

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Ηπείρου
Διατμηματικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών
" Αγροχημεία και Βιολογικές Καλλιέργειες "

*" Χρήση εντόμων ως μέσα παγίδευσης εντομοπαθογόνων μυκήτων σε εδάφη
του νομού Αχαΐας "*

Πέττας Ιωάννης

Ιωάννινα 2017

Εξεταστική Επιτροπή

Πατακιούτας Γεώργιος, Επιβλέπων

Υφαντή Παρασκευή

Μαντζούκας Σπυρίδων

*Σε όλη τη διάρκεια της Ιστορίας, ο άνθρωπος έπρεπε να παλεύει με τη Φύση για να επιβιώσει.
Σ' αυτόν τον αιώνα, έχει αρχίσει να συνειδητοποιεί ότι για να επιβιώσει, πρέπει να την
προστατέψει.*

Ζακ - Υβ Κουστό

Πίνακας Περιεχομένων

	Σελίδα
Πρόλογος.....	6
Περίληψη.....	7
Abstract.....	8
Κεφάλαιο 1 - Εισαγωγή	9
1.1 Παθολογία εντόμων.....	9
1.2 Εντομοπαθογόνοι μύκητες.....	13
1.2.1 Αναγνώριση ξενιστή.....	15
1.2.2 Προσκόλληση – Βλάστηση – Διείσδυση.....	16
1.3 Τρόποι παγίδευσης εντομοπαθογόνων μυκήτων.....	21
1.4 Σκοπός.....	22
Κεφάλαιο 2 – Υλικά και Μέθοδοι	23
2.1 Έντομα.....	23
2.2 Δειγματοληψία – Παγίδευση εντομοπαθογόνων μυκήτων.....	24
2.3 Θρεπτικό υλικό Sabouraud Dextrose Agar (SDA).....	27
2.4 Απομόνωση εντομοπαθογόνων μυκήτων.....	28
2.5 Γονιδιακή ταυτοποίηση (DNA sequencing).....	29
2.5.1 Απομόνωση DNA (DNA extraction).....	29
2.5.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction).....	31
Κεφάλαιο 3 – Αποτελέσματα	33
3.1 Ποσοστό θνησιμότητας και επάνθησης μυκηλίου επί των νεκρών ατόμων.....	33
3.2 Μύκητες που ανιχνεύθηκαν μέσω της τεχνικής παγίδευσής τους με έντομα.....	35
3.3 Μύκητες που ταυτοποιήθηκαν μέσω της αλληλούχισης.....	37
Συζήτηση	47
Βιβλιογραφία	49

Πρόλογος

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

Τον εισηγητή της πτυχιακής εργασίας **Δρ. Πατακιούτα Γεώργιο**, Αναπληρωτή Καθηγητή Ανθοκομίας & Αρχιτεκτονικής Τοπίου, για την ανάθεση της μελέτης μου.

Τον **Δρ. Κοντοδήμα Χ. Δημήτρη**, Αναπληρωτή Ερευνητή του Μπενακείου και Προϊστάμενου του Εργαστηρίου Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας, για το αμέριστο ενδιαφέρον, την καθοδήγηση και προσοχή που μου έδειξε από την πρώτη κιόλας μέρα της συνάντησής μας.

Τον μεταδιδακτορικό 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, για την άψογη συμπεριφορά του και την βοήθεια του στο μοριακό κομμάτι της εργασίας μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον προϊστάμενο του Ινστιτούτου και ερευνητή **Δρ. Ιωάννη Μανουσόπουλο**, ο οποίος έδειξε μεγάλη αφοσίωση για το πείραμα και ήταν αυτός που μελέτησε τα αποτελέσματα προς εξαγωγή ωφέλιμων συμπερασμάτων.

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

Περίληψη

Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού προγράμματος «Αγροχημεία & Βιολογικές Καλλιέργειες» του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και του Τεχνολογικού Ιδρύματος Ηπείρου.

Το πειραματικό της μέρος πραγματοποιήθηκε στο 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 τέσσερις περιοχές οι οποίες είναι ο Γλαύκος, το Ινστιτούτο (περιβάλλοντας χώρος του Ινστιτούτου Προστασίας Φυτών), το Καστρίτσι και το Ζαβλάκι. 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: *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera:Bostryehidae) , *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae) , *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae), *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), και *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae).

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 τους ελαιώνες. Κάθε δύο ημέρες γίνονταν μετρήσεις για νεκρές προνύμφες ή ακμαία. Οι μετρήσεις κράτησαν δεκατέσσερις 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 καλλιιεργειών. Ορισμένες από αυτές τις καθαρές καλλιιεργειες ταυτοποιήθηκαν γονιδιακά για τον πλήρη προσδιορισμό του γένους και είδους του μύκητα ενώ οι υπόλοιπες αναγνωρίστηκαν μέσω μικροσκοπικής εξέτασης.

Τα σημαντικότερα αποτελέσματα αυτής της μελέτης είναι η εξαγωγή των εντομοπαθογόνων μυκήτων *Beauveria bassiana* και *Metarhizium sp.*

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.

Abstract

This study was realised in the framework of the Interdepartmental Postgraduate programme: “Agrochemistry and Biological Cultivation” of the university of Ioannina and the Technological Institute of Epirus.

The experimental part of the study was carried out in the Institute of Plant Protection in Patras and its aim is the detection of entomopathogenic fungi from soil in prefecture of Achaia via various insect bait methods.

Initially, soil samples from four regions, Glafkos, Institute (surrounding area in the Institute of Plant Protection), Kastritsi and Zaviani. The samples were placed in Petri dishes where 3rd and 4th stage larvae as well as adults from six different insects: *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera:Bostrychidae), *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae), *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), και *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) were inserted.

The specific method is based on the already known bait method of entomopathogenic fungi, the Galleria bait method, yet making use of six different species in this study.

The larvae and the young adults were placed by ten in Petri dishes which contained the soil samples. Measurements of dead larvae and adults were carried out every two days. The measurements lasted 14 days. Then, the dead larvae were placed in moist chamber so as to ensure optimum conditions for the growing of the mycelium of entomopathogenic fungi.

Then, the growing's of the mycelia were isolated and inoculated in nutrient medium so as to achieve the development of clear cultivations. Some of these clear cultivations were genetically identified so as to specify thoroughly the species of the fungus while the others were identified via microscopic testing. The most significant results of this study was the deduction of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* και *Metarhizium sp.*

The ultimate aim of this study is to broaden the insect bait method of entomopathogenic fungi on a scientific basis, by boosting the current methods and thus contributing in the improvement of the general principles of Biological Control.

Κεφάλαιο 1 – Εισαγωγή

1.1 Παθολογία Εντόμων

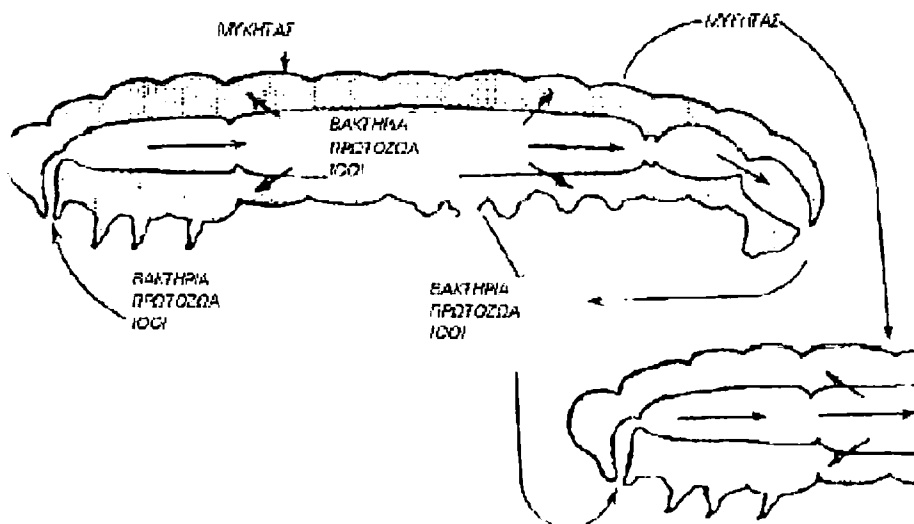
Ως παθογόνος μικροοργανισμός χαρακτηρίζεται ένας μικροοργανισμός που μπορεί να εισχωρήσει στο σώμα ενός οργανισμού- ξενιστή και να είναι αυτός που τελικά θα προκαλέσει κάποια νόσο και ενίοτε το θάνατο του εντόμου-ξενιστή. Μια ασθένεια, για να θεωρηθεί λοιμώδης θα πρέπει να πληρεί κάποιες συγκεκριμένες προϋποθέσεις που διατυπώθηκαν από τον Ρόμπερτ Κοχ το 1882, έπειτα από τη μελέτη που ο ίδιος έκανε σχετικά με τον τρόπο μετάδοσης της φυματίωσης. Σύμφωνα λοιπόν με τα κριτήρια του Κοχ που έχουν εφαρμογή και στη φυτοπαθολογία, μια ασθένεια οφείλεται σε έναν παθογόνο μικροοργανισμό, όταν ο μικροοργανισμός αυτός αρχικά ανιχνεύεται στους ιστούς ή στα υγρά του εντόμου που εμφανίζονται τα συμπτώματα της ασθένειας ή στον οργανισμό εντόμων που πέθαναν από αυτήν την ασθένεια. Ταυτόχρονα, θα πρέπει να μπορεί να απομονωθεί και να καλλιεργηθεί στο εργαστήριο, ενώ παράλληλα θα πρέπει να προκαλεί τα ίδια τυπικά συμπτώματα της ασθένειας σε άλλα έντομα καθώς και να απομονώνεται εκ νέου από αυτά (Madigan *et al.*, 2007).

Πρακτικά, η διάγνωση της ύπαρξης ασθένειας που οφείλεται σε κάποιον παθογόνο μικροοργανισμό από τους εντομολόγους δεν γίνεται πάντα με τον παραπάνω τρόπο, μιας και η καλλιέργεια των μικροοργανισμών είναι αρκετά δύσκολη διαδικασία. Σε ορισμένες περιπτώσεις δε, είναι ανέφικτη, παρόλα την παρακολούθηση και εντέλει την απομόνωση του μικροοργανισμού από προσβεβλημένα έντομα. Τα αρθρόποδα προσβάλλονται από μικροοργανισμούς οι οποίοι προκαλούν υψηλά ποσοστά θνησιμότητας στους πληθυσμούς τους. Τα παθογόνα αυτά προέρχονται από τα ίδια ταξινομικά αθροίσματα οργανισμών που είναι υπεύθυνα για ασθένειες ανώτερων ζώων κυρίως βακτήρια, μύκητες, ιούς, πρωτόζωα και οι νηματώδεις σκώληκες. Οι μικροοργανισμοί αυτοί χρησιμοποιούνται στην βιολογική αντιμετώπιση ως περιοριστικοί παράγοντες. Από τα πιο γνωστά παραδείγματα χρήσης εντομοπαθογόνων μικροοργανισμών είναι το βακτήριο *Bacillus thuringiensis* που χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση λεπιδοπτέρων εντόμων, διπτέρων και κολεοπτέρων (Λυκουρέσης, 1995).

Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται πλέον στα έντομα και στις ασθένειες των εντόμων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός νέου επιστημονικού κλάδου, αυτού της Παθολογίας των 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 πρόοδο του χειρισμού εντομοπαθογόνων μικροοργανισμών για την καταπολέμηση φυτοφάγων εντόμων, στα πλαίσια της βιολογικής καταπολέμησης. Η σωστή επιλογή των φυσικών εχθρών που θα χρησιμοποιηθούν σε κάποια καλλιέργεια έναντι κάποιου επιβλαβούς εντόμου, προϋποθέτει την

άριστη γνώση του βιολογικού κύκλου του εντόμου- φυσικού εχθρού αλλά και αυτή του εντόμου-στόχου, καθώς οι παθογένειες που προκαλούνται δεν είναι ίδιες σε όλα τα έντομα. Μπορεί επίσης να διαφέρουν ακόμα ανάλογα και με το στάδιο ανάπτυξης που βρίσκεται το ίδιο το έντομο. Συνήθως η παθογένεια που προκαλείται είναι μεγαλύτερη στα νεαρά στάδια ανάπτυξης του εντόμου, με συνηθέστερο στο στάδιο της προνύμφης (Steinhaus, 1949; Obornik, 2009).

Κάθε παθογόνο έχει διαφορετικό σημείο εισόδου ή σημείο ανάπτυξης ανάλογα με το έντομο που χρησιμοποιεί ως ξενιστή. Την πιο συνήθη είσοδο των εντομοπαθογόνων μικροοργανισμών αποτελεί η στοματική οδός, ενώ άλλοι παθογόνοι μικροοργανισμοί όπως οι μύκητες για παράδειγμα εγκαθίστανται πρώτα πάνω στην επιφάνεια του εντόμου και στη συνέχεια διαπερνούν το εξωτερικό του περίβλημα με αποτέλεσμα έτσι να εισχωρούν στο εσωτερικό του (Κοντοδήμας και Μεντή, 2006; Obornik., 2009). Στην Εικόνα 1, απεικονίζονται οι οδοί εισόδου διαφόρων εντομοπαθογόνων μικροοργανισμών σε ένα έντομο-ξενιστή. Αντίθετα, τα σημεία εξόδου των εντομοπαθογόνων μικροοργανισμών από το εκάστοτε έντομο-ξενιστή, είναι συνήθως η απεκκριτική οδός αλλά και η επιδερμίδα του εντόμου, διάρρηξη της οποίας προκαλεί την έξοδο του εντομοπαθογόνου μικροοργανισμού (Steinhaus, 1949; Κοντοδήμας και Μεντή, 2006; Obornik, 2009).

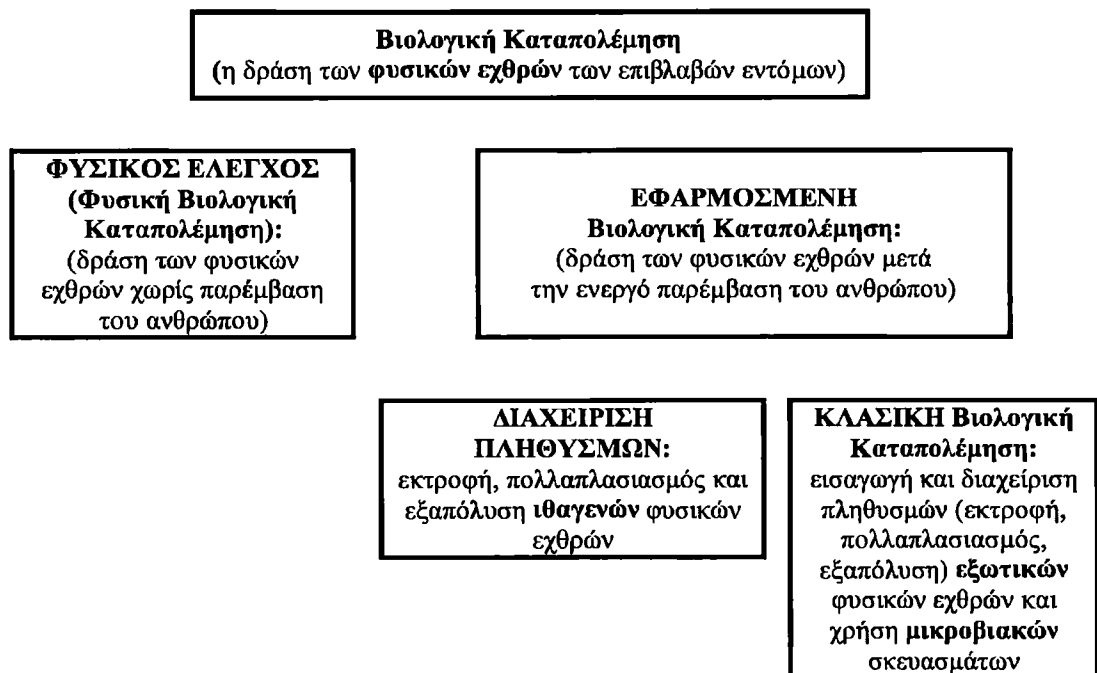


Εικόνα 1: Οδοί εισόδου παθογόνων σε ένα έντομο-ξενιστή.

Η παθολογία των εντόμων αποτελεί ένα σημαντικό κλάδο της βιολογικής διαχείρισης των καλλιεργειών και όπως λέμε πιο συγκεκριμένα της Βιολογικής Αντιμετώπισης. Ο όρος Βιολογική Αντιμετώπιση ή Βιολογική Καταπολέμηση χρησιμοποιείται για να περιγράψει την δράση ζωντανών οργανισμών (παρασιτοειδή, αρπακτικά, παθογόνα) που αποτελούν φυσικούς εχθρούς για διάφορα

επιβλαβή έντομα, με στόχο τον περιορισμό του πληθυσμού τους. Περιλαμβάνει την χρήση σαπροφυτικών κυρίως μικροοργανισμών που καταστέλουν την δραστηριότητα του φυτοπαθογόνου αιτίου, παρεμποδίζουν τη μόλυνση ή περιορίζουν την εκδήλωση μιας ασθένειας, με στόχο την εξασφάλιση της υγείας του φυτού. Η βιολογική αντιμετώπιση των ασθενειών στηρίζεται στις αρχές της φυτοπαθολογίας, της μικροβιολογίας, της εδαφολογίας, της κυτταρολογίας και φυσιολογίας των φυτών και της βιοχημείας, ενώ παράλληλα αφορά την αλληλεπίδραση του φυτού, του παθογόνου παράγοντα και του φυσικού περιβάλλοντος (Τζάμος, 2007).

Διακρίνεται σε Φυσική Βιολογική Καταπολέμηση, που αναφέρεται στην δράση των φυσικών εχθρών των επιβλαβών εντόμων χωρίς την παρέμβαση του ανθρώπου, και σε Εφαρμοσμένη Βιολογική Καταπολέμηση, που αφορά τη δράση των φυσικών εχθρών των επιβλαβών εντόμων μετά την ενεργό παρέμβαση του ανθρώπου. Η Εφαρμοσμένη Βιολογική Καταπολέμηση με τη σειρά της διακρίνεται σε Διαχείριση πληθυσμών (εκτροφή, πολλαπλασιασμός και εξαπόλυση ιθαγενών φυσικών εχθρών) και σε Κλασική Βιολογική Καταπολέμηση (εισαγωγή και διαχείριση πληθυσμών εξωτικών φυσικών εχθρών και χρήση μικροβιακών σκευασμάτων) (Katsoyannos, 1996; Kontodimas *et al.*, 2004). Στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 2.), συνοψίζονται οι κατηγορίες της βιολογικής καταπολέμησης έτσι όπως περιγράφησαν από τους Κοντοδήμα και Ανάγνου (2003).



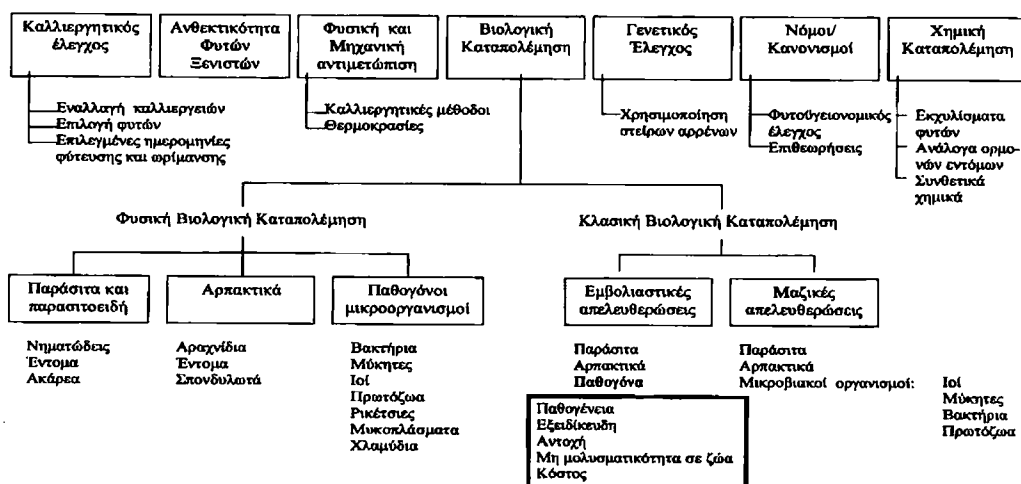
Εικόνα 2: Η Βιολογική Καταπολέμηση (Κοντοδήμας και Ανάγνου, 2003).

Η βιολογική καταπολέμηση αποτελεί τη βασικότερη κατηγορία καταπολέμησης των παθογόνων εντόμων και ασθενειών στα πλαίσια της ολοκληρωμένης αντιμετώπισης. Η ολοκληρωμένη αντιμετώπιση αφορά ένα σύστημα αντιμετώπισης των εχθρών των καλλιεργειών που βασίζεται στο συνδυασμό διαφόρων καλλιεργητικών, βιολογικών, βιοτεχνολογικών και χημικών (εκλεκτικών) φυτοπροστατευτικών μέσων, με τέτοιο τρόπο ώστε να επιτευχθεί ο έλεγχος των εχθρών και ασθενειών που αυτοί προκαλούν στις καλλιέργειες. Οι περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς επίσης και η δυναμική των πληθυσμών των εντόμων είναι αυτές που θα υποδείξουν τις κατάλληλες μεθόδους και τεχνικές που πρέπει να χρησιμοποιηθούν στην εκάστοτε περίπτωση. Ταυτόχρονα, η παραγωγικότητα του μέσου που θα χρησιμοποιηθεί, η ποιότητά του, η οικονομικότητά του και η ασφάλεια του χρήστη, του καταναλωτή και του περιβάλλοντος, είναι κύριες παράμετροι που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά τη διαδικασία επιλογής των κατάλληλων μέσων (Λυκουρέσης, 1995).

Σκοπός της ολοκληρωμένης αντιμετώπισης είναι η διατήρηση του πληθυσμού του εχθρού σε επίπεδα τέτοια ώστε να μη δημιουργεί πρόβλημα, ενώ απώτεροι στόχοι είναι η αποφυγή οικονομικής ζημιάς της καλλιέργειας, η προστασία της δημόσιας υγείας, η προστασία του περιβάλλοντος, η μείωση του κόστους παραγωγής και φυσικά η παραγωγή προϊόντων ανώτερης ποιότητας (Λυκουρέσης, 1995). Δυστυχώς η αντιμετώπιση ήδη υπάρχοντων ασθενειών σε κάποια καλλιέργεια δεν έχει πρακτική σημασία μιας και είναι οικονομικά ασύμφορη και σε αρκετές περιπτώσεις ανέφικτη. Για αυτό το λόγο ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί τα τελευταία χρόνια στην έννοια της πρόληψης. Συνδυάζοντας λοιπόν παραδοσιακά στοιχεία αντιμετώπισης μιας ασθένειας με πιο σύγχρονες πληροφορίες, έχουν δημιουργηθεί πιο σύγχρονες προσεγγίσεις ως προς την ολοκληρωμένη αντιμετώπιση μιας ασθένειας (Τζάμος, 2007).

Πιο συγκεκριμένα, οι γενικές αρχές της ολοκληρωμένης αντιμετώπισης των ασθενειών έχουν ως βάση παραδοσιακές αρχές και έννοιες που ισχύουν διαχρονικά. Αρχικό όμως μέλημα πλέον είναι η αποφυγή της ασθένειας μέσω της επιλογής της τοποθεσίας και της εποχής σποράς έτσι ώστε να αποφεύγονται μέρη και περίοδοι όπου επικρατούν δυσμενείς συνθήκες όσον αφορά συγκεκριμένο παθογόνο. Παράλληλα, η παρεμπόδιση της εισαγωγής ενός παθογόνου σε μια περιοχή και η καταστροφή φυτών που έχουν ήδη μολυνθεί είναι πολύ σημαντικές. Τέλος, η χρήση φυτοπροστατευτικών μεθόδων συμπεριλαμβανομένης και της βιολογικής καταπολέμησης που χρησιμοποιείται πλέον κατά κόρον, είναι απαραίτητη για την προστασία των καλλιεργειών (Τζάμος, 2007). Στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 3.), παρουσιάζονται αναλυτικά όλες οι κατηγορίες της ολοκληρωμένης βιολογικής αντιμετώπισης των εχθρών των καλλιεργούμενων φυτών.

Ολοκληρωμένη Αντιμετώπιση Εχθρών



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

1.2 Εντομοπαθογόνοι Μύκητες

Όσο αφορά τη βιολογική καταπολέμηση, οι μύκητες είναι πολλά υποσχόμενοι μικροοργανισμοί μιας και μέχρι τώρα έχουν ταυτοποιηθεί και απομονωθεί πάνω από 700 είδη εντομοπαθογόνων μυκήτων. Οι μυκητολογικές ασθένειες είναι κοινές και ευρέως διαδεδομένες μεταξύ των εντόμων, ενώ πολύ συχνό είναι το φαινόμενο εντομολογικοί πληθυσμοί να αποδεκατίζονται θεαματικά από επιζωοτίες. Οι απαιτήσεις τους σε υψηλές θερμοκρασίες και η μεγάλη τους εξάρτηση από υψηλή σχετική υγρασία στο περιβάλλον (>85-90%, ώστε να επιτυγχάνεται αποτελεσματική δράση των εντομοπαθογόνων μυκήτων), αιτιολογεί το γεγονός ότι εντομοπαθογόνοι μύκητες συναντιούνται σε έντομα ζόντα σε διαφορετικές κατοικίες όπως φρέσκο νερό, έδαφος, επιφάνεια εδάφους και εναέριες τοποθεσίες (Lacey and Brooks, 1997).

Εντομοπαθογόνοι μύκητες απαντώνται σε όλες τις ταξινομικές κατηγορίες εκτός από τους ανώτερους Βασιδιομύκητες και ορισμένους Hyphomycetes (denatiaceous Hyphomycetes). Μεταξύ τους υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση στο βαθμό μολυσματικότητας. Μπορεί να αποτελούν υποχρεωτικά παθογόνα, ευκαιριακά παθογόνα που προσβάλουν εξασθενημένους ξενιστές, έως και συμβιωτικοί μικροοργανισμοί. Η πλειονότητα τους βρίσκεται στους Entomophthorales (τάξη Zygomycetes) και στην τάξη Hyphomycetes. Οι Entomophthorales χαρακτηρίζονται από υψηλή εξειδίκευση προς τον ξενιστή και μεγάλες πιθανότητες επιζωοτολογίας. Οι δε Hyphomycetes έχουν μεγαλύτερο φάσμα ξενιστών και αναπτύσσονται ευκολότερα in vitro (Lacey and Brooks, 1997; Obernik, 2009). Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 1) παρουσιάζονται οι βασικές τάξεις των

μυκήτων που προκαλούν κάποια ασθένεια σε έντομα- εχθρούς των καλλιεργειών.

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

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

Ουσιαστικά όλες οι τάξεις των εντόμων είναι ευαίσθητες σε μυκητολογικές ασθένειες (Lacey and Brooks, 1997). Ειδικά όσο αφορά τα μυζητικά έντομα, οι μύκητες είναι τα σημαντικότερα παθογόνα παράσιτα καθώς λόγω του μυζητικού τρόπου λήψης της τροφής τους, τα παθογόνα βακτήρια δεν μπορούν να εισαχθούν και να προκαλέσουν εντερικά προβλήματα σε αυτά. Συγκεκριμένα, οι μύκητες προσβάλλουν σε σημαντικό ποσοστό τα Κολεόπτερα, σε αντίθεση με ιολογικές και βακτηριολογικές ασθένειες που είναι σπάνιες μεταξύ των ειδών αυτής της τάξης. Ως επί το πλείστον, πολύ ευπαθή σε μυκητολογικές μολύνσεις, είναι τα Λεπιδόπτερα (προνούμφες), από τα Ημίπτερα (και ειδικότερα από τα Homoptera) είναι οι αφίδες, είδη που ανήκουν στις Οικογένειες Cicadidae και Coccidae, από τα Υμενόπτερα είναι τα Vespoidea, από τα Κολεόπτερα είναι ορισμένα είδη της οικογένειας Scarabeidae και από τα Δίπτερα είναι είδη του γένους Hylemyia καθώς 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 του ξενιστή, με τις ιδιότητες του δερματίου, τις θρεπτικές απαιτήσεις του μύκητα καθώς και με την άμυνα του ξενιστή, σε μερικές περιπτώσεις (Tanada, 1993). Παράλληλα, υπάρχουν μύκητες που μολύνουν ένα μεγάλο φάσμα ξενιστών και άλλοι που περιορίζονται σε λίγα ή και 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 του μύκητα στα έντομα γίνεται δια της στοματικής οδού καθώς και από την επιδερμίδα σε οποιοδήποτε μέρος του σώματος, αρκεί να επικρατεί κατάλληλη υγρασία έτσι ώστε το σπόριο του μύκητα να βλαστήσει (Lacey and Brooks, 1997).

Κατά την προσβολή ενός εντόμου από έναν παθογόνο μύκητα, γίνεται προσκόλληση των κονιδίων στον εξωσκελετό του εντόμου, τα οποία βλασταίνουν και στη συνέχεια διεισδύουν στον εξωσκελετό. Αφού ο μύκητας διαπεράσει την επιδερμίδα, εγκαθίσταται εκεί με αποτέλεσμα να αναπτύσσει σιγά-σιγά στην αιμολέμφο και στο εσωτερικό του εντόμου το μυκήλιο του. Αυτό κατ' επέκταση κατακλύζει όλους τους ιστούς, ενώ ταυτόχρονα παράγονται τοξίνες που επιφέρουν τη θανάτωση του ξενιστή. Στη συνέχεια, το μυκήλιο του μύκητα σε συνδυασμό με επανθίσεις, εμφανίζονται και παρατηρούνται στην επιδερμίδα του εντόμου κονιδιοφόροι από τους οποίους γίνεται η διασπορά του παθογόνου. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι μύκητες εντοπίζονται σε συγκεκριμένα όργανα του ξενιστή τους, όπως για παράδειγμα οι μύκητες *Massospora cicadina* και *Strongwellsea castrans* που απαντώνται μόνο στην κοιλιακή χώρα των ενήλικων εντόμων (Poinar, 1978).

Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν πολλά είδη μυκήτων που προκαλούν ασθένειες σε έντομα, μόλις 10 από αυτά χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο κάποιων από αυτών. Αυτό συμβαίνει αφενός γιατί η αποτελεσματικότητά τους εξαρτάται από την ύπαρξη συγκεκριμένων συνθηκών υγρασίας και θερμοκρασίας και αφετέρου επειδή μερικοί μύκητες είναι πολύ απαιτητικοί ως προς την καλλιέργειά τους και παρουσιάζουν δυσκολίες για τη μαζική παραγωγή τους, ενώ όσοι είναι εύκολο να καλλιεργηθούν, εμφανίζουν εξασθένηση ύστερα από μακροχρόνια παραγωγή σε τεχνητά μέσα. Επιπλέον, λόγω έλλειψης γνώσεων σχετικά με τους παράγοντες που επηρεάζουν την τοξικότητά τους. Ενδεχομένως οι τοξίνες που παράγουν μπορεί να είναι επιβλαβείς για τον άνθρωπο και τα ζώα (Lacey and Brooks, 1997; Obernik, 2009).

1.2.1. Αναγνώριση ξενιστή

Ο τρόπος με τον οποίο οι εντομοπαθογόνοι μύκητες αναγνωρίζουν τον ξενιστή τους δεν είναι ξεκάθαρος. Στην περίπτωση των φυτοπαθογόνων μυκήτων παράγεται ένα ειδικό μόριο

(elicitor) το οποίο ανιχνεύεται από υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης του ξενιστή. Αυτή η σύνδεση είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση ειδικών προϊόντων που με την σειρά τους επάγουν την παραγωγή ενζύμων από το επιτιθέμενο παθογόνο προς το κυτταρικό τοίχωμα του φυτού (Butt, 2002). Παρόμοιο τρόπο δράσης φαίνεται να υιοθετούν και οι εντομοπαθογόνοι μύκητες.

Στην αναγνώριση των ξενιστών συμμετέχουν γονίδια και προϊόντα εξειδικευμένων γονιδίων παθογένειας του μύκητα καθώς και γονίδια ανθεκτικότητας του ξενιστή. Όταν αναγνωριστεί σήμα από τον παθογόνο μύκητα, επάγεται η ανάπτυξη και η διαφοροποίηση του ενώ ταυτόχρονα οι τοξικές ουσίες που παράγονται οδηγούν στο θάνατο του εντόμου – ξενιστή (Hajek et al. 2007). Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες περιέχουν ένα πολύπλοκο σύστημα σηματοδότησης (περιλαμβάνει G πρωτεΐνες, υποδοχείς, κινάσες και δευτερογενείς μηνύτορες) που ρόλο έχει την αναγνώριση του ξενιστή και την επαγωγή σύνθεσης των καταλλήλων αποικοδομητικών ενζύμων (Butt, 2002).

1.2.2 Προσκόλληση – Βλάστηση – Διεΐσδυση

Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες μολύνουν τον ξενιστή τους μέσω των κονιδίων που παράγουν. Για την επιτυχή βλάστηση του σπορίου και την ανάπτυξή του απαιτούνται ευνοϊκές συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και νερού. Η βλάστηση του κονιδίου οδηγεί είτε στην δημιουργία δευτερογενών κονιδίων, είτε στην δημιουργία ενός ή περισσότερων βλαστικών σωλήνων. Ο βλαστικός σωλήνας (germtube) που δημιουργείται διατρύπαι απευθείας την επιδερμίδα του εντόμου και συγκεκριμένα σε μια πολύ σύνθετη δομή, συντιθέμενη από πρωτεΐνες, χιτίνη και λιπαρά οξέα, το λεγόμενο δερμάτιο (Hackmann, 1974). Κατά την προσκόλληση των κονιδίων του εντομοπαθογόνου μύκητα στο δερμάτιο του ξενιστή, απαιτούνται συνήθως 12-24 ώρες για την βλάστησή τους. Το παθογόνο, μέσα στο σώμα του ξενιστή, πολλαπλασιάζεται με τμήματα υφών που καλούνται βλαστοσπόρια. Τα βλαστοσπόρια ποικίλλουν τόσο σε μέγεθος όσο και σε σχήμα (Phasenton και Tanada, 1968).

Η μολυσματικότητα των εντομοπαθογόνων μυκήτων περιλαμβάνει τέσσερα στάδια: α) προσκόλληση, β) βλάστηση, γ) διαφοροποίηση και δ) διεΐσδυση. Κάθε βήμα επηρεάζεται από μια σειρά ενσωματωμένων ενδογενών και εξωγενών παραγόντων που τελικά χαρακτηρίζουν την παθογένεια. Η περίπτωση των εντομοπαθογόνων μυκήτων είναι μοναδική μιας και η είσοδος στο έντομο-ξενιστή γίνεται από την επιδερμίδα και όχι από το πεπτικό σύστημα όπως συμβαίνει με άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς (Hajek et al., 2007). Η επιδερμίδα αποτελείται από λιπίδια, είναι υδατοαπωθητική και ανθεκτική στην ενζυμική αποδόμηση δυσχεραίνοντας έτσι την μόλυνση από έναν εντομοπαθογόνο μύκητα.

Η μόλυνση καθορίζεται από την προσάρτηση ή προσκόλληση των σπορίων στο έντομο-ξενιστή. Η προσκόλληση είναι αναγκαία και συνήθως επιτυγχάνεται μέσω της έκκρισης κολλώδους ουσίας (βλέννα). Ένζυμα, λεκτίνες καθώς και υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές δυνάμεις επίσης παίζουν ένα ρόλο (Boucias et al., 1998). Αφού επιτευχθεί η προσκόλληση, ο επόμενος παράγοντας της μολυσματικότητας ενός παθογόνου στελέχους είναι η παραγωγή ενζύμων (λιπάσες, πρωτεάσες, χιτινάσες) που υδρολύουν την επιδερμίδα του εντόμου-ξενιστή (Smith et al., 1981).

Ένα ευρύ φάσμα παραγόντων όπως το νερό, τα ιόντα, τα λιπαρά οξέα και τα θρεπτικά στοιχεία που βρίσκονται υπό φυσιολογικές συνθήκες στη επιφάνεια του εξωσκελετού του εντόμου, επηρεάζουν την συμπεριφορά της βλάστησης των σπορίων (Hassan et al., 1989). Η επιτυχής βλάστηση των σπορίων απαιτεί την παρουσία των απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων καθώς και την επίδειξη ανθεκτικότητας στις τοξικές ουσίες της επιδερμίδας του εντόμου-ξενιστή (Latge et al., 1987). Για την βλάστηση των σπορίων του εντομοπαθογόνου μύκητα *B. bassiana* απαιτείται η παρουσία πηγής άνθρακα ενώ για την περαιτέρω ανάπτυξη του μύκητα απαιτείται μια πηγή αζώτου (Smith και Grula, 1982). Στην περίπτωση του *M. anisopliae* η παρουσία νερού ενεργοποιεί την πρώτη φάση της βλάστησης των κονιδίων, εξωγενείς όμως πηγές άνθρακα είναι απαραίτητες για την περαιτέρω ανάπτυξή του (Charnley, 1990). Τα περισσότερα κονίδια βλαστάνουν 6-18 ώρες μετά την προσκόλληση, ενώ αυτά που θα βλαστήσουν μετά την πάροδο 24 ωρών θεωρούνται δευτερογενή ή τριτογενή κονίδια. Όταν τα κονίδια του μύκητα προσκολληθούν σε υδρόφοβες, σκληρές και φτωχές σε θρεπτικά υλικά επιφάνειες, τότε διαφοροποιούνται σε απρεσσόρια (appressorium).

Τα απρεσσόρια εμφανίζονται στην κατάληξη των βλαστικών σωλήνων, το μέγεθος και το σχήμα των οποίων εξαρτάται από το είδος και το στέλεχος του μύκητα καθώς και από τα χαρακτηριστικά της επιδερμίδας (Butt et al., 1995). Η μορφολογία των απρεσσορίων φαίνεται να είναι ροπαλοειδής ή σφαιρική (St. Leger et al., 1988). Απρεσσόρια παράγουν όλα τα στελέχη του είδους *M. anisopliae*, ενώ η ιδιότητα αυτή δεν είναι καθολική στα στελέχη του είδους *Beauveria*. Τα απρεσσόρια των περισσότερων μυκήτων παράγουν άφθονη βλέννα, βοηθώντας την προσκόλληση του μύκητα κατά την διάρκεια της διείσδυσης. Φαίνεται να είναι κοινό μεταξύ των μυκήτων οι διεισδυτικές υφές να αναπτύσσονται πλευρικά, παράλληλα προς τα ελικοειδή στρώματα διασπώντας την ακεραιότητα του δερματίου (Mohamed et al., 1978, Brey et al., 1986, Brobyn et al., 1987, Hajek et al., 2007).

Η διείσδυση της επιδερμίδας επιτυγχάνεται από τον ίδιο τον βλαστικό σωλήνα ή από τον σχηματισμό ενός απρεσσορίου που συνδέεται στην επιδερμίδα και ευνοεί την ανάπτυξη ενός στενού διεισδυτικού καρφίου (Boucias and Pendland, 1982; Roberts and Humber, 1981; Wraight et al., 1998; Zacharuk, 1973). Η διείσδυση είναι τόσο μια μηχανική και ενζυμική διαδικασία

(Charnley, 1984; McCoy et al., 1988; St. Leger et al., 1988). Στους περισσότερους εντομοπαθογόνους μύκητες του εδάφους η διείσδυση γίνεται άμεσα και σπάνια μέσω πληγών ή αισθητηρίων οργάνων. Ο ακριβής μηχανισμός εισόδου συνήθως χαρακτηρίζει και το είδος του εντομοπαθογόνου μύκητα. Κατά τη διάρκεια της διείσδυσης στον ξενιστή παράγεται μια σειρά ενζύμων επιδερμίδας-αποικοδόμησης (λιπάσες, πρωτεάσες, χιτινάσες) (Gillespie et al., 1998).

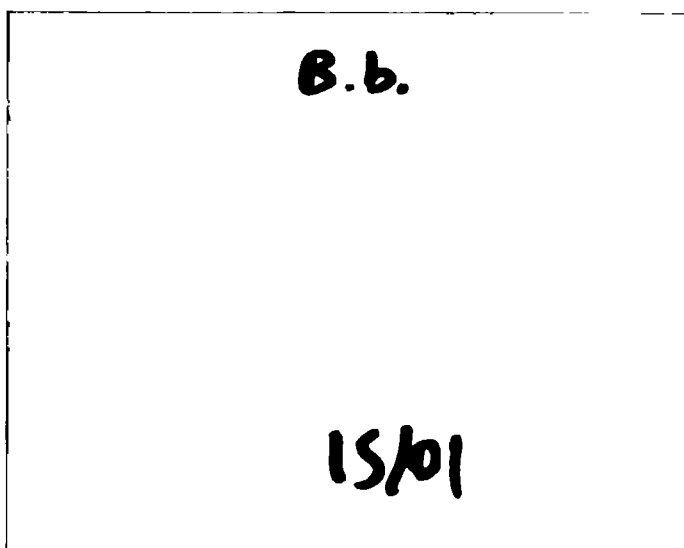
Παρακάτω αναφέρονται οι σημαντικότεροι εντομοπαθογόνοι μύκητες, οι οποίοι ανιχνεύθηκαν και στο συγκεκριμένο πείραμα και είναι οι *Beauveria bassiana* και *Metarhizium anisopliae*.

Beauveria bassiana

Ο μύκητας *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Moniliales) είναι ευρέως διαδεδομένος στη φύση και έχει την ικανότητα να αντιμετωπίζει πάνω από 200 είδη εντόμων όπως θρίπες, αλευρώδεις, αφίδες, ακάρεα, τερμίτες, οικιακές μύγες, Κολεόπτερα κ.α.

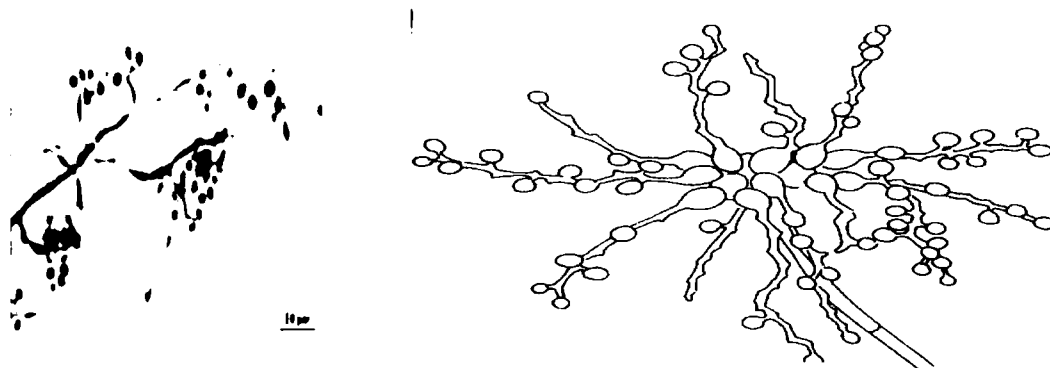
Η προέλευση του βιολογικού ελέγχου χρονολογείται τον 19^ο αιώνα, όταν ο Ιταλός επιστήμονας Agostino Bassi αφιέρωσε περισσότερα από 30 έτη μελετώντας την ασθένεια «white muscardine» στο *Bombyx mori* (L) και τελικά απέδειξε ότι ο μύκητας *B. bassiana* είναι το αίτιο της ασθένειας.

Ο μύκητας παράγει τρεις τύπους σπορίων: τα λεπτά, μονοκύτταρα σπόρια, γνωστά ως βλαστοσπόρια τα οποία παράγονται σε υγρή καλλιέργεια (Bidochka et al, 1987), τα κονίδια τα οποία παράγονται σε στερεό υλικό και τα κονίδια τα οποία παράγονται σε υγρή καλλιέργεια.



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

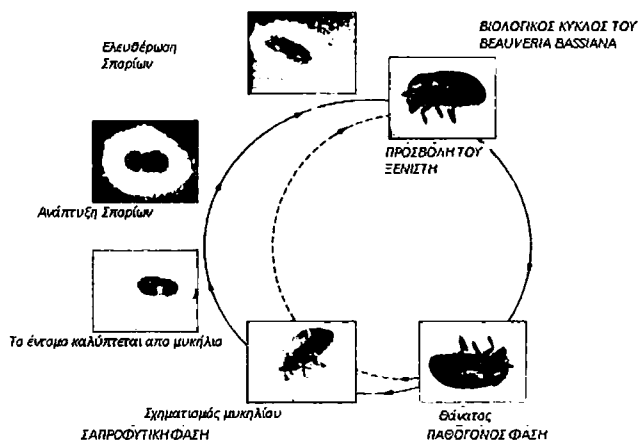
Όσον αφορά τη βιωσιμότητα και των τριών τύπων του *B. bassiana* οι Hedegus et al (1991) απέδειξαν ότι η θερμοκρασία -70°C είναι η καλύτερη για αποθήκευση για μεγάλη χρονική περίοδο. Αντίθετα τα κονίδια του *B. bassiana* και άλλων εντομοπαθογόνων μυκήτων χάνουν τη βιωσιμότητα τους όταν αποθηκευτούν σε υψηλές θερμοκρασίες. Η υψηλή υγρασία είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό των κονιδίων και η μόλυνση ολοκληρώνεται μέσα σε 24-48 ώρες αναλόγως της θερμοκρασίας. Το έντομο μπορεί να επιζήσει μέχρι και 3-5 μέρες αφού μολυνθεί.



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

Ο εντομοπαθογόνος αυτός μύκητας εισβάλλει στο σώμα του εντόμου. Τα κονίδια του έρχονται σε επαφή με την επιδερμίδα του εντόμου και αφού βλαστήσουν, διαπερνούν την επιδερμίδα και πολλαπλασιάζονται μέσα στο σώμα του εντόμου. Τα κονίδια του μύκητα είναι μονοκύτταρα, απλοειδή και υδρόφοβα (Rehner & Buckley, 2005).

Στην Ευρώπη κυκλοφορούν εμπορικά σκευάσματα όπως τα Metab, Naturalis-L, Bio-power, Botanigard κ.α. Ο μύκητας αυτός δεν παρουσιάζει φυτοτοξικότητα ούτε δημιουργεί τοξικότητες σε πτηνά, ζώα και ψάρια (Copping, 2001).



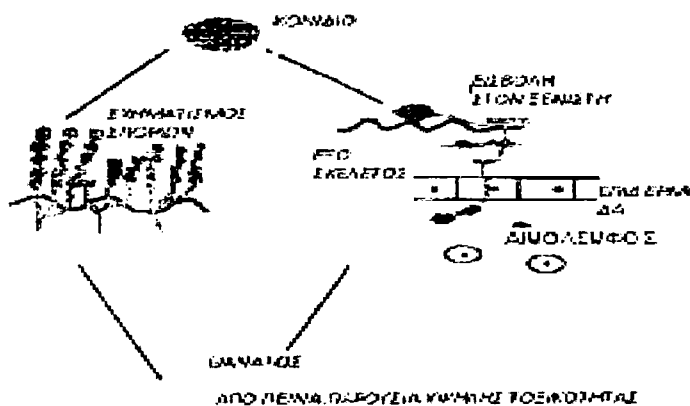
Εικόνα 6: Βιολογικός Κύκλος του *Beauveria bassiana*.

Metarhizium anisopliae var anisopliae και Metarhizium anisopliae var robertsii

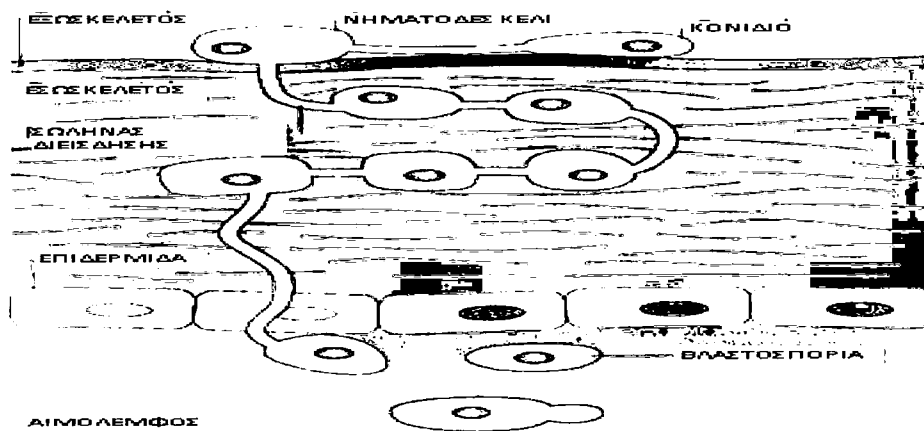
Ο μύκητας μπορεί να παραχθεί εύκολα σε ζυμωτήρες, όμως το μυκήλιο δεν έχει εντομοκτόνο δράση. Αντίθετα τα βλαστοσπόρια και κονίδια είναι βιολογικώς δραστικά και έχουν την ικανότητα να μολύνουν και να σκοτώσουν τον ξενιστή τους. Ο μύκητας παράγει βλαστοσπόρια μόνο σε υγρές καλλιέργειες και εφόσον ικανοποιηθούν κάποιες συνθήκες.

Έχει βρεθεί να προσβάλλει 300 διαφορετικά είδη εντόμων και συνιστά έναν από τους καλύτερα μελετημένους εντομοπαθογόνους μύκητες.

Εάν η υγρασία είναι αρκετά υψηλή, εμφανίζεται μια λευκή μούχλα στο νεκρό σώμα του εντόμου που σιγά – σιγά αυξάνεται και σε σύντομο χρονικό διάστημα μεταχρωματίζεται σε πράσινη (Tanada and Kaya, 1993).

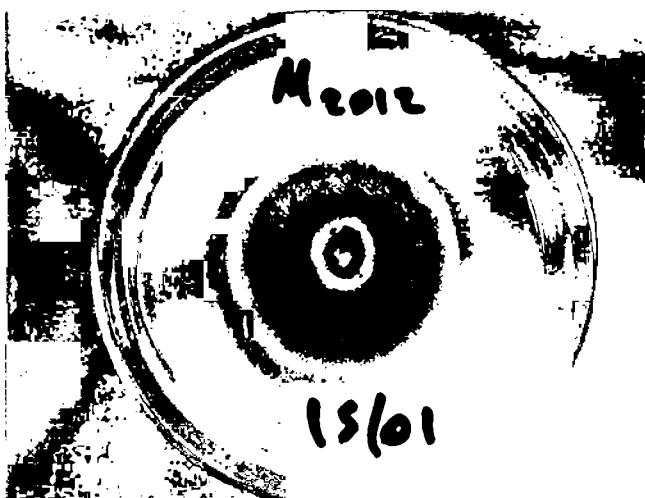


Εικόνα 7: Βιολογικός κύκλος του *M. anisopliae*.



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

Το Bioblast είναι μία εμπορική διαθέσιμη μορφή του εντομοπαθογόνου μύκητα *M. anisopliae* που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των τερμιτών του γένους *Reticulitermes* spp. Ο μύκητας εφαρμόζεται πάνω στο ξύλο οπού είναι γνωστό ότι οι τερμίτες διατηρούν τις στοές τους. Οι τερμίτες που βρίσκονται μέσα στις στοές είναι εκτεθειμένοι σε άμεση επαφή με τα κονίδια του μύκητα. Παράλληλα με αυτήν την μέθοδο προκαλούμε εξάπλωση του παθογόνου μύκητα σε υγιή, μη μολυσμένα, άτομα της αποικίας. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο θάνατος επέρχεται σε 4 έως 10 ήμερες ανάλογα με την θερμοκρασία. Το Metab αποτελεί κι αυτό μία εμπορική διαθέσιμη μορφή του εντομοπαθογόνου μύκητα *M. anisopliae* το οποίο όμως περιέχει και κονίδια του *B. bassiana*. Έχει ευρύ φάσμα δράσης σε φυτοφάγα έντομα όπως: τετράνυχος, αλευρώδης, θρίπας, κοκκοειδή.



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

1.3 Τρόποι παγίδευσης εντομοπαθογόνων μυκήτων

Η ανάπτυξη, η εξέλιξη της επιζωοτίας καθορίζεται σε σημαντικό βαθμό και από την πυκνότητα του ξενιστή, την παθογόνο δύναμη του παθογόνου, την ικανότητά του να αναπτύσσεται σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες, την ικανότητά του να αναπτύσσεται γρήγορα ξεπερνώντας την αντίσταση του ξενιστή και να παράγει υψηλούς αριθμούς κονιδίων, την ικανότητα επιβίωσης και διάδοσής του (Μαντζούκας, 2008). Ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη του παθογόνου διαμορφώνονται σε θερμοκρασιακό περιβάλλον 20-30 °C και σε υγρασίες πάνω από 90%. Επιζωοτολογίες έχουν αναφερθεί και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες και συνθήκες υγρασίας 50-60%.

Τεχνητά, η φυσική διαδικασία μπορεί να επιτευχθεί μέσω εντόμων, τα οποία χρησιμοποιούνται ως δόλωμα, για να παγιδεύουν εντομοπαθογόνους μύκητες. Έτσι, η παγίδευση γηγενών στελεχών των εντομοπαθογόνων μυκήτων πραγματοποιείται μέσω της τεχνικής παγίδευσής τους με έντομα. Η τεχνική παγίδευσης εντομοπαθογόνων στελεχών μέσω των εντόμων

αναπτύχθηκε αρχικά για την απομόνωση εντομοπαθογόνων νηματωδών (Zimmerman, 1986). Η μέθοδος στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε και για την απομόνωση των εντομοπαθογόνων μυκήτων.. Ως δόλωμα χρησιμοποιείται η προνύμφη του λεπιδοπτέρου *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) (Galleria Bait Method), όσο η προνύμφη του κολεοπτέρου *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). Παρόλα αυτά πολλές μελέτες έχουν ασχοληθεί με την αξιολόγηση της χρήσης διάφορων εντόμων-παγίδων από διαφορετικές τάξεις. Η μέθοδος παγίδευσης με το λεπιδοπτερο *G. mellonella* φαίνεται να είναι η πιο ευαίσθητη τεχνική από κάθε άλλο έντομο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δόλωμα, 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) ενώ οι Klingen *et al.* 2002 αναφέρουν ότι ο μύκητας *Tolypocladium cylindrosporium* απομονώθηκε ευκολότερα από την προνύμφη του εντόμου *Delia floralis* (Οικογένεια: Anthomyiidae) απ' ότι από την προνύμφη του *G. mellonella*.

Το 2006 οι Meyling & Eilenberg έχοντας κάνει χρήση, κατά την δειγματοληψία χώματος, τα γεωγραφικά πληροφοριακά συστήματα (Geographical Information Systems). Έτσι η εμφάνιση κάθε εντομοπαθογόνου μύκητα θεωρήθηκε ποσοτικό δεδομένο το οποίο θα συμπεριλαμβανόταν στην ανάλυση μαζί με τα χωρικά δεδομένα. Το κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι επιτρέπει την αναγνώριση συμπλεγμάτων των οργανισμών και μπορεί να καταδείξει με ευκρίνεια αν τα δεδομένα ακολουθούν τυχαία κατανομή ή όχι. Η γνώση αυτών των δεδομένων δεν θα ήταν δυνατή αν δεν ήταν διαθέσιμη η ακριβής τοποθεσία της δειγματοληψίας. Αυτά τα στοιχεία παρέχουν τη δυνατότητα συσχετισμού των εμφανίσεων των εντομοπαθογόνων μυκήτων με έτερους χωρικούς παράγοντες στο σύστημα της καλλιέργειας και συνεπώς αναπτύσσονται υποθέσεις σχετικά με τους παράγοντες που θα μπορούσαν να επιδράσουν στην κατανομή της εμφάνισής τους. Για παράδειγμα, ο συσχετισμός των πληθυσμών των εντόμων-παγίδων (ξενιστές) και των επανθίσεων των μυκηλίων πάνω σε αυτά, θα μπορούσε να παρέχει σημαντικές πληροφορίες όσον αφορά την κατανομή των μεταξύ τους πληθυσμών των παθογόνων(Meyling, 2007).

1.4 Σκοπός

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία έχει ως στόχο την χρήση διαφορετικών εντόμων ως μέσα παγίδευσης εντομοπαθογόνων μυκήτων (bait methods). Η χρήση της *Galleria mellonella* ως δόλωμα είναι μεν η πλέον παραδοσιακή, όμως, η χρήση άλλων εντόμων ως παγίδες θα μας βοηθήσει να διευρύνουμε το φάσμα των εντομοπαθογόνων μυκήτων που μπορούμε να ανιχνεύσουμε. Επίσης εκτός από την χρήση καινούργιων εντόμων-παγίδων, η ταυτοποίηση των στελεχών των εντομοπαθογόνων μυκήτων που θα προκύψουν, αποτελεί αντικείμενο της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας. Για την ταυτοποίηση θα χρησιμοποιηθούν σύγχρονες μοριακές τεχνικές που πρώτη φορά εφαρμόζονται στο Πεδίο της Εντομοπαθολογίας.

Κεφάλαιο 2 – Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Έντομα

Οι εκτροφές των εντόμων πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Ιολογίας του Ινστιτούτου Προστασίας Φυτών της Πάτρας. Για την εκτροφή των *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae) και *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera:Bostryehidae) χρησιμοποιήθηκαν σπόροι σιταριού, για την εκτροφή του *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae) χρησιμοποιήθηκε αλεύρι ενώ για την εκτροφή του *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) χρησιμοποιήθηκε πατάτα.

Η εκτροφή των ενήλικων ατόμων των λεπιδόπτερον *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) και *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) έγινε σε κλωβούς 25x45x30 cm. Ο σκελετός των κλωβών ήταν ξύλινος, οι δύο πλάγιες πλευρές ήταν καλυμμένες με πλαστικό πλέγμα και η οπίσθια πλευρά ήταν ξύλινη (MDF). Η πρόσθια πλευρά του κλωβού ήταν καλυμμένη με πλαστικό πλέγμα μικρής διατομής, το οποίο λειτουργούσε και σαν είσοδος για το εσωτερικό του. Το δάπεδο του κλωβού ήταν ξύλινο (MDF). Σε κάθε κλωβό διατηρούνταν 15 έως 20 ζεύγη ενήλικων εντόμων. Το ζαχαρόνερο προσφέρονταν στα ενήλικα άτομα με οδοντιατρικά τεμάχια βάμβακος 1cm, που τοποθετούνταν σε τρυβλίο Petri με νερό στο δάπεδο του κλωβού.

Στους κλωβούς του λεπιδόπτερου *E. kuehniella* τοποθετούνταν διάφανοι πλαστικοί κεσέδες, οι οποίοι είχαν Χονδρό Σιμιγδάλι Αποστειρωμένο και Αντιβιοτικό που χρησίμευε ως τεχνητό υπόστρωμα φωτοκίας. Οι κεσέδες παρέμεναν στους κλωβούς για τρεις έως τέσσερις μέρες και στην συνέχεια τοποθετούνταν σε ξεχωριστό σκοτεινό χώρο για να συμπληρώσουν τον βιολογικό τους κύκλο αφού πρώτα καλυφθεί με τούλι, ώστε να μην δραπετεύσουν οι νεοεκκολαφθείσες προνύμφες. Ανάλογα με την προνυμφική τους ηλικία οι προνύμφες κατανέμονταν αναλόγως στα διάφανα δοχεία ώστε να αποφευχθεί ο συνωστισμός που θα επηρέαζε την ανάπτυξη και την πρόσληψη τροφής των προνυμφών.

Στους κλωβούς του λεπιδόπτερου *P. interpunctella* τοποθετούνταν διάφανοι πλαστικοί κεσέδες, οι οποίοι είχαν Μέλι, Γλυκερίνη, Ξερή Μαγιά, Αλεύρι Ολικής Αποστειρωμένο και Πίτουρο Αποστειρωμένο που χρησίμευε ως τεχνητό υπόστρωμα φωτοκίας. Οι κεσέδες παρέμεναν στους κλωβούς για δυο μέρες και στην συνέχεια τοποθετούνταν σε ξεχωριστό σκοτεινό χώρο για να συμπληρώσουν τον βιολογικό τους κύκλο αφού πρώτα καλυφθεί με τούλι, ώστε να μην δραπετεύσουν οι νεοεκκολαφθείσες προνύμφες. Ανάλογα με την προνυμφική τους ηλικία οι προνύμφες κατανέμονταν αναλόγως στα διάφανα δοχεία ώστε να αποφευχθεί ο συνωστισμός που θα επηρέαζε την ανάπτυξη και την πρόσληψη τροφής των προνυμφών Η εναπομένουσα τροφή αποθηκεύεται στους 4°C μέχρι να ξαναχρησιμοποιηθεί.

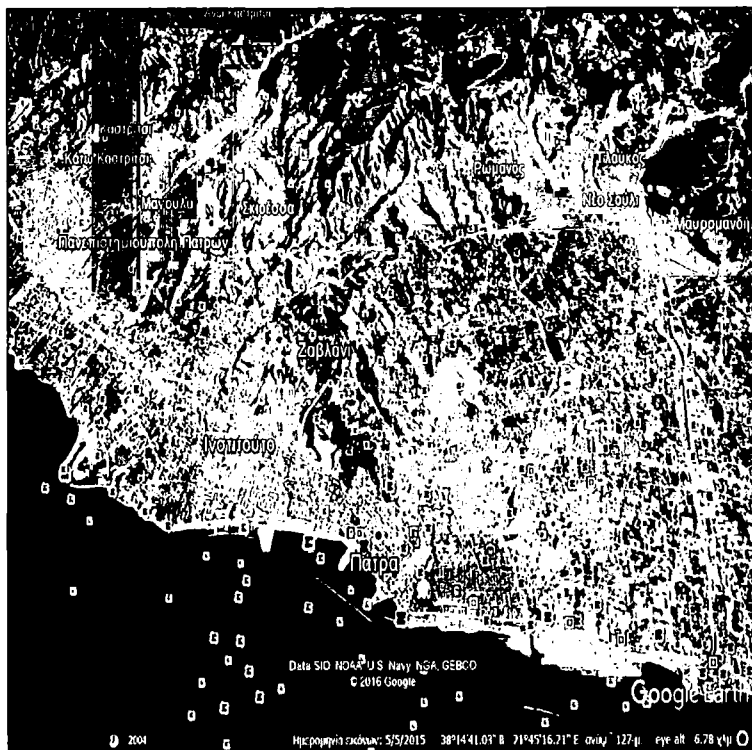
Σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης του εντόμου, τα έντομα βρίσκονταν σε δωμάτιο με σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας 25±1°C, υγρασίας 60 – 70% Σ.Υ. και φωτοπερίοδου 16:8 ώρες Φ:Σ.

2.2. Δειγματοληψία - Παγίδευση εντομοπαθογόνων μυκήτων

Συνολικά συλλέχθηκαν 4 δείγματα χώματος από περιοχές του Ν. Αχαΐας. Οι περιοχές αυτές είναι ο Γλαύκος, ο περιβάλλοντας χώρος του Ινστιτούτου όπου έγινε και η εκπόνηση της παρούσας μελέτης, το Καστρίτσι και το Ζαβλάκι. Τα δείγματα συλλέχθηκαν κατά τους μήνες Ιανουάριο και Φεβρουάριο του 2016 σε βάθος 10 cm και η ποσότητα του καθενός αντιστοιχούσε σε 300gr. Έπειτα 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
Γλαύκος	38°12'23.50''B	21°47'2.25''A
Ινστιτούτο	38°15'43.98''B	21°44'58.31''A
Καστρίτσι	38°17'13.08''B	21°48'12.46''A
Ζαβλάκι	38°15'22.38''B	21°45'25.95''A

Τα παραπάνω σημεία αποτυπώνονται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 10: Χάρτης σημείων δειγματοληψίας.

Το χώμα που συλλέχθηκε τοποθετήθηκε πάνω σε σκληρό χαρτόνι στου πάγκους του εργαστηρίου για 24h, ώστε να μειωθεί η υγρασία του. Αυτό έγινε διότι σε συνθήκες υπερβολικής υγρασίας οι εντομοπαρασιτικοί νηματώδεις του εδάφους επιτίθενται και σκοτώνουν τις προνύμφες των εντόμων «παγίδων» πριν από τους εντομοπαθογόνους μύκητες. Στη συνέχεια, το χώμα κοσκινίστηκε και τοποθετήθηκε σε τρυβλία Petri. Σε αυτό το σημείο εισάχθηκαν οι προνύμφες των εντόμων (προνύμφες 3^{ης} και 4^{ης} ηλικίας) ή αν αυτό δεν ήταν δυνατό (λόγω του πολύ μικρού μεγέθους τους), ολόκληρα τα νεαρά ακμαία. Σε κάθε δείγμα χώματος εισάχθηκαν 10 προνύμφες ή ακμαία, οπότε 30 συνολικά για κάθε περιοχή, τα οποία και αφέθηκαν σε ειδικούς θαλάμους στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία 25±1 °C για 14 ημέρες.

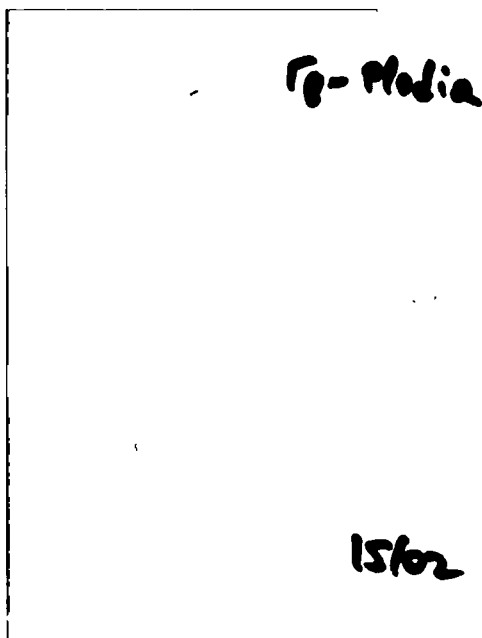


Εικόνα 11: Δείγματα χώματος στον εργαστηριακό πάγκο (Ινστιτούτο Πάτρας, 2016).

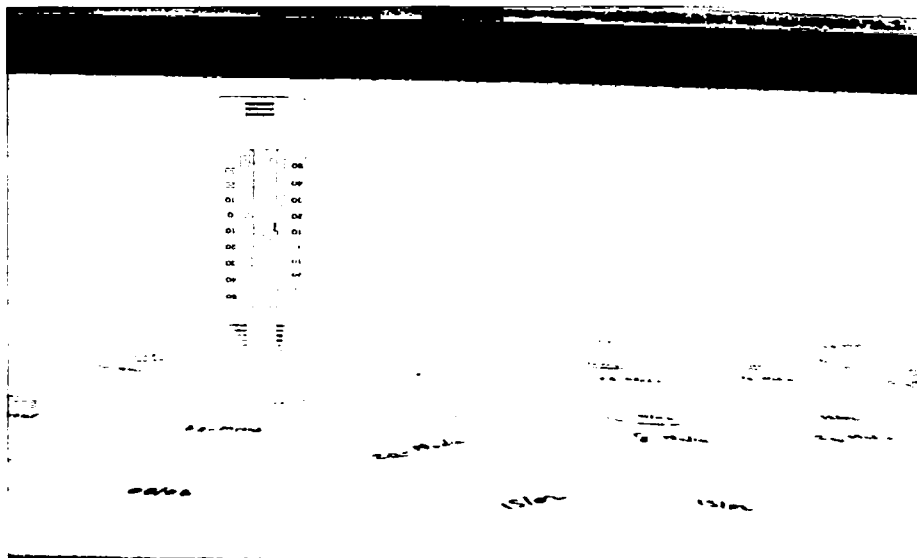
Κάθε 2 ημέρες πραγματοποιούνταν μετρήσεις για τυχόν θανατωμένες προνύμφες ή ακμαία. Τα νεκρά ακμαία καθώς και οι νεκρές ή μούμιοποιημένες προνύμφες αφού απομακρύνθηκαν, εμβαπτίστηκαν σε υποχλωριώδες νάτριο 1% για μερικά δευτερόλεπτα, προς αποστείρωσή τους (αποφυγή ανάπτυξης σαπροφυτικών μυκήτων). Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε τρυβλία Petri και συγκεκριμένα πάνω σε διηθητικό χαρτί εμποτισμένο σε d H₂O (**moist chamber**). Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε εντός θαλάμου νηματικής ροής (laminar flow). Τα δείγματα αυτά φυλλάχθηκαν σε ειδικούς θαλάμους στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία 25±1 °C όπου γίνονταν καθημερινές παρατηρήσεις στο στερεοσκόπιο για τυχόν συμπτώματα προσβολών από εντομοπαθογόνους μύκητες.



Εικόνα 12: Επάνθιση μυκηλίου στο έντομο *Rhyzopertha dominica* (Ινστιτούτο Πάτρας, 2016).



Εικόνα 13: Νεκρή προνύμφη του εντόμου *Plodia interpunctella* πάνω σε υγρασία σε τρυβλίο τύπου Petri (Ινστιτούτο Πάτρας, 2016).



Εικόνα 14: Νεκρές προνύμφες πάνω σε υγρασία σε τρυβλία τύπου Petri (Ινστιτούτο Πάτρας, 2016).

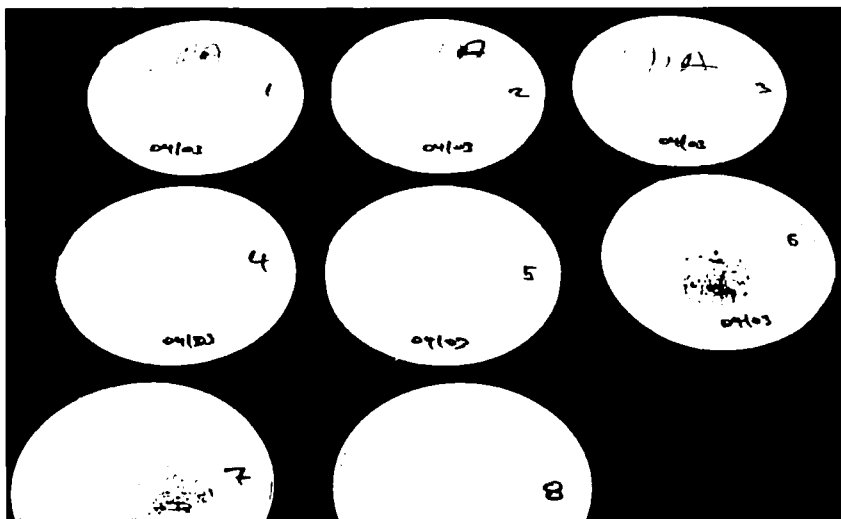
Η απομόνωση των μυκήτων έγινε με τη μέθοδο της χρήσης ως δολώματος των εντόμων *Plodia interpunctella*, *Rhyzopertha dominica*, *Tribolium confusum*, *Trogoderma granarium*, *Tenebrio molitor* και *Ephesti kuehniella*.

Οι Bedding και Akhurst ανακάλυψαν το 1975 την συγκεκριμένη μέθοδο, η οποία πραγματοποιήθηκε με επιτυχία σε πάρα πολλές έρευνες. Ειδικότερα, αυτή η τεχνική χρησιμοποιεί προνύμφες του κηρόσκορου (*Galleria mellonella*) ως δόλωμα για τη φυσική εμφάνιση των εντομοπαθογόνων νηματωδών του εδάφους.

2.3 Θρεπτικό υλικό Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

Το Sabouraud Dextrose Agar δημιουργήθηκε για πρώτη φορά το 1800 από τον γαλλικής καταγωγή δερματολόγο Raymond J. A. Sabouraud, για να υποστηρίξει την ανάπτυξη των μυκήτων που προκαλούν λοιμώξεις στο δέρμα, τα μαλλιά ή τα νύχια (Sabouraud, R. 1896).

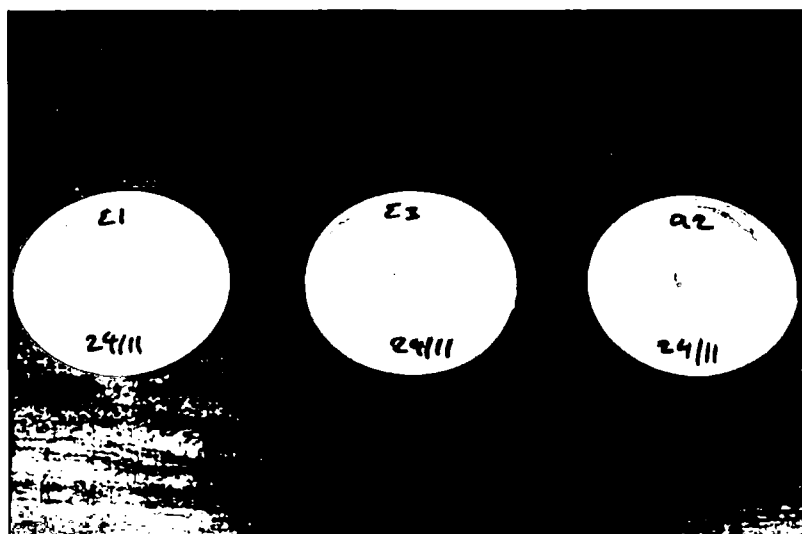
Η παρασκευή του μέσου γίνεται ως εξής: Σε 1000 ml κρύου αποστειρωμένου νερού προστίθενται 65 gr λυοφιλιωμένου Sabouraud Dextrose Agar του εμπορίου. Το μίγμα θερμαίνεται σε Ben-Mari για να διαλυθεί το μέσο εντελώς. Έπειτα διανέμεται σε κωνικές φιάλες και αποστειρώνεται σε κλίβανο για 15 λεπτά στους 121 °C. Η τελική αντίδραση του μέσου είναι: PH 5,6. 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

Τα προσβεβλημένα ακμαία ή προνύμφες από εντομοπαθογόνους μύκητες απομονώθηκαν είτε ολόκληρα σε τρυβλία Petri έχοντας ως υπόστρωμα το θρεπτικό υλικό SDA είτε έγινε καλλιέργεια των κονιδίων των μυκήτων που είχαν εκπτυχθεί από το σώμα των προσβεβλημένων ακμαίων-προνυμφών στο ίδιο υλικό. Τα τρυβλία φυλλάσσονται σε θερμοκρασία 25 ± 1 °C στο σκοτάδι προς επώαση και ανάπτυξη των μυκήτων. Αν κάποιος μύκητας αναπτυχθεί, απομονώνεται εκ νέου προς αποφυγή επιμολύνσεων και ανάπτυξη καθαρών καλλιεργειών και αναγνωρίζεται μέσω της μικροσκοπικής εξέτασης (όπου είναι δυνατό) για να επιβεβαιωθεί το είδος βάσει του σχήματος και του μεγέθους των σπορίων και έπειτα μέσω της διαδικασίας ταυτοποίησης του γενετικού του υλικού (DNA sequencing).

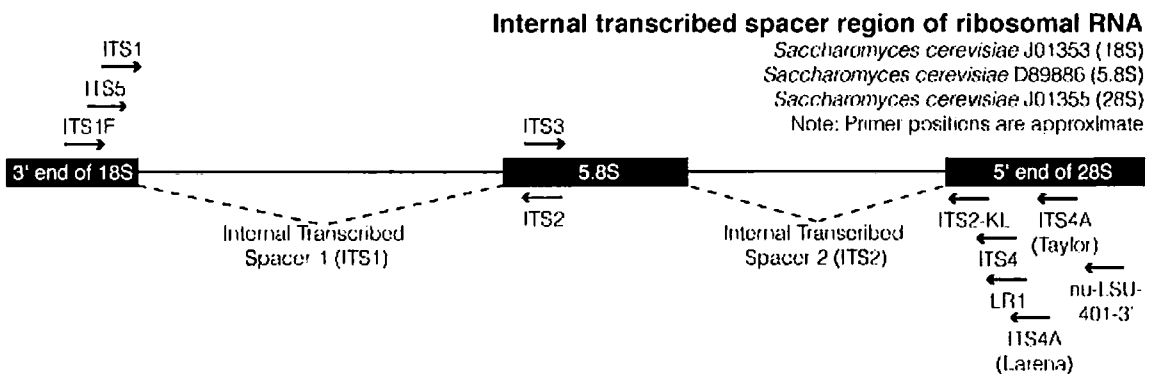


Εικόνα 14: Προσβεβλημένες προνύμφες από εντομοπαθογόνους μύκητες (Ινστιτούτο Πάτρας, 2016)

2.5 Γονιδιακή ταυτοποίηση (DNA sequencing)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μία τεχνική που αναπτύχθηκε το 1985 για την *in vitro* ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων του DNA. Αυτή η τεχνική επέτρεψε την ακριβή αναγνώριση και γρήγορη ανίχνευση των ειδών χωρίς την ανάγκη για απομόνωση καθαρών καλλιιεργειών (Sartori et al., 2010)

Η πλήρης ITS περιοχή σε μύκητες έχει ένα μέσο μήκος 500 και 600 ζευγών βάσεων (bp) για ασκομύκητες και βασιδιομύκητες, αντίστοιχα, και ένα μέσο μήκος των 600 bp σε όλες τις μυκητιακές γενεαλογικές σειρές (Porter & Golding, 2011). Η ταυτοποίηση και ταξινόμηση των μυκήτων βασίζεται σε παραδοσιακές αναλύσεις των μακροσκοπικών και μικροσκοπικών δομών και τα χαρακτηριστικά τους μπορεί να αλλάξουν σημαντικά ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο εκτίθενται. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί μοριακές μέθοδοι με σκοπό τη ταυτοποίηση και διαφοροποίηση των μικροοργανισμών (Jimenez et al., 1999; Mirhosseini et al., 2010). Το ριβοσωμικό DNA (rDNA) αποτελεί ενδιαφέροντα στόχο για τη φυλογενετική διαφοροποίηση των μυκήτων, δεδομένου ότι κωδικοποιεί μια υψηλά πολυμορφική περιοχή 600-800 bp ITS (Internal Transcribed Spacers), η οποία χρησιμοποιείται και για τη διαφοροποίηση πολλών ειδών ζυμών και μυκήτων (Anderson & Cairney, 2004; Anderson & Parkin, 2007; Larena et al., 1999). Η πλήρης ITS περιοχή σε μύκητες έχει ένα μέσο μήκος 500 και 600 ζευγών βάσεων (bp) για ασκομύκητες και βασιδιομύκητες, αντίστοιχα, και ένα μέσο μήκος των 600 bp σε όλες τις μυκητιακές γενεαλογικές σειρές (Porter & Golding, 2011).



Εικόνα 15: Fungal Internal Transcribed Spacer (ITS)

2.5.1 Απομόνωση DNA (DNA extraction)

Η εξαγωγή του DNA είναι το πρώτο βήμα της μοριακής ταυτοποίησης των μυκήτων. Για τη διεξαγωγή του DNA Extraction, το μυκήλιο των μυκήτων λήφθηκε από υγρή καλλιέργεια αυτών σε θρεπτικό μέσο. Το μυκήλιο, που συλλέχθηκε από το υγρό θρεπτικό μέσο, μεταφέρθηκε με τη

βοήθεια αποστειρωμένης βελόνας σε σωλήνα erpendorf, προσθέτοντας 200 μl διάλυμα SDS. Έγινε 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' και ταυτόχρονα να εμφανίζεται ικανοποιητική ομογενοποίηση ενώ στο τέλος προστέθηκε 300 μl από το ίδιο διάλυμα.

Στην συνέχεια, προστέθηκε ίσος όγκος μίγματος φαινόλης – χλωροφορμίου/ ισοαμυλικής αλκοόλης ογκομετρικής αναλογίας 25:24:1 και έγινε ανάδευση. Στο επόμενο βήμα ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1h στις 10.800 r/m στους 4 °C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης μεταφέρθηκε η υπερκείμενη υδατική φάση σε νέο σωλήνα erpendorf, όπου αναμίξαμε με ίσο όγκο χλωροφορμίου και έγινε ανάδευση. Στο επόμενο βήμα ακολούθησε φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min στις 15.000 r/m. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης μεταφέρθηκε η υπερκείμενη υδατική φάση σε νέο σωλήνα erpendorf, ογκομετρήθηκε και προστέθηκε ίσος όγκος ισοπροπανόλης θερμοκρασίας -20 °C και έγινε ανάδευση. Στην συνέχεια, τοποθετήθηκαν στους -20 °C για 15 min. Στο επόμενο βήμα ακολούθησε φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min στις 15.000 r/m. Η υπερκείμενη φάση απορρίφθηκε και προστέθηκαν 200 μl μίγματος αιθανόλης/ αποστειρωμένου ύδατος ογκομετρικής αναλογίας 7:3. Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min στις 15.000 r/m. Στη συνέχεια, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα αφήθηκε να στεγνώσει στην θερμοκρασία των 55°C για 10 λεπτά.

Τέλος, το ίζημα διαλύθηκε σε 50μL d.d. H₂O. Η φύλαξη του DNA έλαβε χώρα στους -33 οC.

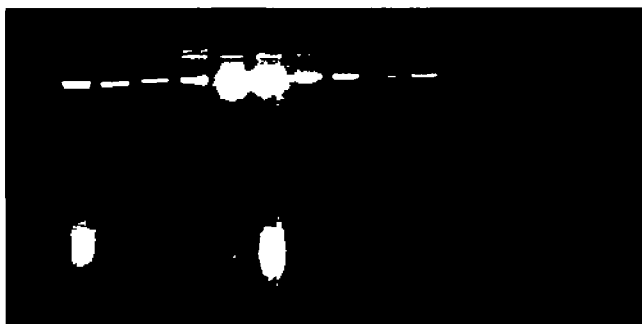
Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του DNA είναι τα εξής:

I. Διάλυμα SDS (100ml):

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

II. Μίγμα Φαινόλης /χλωροφόρμιου/ ισοαμυλικής αλκοόλης 25:24:1: Μίγμα 25 μονάδων όγκου φαινόλης με 24 μονάδες όγκου χλωροφορμίου και μίας ισοαμυλικής αλκοόλης.

Η ποσοτικοποίηση του πυρηνικού οξέος έγινε με μικροφωτόμετρο σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και ηλεκτροφορητικά, ως γίνεται τυπικά σε πειράματα μοριακής βιολογίας.



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

2.5.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction =PCR)

Με την PCR μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέχρι και δισεκατομμύρια φορές, δεδομένου ότι είναι γνωστή η νουκλεοτιδική του αλληλουχία. Η αλληλουχία του γονιδίου είναι απαραίτητη για τον σχεδιασμό των συνθετικών DNA ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητών, primers), καθένα από τα οποία είναι συμπληρωματικό με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA.

Ένας πλήρης κύκλος μιας PCR αντίδρασης περιλαμβάνει τρία στάδια: 1. Αποδιάταξη του DNA (denaturation)

2. Προσαρμογή των εκκινητών στο μονόκλωνο πλέον DNA (annealing)

3. Επιμήκυνση των εκκινητών (extension)

Ένας πλήρης τέτοιος κύκλος περιλαμβάνει την επώαση των δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες και πραγματοποιείται από ειδικά μηχανήματα τους θερμοκυκλοποιητές (thermal cyclers).

I. Αραιώση:

Οι εκκινητές ITS λειτουργούν καλά και με μεγάλες συγκεντρώσεις. Παρ, όλ' αυτά, μια αρχική συγκέντρωση περί τα 20-50 ng/μl, που επιτυγχάνεται προσεγγιστικά- με αραιώση 1/10 όταν εμφανιστεί έντονο ίζημα DNA- είναι ίσως καλύτερη για τυποποιημένη εφαρμογή της τεχνικής. Αν η τεχνική εφαρμόζεται με βάση την ολική ποσότητα DNA-στόχου στην αντίδραση, τα 250 ng είναι ίσως η καλύτερη ποσότητα, και αν εφαρμόζεται με βάση την τελική συγκέντρωση, προκρίνονται τα 5 ng/μl στο μίγμα αντίδρασης. Πάντως, η προτυποποίηση της τεχνικής προτείνει σταθερά όγκο αντίδρασης 50 εκ των οποίων τα 5 είναι αραιωμένο (ή μη) εκχύλισμα DNA, διότι αυτή η πρακτική βοηθά στην επαναληψιμότητα και την ελαχιστοποίηση σφαλμάτων.

Name	Concn (pmol/μL)	Sequence (optional)	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

30 κύκλοι [1 min @95°C, 1 min @55°C, 90sec @72°C]

1 κύκλος [1 min @ 95°C, 1 min @ 55°C, 5 min @72°C]

III. Αλληλουχίες εκκινητών

IV. Συνθήκες αντιδράσεων PCR

[dNTPs] 0,4 mM;

[MgCl₂] 1,5 mM;

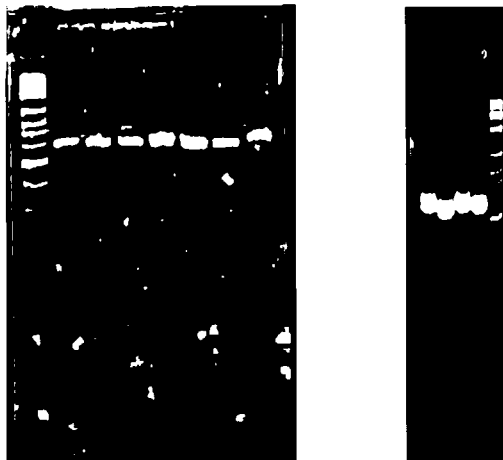
[Taq πολυμεράση] 0,07 u/λ;

[εκκινητές] 1 pmol/λ έκαστος;

Υπόστρωμα DNA: 5 μl άμεσα απομονωμένου ή αραιωμένου παρασκευάσματος DNA.

V. Ηλεκτροφόρηση

Τα προϊόντα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 2,0-3% σε 0.5XTBE υπό ένταση ως 100mA με τυπικό διάλυμα φόρτωσης και φθορίζουσα χρώση Sybr Safe Green.



Εικόνες 19, 20: Ανάλυση των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 2% με εκκινητές ITS στις 600bp

Κεφάλαιο 3 – Αποτελέσματα

3.1 – Ποσοστά θνησιμότητας και επάνθισης μυκηλίου επί των νεκρών ατόμων

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα ποσοστά θνησιμότητας των προνυμφών 3ης και 4ης ηλικίας και των νεαρών ακμαίων και τα αντίστοιχα ποσοστά τους ως προς την επάνθιση μυκηλίου. Θυμίζουμε ότι ο συνολικός αριθμός ατόμων για κάθε έντομο είναι 120 (30 για κάθε περιοχή).

Plodia interpunctella (προνύμφες 4^{ης} ηλικίας)

Περιοχές	Ποσοστό θνησιμότητας (%)	Ποσοστό επάνθισης μυκηλίου (%)
Γλαύκος	10	67
Ινστιτούτο	50	13
Καστρίτσι	17	80
Ζαβλάνι	33	50

Rhyzopertha dominica (νεαρά ακμαία)

Περιοχές	Ποσοστό θνησιμότητας (%)	Ποσοστό επάνθισης μυκηλίου (%)
Γλαύκος	87	27
Ινστιτούτο	100	20
Καστρίτσι	100	27
Ζαβλάνι	100	50

Tribolium confusum (νεαρά ακμαία)

Περιοχές	Ποσοστό θνησιμότητας (%)	Ποσοστό επάνθισης μυκηλίου (%)
Γλαύκος	97	10
Ινστιτούτο	90	22
Καστρίτσι	33	0
Ζαβλάνι	97	31

Trogoderma granarium (προνύμφες 4^{ης} ηλικίας)

Περιοχές	Ποσοστό θνησιμότητας (%)	Ποσοστό επάνθισης μυκηλίου (%)
Γλαύκος	7	0
Ινστιτούτο	3	0
Καστρίτσι	7	0
Ζαβλάνι	10	33

Erhestia kuehniella (προνύμφες 4^{ης} ηλικίας)

Περιοχές	Ποσοστό θνησιμότητας (%)	Ποσοστό επάνθισης μυκηλίου (%)
Γλαύκος	37	9
Ινστιτούτο	53	13
Καστρίτσι	50	20
Ζαβλάνι	35	0

Tenebrio molitor (προνύμφες 3^{ης} ηλικίας)

Περιοχές	Ποσοστό θνησιμότητας (%)	Ποσοστό επάνθισης μυκηλίου (%)
Γλαύκος	3	100
Ινστιτούτο	3	0
Καστρίτσι	7	0
Ζαβλάνι	10	0

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 ονομασίες των μυκήτων με την έντονη γραμματοσειρά ταυτοποιήθηκαν γονιδιακά (DNA sequencing) ενώ οι υπόλοιποι αναγνωρίστηκαν κατόπιν μικροσκοπικής εξέτασης και παρατήρησης προκειμένου να επιβεβαιωθεί, με βάση το σχήμα και το μέγεθος των σπορίων, το είδος του εντομοπαθογόνου μύκητα που προκάλεσε τη θνησιμότητα.

Plodia interpunctella

Περιοχές	Μύκητες που ανιχνεύθηκαν
Γλαύκος	<i>Metarhizium spp</i> , άγνωστο
Ινστιτούτο	άγνωστο, <i>Nigrospora sp.</i>
Καστρίτσι	<i>Penicillium spp.</i> , άγνωστο, <i>Nigrospora sp.</i>
Ζαβλάνι	άγνωστο, άγνωστο, <i>Nigrospora sphaericae</i> , άγνωστο, <i>Nigrospora sphaericae</i>

Rhyzopertha dominica

Περιοχές	Μύκητες που ανιχνεύθηκαν
Γλαύκος	άγνωστο, <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Metarhizium spp.</i> , άγνωστο, <i>Metarhizium spp.</i> , βακτήριο, <i>Nigrospora sp.</i>
Ινστιτούτο	Άγνωστο, βακτήριο, βακτήριο, βακτήριο, <i>Penicillium</i> , <i>Chaetomium acropullum</i>
Καστρίτσι	άγνωστο, άγνωστο, άγνωστο, <i>Aspergillus spp.</i> , <i>Aspergillus alliaceus</i> , βακτήριο, βακτήριο, βακτήριο
Ζαβλάνι	<i>Metarhizium spp.</i> , άγνωστο, <i>Nigrospora sp.</i> , <i>Metarhizium spp.</i> , <i>Nigrospora sp.</i> , <i>Nigrospora sphaericae</i> , <i>Nigrospora sp.</i> , <i>Aspergillus spp.</i> , βακτήριο, <i>Trichoderma gamsii</i> , <i>Nigrospora sp.</i> , <i>Chaetomium globosum</i> , <i>Aspergillus spp.</i> , <i>Nigrospora sp.</i> , <i>Apophysomyces ossiformis</i>

Tribolium confusum

Περιοχές	Μύκητες που ανιχνεύθηκαν
Γλαύκος	<i>Beauveria bassiana</i> , άγνωστο, <i>Beauveria bassiana</i>
Ινστιτούτο	<i>Chaetomium sp.</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Chaetomium truncatulum</i> άγνωστο, άγνωστο, βακτήριο, άγνωστο
Καστρίτσι	-
Ζαβλάνι	<i>Nigrospora sp.</i> , <i>Chaetomium truncatulum</i> , <i>Nigrospora sp.</i> , <i>Nigrospora sp.</i> , <i>Aspergillus insuetus.</i> , <i>Chaetomium sp.</i> , άγνωστο

Trogoderma granarium

Περιοχές	Μύκητες που ανιχνεύθηκαν
Γλαύκος	-
Ινστιτούτο	-
Καστρίτσι	-
Ζαβλάνι	άγνωστο

Ephestia kuehniella

Περιοχές	Μύκητες που ανιχνεύθηκαν
Γλαύκος	άγνωστο
Ινστιτούτο	άγνωστο, άγνωστο
Καστρίτσι	άγνωστο, άγνωστο, άγνωστο
Ζαβλάνι	-

Tenebrio molitor

Περιοχές	Μύκητες που ανιχνεύθηκαν
Γλαύκος	<i>Beauveria sp.</i>
Ινστιτούτο	-
Καστρίτσι	-
Ζαβλάνι	-

3.3 Μύκητες που ταυτοποιήθηκαν μέσω της αλληλούχισης

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης επεξεργάστηκαν στη διαδικτυακή βάση δεδομένων.ncbi με το BLAST και τέλος, προέκυψαν οι πιθανοί μύκητες από την αλληλουχημένη σειρά βάσεων με φθίνουσα σειρά ομοιότητας.

1. Χαρακτηρισμός βασιζόμενος στην ITS αλληλουχία του (BLASTN).
2. Το μήκος της ταυτόσημης συγκρινόμενης αλληλουχίας με τη χρήση BLASTN.

Δείγμα	Αλληλούχιση	Χαρακτηρισμός ¹	Μήκος Αλληλουχίας ²	Ομοιότητα
<u><i>Tribolium Confusum</i> - Ζαβλάνι (20170105CS8P1_H01_20 17-01-11)</u>	<pre> TAAATAAAGGATTTGACCGTATGCGAGGAGGATTAACAGAGATTTCAGAACTTCCCTAAACGCACTTCTTGAGGGT TACCTTT ATGCTTTCAGTTTCGGCGGATTCGCGCCGCGCCAGCGCCCGCGAGCGCCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG GAAAGCT AACTCTTTCAGCAACTGTATATGCGCTCTCTCTGAGTAACTATATCTTAATAGCTTAAAGTTTTCAGCAAA CGAGACTC CTTGGATTCTGGGATTCGATCGAGGAGCGAGCGAGGATCGGATAGTATATCTGATTTGATTCGAGGATTC ACTGAAT CATCGAATCTTTCAGAGCGCAATTCG GATTCGA ACCATGAGCGCCGAGCGCTCTCTTGGGAGACTCG CGGCTCG CTAGTCAAGCGCGAGCGCGAGTACAGTACAGCAATCGACTAGGAGACTCGTCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG AGCGCGCG CGACTATATGAGCGTTGACCTCTCGATCGAGGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG CGGAGAG A </pre>	<i>Chaetomium sp.</i>	547	99%
<u><i>Tribolium Confusum</i> - Ζαβλάνι (20170105CS8P2_H02_20 17-01-11)</u>	<pre> CGTCCCTCGGATATCTACCTGTATCGAGGATCACTTATATATGATGGAGGATTTAAACCGCGCGAG AAGCGCA CGAGCTCTCTAAGCGATGTATATCTACTACCGCTCGCGGTGACTAGCGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG TTACGCGG CTCGCGGAGCGCGCGAGCGTCCGCGAGAGAGAGCG CGCATTCG CGCGCGAGGATACCTCG TTCAAT TACTATCGACGATTTCCGCTCGCTTCTGATCGATCGCGAGAGCGAGAGATCCGTTCTGAAAGT TTTAAAT TATTAATATAGTTACTCAGAGAGCGCATACAGTTCTCAAGAGTTAGGTTTCTCGCGCGCGCGCGCGCGCG CGCGCGCG CG CGTTAG CGAGTTTTCGAGCTCTGTAATGATCTCTCCGCTGATTCAGAGCGAGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG TTTAACTT CGA </pre>	<i>Chaetomium sp.</i>	547	99%

Tribolium Confusum -
Ζαβλάνι
(20170105CS6P2_F02_20)
17-01-11)

TCDBAATACCAACTAACACTACCTGATLNGHYCAKCTYGTFAAMAATA
GACGTTTGGACGGGGGGGGG
GCDCGGCGCGCCCTAATCGAGCGGGTTCACAAAGCCCTACACACTEGA
GGACCGGAGCGGGCGGGCGGGCT
GGCTTTTCGGCGCGGTCCCGCAGGGGGAGGAGGACCCAGACACAGAG
CGGGCTTGAAGGGGACAGAACTGA
CGCTTCGGACAGGCAATGCGCGGAACTCCAGGGGGCGCGAATGTGGC
TTCAAGAGCTGCGATTCACCTC
AAHYTCGAAATTCAGATTAATTAAGGAAATTCGCTTCCATCTTAAATC
GATTCGCGAAACCAAGAAATTCAT
TCTTGAAGATTTTAAATGATTTCTGATGAGCTCAGAGACACTAA
GACAAAGATTTCAATGTGGCTC
CGGGGATACGGGCGGGGGGGGACCGCGAAACAAATTTGCTGAG
CTTATTAAGGGTGGAGTTAG
CGTACCTGGAGGACACTGACCTGATATGATCTTCCGACGCTT
CGCTACGGAAGCTTGTTAGGA
CTTTGCTTC

Tribolium Confusum -
Ζαβλάνι
(20170105CS7P1_G01_20)
17-01-11)

CACGGAGTGGGTGACCGGGAGGGACATTACAGAGTTGCAAAATCC
TAAACACTTGTGAALGTAGCCCA
AAKCGTTCTTCGGCGGGGGGGCTTCGGGGGGCCCGGGGGCTCGG
GGGGCGGGCGGGAGGTMOGCA
ACCAITGATACITTAATGGCTCTCTGAGCTTCTACTCAATAGCT
CAAACTTTCAGAGGGGATCTC
TTGGCTTTCGAGTGAAGAGAGGGAGCGGAATTCGATAATGATG
TCAATTCGAGAAATTCAGTCAATC
ATGGAATCTTGAAGCGACATTTGGCGCGGATTTCTGGCGGCA
TGGCTTTCGAGGCTCAITTCAA
CGATCAAGCGCGGGGCTTTCGTTGGGAGCTCGGGCTCGGGAGGC
CTGAAGAGAGGGGGGGTGG
TCTACAGACAGGCAAAATGAAATTCATCTTCGATCAGGGGGTACTAGC
GGTTCGGCGGTTAAACACACTT
CATAAECGAGGTTACCTGGGATGAGGTAGGAAGACCGGCTGAACT
TAAAGATATCAATTAAGTGAAGAA
A

Tribolium Confusum -
Ζαβλάνι
(20170105CS7P2_G02_20)
17-01-11)

AGGAGCTGGGATCTAGCTGATCGAGGTEACCTTGGGTTATGAG
GTGGTTTAAAGGGCGGAGACCGC
AGACAGCGCTTCAGGAAATGAAATTAATCTACTAGCTTCGGTGTGAGAGG
AGCGGCGAGTGGTTCTAGGG
CTGGGGAGCGCGGAGTCCGAGACAGCGGGGCTTTCATGCTTC
AAATCAGCTGGGAGAGCGGATTC
CGCGGAGAAATTCGGCGGCGCAATTCGATTTCAAGATTCGATGAT
TCAGTATTCATTCAGATTCAGAT
TCTTATAGGAAATTCAGCGGCTTCTATGATTCAGAGACAGAG
ATCCGCTTGTAAAGTTTGAAT
TATTCAGTCAAGAGACTCAGAGAGGCGATAAAGTCAATGCTTTC
GATACCTCGCGGGGGGGGGGG
AGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
GTAAAGCTTCAAGATGTTAGGG
ACTTTTGAACCTCTTAAATGATCTTCGATTCAGAGAGAGAGAA
GCTTGTAGGAACTTTCAGATTC
A

Aspergillus insuetus 553

99%

Chaetomium truncatum

531

99%

Chaetomium truncatum

518

99%

Trogoderma granarium -
Ζαβλάκι
20140422CS3P2_C02_201
6-04-27

```
CTTCCCGCATGAGATTGCGHGGGCGACRABRAGTGGHTGAGCA
RAHYECCCTCTRETCGCGYAVT
CATTTACCCGCGCCSRNAGCGCCTTTTDSACCTGACCCCTGGCCGCG
CGAWTTTCTCTGGACAGADAGA
WCTYNTCAAGITGCCGATYIATRAAATAIATAATTGCTCTWAAAAA
TGTCCANCTTGCATTCCCTCCMGA
TACCTTCSABJL CAGGAMT TCTCCANCTAATTCGAAADLYGHSITTTA
CGGAGCGNATCCCTCTCTCATTT
SACTCGAATTTTCATACCCGCTTCTTCCGCGYATWAGAGGGGAGAG
YCCMATMCTTTCATACNAMTAT
TFTGATTTGGTGGTCAGCCTCAATGGATTTGAKCCTTACCKGGATK
LGGATTAACGACGACCGKGGTAA
NTGAAHAGCCACCGGAATTTGTCTGTCTC
```

Tribolium confusum -
Ινσιτιούτο
(20140422CS4P1_D01_20
16-04-27)

```
CCGAAAGGTGAGGTGCSAGAGCTYNGAGGCTGTGGGGTTCGCVCA
TGGATCCTACGCGCACCCRTGTG
TACTGTACCTCTGTTGCTGCCATOKACCGGACCGCCACAGAGSDD
CTTCTGCCGAWYGGCCNKGCC
GGCSATCAGWYGTACTYCTTSTYTGATTAATKAAETCTGATGAATM
TAGAHVCTTCALAGATTTCAAA
WYFQDZCTTTTCTGTTGGCTTCAAGSANGAKREZATCKAATGDC
AATAGLGAATGGAAANAAAKTT
CCTTGATGAATYTTGKAAAGSACATTTCRCGCCCTGTGATGG
GGAGHTEATGCTTGACRGTGCSN
YATTCGSAUCNCHWIKJCALAACTCAGTGTGAMTCTCCDHONRUK
AGGAGAGAGGACCRANAGGCRGRH
CGGCGCNATYCAKCCCGGACANH93ZGGGCTTJZKCNAMITAA
GAKCGRGAGYTAGGGAGGCG
CGAAGC
```

Aspergillus sp.

232

68%

Tribolium confusum -
Ινσιτιούτο
(20140422CS4P2_D02_20
16-04-27)

```
TTTTGCTTATTAAGCTGGGGCTGWHMTTCAGGGTGTGGGGTCC
CCGAGGGTCTTAAMAGAGGACAC
TUTSAPYACULUULCAGAGATGATITACTACCTCCGACTGACTYK
CGAGCCGCTATTGCTTTGAC
GGCTGCSGNGCCCTCKGCTCCDKKAGAMTANAGGGGGCTTTGTTGT
GAATGACCTCCACAGSACATG
CCCTCCNMAIACTGRCGGCTCAATGGCTTCAAGATTCAGYCA
TICRATGATTCWGGATTCACA
TBACTKATYATTTGATGCTBYCTTATAGATCCCATATCCANCA
CATTCCTGCTAGGTTTTCAG
TFAATTAATTAATATTECRATAGGRCATARISHTTCAAGATTTGAM
TTCCTCCSGGGGGGAGYVAG
GGZRGGGGGCGGGGGRATYGTGCCGCCCGGACATTTGGGT
GAWTGRACRAPHATGTTGATAG
GAGATTAGGATATABAAAASYTTGTYAATYAAAAAAAARABT
ARAWA
```

*Chaetomium
acropullum*

487

78%

Rhizopertha dominica -
Καστρίτσι
(20140422CS5P1_E01_20
16-04-27)

```
ATTGCGGCTATCCCTACCTGVCCEGRTVADZTGGAGAAAATGG
TTCCTTTCLESTTCGLJLJLEL:
GCGGGGGCTCGAGAGCGGCTGACAAAGCCCATACGCTCGAGGAGCG
GAGCGGCTGGCGGGCTGCTTT
UAGGACGCTCCCGCCGATGAGACAGGACCCACACAGCCGCTGC
TGTATGGGAGCAATGAGCTG
GAGHACALCCCCCGGATACAGGGGGGCAHTGTGUSTTCAAA
GACTGCTGATTCAGGAAATTC
GCAATCAGATAGTATCGCATTTCCGCTGGCTTCTGATCGAGCC
DGAAACANAGNATCCATTTTGA
AGTTTAACTGATTTGTGCAATCACTEAGACTCACTAGATCA
GACAGATTCATGCTCTCCGGG
GGGAGGGGGGGGGGGAGAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
CCCGCCGACAGCAAGGAGAGGAG
CTATACAGCGGTTGGGAGGTTGGGCTCCAGGAGGAGGAGGAGGAG
CTAATGATCCTTCCGAGGTTCA
CCTACGAAAGCCTTCTTACGACTTTTACTTCCA
```

Aspergillus alliaceus

618

99%

Rhizopertha dominica -
Καστρίτσι
(20140422CS5P2_E02_20
16-04-27)

```
TTCGCTAGTGAECTGGCGAGGATVITACCGAGTGTAGGGTTCCTCG
TGGAGCCALNCTCCAGCCGTTG
TPTAGTHTAGCTGGTTGCTTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
GGGGGGTTTGGCCCGGGGGCG
CCCGCCCGGAGCAATGACTCTGTGTGATCTAGTGAAGTCTGAG
TGTGATTCACAGACTGATTA
AACITTCACAGATGATCTCTTGGTTCGGGATCGATGAGAGCCGA
RGGAAATGATTAAGTAACTGATG
ATTTCAGAAATTCGTTAATATAGCTCTTTCAGAGGAGATTCCGCG
CCCTGTATTCGCGGGGAGTGG
TCTCCGCAAGTCTATTTCTGCCALGAGCAGULYFTGTIHTTGGG
TCTCTCTCCCGCCGGGAGGCT
GGCGAAGGGAGGGGGGGAGCCGCGCTCCGCTCTGAGGDTATGGG
GCTTCTLACCCGCTLIGAGGCG
CCGGCCGGGGCTGGCGGAGGCGGAGAGCAACCATTTTCTCCAGGTT
GALCTGGATCAGTAFGRANTAC
CCCTCAACTTAAZCATATCATAGCGGAGGAA
```

Aspergillus alliaceus

618

99%

Rhizopertha dominica -
Ινσιτιούτο
(20140422CS6P1_F01_20
16-04-27)

```
TEITLYTAVCCBRTMAKCTTGGTAAATAGHLYITTAAGCGGCG
GAGCCGGAGGAGGCGCTGAGGGA
GATYTAATYATAGGCTCGAGYBACTYAGGAGCGCGGCGGAGTGGYTT
CAGGGGCTTGGCGAGGUCAGGCT
CCDCAGCAGAGCGGGGGCTTGAITGGATGAAATGAGGCTCGAAGAG
GCAITGCGGCGULGAAATGCTGGG
GGGCAATGTGTCTCAAAATTCGATGATCACTCAATCTGCAAT
TCACATTCATTCGATTTCCG
TGGCTGTTTATGATGCGAGAAAGAGAGATGERTTITGAAAGTT
TTCATTAITAAATCACTC
AGAGAGGCGATACATTTTCAGAGITAGATACCTCCGGCGGGGGCG
GTAGAGGCTTGGAGGCTCGAGG
GAGCGGAGGAGGCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
TGGTTTGGGAGCTTTCAGCTCT
TFAATGATCCCTCCCTCTCCAGCAGCGAGAGCTTTTADGACTT
TACTTCCA
```

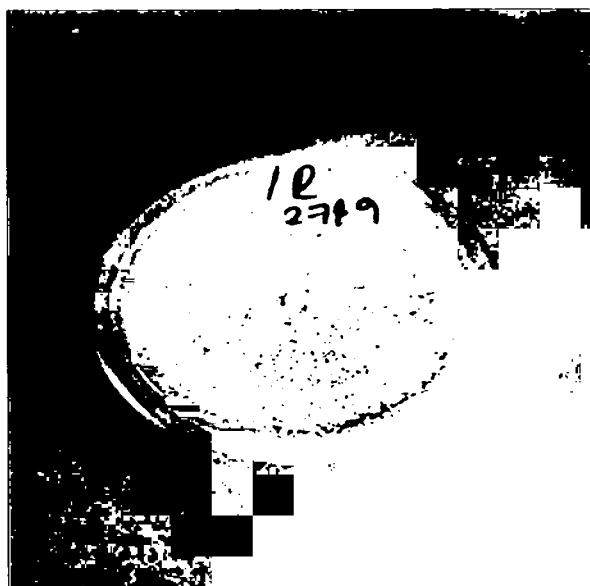
Chaetomium sp.

522

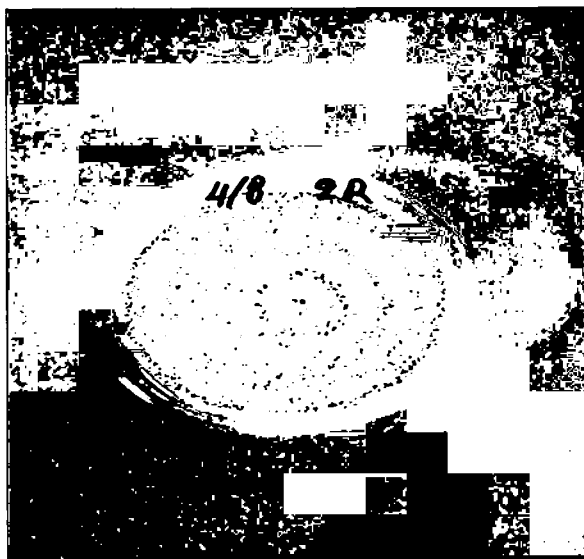
98%

Εικόνα 21: Αλληλουχίες απομονωμένων μυκήτων από έντομα.

Παρακάτω παρατίθενται εικόνες των μυκήτων που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν γονιδιακά κατά την διάρκεια του πειράματος στο Ινστιτούτο Προστασίας Φυτών Πάτρας:



Εικόνα 22: Ο μύκητας *Aspergillus alliaceus* (Ινστιτούτο Πάτρας, 2016)



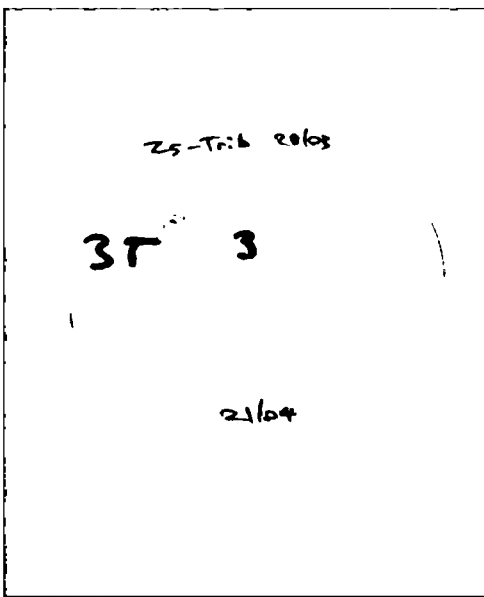
Εικόνα 23: Ο μύκητας *Chaetomium acropullum* (Ινστιτούτο Πάτρας, 2016)



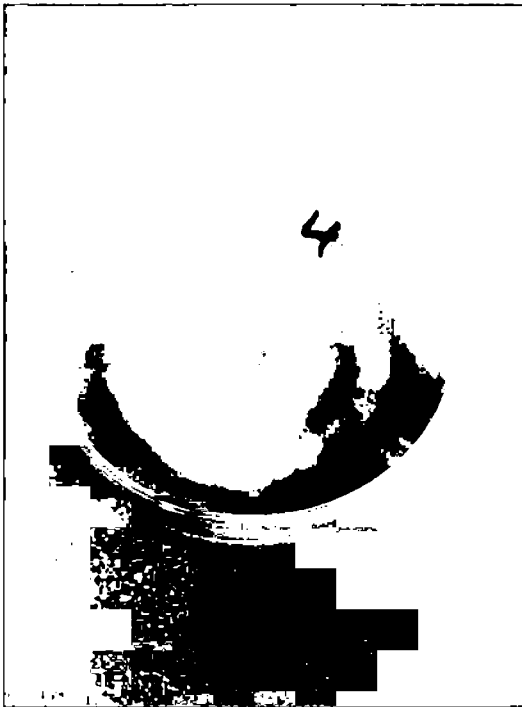
Εικόνα 24: Ο μύκητας *Trichoderma gamsii* (Ινστιτούτο Πάτρας, 2016).



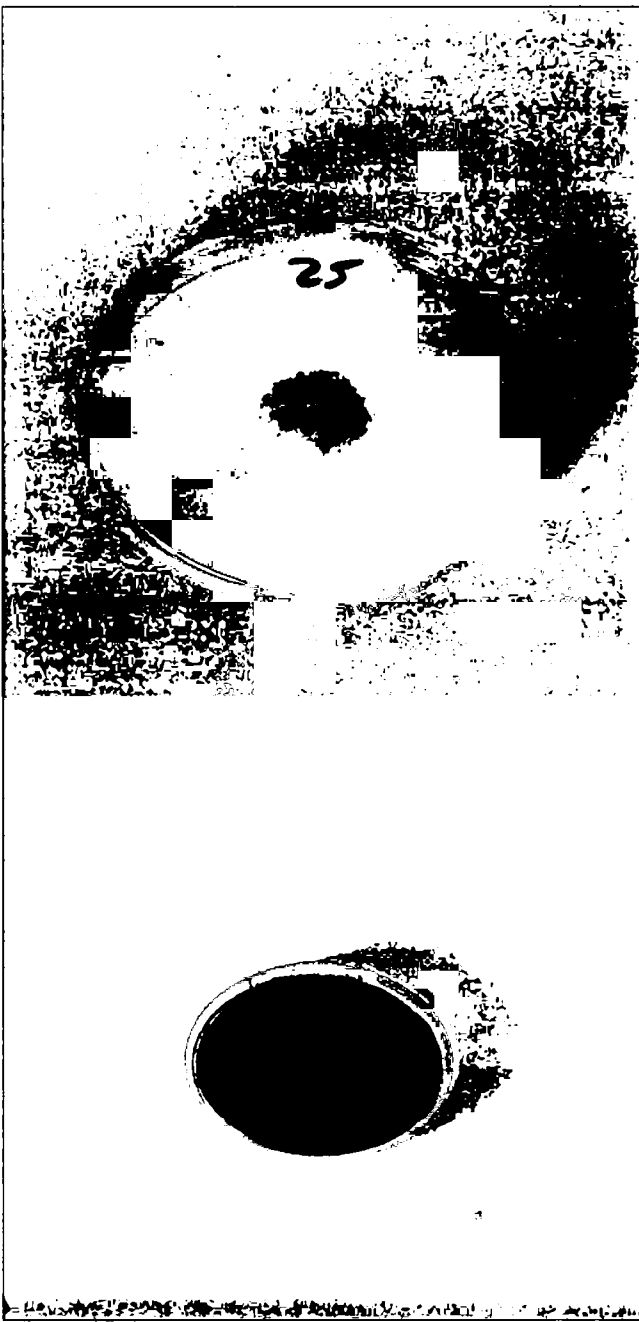
Εικόνα 25: Ο μύκητας *Aporhysomyces ossiformis* (Ινστιτούτο Πάτρας, 2016).



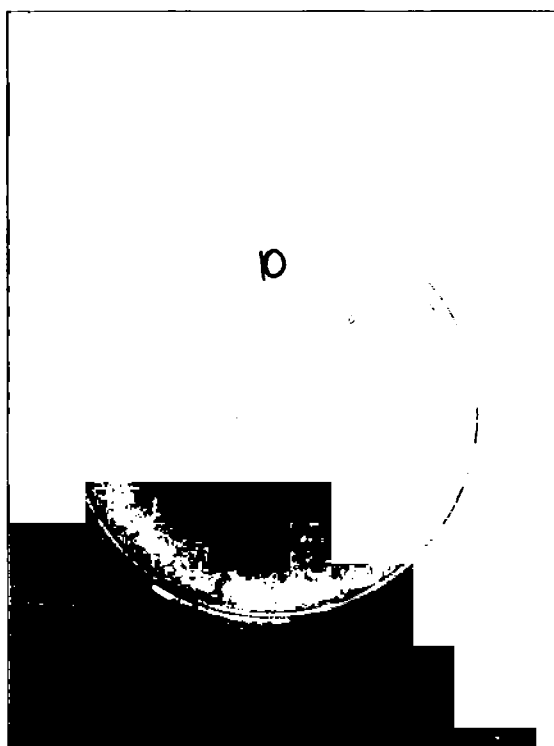
Εικόνα 26: Ο μύκητας *Chaetomium truncatulum* (Ινστιτούτο Πάτρας, 2016).



Εικόνα 27: Ο μύκητας *Chaetomium iraniamum* (Ινστιτούτο Πάτρας, 2016).



Εικόνες 28 29 Μύκητες του γένους *Chaetomium* (Ινστιτούτο Πάτρας, 2016).



Εικόνα 30: Ο εντομοπαθογόνος μύκητας *Beauveria bassiana* (Ινστιτούτο Πάτρας, 2016)

Συζήτηση

Η σύγχρονη τάση στο πεδίο της παραγωγής προϊόντων με ολοκληρωμένες μεθόδους παραγωγής και διαχείρισης ευνοεί την ανάπτυξη βιολογικών σκευασμάτων, που τείνουν να αντικαταστήσουν τα χημικά-συνθετικά σκευάσματα με τα οποία αντιμετώπιζονταν οι ασθένειες, οι προσβολές και η θήρευση των καλλιεργειών. Για το σκοπό αυτό, πολλά είδη εντομοπαθογόνων μυκήτων έχουν χρησιμοποιηθεί εναντίον διαφόρων επιβλαβών για τις καλλιέργειες εντόμων και έχουν επιδείξει ικανοποιητικά επίπεδα ελέγχου. Αρκετά είδη εξ αυτών έχουν αναφερθεί ως σημαντικοί παράγοντες αντιμετώπισης επιζήμιων εντόμων - εχθρών στις καλλιέργειες, όπως οι εντομοπαθογόνοι μύκητες της τάξης *Hyocreales* *M. robertsii* και *B. 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 ανεύρεση και η μοριακή ταυτοποίηση των εντομοπαθογόνων μυκήτων *B. bassiana*, *M. anisopliae* var *anisopliae* και var *robertsii* (Bischoff et al. 2009) και οι μύκητες με εντομοπαθογόνο φάση *Chaetomium acropullum*, *Aspergillus alliaceus*, *Trichoderma gamsii*, *Chaetomium truncatulum*, *Apophysomyces ossiformis* και *Chaetomium globosum* στην Ελλάδα δίνει τη δυνατότητα αξιοποίησης αυτών των μυκήτων, κατ' αρχήν ως φυσικών παραγόντων βιολογικής αντιμετώπισης και εν συνεχεία ως παραγόντων για την ανάπτυξη βιολογικών σκευασμάτων. Οι παραπάνω μύκητες συλλέχθηκαν και προσδιορίστηκαν με τις εξής μεθόδους: α) με την δολωματική μέθοδο (Insect bait method), και β) με τη μέθοδο των ημιεκλεκτικών υποστρωμάτων (Strasser et al. 1996) και έγινε γονιδιακή ταυτοποίηση (DNA sequencing) των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) από περιοχές του Νομού Αχαΐας με ικανοποιητικά αποτελέσματα για την ανάπτυξη βιολογικών σκευασμάτων.

Η χρήση των εντομοπαθογόνων μυκήτων δεν απαιτεί ταυτόχρονη κατάργηση των συνθετικών σκευασμάτων αλλά δημιουργεί ένα καινούριο πλαίσιο συνεργασίας με την φύση και το περιβάλλον και εξασφαλίζει προστασία και ποιότητα στον μέσο καταναλωτή. Αποτελεί δε ένα καινούργιο πεδίο έρευνας που θα οδηγήσει σε μια φιλική ως προς το περιβάλλον γεωργία έχοντας σαν γνώμονα την προστασία του περιβάλλοντος. Υπάρχουν πολλά είδη μυκήτων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη Βιολογική Αντιμετώπιση των ζωικών εχθρών των καλλιεργειών, από του πιο μελετημένους και τους πιο γνωστούς μύκητες είναι ο *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 *C. acropullum*, *A. alliaceus*, *T. gamsii*, *C. truncatulum*, *A. ossiformis* και *C. globosum* 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.

Η χρήση διαφορετικών εντόμων (Insect bait method) (unpublished) ως μέσα παγίδευσης, εκτός του *Galleria mellonella* (*Galleria* bait method) (Zimmermann 1986), μπορεί στο μέλλον να αποδειχθεί σημαντική τόσο στο πεδίο της εντομοπαθολογίας, όσο και στην οικονομία της

επιστήμης. Στο πεδίο της εντομοπαθολογίας θα οδηγήσει στην ανεύρεση καινούριων στελεχών των εντομοπαθογόνων μυκήτων πιο αποτελεσματικών σε σχέση με τα χρησιμοποιούμενα μέχρι σήμερα στελέχη. Από την άλλη, στην οικονομία της επιστήμης, αφού με την χρήση οικονομικότερων εκτροφών θα μειωθεί δραστικά το κόστος οπότε και αυξάνεται η επαναληψιμότητα σημαντικών πειραματικών διεργασιών. Η αποτελεσματικότητα των εντομοπαθογόνων μυκήτων είναι η διαδικασία με την οποία εισέρχονται αυτοί στο έντομο και αποτελεί μια αλληλουχία γεγονότων που επηρεάζεται από εσωτερικούς και εξωτερικούς παράγοντες, οι οποίοι τελικά καθορίζουν εάν το παθογόνο θα διαρρήξει την επιδερμίδα του ξενιστή ή όχι (Μαντζούκας 2013).

Εκτός από την χρήση καινούριων εντόμων-παγίδων, η ταυτοποίηση των στελεχών των εντομοπαθογόνων μυκήτων που προέκυψαν, αποτέλεσε σημαντικό αντικείμενο της παρούσας εργασίας. Για την ταυτοποίηση χρησιμοποιήθηκαν σύγχρονες μοριακές τεχνικές που πρώτη φορά εφαρμόζονται στο πεδίο της εντομοπαθολογίας. Τέλος, το τελικό αποτέλεσμα της μόλυνσης από τους εντομοπαθογόνους μύκητες εξαρτάται από την γενετική ικανότητα του μύκητα να μολύνει, από την ικανότητα του εντόμου να αμύνεται και από ένα μεγάλο αριθμό βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων και αλληλεπιδράσεων (Shahid et al. 2012).

Εν κατακλείδι η χρήση των ολοκληρωμένων μέσων και μεθόδων παραγωγής και διαχείρισης, μέσω μελετών (Αποτελεσματικότητας, Μολυσματικότητας, Διεύρυνση καινούργιων ξενιστών, Ενδοφυτικότητα), θα δώσουν την δυνατότητα εφαρμογής σε ευρεία κλίμακα των εντομοπαθογόνων μυκήτων ως μέσα αντιμετώπισης, συνεισφέροντας ουσιαστικά στο σημαντικό και ευαίσθητο τομέα της φυτοπροστασίας. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα προς την κατεύθυνση αυτή από όλους όσους λαμβάνουν μέρος σε αυτό το ευαίσθητο πλην όμως σημαντικό τομέα στη γεωπονική επιστήμη. Η διερεύνηση της χρήσης των εντομοπαθογόνων μυκήτων ως παραγόντων βιολογικής αντιμετώπισης έχει στόχο τόσο τη διασφάλιση της ποιότητας των γεωργικών προϊόντων που παράγονται στην χώρα μας, όσο και της υγείας του καταναλωτή που είναι και ο τελευταίος αποδέκτης αυτών .

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 of 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. Waiton, D.W.H. (Eds.) *Invertebrate Microbiology: 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, K., & 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. & Anagnou-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. and Brooks, W.A. 1997. *Biological techniques series – Manual of techniques in insect pathology*. Academic press, London. P:8-11.

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, M.T.; Martingο, J.M.; 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.

Mirhosseini, S. Z., Seidavi, A., Shivazad, M., Chamani, M., Sadeghi, A. A., & Pourseify, R. (2010). Detection of *Clostridium* sp. and its Relation to different ages and gastrointestinal segments as Measured by molecular analysis of 16 rRNA genes. *Brazihan Archives of Biology and Technology*, 53(1), 69–76. <http://doi.org/10.1590/S1516-89132010000100009>

Μοριακή ταυτοποίηση και in vitro εκτίμηση της ανάπτωξης μυκή των από αρτοσκευάσματα που 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.

Steinhaus, E. A. 1949. Principles of Insect Pathology. McGraw-Hill Book Company, Inc., N.Y., U.S.A.

Quesada-Moraga, E., Landa, B. B., Munoz-Ledesma, J., Jimenez-Diaz, R. M., Santiago-Alvarez, C., 2006. Endophytic colonization of opium poppy, *Papaver somniferum*, by an entomopathogenic *Beauveria bassiana* strain. *Mycopath.* 161: 323–329.

Saikkonen, K., Ion, D., Gyllenberg, M., 2002. The persistence of vertically transmitted fungi in grass metapopulations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 269: 1397–1403.

Tanada, Y. 1993. Epizootiology of infectious diseases, In: *Insect Pathology*, Ed: Steinhilber E, Academic Press, Inc, USA., p: 461-468.