξωσκελετού του εντόμου, διάφορα ιόντα, τα λιπαρά οξέα και θρεπτικά στοιχεία (Hassan et al., 1989). Για να είναι επιτυχής η βλάστηση απαιτείται παρουσία συγκεκριμένων θρεπτικών στοιχείων καθώς και ανθεκτικότητα του παθογόνου στις τοξικές ουσίες που μπορεί να εκλύονται/εκκρίνονται από τον εξωσκελετό του εντόμου-ξενιστή (Latge et al., 1987). Για παράδειγμα, για τη βλάστηση των σπορίων του εντομοπαθογόνου μύκητα *Beauveria bassiana* απαιτείται παρουσία πηγής άνθρακα και για την μετέπειτα ανάπτυξή του απαιτείται πηγή αζώτου (Smith και Grula, 1982). Ο μύκητας *Metarhizium anisopliae* απαιτεί παρουσία νερού για την έναρξη της βλάστησης των κονιδίων, αλλά και εξωγενείς πηγές άνθρακα για την ανάπτυξή του (Charnley, 1990).

Τα περισσότερα κονίδια βλαστάνουν 12-24 ώρες από την προσκόλλησή τους στον εξωσκελετό του εντόμου, ενώ παρατηρείται και βλάστηση μετά την πάροδο 24 ωρών που αποδίδεται σε δευτερογενή ή τριτογενή κονίδια.

Στην περίπτωση που ένα κονίδιο προσπέσει και προσκολληθεί σε επιφάνεια υδρόφοβη, σκληρή και πτωχή σε θρεπτικά υλικά, τότε διαφοροποιείται σε απρεσσόριο (appressorium). Το απρεσσόριο αποτελεί το καταληκτικό άκρο ενός βλαστικού σωλήνα. Το μέγεθος και το σχήμα του μπορεί να διαφοροποιείται και εξαρτάται από το είδος και το στέλεχος του μύκητα αλλά και από τα χαρακτηριστικά του εξωσκελετού του ξενιστή του (Butt et al., 1995), συνήθως πρόκειται για μια ροπαλοειδή ή σφαιρική κατασκευή (Leger et al., 1988). Απρεσσόρια μπορούν να παράγουν όλα τα στελέχη του είδους *M. anisopliae*, ενώ για το είδος *B. bassiana*, η ιδιότητα αυτή δεν αποτελεί κανόνα για όλα τα στελέχη.

Τα απρεσσόρια των περισσότερων μυκήτων παράγουν άφθονο κολλώδες υγρό που βοηθά την προσκόλλησή του μύκητα κατά την διάρκεια της διείσδυσης, ενώ φαίνεται να αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό για όλα τα είδη, οι διεισδυτικές υφές να αναπτύσσονται πλευρικά, διασπώντας την ακεραιότητα του εξωσκελετού (Mohamed et al., 1978, Brey et al., 1986, Brobyn et al., 1987, Hajek et al., 2007).

Η διείσδυση στο σώμα του εντόμου μέσα από τον εξωσκελετό επιτυγχάνεται είτε απευθείας από τον βλαστικό σωλήνα του μύκητα είτε από το απρεσσόριο που συνδέεται με τον εξωσκελετό και ευνοεί την ανάπτυξη μιας στενής διεισδυτικής υφής (Boucias and Pendland, 1982; Roberts and Humber, 1981; Wraight et al., 1998; Zacharuk, 1973). Η διείσδυση είναι μηχανική και ενζυμική διαδικασία (Charnley, 1984; McCoy et al., 1988; St.

Leger et al., 1988).

Στους περισσότερους εδαφογενείς εντομοπαθογόνους μύκητες, η διείσδυση γίνεται άμεσα, σπανιότερα δε μπορεί να επιτευχθεί μέσω πληγών ή μέσω των αισθητηρίων οργάνων. Ο ακριβής μηχανισμός εισόδου διαφοροποιείται και συνήθως χαρακτηρίζει το είδος του μύκητα (Gillespie et al., 1998).

Ο μύκητας *Beauveria bassiana*

Το είδος *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Moniliales) είναι ένας μύκητας ευρέως διαδεδομένος που έχει την ικανότητα να προσβάλλει πλέον των 200 ειδών εντόμων, που ανήκουν σε διάφορες ομάδες όπως θρίπες, αλευρώδεις, αφίδες, ακάρεα, τερμίτες, οικιακές μύγες, κολεόπτερα κ.α.

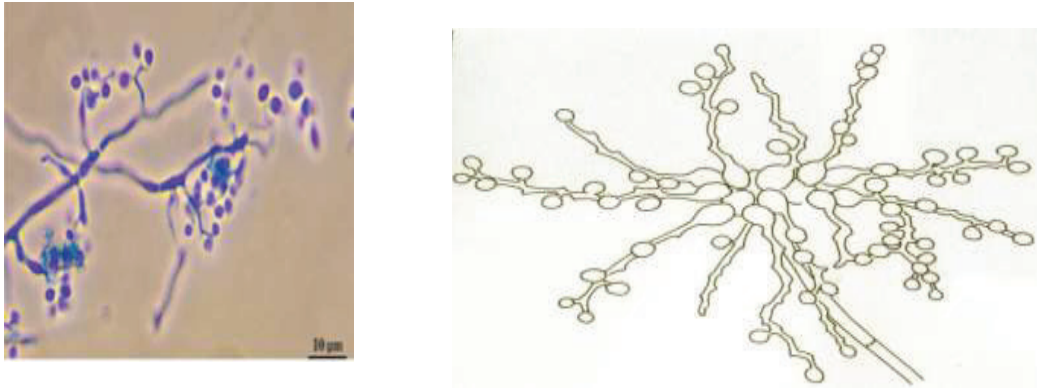
Ιστορικά αποτελεί το πρώτο είδος που εμπλέκεται στη βιολογική αντιμετώπιση εντόμων, αφού κατά τον 19^ο αιώνα, ο Ιταλός επιστήμονας Agostino Bassi αφιέρωσε περισσότερα από 30 χρόνια μελέτης της ασθένειας που ήταν γνωστή ως «white muscardine» στο *Bombyx mori* (L), αποδεικνύοντας τελικά ότι το παθογόνο αίτιο της ασθένειας ήταν ο μύκητας *B. bassiana* είναι.

Το είδος αυτό παράγει τρεις τύπους σπορίων: (i) λεπτά, μονοκύτταρα σπόρια, γνωστά ως βλαστοσπόρια που παράγονται σε υγρή καλλιέργεια του μύκητα (Bidochka et al, 1987), (ii) κονίδια που παράγονται σε στερεό θρεπτικό μέσο και (iii) κονίδια που παράγονται σε υγρή καλλιέργεια. Τα κονίδια είναι μονοκύτταρα, απλοειδή και υδρόφοβα.



Εικόνα 4: Ο μύκητας *Beauveria bassiana* σε τρυβλίο στο Ινστιτούτο Πάτρας.

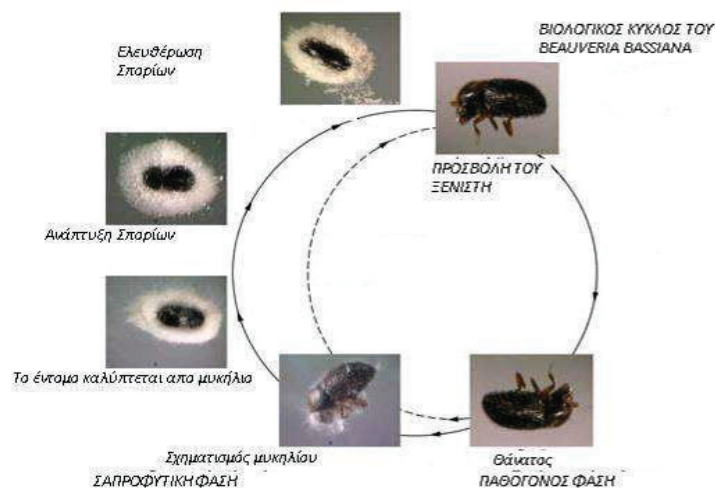
Όσον αφορά στη βιωσιμότητα των τριών τύπων σπορίων του *B. bassiana*, ο Hedegus και οι συνεργάτες του (1991) έδειξαν ότι θερμοκρασία -70°C είναι καλύτερη για την αποθήκευσή τους για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Πάντως τα κονίδια του *B. bassiana*, όπως και άλλων εντομοπαθογόνων μυκήτων, χάνουν τη βιωσιμότητα τους όταν αποθηκευτούν σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Εξάλλου, η υψηλή υγρασία θεωρείται απαραίτητη για την ανάπτυξη των κονιδίων ενώ η μόλυνση ολοκληρώνεται σε 24-48 ώρες ανάλογα με τη θερμοκρασία. Μετά τη μόλυνση, το έντομο μπορεί να επιζήσει μέχρι 5 ημέρες.



Εικόνα 5: Ο μύκητας *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin

Ο μύκητας *B. bassiana* καταλαμβάνει το σώμα του εντόμου, αφού τα κονίδιά του έλθουν σε επαφή με τον εξωσκελετό του εντόμου και βλαστήσουν, διαπερνώντας τον εξωσκελετό και τελικά πολλαπλασιαζόμενα στο εσωτερικό του (Rehner & Buckley, 2005).

Σήμερα στην Ευρώπη κυκλοφορούν διάφορα εμπορικά σκευάσματα που περιέχουν τον μύκητα *B. bassiana*, όπως Metab, Naturalis-L, Bio-power, Botanigard κ.α. Ο μύκητας δεν παρουσιάζει φυτοτοξικότητες, ούτε είναι επιβλαβής για τα πτηνά, τα ζώα και τα ψάρια (Copping, 2001).



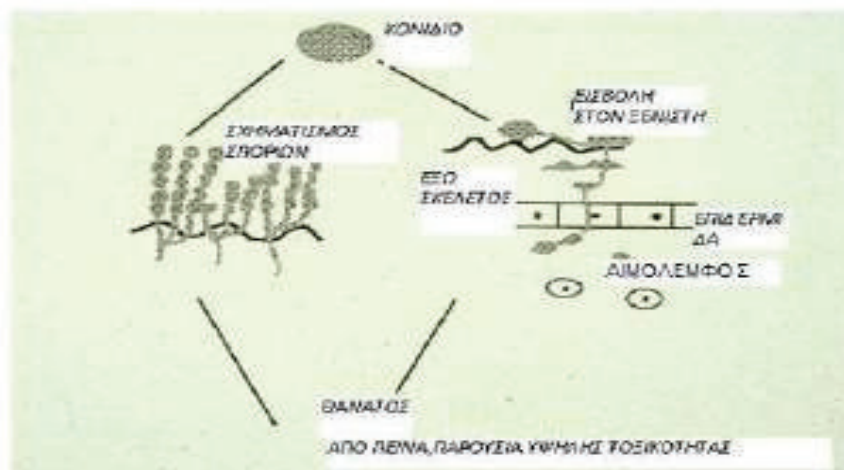
Εικόνα 6: Βιολογικός Κύκλος του *Beauveria bassiana*.

Metarhizium anisopliae var anisopliae και M. anisopliae var robertsii

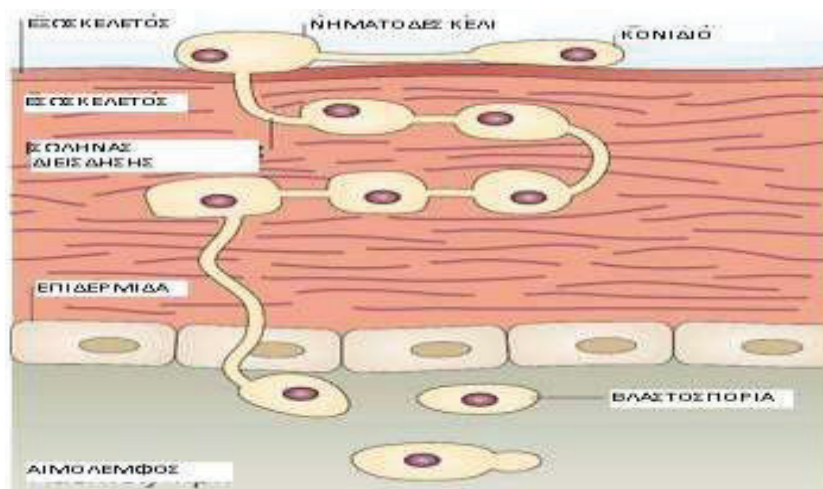
Οι μύκητες του είδους *Metarhizium anisopliae* αναφέρεται ότι προσβάλουν περί τα 300 διαφορετικά είδη εντόμων και αποτελούν το καλύτερα μελετημένο εντομοπαθογόνο είδος.

Οι μύκητες αυτοί μπορούν να παραχθούν εύκολα σε ειδικούς ζυμωτήρες, όμως το μυκήλιο που προκύπτει δεν έχει εντομοκτόνο δράση. Αντίθετα τα βλαστοσπόρια και τα κονίδια που παράγονται σε υγρές καλλιέργειες και με την προϋπόθεση ότι πληρούνται συγκεκριμένες συνθήκες είναι βιολογικώς δραστικά και έχουν την ικανότητα να μολύνουν και να σκοτώσουν τον ξενιστή τους.

Μετά την προσβολή του εντόμου και όταν η υγρασία είναι αρκετά υψηλή, πάνω στο νεκρό σώμα του εντόμου παρατηρείται λευκή επάνθιση (μούχλα) που σιγά – σιγά επεκτείνεται και σε σύντομο χρονικό διάστημα μεταχρωματίζεται σε πράσινη και μπορεί να καλύψει ολόκληρο το σώμα του εντόμου (Tanada and Kaya, 1993).



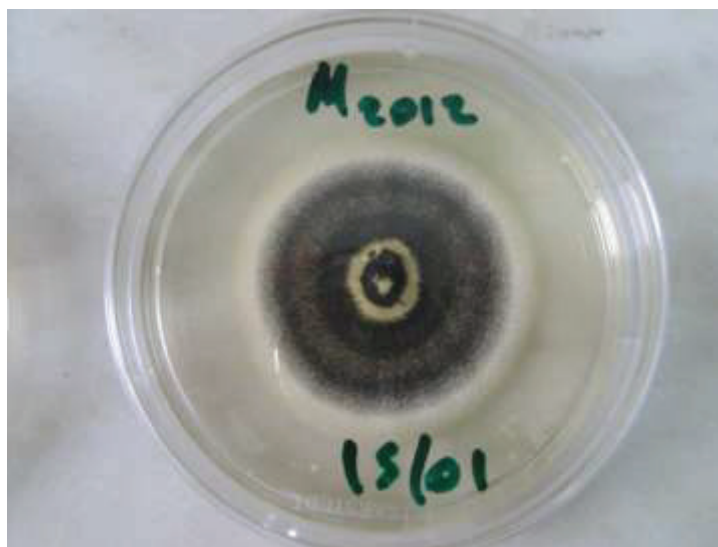
Εικόνα 7: Βιολογικός κύκλος του *M. anisopliae*.



Εικόνα 8: Τρόπος διείσδυσης του *M. anisopliae* στο εσωτερικό του εντόμου.

Μία εμπορικά διαθέσιμη μορφή του εντομοπαθογόνου μύκητα *M. anisopliae* είναι το σκεύασμα Bioblast που χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση των τερμιτών του γένους *Reticulitermes*. Το σκεύασμα εφαρμόζεται πάνω στο ξύλο, όπου οι τερμίτες δημιουργούν τις στοές τους, έτσι τα άτομα των τερμιτών που βρίσκονται μέσα στις στοές είναι εκτεθειμένα και έρχονται σε άμεση επαφή με τα κονίδια του μύκητα. Επιπλέον, προκαλείται εξάπλωση του παθογόνου μύκητα στα υγιή, μη μολυσμένα, άτομα που δεν βρίσκονται εντός των στοών αλλά αποτελούν μέλη της αποικίας. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο θάνατος επέρχεται σε 4 έως 10 ημέρες ανάλογα με την θερμοκρασία.

Εξάλλου το Metab αποτελεί μία άλλη εμπορική διαθέσιμη μορφή του συγκεκριμένου εντομοπαθογόνου μύκητα *αν και* περιέχει και κονίδια του *B. bassiana*.



Εικόνα 9: Ο μύκητας *M. anisopliae* σε απομόνωση στο Ινστιτούτο Πάτρας.

1.3 Τρόποι παγίδευσης/ανεύρεσης εντομοπαθογόνων μυκήτων

Η ανάπτυξη και εξέλιξη της επιζωοτίας καθορίζεται σε σημαντικό βαθμό από τον πληθυσμό του ξενιστή, την παθογόνο δύναμη του μύκητα, την ικανότητά του να αναπτύσσεται σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες, την ικανότητά του για γρήγορη ανάπτυξη ξεπερνώντας τις αντιστάσεις του ξενιστή, παράγοντας υψηλούς αριθμούς κονιδίων, και τέλος την ικανότητά του για επιβίωση και διάδοση (Μαντζούκας, 2008). Οι ευνοϊκότερες συνθήκες για το συγκεκριμένο εντομοπαθογόνο είναι υγρασία >90% και θερμοκρασία 20-30°C, αν και επιζωοτίες έχουν αναφερθεί και σε συνθήκες χαμηλότερων θερμοκρασιών και υγρασίας.

Η παγίδευση γηγενών στελεχών εντομοπαθογόνων μυκήτων πραγματοποιείται μέσω της τεχνικής παγίδευσής τους με έντομα, τα οποία χρησιμοποιούνται ως δόλωμα. Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε αρχικά για την απομόνωση εντομοπαθογόνων νηματωδών από το έδαφος (Zimmerman, 1986) και αργότερα χρησιμοποιήθηκε και για την απομόνωση των εντομοπαθογόνων μυκήτων. Για δόλωμα χρησιμοποιούνται οι προνύμφες του λεπιδοπτέρου *Galleria mellonella* (Οικογένεια Pyralidae), γι' αυτό και η μέθοδος είναι γνωστή ως Galleria Bait Method. Σπανιότερα χρησιμοποιούνται και οι προνύμφες του κολεοπτέρου *Tenebrio molitor* (Οικογένεια Tenebrionidae). Στις μέρες μας, πολλές μελέτες ασχολούνται με την αξιολόγηση επί της δυνατότητας χρήσης διαφόρων εντόμων και από άλλες οικογένειες ως παγίδες, αν και η μέθοδος το *G. mellonella* φαίνεται να είναι, μέχρι στιγμής, η πιο ευαίσθητη και χρήσιμη για την ανίχνευση και την αναγνώριση ενός μεγάλου φάσματος εντομοπαθογόνων μυκήτων (Vanninen *et al.*, 1989; Vanninen, 1996; Chandler *et al.*, 1997; Bidochka *et al.*, 1998; Klingen *et al.*, 2002; Keller *et al.*, 2003; Meyling & Eilenberg, 2006). Παρ' ολ' αυτά, οι Klingen και συνεργάτες (2002) αναφέρουν ότι ο μύκητας *Tolyposcladium cylindrosporium* απομονώθηκε πολύ αποτελεσματικά με την προνύμφη του εντόμου *Delia floralis* της οικογένειας Anthomyiidae, ευκολότερα δε απ' ό,τι με την προνύμφη του *G. mellonella*.

Πιο πρόσφατα, η εκμετάλλευση των γεωγραφικών πληροφοριακών συστημάτων (Geographical Information Systems) κατά την δειγματοληψία εδάφους, επιτρέπει την αναγνώριση συγκεκριμένων συμπλεγμάτων οργανισμών και μπορεί να καταδείξει με ευκρίνεια αν τα δεδομένα ακολουθούν τυχαία κατανομή ή όχι, σε συνδυασμό με την ακριβή τοποθεσία της δειγματοληψίας (Meyling & Eilenberg, 2006). Έτσι η εμφάνιση κάθε εντομοπαθογόνου μύκητα μπορεί να θεωρηθεί ποσοτικό δεδομένο το οποίο συμπεριλαμβάνεται σε μια ανάλυση μαζί με τα χωρικά δεδομένα. Αυτός ο τρόπος καταχώρησης δεδομένων επιτρέπει το συσχετισμό της παρουσίας εντομοπαθογόνων μυκήτων με άλλους παράγοντες που αφορούν στο σύστημα της καλλιέργειας και συνεπώς μπορούν να αναπτυχθούν υποθέσεις σχετικά με τους παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την κατανομή της εμφάνισής τους ή ακόμη να τροποποιηθούν ώστε να προάγουν αύξηση των πληθυσμών τους. Για παράδειγμα, ένας συσχετισμός μεταξύ του πληθυσμού ενός εντόμου – παγίδας (ξενιστής) και τη συχνότητα εμφάνισης επανθίσεων μυκήτων πάνω στα άτομα του πληθυσμού, θα μπορούσε να παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την μεταξύ τους κατανομή (Meyling, 2007).

1.4 Σκοπός της εργασίας

Η παρούσα εργασία έχει ως στόχο τη μελέτη επί της δυνατότητας χρήσης διαφορετικών εντόμων σαν μέσα παγίδευσης εντομοπαθογόνων μυκήτων, ώστε η παραδοσιακή χρήση του *Galleria mellonella* ως δόλωμα να μην αποτελεί μονόδρομο, αλλά να είναι δυνατή και η χρήση άλλων εντόμων ώστε να διευρυνθεί το φάσμα εντομοπαθογόνων μυκήτων που μπορούμε να ανιχνεύσουμε.

Κεφάλαιο 2 – Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Έντομα

Για την εκπόνηση της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν τα είδη:

- *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae)
- *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera:Bostrychidae)
- *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae)
- *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae)
- *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae)
- *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae).

Οι εκτροφές των εντόμων πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Ιολογίας του Ινστιτούτου Προστασίας Φυτών της Πάτρας, ώστε να μην απαιτούνται συνεχείς μετακινήσεις των εντόμων για τις ανάγκες του πειραματικού μέρους, γεγονός το οποίο μπορούσε να επηρεάσει τη συμπεριφορά και την καλή κατάσταση των εντόμων, και κατά συνέπεια τα αποτελέσματα του πειράματος.

Για τις εκτροφές των κολεοπτέρων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά:

- *T. granarium* και *R. dominica* → σπόροι σίτου
- *T. confusum* → αλεύρι
- *T. molitor* → πατάτα

Για τις εκτροφές των ενήλικων λεπιδοπτέρων χρησιμοποιήθηκαν κλωβοί 25x45x30cm, κατασκευασμένοι με ξύλινο σκελετό, των οποίων οι δύο πλάγιες πλευρές ήταν καλυμμένες με πλαστικό πλέγμα και οι οπίσθιες με MDF. Η πρόσθια πλευρά των κλωβών ήταν καλυμμένη με πλαστικό πλέγμα μικρής διατομής, το οποίο λειτουργούσε και σαν είσοδος για το εσωτερικό του. Το δάπεδο των κλωβών ήταν από MDF και σε κάθε κλωβό διατηρούνταν 15 έως 20 ζεύγη ενήλικων εντόμων.

Ως τροφή των ενήλικων λεπιδοπτέρων προσφέρονταν ζαχαρόνερο με οδοντιατρικά τεμάχια βάμβακος μήκους 1cm, τοποθετημένων σε τρυβλίο Petri με νερό στο δάπεδο του κλωβού.

Ως τεχνητό υπόστρωμα ωτοκίας για το λεπιδόπτερο *E. kuehniella*, χρησιμοποιούνταν διάφανοι πλαστικοί κεσέδες με αποστειρωμένο χονδρό σιμιγδάλι και αντιβιοτικό, οι οποίοι παρέμεναν στους κλωβούς για τρεις έως τέσσερις μέρες και στην συνέχεια τοποθετούνταν σε ξεχωριστό σκοτεινό θάλαμο για να γίνει η εκκόλαψη των ωών και να αναπτυχθούν οι νεοεκκολαφθείσες προνύμφες. Οι κεσέδες καλύπτονταν με τούλι για να αποφευχθεί τυχόν απόδρασή τους. Εν συνεχεία, οι προνύμφες κατανέμονταν, ανάλογα με την ηλικία τους, σε διάφανα δοχεία ώστε να αποφευχθεί ο συνωστισμός που θα επηρέαζε την πρόσληψη τροφής και την ανάπτυξή τους.

Αντίστοιχα, ως τεχνητό υπόστρωμα ωτοκίας στους κλωβούς του λεπιδόπτερου *P. interpunctella* τοποθετούνταν διάφανοι πλαστικοί κεσέδες με μέλι, γλυκερίνη, ξηρή μαγιά, αποστειρωμένο αλεύρι ολικής άλεσης και αποστειρωμένο πίτουρο. Οι κεσέδες παρέμεναν στους κλωβούς για δυο μέρες και στην συνέχεια καλύπτονταν με το τούλι και τοποθετούνταν σε ξεχωριστό σκοτεινό θάλαμο για την εκκόλαψη και την ανάπτυξη των προνυμφών. Ακολουθούσε κατανομή ανάλογα με την ηλικία για την αποφυγή συνωστισμού.

Η εναπομένουσα τροφή αποθηκεύονταν στους 4°C μέχρι να ξαναχρησιμοποιηθεί.

Όλες οι εκτροφές και όλα τα στάδια ανάπτυξης των εντόμων διεξάγονταν σε δωμάτιο όπου οι συνθήκες διατηρούνταν σταθερές (θερμοκρασία 25±1°C, σχετική υγρασία 60 – 70% και φωτοπερίοδος 16:8 ώρες Φ:Σ).

2.2. Δειγματοληψία - Παγίδευση εντομοπαθογόνων μυκήτων

Τα δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν ήταν δύο και προέρχονταν από δύο περιοχές της Αχαΐας, την περιοχή «Ανεμογεννήτριες» και την περιοχή «Πανόπουλου-Φολόη». Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε τον Ιανουάριο και Φεβρουάριο του 2016. Το βάθος δειγματοληψίας ήταν 10 cm και η ποσότητα του δείγματος αντιστοιχούσε σε 300g. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πλαστικές σακούλες και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία 4°C έως ότου μεταφερθούν στο εργαστήριο για επεξεργασία. Τα σημεία της δειγματοληψίας καταγράφηκαν με συσκευή GPS Garmin Etrex και φαίνονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα:

Περιοχή	Γεωγραφικό Πλάτος	Γεωγραφικό Μήκος
Ανεμογεννήτριες	29°52'86.73''B	41°88'79.95''A
Πανόπουλου-Φολόη	37°82'62.94''B	21°67'56.82''A

Για την επεξεργασία των δειγμάτων, τοποθετήθηκαν σε σκληρό χαρτόνι πάνω στον εργαστηριακό πάγκο του εργαστηρίου και αφέθηκαν για 24h, ώστε να μειωθεί η υγρασία τους. Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη γιατί όταν τα δείγματα βρίσκονται σε συνθήκες πολύ υψηλής υγρασίας οι προνύμφες των εντόμων-παγίδων προσβάλλονται πρώτα από τυχόν παρόντες εντομοπαθογόνους νηματώδεις που τις θανατώνουν πριν την προσβολή από τους εντομοπαθογόνους μύκητες.

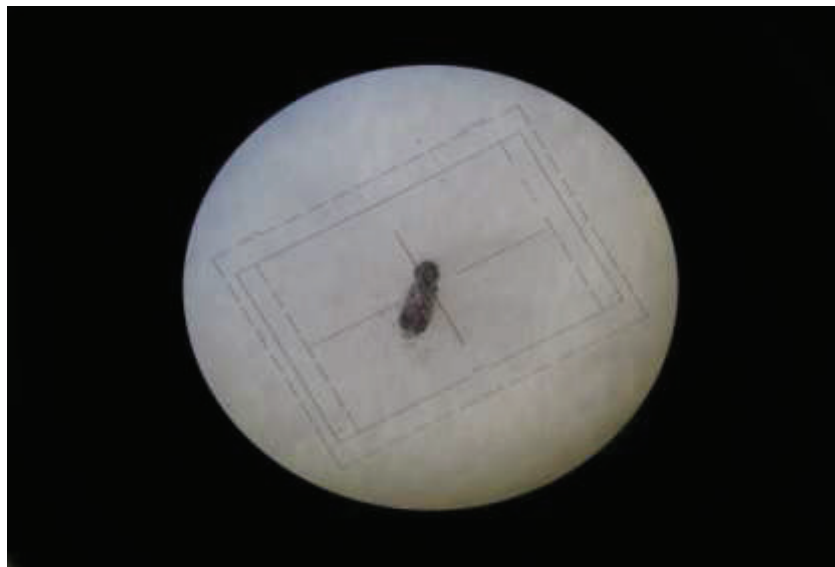
Στη συνέχεια, τα δείγματα κοσκινίστηκαν και μοιράστηκαν σε 3 τρυβλία Petri για κάθε δείγμα. Σε κάθε τρυβλίο εισήχθησαν προνύμφες των εντόμων, 3^{ης} και 4^{ης} ηλικίας, ή σε περίπτωση που αυτό δεν ήταν δυνατό λόγω του πολύ μικρού μεγέθους τους, ολόκληρα νεαρά ακμαία. Σε κάθε τρυβλίο εισήχθησαν 10 προνύμφες ή ακμαία, 30 συνολικά για κάθε περιοχή, τα οποία και αφέθηκαν σε ειδικά κατασκευασμένους θαλάμους υπό συνθήκες ελεγχόμενης θερμοκρασίας ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$), στο σκοτάδι για 21 ημέρες.



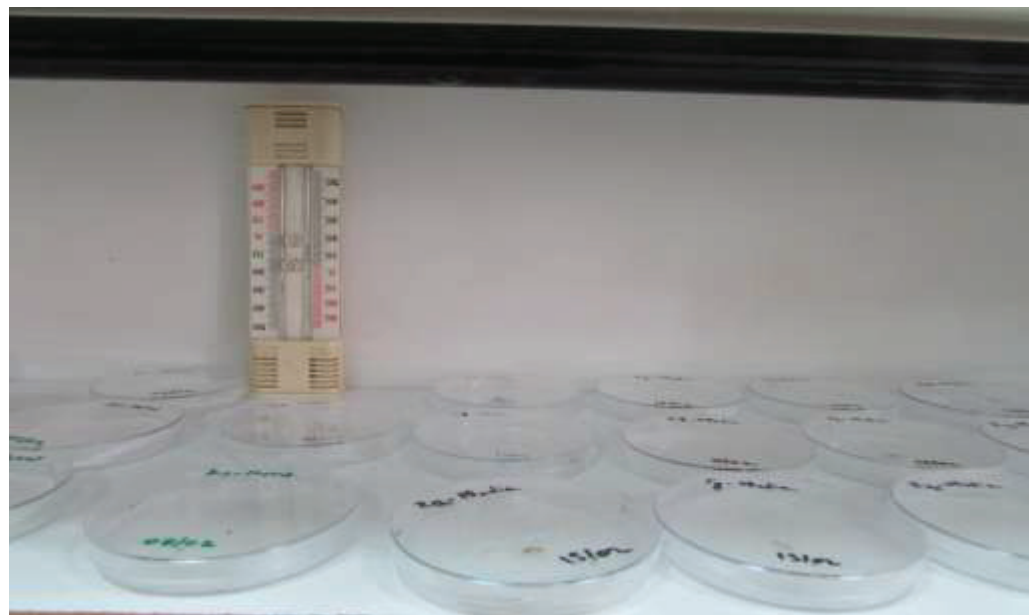
Εικόνα 10: Δείγματα χώματος στον εργαστηριακό πάγκο, Ινστιτούτο Προστασίας Φυτών Πάτρας (φωτογραφία από το αρχείο του Ιωάννη Πέττα, 2016).

Κάθε 7 ημέρες οι θάλαμοι ελέγχονταν ως προς την παρουσία νεκρών ατόμων (ακμαίων ή προνυμφών), τα οποία απομακρύνονταν και εν συνεχεία αποστειρώνονταν επιφανειακά, για την αποφυγή ανάπτυξης σαπροφυτικών μυκήτων, με εμβάπτιση μερικών δευτερολέπτων σε υποχλωριώδες νάτριο 1%. Στη συνέχεια τοποθετούνταν σε τρυβλία Petri

το οποίο περιείχε δίσκο διηθητικού χαρτιού εμποτισμένο με δις-απεσταγμένο νερό (ddH₂O) (**moist chamber**). Ο χειρισμός των νεκρών ατόμων πραγματοποιούνταν εξ ολοκλήρου σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar flow) για την αποφυγή επιμολύνσεων. Τα τρυβλία με τα νεκρά άτομα μεταφέρονταν στους ειδικά κατασκευασμένους θαλάμους υπό συνθήκες ελεγχόμενης θερμοκρασίας (25±1°C), στο σκοτάδι και πραγματοποιούνταν καθημερινοί έλεγχοι στο στερεοσκόπιο για την εμφάνιση σημείων λόγω προσβολής από εντομοπαθογόνους μύκητες.



Εικόνα 11: Επάνθιση μυκηλίου στο έντομο *Rhyzopertha dominica* (φωτογραφία από το αρχείου του Ιωάννη Πέττα, 2016)



Εικόνα 12: Νεκρές προνύμφες πάνω σε υγρασία σε τρυβλία τύπου Petri (φωτογραφία από το αρχείου του Ιωάννη Πέττα, 2016)

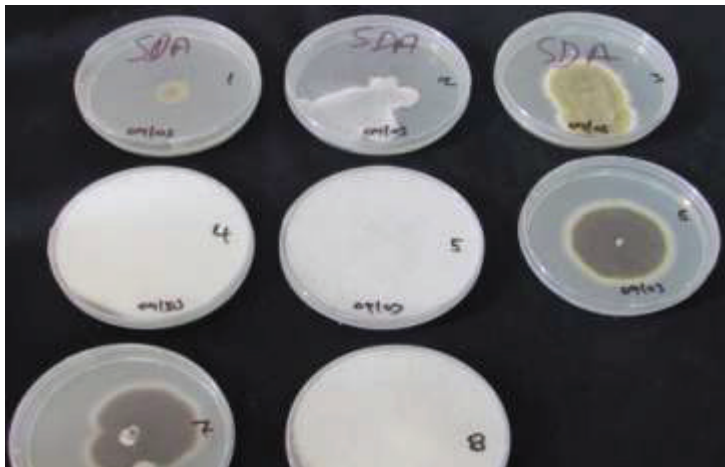
Η μέθοδος που προαναφέρθηκε αναπτύχθηκε από τους Bedding και Akhurst το 1975, και έχει χρησιμοποιηθεί πολλάκις και με επιτυχία σε πάρα πολλές έρευνες. Οι συγκεκριμένοι ερευνητές χρησιμοποίησαν προνύμφες του κηρόσκορου (*Galleria mellonella*) ως δόλωμα για την παγίδευση εντομοπαθογόνων νηματωδών του εδάφους. Στην παρούσα πειραματική μελέτη σαν δόλωμα χρησιμοποιήθηκαν άτομα των ειδών *Sitophilus granarius*, *Rhizopertha dominica*, *Tribolium confusum*, *Trogoderma granarium*, *Tenebrio molitor* και *Ephestia kuehniella*, όπως προαναφέρθηκε.

2.3 Θρεπτικό υλικό Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

Γύρω στο 1800 μ.Χ., ο γαλλικής καταγωγής δερματολόγος Raymond J. A. Sabouraud ανέπτυξε ένα θρεπτικό υλικό, Sabouraud Dextrose Agar - SDA, με σκοπό να μπορέσει να μελετήσει την ανάπτυξη μυκήτων που προκαλούν λοιμώξεις στο δέρμα, τα μαλλιά και τα νύχια (Sabouraud, 1896).

Το SDA παρασκευάζεται ως εξής:

1. Σε 1000 ml κρύου αποστειρωμένου νερού προστίθενται 65g λυοφιλιωμένου Sabouraud Dextrose Agar εμπορίου.
2. Το μίγμα θερμαίνεται σε μπεν μαρί για να διαλυθεί το μέσο εντελώς.
3. Έπειτα διανέμεται σε κωνικές φιάλες και αποστειρώνεται σε κλίβανο για 15 λεπτά στους 121°C.
4. Η τελική αντίδραση του μέσου είναι: pH=5,6.
5. Στη συνέχεια πριν το μέσο στερεοποιηθεί τοποθετείται σε αποστειρωμένα τρυβλία τύπου Petri.



Εικόνα 13: Απομονώσεις μυκήτων σε θρεπτικό υλικό SDA (Ινστιτούτο Πάτρας, 2016).

2.4 Απομόνωση εντομοπαθογόνων μυκήτων

Όλα τα νεκρά άτομα, ακμαία και προνύμφες που εμφάνισαν ανάπτυξη μυκηλίου στον εξωσκελετό τους, μεταφέρθηκαν ολόκληρα σε τρυβλία Petri που περιείχε ως υπόστρωμα το θρεπτικό υλικό SDA. Εξάλλου, τμήματα του μυκηλίου απομονώθηκαν από το σώμα των νεκρών ατόμων και πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια στο ίδιο υλικό.

Τα τρυβλία φυλάσσονταν σε θερμοκρασία $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ στο σκοτάδι προς επώαση και ανάπτυξη των μυκήτων.

Αν παρατηρούνταν ανάπτυξη κάποιου μύκητα, πραγματοποιούνταν απομόνωση και επανάληψη της καλλιέργειας με στόχο ανάπτυξη καθαρών καλλιεργειών ώστε να είναι δυνατή η αναγνώριση του είδους του μύκητα μέσω μικροσκοπικής εξέτασης για την ταυτοποίηση του είδους βάσει του σχήματος και του μεγέθους των σπορίων (όπου ήτο δυνατό).

Στη συνέχεια, με τη βοήθεια του κυρίου Ιωάννη Πέττα, μεταπτυχιακού φοιτητή, και κατά τη διάρκεια εκπόνησης της - σχετικής με το παρόν αντικείμενο - μεταπτυχιακής του διατριβής, πραγματοποιήθηκε διαδικασία ταυτοποίησης μέσω αλληλούχισης του γενετικού υλικού των μυκήτων (DNA sequencing),

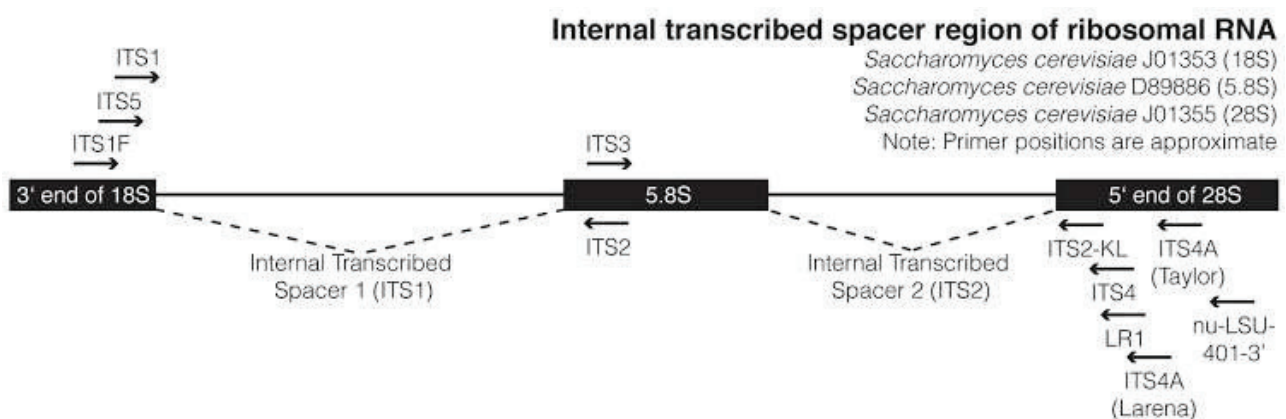


Εικόνα 14: Προσβεβλημένες προνύμφες από εντομοπαθογόνους μύκητες (Ινστιτούτο Πάτρας, 2016)

2.5 Αλληλούχιση DNA (DNA sequencing)

Η βασική ταυτοποίηση και ταξινόμηση των μυκήτων πραγματοποιείται με τις παραδοσιακές μεθόδους παρατήρησης των μακροσκοπικών, δια γυμνού οφθαλμού, αλλά και υπομικροσκοπικών, με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου, δομών και των χαρακτηριστικών τους. Ωστόσο τα χαρακτηριστικά αυτά μπορεί να παραλλάσουν ανάλογα με το περιβάλλον ανάπτυξης και έκθεσης των μυκήτων και έτσι να δυσχεραίνεται η όλη διαδικασία. Για το λόγο αυτό αναπτύχθηκαν διάφορες μοριακές μέθοδοι που βοηθούν να επιτυγχάνεται καλή διαφοροποίηση ειδών και απομονώσεων και αδιάψευστη ταυτοποίησή τους (Jimenez et al., 1999; Mirhosseini et al., 2010).

Στην περίπτωση των μυκήτων λοιπόν, το ριβοσωμικό DNA (rDNA) αποτελεί τον στόχο βάσει του οποίου γίνεται η φυλογενετική διαφοροποίηση των μυκήτων. Το rRNA κωδικοποιεί μια εσωτερικά μεταγραφόμενη περιοχή (Internal Transcribed Spacer - ITS) υψηλά πολυμορφική, 600-800 bp, η οποία χρησιμοποιείται και για τη διαφοροποίηση πολλών ειδών οργανισμών αλλά και μυκήτων (Anderson & Cairney, 2004; Anderson & Parkin, 2007; Larena et al., 1999). Η πλήρης ITS περιοχή έχει ένα μέσο μήκος 600 ζευγών βάσεων (bp) σε όλες τις γενεαλογικές σειρές μυκήτων και μέσο μήκος 500 και 600 bp για τους ασκομύκητες και τους βασιδιομύκητες, αντίστοιχα (Porter & Golding, 2011). Παρ' ολ' αυτά, η αξιοποίηση ολόκληρων των διαφορετικών αλληλουχιών ITS είναι δύσκολη λόγω του μεγάλου μήκους τους, έτσι στη φυλογενετική ανάλυση χρησιμοποιείται η εξαιρετικά διατηρημένη περιοχή 5.8S (Pringle et al., 2003, Nagano et al., 2010) (Εικ. 15).



Εικόνα 15: Fungal Internal Transcribed Spacer (ITS)

2.5.1 Απομόνωση DNA (DNA extraction)

Η απομόνωση του DNA από έναν οργανισμό είναι το πρώτο βήμα για τη μοριακή του ταυτοποίηση. Το αυτό ισχύει και την περίπτωση των μυκήτων.

Για την απομόνωση του DNA (DNA extraction) πραγματοποιούνται τα ακόλουθα βήματα:

1. Από υγρή καλλιέργεια του μύκητα σε θρεπτικό μέσο λαμβάνεται τμήμα μυκηλίου.
2. Το μυκήλιο μεταφέρεται με τη βοήθεια αποστειρωμένης βελόνας σε σωλήνα Eppendorf, όπου προστίθεται 200 μl διάλυμα SDS.
3. Ομογενοποίηση με οδοντιατρικό εργαλείο επί κεφαλής τρυπανιού οικιακής χρήσης, με στροφές κατά το δοκούν ώστε να μην υπερθερμαίνεται ή καταστρέφεται το σωληνάριο για 1' – 3' έως ότου παρατηρηθεί ικανοποιητική ομογενοποίηση.
4. Προσθήκη 300 μl από το ίδιο διάλυμα.
5. Προσθήκη ίσου όγκου μίγματος φαινόλης – χλωροφορμίου/ ισοαμυλικής αλκοόλης ογκομετρικής αναλογίας 25:24:1 και γίνεται ανάδευση.
6. Φυγοκέντρηση για 1h στις 10.800 r/m στους 4°C.
7. Η υπερκείμενη υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα Eppendorf, όπου προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου.
8. Ανάδευση.
9. Φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min στις 15.000 r/m.
10. Η υπερκείμενη υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα Eppendorf, ογκομετρείται και προστίθεται ίσος όγκος ισοπροπανόλης θερμοκρασίας -20°C.
11. Ανάδευση.
12. Αποθήκευση στους -20 °C για 15 min.
13. Φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min στις 15.000 r/m.
14. Η υπερκείμενη φάση απορρίπτεται και προστίθενται 200 μl μίγματος αιθανόλης/ αποστειρωμένου ύδατος ογκομετρικής αναλογίας 7:3.
15. Φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min στις 15.000 r/m.
16. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει στους 55°C για 10 λεπτά.
17. Το ίζημα αναδιαλύεται σε 50μL ddH₂O.
18. Αποθήκευση στους -33°C.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την προηγούμενη διαδικασία και την απομόνωση του DNA είναι τα εξής:

I. Διάλυμα SDS (100ml):

0,5 g SDS, 1,46g NaCl, 0,73 g EDTA, 20 ml Tris-HCl 1M.

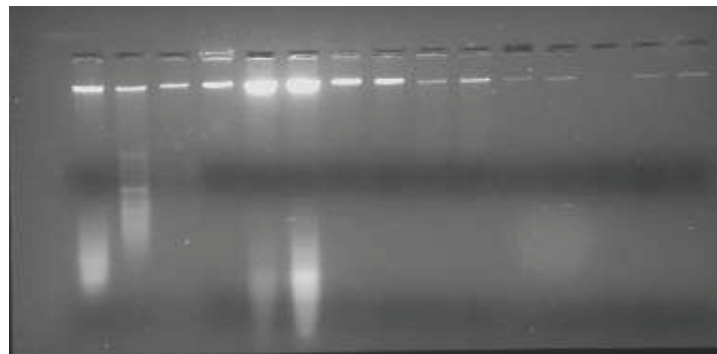
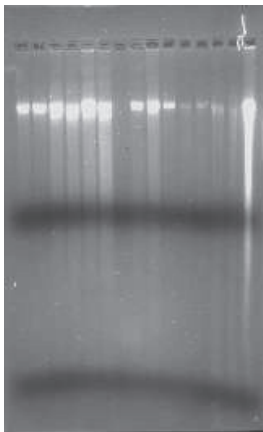
II. Μίγμα Φαινόλης /χλωροφόρμιου/ ισοαμλικής αλκοόλης 25:24:1:

Μίγμα 25 μονάδων όγκου φαινόλης με 24 μονάδες όγκου χλωροφορμίου και μίας ισοαμλικής αλκοόλης.

2.5.2 Έλεγχος του DNA

Ο έλεγχος της παρουσίας DNA στα δείγματα έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, ως γίνεται τυπικά σε πειράματα μοριακής βιολογίας.

Ακολούθησε ποσοτικοποίηση της ποσότητας του DNA που πραγματοποιήθηκε με μικροφωτόμετρο σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.



Εικόνες 16, 17: Ανίχνευση απομονωθέντων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 2%

2.5.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction =PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια μέθοδος βιοχημείας και μοριακής βιολογίας που αναπτύχθηκε το 1985 και χρησιμοποιείται για την *in vitro* ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων του DNA, δηλαδή την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA μέσω ενζυμικής αναπαραγωγής. Η χρήση αυτής της τεχνικής επιτρέπει τη γρήγορη αναγνώριση, ανίχνευση και διαφοροποίηση συγκεκριμένων ειδών χωρίς την ανάγκη δημιουργίας καθαρών καλλιιεργειών (Sartori et al., 2010).

Η χρησιμότητα της μεθόδου έγκειται στο γεγονός ότι η ποσότητα του DNA που απομονώνεται από έναν οργανισμό είναι πολύ μικρή για να μπορέσει να μελετηθεί. Με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, μια επιλεγμένη περιοχή ενός γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέχρι και δισεκατομμύρια φορές, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω σε διάφορες μοριακές τεχνικές.

Στην PCR απαιτείται η παρουσία ενός ζεύγους συνθετικών ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers) συμπληρωματικά με συγκεκριμένες περιοχές του δίκλωνου DNA του οργανισμού του οργανισμού – στόχου. Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR απαιτείται επώαση των δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες και επεξεργασία του DNA σε τρία στάδια:

- (α) Αποδιάταξη (denaturation): η διπλή έλικα του DNA-στόχου αποδιατάσσεται, δηλαδή διαχωρίζονται οι δύο επιμήκεις αλυσίδες
- (β) υβριδοποίηση των εκκινητών (annealing): οι εκκινητές υβριδοποιούνται (ενώνονται) με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες του DNA-στόχου και
- (γ) επιμήκυνση (extension): με τη βοήθεια του ενζύμου DNA πολυμεράση επιμηκώνονται οι αλληλουχίες των υβριδισμένων εκκινητών με κατεύθυνση 5'–3' χρησιμοποιώντας ως μήτρα τον DNA-στόχο όπου έχουν προσδεθεί οι εκκινητές.

Στο τέλος του παραπάνω κύκλου, η ποσότητα της συγκεκριμένης περιοχής του δίκλωνου DNA του οργανισμού του οργανισμού – στόχου που έχουμε επιλέξει θεωρητικά διπλασιάζεται. Μετά από μερικούς κύκλους το επικρατές προϊόν είναι ένα τμήμα DNA που αντιστοιχεί στην μεταξύ των δύο αρχικών εκκινητήρων απόσταση.

Η PCR, στο σύνολό της, ολοκληρώνεται μετά από 30–50 τέτοιους κύκλους (καθένας από τους οποίους αποτελείται από τα παραπάνω τρία στάδια) και στο τέλος κάθε κύκλου η

ποσότητα των προϊόντων της αντίδρασης θεωρητικά διπλασιάζεται. Η όλη διαδικασία διεξάγεται σε προγραμματισμένους θερμικούς κυκλοποιητές (thermal cyclers) και έχει τελικά αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση του συνολικού αριθμού των αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου.

Στην περίπτωση που η περιοχή του DNA που έχουμε επιλέξει να ενισχύσουμε είναι χαρακτηριστική ενός είδους, η χρήση της PCR μας επιτρέπει να το αναγνωρίσουμε (ταυτοποιήσουμε) ή να το διαφοροποιήσουμε από ένα σύνολο.

2.5.4 Η PCR στην παρούσα μελέτη

I. Αλληλουχίες εκκινητών

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη αφορούσαν την περιοχή ITS, σύμφωνα και με όσα προαναφέρθηκαν.

Name	Conc (pmol/μL)	Sequence	Tm
ITS-4	100	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	(1 M Na+) 66
ITS-5	100	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'	(1 M Na+) 68

Εικόνα 18: Οι εκκινητές ITS και τα χαρακτηριστικά τους.

II. Πρόγραμμα θερμικού κυκλοποιητή

Η PCR για την παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σε 30 κύκλους:

1^ο στάδιο: 1 min @95°C

2^ο στάδιο: 1 min @55°C

3^ο στάδιο: 90sec @72°C.

Μετά το πέρας των 30 κύκλων ακολούθησε 1 κύκλος τριών σταδίων (1min @95°C, 1min @55°C, 5 min @72°C).

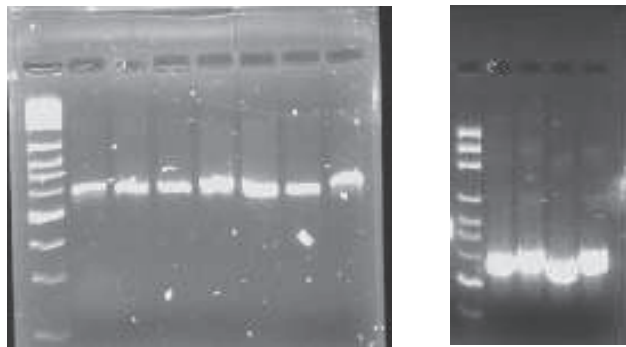
III. Αντιδραστήρια αντίδρασης PCR

- dNTPs 0,4mM
- MgCl₂ 1,5mM
- Ταq πολυμεράση 0,07u/λ
- εκκινητές 1 pmol/λ έκαστος
- Υπόστρωμα DNA: 5μl (άμεσα απομονωμένου ή αραιωμένου DNA, ανάλογα με την αρχική του συγκέντρωση).

Κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιούνταν σε συνολικό όγκο 50μl.

IV. Ηλεκτροφόρηση

Τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2,0% σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.5xTBE υπό ένταση ~100mA με τυπικό διάλυμα φόρτωσης και φθορίζουσα χρωστική Sybr Safe Green.



Εικόνες 19, 20: Ανάλυση των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 2%

V. Αλληλούχιση

Η αλληλούχιση των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε από τον κύριο Ιωάννη Πέττα και αποτελούσε μέρος της μεταπτυχιακής του διατριβής.

Κεφάλαιο 3 – Αποτελέσματα

3.1 – Ποσοστά θνησιμότητας επί των νεκρών ατόμων

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα ποσοστά θνησιμότητας των προνυμφών 3ης και 4ης ηλικίας και των νεαρών ακμαίων.

Είδος	Περιοχές	Ποσοστό θνησιμότητας (%)
<i>Tenebrio molitor</i> (νεαρά ακμαία)	Ανεμογεννήτριες	100
	Πανόπουλου-Φολόη	73
<i>Rhyzopertha dominica</i> (νεαρά ακμαία)	Ανεμογεννήτριες	80
	Πανόπουλου-Φολόη	0
<i>Tribolium confusum</i> (νεαρά ακμαία)	Ανεμογεννήτριες	0
	Πανόπουλου-Φολόη	10
<i>Trogoderma granarium</i> (προνύμφες 4 ^{ης} ηλικίας)	Ανεμογεννήτριες	7
	Πανόπουλου-Φολόη	43
<i>Ephestia kuehniella</i> (προνύμφες 4 ^{ης} ηλικίας)	Ανεμογεννήτριες	27
	Πανόπουλου-Φολόη	17
<i>Plodia interpunctella</i> (προνύμφες 3ης ηλικίας)	Ανεμογεννήτριες	0
	Πανόπουλου-Φολόη	13

3.2 – Μύκητες που ανιχνεύθηκαν μέσω της τεχνικής παγίδευσής τους με έντομα

Στη συνέχεια παρουσιάζεται το πανόραμα των μυκήτων που ανιχνεύθηκαν μέσω της τεχνικής παγίδευσης με έντομα (bait method).

Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες που προκάλεσαν θνησιμότητα ταυτοποιήθηκαν κατόπιν μικροσκοπικής εξέτασης και παρατήρησης, με βάση το σχήμα και το μέγεθος των κονιδίων τους. Όπου κρίθηκε αναγκαίο έγινε επιβεβαίωση της ταυτοποίησης χρησιμοποιώντας τη μέθοδο αλληλούχισης του DNA (DNA sequencing) προκειμένου να επιβεβαιωθεί το είδος

του μύκητα.

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται τα είδη των μυκήτων, ανά περιοχή και ανά έντομο-παγίδα.

Είδος	Περιοχές	Μύκητας
<i>Tenebrio molitor</i> (νεαρά ακμαία)	Ανεμογεννήτριες	<i>Metarhizium</i> spp. άγνωστο
	Πανόπουλου-Φολόη	<i>Nigrospora</i> sp. άγνωστο
<i>Rhizopertha dominica</i> (νεαρά ακμαία)	Ανεμογεννήτριες	<i>Aspergillus alliaceus</i> άγνωστο άγνωστο βακτήριο
	Πανόπουλου-Φολόη	<i>Chaetomium acropullum</i> άγνωστο βακτήριο
<i>Tribolium confusum</i> (νεαρά ακμαία)	Ανεμογεννήτριες	<i>Beauveria bassiana</i> άγνωστο
	Πανόπουλου-Φολόη	<i>Aspergillus</i> sp. <i>Chaetomium truncatulum</i> άγνωστο Βακτήριο άγνωστο
<i>Trogoderma granarium</i> (προνύμφες 4 ^{ης} ηλικίας)	Ανεμογεννήτριες	άγνωστο
	Πανόπουλου-Φολόη	Βακτήριο
<i>Ephestia kuehniella</i> (προνύμφες 4 ^{ης} ηλικίας)	Ανεμογεννήτριες	άγνωστο
	Πανόπουλου-Φολόη	Άγνωστο άγνωστο
<i>Plodia interpunctella</i> (προνύμφες 3ης ηλικίας)	Ανεμογεννήτριες	<i>Beauveria</i> sp.
	Πανόπουλου-Φολόη	άγνωστο

Παρακάτω παρατίθενται οι εικόνες των καλλιεργειών των μυκήτων *Aspergillus alliaceus* και *Chaetomium truncatulum* που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της παρούσας εργασίας.



Εικόνα 21: Ο μύκητας *Aspergillus alliaceus*
(φωτογραφία από το αρχείο του Ιωάννη Πέττα, 2016).



Εικόνα 22: Ο μύκητας *Chaetomium truncatulum*
(φωτογραφία από το αρχείο του Ιωάννη Πέττα, 2016).

Κεφάλαιο 4 - Συζήτηση

Η σύγχρονη τάση στο πεδίο της παραγωγής αγροτικών διατροφικών προϊόντων με ολοκληρωμένες μεθόδους παραγωγής και διαχείρισης ευνοεί την ανάπτυξη νέων βιολογικών σκευασμάτων και την αντικατάσταση των χημικών συνθετικών ουσιών που εφαρμόζονται ευρέως για την αντιμετώπιση των εχθρών και των ασθενειών των καλλιεργειών.

Για το σκοπό αυτό, πολλά είδη εντομοπαθογόνων μυκήτων έχουν δοκιμαστεί και χρησιμοποιούνται εναντίον διαφόρων επιβλαβών εντόμων και επιδεικνύουν ικανοποιητικά επίπεδα ελέγχου των πληθυσμών τους. Από τα πιο γνωστά είδη που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία είναι οι εντομοπαθογόνοι μύκητες της τάξης *Hypocreales* *Metarhizium robertsii* και *Baueveria bassiana* (Glare et al. 2002, Tefera και Pringle 2003, 2004, Liu και Buer 2006, Marannino et al. 2006, Er et al. 2007, Meyer et al. 2008, Zimmermann 2008, Godonou et al. 2009, Abood et al. 2010, Sevim et al. 2010, Pogetto et al. 2012).

Η χρήση των εντομοπαθογόνων μυκήτων δεν απαιτεί ταυτόχρονη κατάργηση των συνθετικών σκευασμάτων αλλά δημιουργεί ένα καινούριο πλαίσιο συνεργασίας με το περιβάλλον και εξασφαλίζει προστασία και προϊόντα υψηλότερης ποιότητας στον μέσο καταναλωτή. Αποτελεί ένα πεδίο έρευνας που οδηγεί σε μια φιλική ως προς το περιβάλλον γεωργία έχοντας σαν γνώμονα την προστασία του περιβάλλοντος. Υπάρχουν πολλά είδη μυκήτων χρησιμοποιούνται στη Βιολογική Αντιμετώπιση των ζωικών εχθρών των καλλιεργειών, με πιο μελετημένο και γνωστό τον μύκητα *B. bassiana* (Pingel και Lewis 1996, Vandenberg et al. 1998, Keller et al. 1997, 1999, Tefera και Pringle 2003, 2004, Ownley 2004, Liu και Bauer 2006, Amora et al. 2009), ο οποίος κατά την διάρκεια αυτής της μελέτης προσδιορίστηκε μαζί με τους μύκητες *Aspergillus alliaceus* και *Chaetomium truncatulum* που αναφέρονται πρώτη φορά ως εν δυνάμει παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης, ενώ τα δεδομένα για τη δράση των συγκεκριμένων μυκήτων εναντίον εντόμων είναι ελάχιστα στην διεθνή βιβλιογραφία.

Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες συλλέγονται παραδοσιακά με την δολωματική μέθοδο (Insect bait method) χρησιμοποιώντας ως έντομο παγίδα τον κηρόσκωρο (*Galleria melonella*) και προσδιορίζονται με τη μέθοδο των ημικλεκτικών υποστρωμάτων (Strasser et al. 1996) ή μοριακά με γονιδιακή αλληλούχιση (DNA sequencing) των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).

Η ανεύρεση και η μοριακή ταυτοποίηση άλλων ειδών εντομοπαθογόνων μυκήτων μπορεί δυνητικά να παρέχει προστασία από πλήθος άλλων επιβλαβών για τις καλλιέργειες

εχθρών.

Στην παρούσα εργασία έγινε μια προσπάθεια να ελεγχθεί το κατά πόσον άλλα έντομα μπορούν να χρησιμοποιούνται ως έντομα-παγίδες κατά την εφαρμογή της δολωματικής μεθόδου, με σκοπό να αυξηθεί το εύρος εφαρμογών αλλά ενδεχομένως και να ανιχνευτούν άλλα είδη μυκήτων. Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα εδάφους από δύο περιοχές του Νομού Αχαΐας και έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Δεδομένου ότι η αποτελεσματικότητα των εντομοπαθογόνων μυκήτων εξαρτάται από εσωτερικούς και εξωτερικούς παράγοντες, οι οποίοι τελικά καθορίζουν εάν το παθογόνο θα διαρρήξει την επιδερμίδα του εντόμου-ξενιστή ή όχι και τελικά θα το προσβάλει (Μαντζούκας 2013), η χρήση διαφορετικών, εκτός του *Galleria mellonella*, εντόμων ως μέσα παγίδευσης των μυκήτων μπορεί να αποδειχθεί στο μέλλον σημαντική για την εντομοπαθολογία, ενώ επιπλέον μπορεί να οδηγήσει στην ανεύρεση καινούριων στελεχών εντομοπαθογόνων μυκήτων, πιθανόν πιο αποτελεσματικών από τα μέχρι σήμερα χρησιμοποιούμενα στελέχη. Αφετέρου η χρήση άλλων εντόμων μπορεί να οδηγήσει σε οικονομία κλίμακος, αφού η χρήση οικονομικότερων εκτροφών – η εκτροφή του κηρόσκωρου αποτελεί ένα περιοριστικό παράγοντα στη μείωση του κόστους της παραπάνω μεθοδολογίας - θα μειώσει δυνητικά το συνολικό κόστος.

Στην παρούσα εργασία δοκιμάστηκε και επιβεβαιώθηκε η αποτελεσματικότητα τεσσάρων κολεοπτέρων: *Tenebrio molitor*, *Rhyzopertha dominica*, *Tribolium confusum* και *Trogoderma granarium* και δύο λεπιδοπτέρων *Ephestia kuehniella* και *Plodia interpunctella* ως εντόμων-παγίδων για την ανίχνευση εντομοπαθογόνων μυκήτων.

Εκτός από την χρήση καινούριων εντόμων-παγίδων, η ταυτοποίηση των στελεχών των εντομοπαθογόνων μυκήτων *Aspergillus alliaceus* και *Chaetomium truncatulum* που προέκυψαν, αποτελεί σημαντικό εύρημα της παρούσας εργασίας και τα είδη αυτά αναφέρονται πρώτη φορά ως εν δυνάμει παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης

Η βελτίωση των μεθόδων ολοκληρωμένης διαχείρισης εχθρών και ασθενειών των καλλιεργειών μέσω μελετών αποτελεσματικότητας, μολυσματικότητας, εύρεσης νέων ξενιστών, ενδοφυτικότητας, θα διευρύνουν τη δυνατότητα εφαρμογών των εντομοπαθογόνων μυκήτων ως μέσα αντιμετώπισης σε ευρύτερη κλίμακα, συνεισφέροντας ουσιαστικά στον ευαίσθητο τομέα της φυτοπροστασίας, τη διασφάλιση της ποιότητας των γεωργικών προϊόντων που παράγονται στην χώρα μας, αλλά και της υγείας των καταναλωτών που είναι και ο τελευταίος αποδέκτης αυτών.

Κεφάλαιο 5 - Βιβλιογραφία

- Anderson, I. C., & Cairney, J. W. G. (2004). Diversity and ecology of soil fungal communities: Increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology*, 6(8), 769–779. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00675.x>
- Anderson, I. C., & Parkin, P. I. (2007). Detection of active soil fungi by RT-PCR amplification of precursor rRNA molecules. *Journal of Microbiological Methods*, 68(2), 248–253. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.08.005>
- Bing, L. A., Lewis, L. C., 1992a. Temporal relationships between *Zea mays*, *Ostrinia nubilalis* (Lep.: Pyralidae) and endophytic *Beauveria bassiana*. *Entomophaga*. 37: 525–536.
- Bing, L. A., Lewis, L. C., 1992b. Endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in corn: the influence of the plant growth stage and *Ostrinia nubilalis* (Hubner). *Biocontrol Science and Tech.* 2: 39–47.
- Brobyn, P.J., Wilding, N., Clark, S.J., 1987. Laboratory observations on the effect of humidity on the persistence of infectivity of conidia of the pathogen *Erynia neoaphidis*. *Ann. Appl. Biol.* 110: 579-584.
- Butt, T. M., Brahim, L., Clark, S. J., Beckett A., 1995. The germination behavior of *Metarhizium anisopliae* on the surface of aphid and flea beetle cuticle. *Mycol Res.* 99: 945-950.
- Butt, T. M., 2002. Use of entomogenous fungi for the control insect pests. *The Mycota XI Agricultural applications*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp 111-134.
- Charnley, A. K., 1984. Physiological aspects of destructive pathogenesis in the insects by fungi: a speculative review. In. Anderson, J.M., Rayner A.D.M. Walton, D.W.H. (Eds.) *Ivr. Microb. Interactions*. Brit. Mycol. Soc. Symp., Vol 6. Cambridge Un. Press London, pp 229 -270.
- Charnley, A. K., 1990. Secondary metabolites, toxins and entomopathogenic fungi: an evolutionary perspective. *Vth Inter. Coll. Inv. Path and Micr. Contr.* Adelaide.

- Copping, L. G., 2001. The BioPesticide manual, Second edition. British crop protection council, U.K., p: XIIV-XIVII, 3-154, 161-3, 494-6. Cornell Extension Service. Retrieved on 2006-12-14.
- Godfray, H.C.J. 1994. Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Gunsalus, I.C. and Stanier, R.Y. 1960. Bacteria V.I. Academic Press Inc. London.
- Hackman, R. H., 1974. Chemistry of the insect cuticle. In: The Physiology of Insecta, 2nd ed., Vol. VI. Academic Press, New York, In: Entomology, Cedric Gillot 3rd edition, 2005.
- Hajek, A.E., McManus, M.L. and Delalibera, I. 2007. A review of introductions of pathogens and nematodes for classical biological control of insects and mites. Biological Control. 41(1): 1-13.
- Huber, J. 1990. Viral insecticides: Profits, Problems, and Prospects. In: Pesticides and alternatives, innovative chemical and biological approaches to pest control, Ed: Cassida, J., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Oxford, N.Y., p: 117-121.
- Jimenez, L., Bosko, Y., Smalls, S., Ignar, R., & English, D. (1999). Molecular detection and identification of *Aspergillus niger* contamination in cosmetic/pharmaceutical raw materials and finished materials. Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology, 7(1), 39–46. <http://doi.org/10.1111/j.1745-4581.1999.tb00370.x>
- Katsoyannos, P., 1996. Integrated Insect Pest Management for Citrus in Northern Mediterranean Countries. Benaki Phytopathological Institute.
- Kontodimas, D.C., Kavallieratos, N.G., Mantzoukas, S.D., Athanassiou, C.G. & Anagnostou-Veroniki, M., 2004. Effect of *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* and azadiractin compounds on *Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium confusum* Du Val in stored rye. 37th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, 7th International Conference on *Bacillus thuringiensis*, August 1-6, 2004, Helsinki, Finland.
- Κοντοδήμας, Δ.Χ. και Ανάγνου-Βερονίκη, Μ., 2003. Πρόληψη & έλεγχος εχθρών αστικού και περιαστικού πρασίνου. Εισ Πρακτικά Ημερίδας: “Αστικό & Περιαστικό Πράσινο” – Πάτρα, 10 Μαΐου 2003. Διοργάνωση: ΓΕΩΤ.Ε.Ε., Παράρτημα Πελοποννήσου & Δ. Στερεάς και Σύλλογος Γεωπόνων Αχαΐας, Κεφαλληνίας & Ζακύνθου: 50-59.

- Κοντοδήμας, Δ.Χ. και Μεντή, Χ. 2006. Χρήση εντομοπαθογόνων μικροοργανισμών για την αντιμετώπιση των εντόμων εχθρών των καλλιεργειών. Εις Πρακτικά Ημερίδας : "Σύγχρονες Μέθοδοι Αντιμετώπισης Εχθρών των Καλλιεργειών" – Θεσσαλονίκη, 2 Φεβρουαρίου 2006. Συνδιοργάνωση Εντομολογική Εταιρεία Ελλάδος και HELEXPO ΑΕ., στα πλαίσια της AGROTICA 2006.
- Lacey, L.A., Frutos, R., Kaya, H.K. and Vail, P. 2001. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do they Have a Future?. *Biological Control*. 21(3): 230-248.
- Larena, I., Salazar, O., González, V., Julián, M. C., & Rubio, V. (1999). Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. *Journal of Biotechnology*, 75(2), 187–194. [http://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00154-6](http://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00154-6)
- Leger, R.G.S. and Wang, C. 2010. Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insects pests. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85(4): 901-907.
- Λυκουρέσης, 1995. Ολοκληρωμένη αντιμετώπιση εντόμων –εχθρών καλλιεργειών. Αθήνα: Πανεπιστημιακές παραδόσεις.
- Madigan, MT.; Martingo, JM.; Parker, J. 2007. Brock: Βιολογία των Μικροοργανισμών Τόμος II. Αθήνα: Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
- McCoy, C. W., Samson, R. A., Boucias, D. G., 1988. Entomogenous fungi. In: Ignoffo CM (ed) CRC Handbook of Natural Pesticides vol V. Microbial insecticides, part A. Entomogenous protozoa and fungi. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 151–236.
- Meyling, 2007. Methods for isolation of entomopathogenic fungi from the soil environment.
- Μοριακή ταυτοποίηση και in vitro εκτίμηση της ανάπτυξης μυκήτων από αρτοσκευάσματα τύπου BRIOCHE, ΓΠΑ, Μπερτόλη Μαρία- Αθανασία Αθήνα, Ιούνιος 2016 <https://sites.google.com/site/mpnelsen/primer-maps>
- Obornik, M. 2009. Insect pathogens: Molecular approaches and techniques. University of Arizona, Tuscon, USA.
- Poinar Jr., G.O. and Thomas, G.M., 1978. Diagnostic manual for the identification of insect pathogens. E.d.: Plenum Press, N.Y. and London, p: 1-151.

- Porter, T. M., & Brian Golding, G. (2011). Are similarity- or phylogeny-based methods more appropriate for classifying internal transcribed spacer (ITS) metagenomic amplicons? *New Phytologist*, 192(3), 775–782. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03838.x>
- 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: 1195–1200.
- Prasertphon, S., Tanada, Y. 1968. The formation and circulation in *Galeria*, of hyphal bodies of entomophthoraceous fungi. *J. Inv. Pathol.* 11: 260-280.
- Sartori, D., Taniwaki, M. H., Iamanaka, B., & Fungaro, M. H. P. (2010). Molecular Diagnosis of Ochratoxigenic Fungi. In Y. Gherbawy & K. Voigt (Eds.), *Molecular Identification of Fungi* (pp. 195–212). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. http://doi.org/10.1007/978-3-642-05042-8_10
- Shahid, A.A., Rao, A.Q., Bakhsh, A. and Husnain, T. 2012. Entomopathogenic fungi as biological controllers: New insights into their virulence and pathogenicity. *Arch.Biol.Sci.* 64(1): 21-42.