



Πανεπιστήμιο
Ιωαννίνων

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΠΜΣ «ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΑΓΡΟΔΙΑΤΡΟΦΗ»

“Η επίδραση του ενδοφυτικού εντομοπαθογόνου μύκητα *Beauveria bassiana* στο ημίπτερο *Aphis gossypii* σε καλλιέργεια πεπονιού στην περιοχή της Κόνιτσας.”

Ονοματεπώνυμο: Δασκαλάκη Ευφροσύνη Ραφαέλλα

Ακαδημαϊκό έτος 2022-2023

Τριμελής επιτροπή

Πατακιούτας Γεώργιος (Επιβλέπων)

Ηλιόπουλος Παναγιώτης

Μαντζούκας Σπυρίδων

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η υλοποίηση και η ολοκλήρωση του πειραματικού μέρους του μεταπτυχιακού προγράμματος «ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΑΓΡΟΔΙΑΤΡΟΦΗ» του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, έγινε με την πολύτιμη βοήθεια του κύριου Πατακιούτα Γεώργιου και του κύριου Μαντζούκα Σπυρίδων. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον κύριο Μαντζούκα για την πολύτιμη στήριξη και καθοδήγηση που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Επιπλέον, δεν θα ήθελα να παραλείψω να ευχαριστήσω τον κύριο Ντίνο Πασχάλη που μας παραχώρησε τον πειραματικό αγρό, τον μηχανισμό άρδευσης και τα φυτά πεπονιάς που μεταφυτεύσαμε στον αγρό, την φαρμακευτική εταιρία BASF για την παραχώρηση του σκευάσματος Velifer και την Εντομολογική Εταιρεία Ελλάδος για την οικονομική ενίσχυση που μου παρείχε χάρη στην υποτροφία που κέρδισα. Τέλος αξίζει ένα μεγάλο ευχαριστώ ο σύζυγός μου που με στηρίζει σε κάθε μου βήμα και μου δίνει κουράγιο και δύναμη σε οτιδήποτε κάνω!

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες (EPF) μπορούν να αποικίζουν φυτικούς ιστούς και να δρουν στις καλλιέργειες όχι μόνο ως βιοπαρασιτοκτόνα, αλλά και ως βιοδιεγέρτες, προάγοντας την φυτική ανάπτυξη και ενεργοποιώντας τους φυτικούς αμυντικούς μηχανισμούς. Στο παρόν πείραμα πεδίου, πραγματοποιείται η αξιολόγηση των εμπορικών σκευασμάτων δύο στελεχών του *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae), GHA (Botanigard) και PPRI 5339 (Velifer® ES) και ενός άγριου στελέχους (AP0101) που απομονώθηκε από την Αχαΐα, Ελλάδα. Τα τρία στελέχη ερευνήθηκαν στο πεδίο για τις ενδοφυτικές τους επιδράσεις στο πεπόνι *Cucumis melo* (Cucurbitales: Cucurbitaceae) και ειδικότερα για την ικανότητά τους να αποικίζουν φυτικούς ιστούς, να ελέγχουν την προσβολή των φυτών από τα μυζητικά έντομα *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) και να βελτιώνουν τις παραμέτρους ανάπτυξης των φυτών (ύψος φυτού, αριθμός λουλουδιών και καρπών). Όλα τα πειραματικά στελέχη αποίκισαν με επιτυχία τα φυτά *Cucumis melo*. Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του πληθυσμού της αφίδας στα φυτά που είχαν εμβολιαστεί με τα τρία στελέχη του εντομοπαθογόνου μύκητα σε σχέση με τα φυτά ελέγχου. Όσον αφορά την φυτική ανάπτυξη, τον αριθμό των λουλουδιών και των καρπών, αυξήθηκαν σημαντικά στα φυτά που ήταν εμβολιασμένα με τα στελέχη του *B. bassiana* AP0101 και PPRI 5339. Τα αποτελέσματά μας, υποδεικνύουν ξεκάθαρα ότι οι ενδοφυτικοί μύκητες μπορούν να δράσουν αποτελεσματικά ως παράγοντες διπλής δράσης, δρώντας τόσο ως εντομοκτόνα, όσο και ως προαγωγείς ανάπτυξης.

Λέξεις κλειδιά: Εντομοπαθογόνοι μύκητες, ενδόφυτα, βιολογικός έλεγχος, αφίδες, βιοδιεγέρτες, φυτική ανάπτυξη.

ABSTRACT

Entomopathogenic fungi (EPF) can colonize plant tissues and serve crops not only as biopesticides but also as biostimulants that promote plant growth and trigger defense mechanisms. In this context, field trial was conducted evaluating two commercial strains of the entomopathogen *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae), GHA (Botanigard) and PPRI 5339 (Velifer® ES) and a wild strain (AP0101) isolated from Achaia, Greece. The three strains were investigated in the field for their endophytic effects on melon *Cucumis melo* (Cucurbitales: Cucurbitaceae) and in particular for their ability to colonize plant tissues, control infestations of sucking insects *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) and improve plant growth parameters (plant height, number of flowers and fruits). All experimental fungal strains successfully colonized the *C. melon* plants. A significant decrease in the aphid population was observed in the treated plants compared to the untreated control. As for plant growth, the number of flowers and fruits was significantly increased in plants treated with *B. bassiana* strains AP0101 and PPRI 5339. Our results clearly indicate that fungal endophytes can efficiently act as dual action agents demonstrating both insecticidal and growth-promoting effects.

Keywords: Entomopathogenic fungi, endophytes, biological control, aphids, biostimulant, plant growth.



Article

Dual Action of *Beauveria bassiana* (Hypocreales; Cordycipitaceae) Endophytic Stains as Biocontrol Agents against Sucking Pests and Plant Growth Biostimulants on Melon and Strawberry Field Plants

Spiridon Mantzoukas ^{1,*}, Eufrosini Daskalaki ¹, Foteini Kitsiou ², Vasileios Papantzikos ¹,
Dimitrios Servis ³, Stergios Bitivanos ³, George Patakioutas ^{1,*} and Panagiotis A. Eliopoulos ^{4,*}

¹ Department of Agriculture, Arta Campus, University of Ioannina, 45100 Ioannina, Greece

² Laboratory of Plant Physiology, Department of Biology, University of Patras, 26504 Patras, Greece

³ BASF Hellas S.A., 15125 Marousi, Greece

⁴ Laboratory of Plant Health Management, Department of Agrotechnology, University of Thessaly, Geopolis, 41500 Larissa, Greece

* Correspondence: sdmantzoukas1979@gmail.com (S.M.); gpatakiu@uoi.gr (G.P.); eliopoulo@uth.gr (P.A.E.)



Citation: Mantzoukas, S.; Daskalaki, E.; Kitsiou, F.; Papantzikos, V.; Servis, D.; Bitivanos, S.; Patakioutas, G.; Eliopoulos, P.A. Dual Action of *Beauveria bassiana* (Hypocreales; Cordycipitaceae) Endophytic Stains as Biocontrol Agents against Sucking Pests and Plant Growth Biostimulants on Melon and Strawberry Field Plants. *Microorganisms* **2022**, *10*, 2306. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112306>

Academic Editors: Maria Maddalena Del Gallo and Annamaria Bevivino

Received: 16 October 2022

Accepted: 19 November 2022

Published: 21 November 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Entomopathogenic fungi (EPF) can colonize plant tissues and serve crops not only as biopesticides but also as biostimulants that promote plant growth and trigger defense mechanisms. In this context, field trials were conducted evaluating two commercial strains of the entomopathogen *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae), GHA (Botanigard) and PPRI 5339 (Velifer® ES) and a wild strain (AP0101) isolated from Achaia, Greece. The three strains were investigated in the field for their endophytic effects on melon *Cucumis melo* (Cucurbitales: Cucurbitaceae) and strawberry *Fragaria* sp. (Rosales: Rosaceae) plants and in particular for their ability to colonize plant tissues, control infestations of sucking insects *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae), *Chaetosiphon fragaefolii* (Hemiptera: Aphididae) and *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae), and improve plant growth parameters (plant height, number of flowers and fruits). All experimental fungal strains successfully colonized both plants. A significant decrease in the aphid and thrip populations was observed in the treated plants compared to the untreated control. As for plant growth, the number of flowers and fruits was significantly increased in plants treated with *B. bassiana* strains AP0101 and PPRI 5339. Our results clearly indicate that fungal endophytes can efficiently act as dual action agents demonstrating both insecticidal and growth-promoting effects.

Keywords: entomopathogenic fungi; endophytes; biological control; aphids; thrips; biostimulant; plant growth

1. Introduction

One group of insects of great importance to agriculture and the integrated pest management (IPM) program are the sucking pests. The piercing-sucking mouthparts of these pests have evolved to penetrate plant tissue by piercing it and sucking out the juices, causing damage while carrying pathogenic microorganisms and transmitting diseases to the plants [1]. Heavily infested plants show symptoms, such as leaf chlorosis, wilting and malformations and may eventually die [2]. Among the harmful sucking pests, the cotton or melon aphid *Aphis gossypii* (Glover), the strawberry aphid *Chaetosiphon fragaefolii* (Cockerell) (Hemiptera: Aphididae) and the Western flower thrip *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) are of great interest because in all their developmental stages, they deprive plants of nutrients [2–5] and at the same time transmit viral diseases [3–7], resulting in significant financial losses in the production of commercially important crop species, such as melons and strawberries.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.2. ΒΙΟΔΙΕΓΕΡΤΕΣ ΦΥΤΩΝ	10
1.3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ	17
1.4. ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΟΙ ΕΝΤΟΜΟΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ	19
1.4.1. Ο εντομοπαθογόνος μύκητας <i>Beauveria bassiana</i>	26
1.5. Το ημίπτερο <i>Aphis gossypii</i>	31
1.6 ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗΣ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ (IPM) ..	32
1.7 ΣΚΟΠΟΣ	35
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	36
2.1 Προετοιμασία του πειραματικού αγρού.	36
2.2 Ανίχνευση των EPF σε φύλλα του φυτού πεπονιάς	38
2.3 Μοριακή Ανίχνευση των εντομοπαθογόνων μυκήτων στους ιστούς του πεπονιού.	39
2.3.1 Εξαγωγή ολικού γονιδιώματος των φυτών.....	39
2.3.2 Εξαγωγή ολικού γονιδιώματος των εντομοπαθογόνων μυκήτων	39
2.3.3 Πολλαπλασιασμός των γονιδίων στόχων μέσω της PCR.....	40
2.3.4 Η αντίδραση της PCR.....	40
2.4 Εκτίμηση της φυσικής προσβολής των φυτών πεπονιού από το ημίπτερο <i>A. gossypii</i> ..	40
2.5 Στατιστική ανάλυση.	40
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	41
3.1 Απομόνωση εντομοπαθογόνου μύκητα από φύλλα πεπονιού σε υπόστρωμα SDA.	41
3.4 Ο πληθυσμός των αφίδων στα φυτά.....	42
3.5 Αξιολόγηση της φυτικής ανάπτυξης.	43
4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	46
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	51

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Από την αρχαιότητα, ο γεωργικός τομέας αντιμετωπίζει καταστροφικές ζημιές που προκαλούνται από ζιζάνια, ιούς, νηματώδεις, μύκητες, βακτήρια, πρωτόζωα, επιβλαβή έντομα, ζώα και πτηνά, οδηγώντας σε μειωμένη παραγωγή της καλλιέργειας. Οι πιο σοβαρές απώλειες στην παραγωγή προκαλούνται κυρίως από έντομα, ασθένειες (ιοί, μύκητες, βακτήρια και πρωτόζωα) και ζιζάνια. Είναι γεγονός ότι περίπου το 10-16% της παγκόσμιας παραγωγής τροφίμων, χάνεται λόγω ασθενειών των φυτών που προκύπτουν στο χωράφι καθώς και μετά τη συγκομιδή τους (De Silva et al., 2019) και το 18-26% της ετήσιας παγκόσμιας παραγωγής, που αντιστοιχεί περίπου σε \$470 δις., χάνεται εξαιτίας της προσβολής τους από επιβλαβή έντομα (Culiney, 2014). Το μεγαλύτερο μέρος των απωλειών (13-16%) λαμβάνει χώρα στο χωράφι πριν την συγκομιδή, ενώ ένα άλλο σημαντικό μέρος των απωλειών συμβαίνει κατά την αποθήκευση των γεωργικών προϊόντων. Μπορεί το 50-60% των αποθηκευμένων σιτηρών να χαθεί, λόγω των ανεπαρκών μέτρων ελέγχου (Kumar & Kalita, 2017). Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν διάφορες στρατηγικές αντιμετώπισης. Μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους απαλλαγής από επιβλαβείς οργανισμούς, είναι η χρήση χημικών/συνθετικών φυτοφαρμάκων (π.χ. καρβαμικά, οργανοφωσφορικά κ.α.) (Singh et al., 2019).

Παρά την επιτυχή αντιμετώπιση των προβλημάτων αυτών, η ανεξέλεγκτη χρήση των χημικών φυτοφαρμάκων επιφύλασσε κινδύνους για την υγεία και το περιβάλλον. Αρχικά, τα χημικά φυτοφάρμακα έχουν μακρά περίοδο παραμονής στο περιβάλλον. Επιπλέον, η αδιάκριτη και συνεχής χρήση τους είχαν ως αποτέλεσμα την κλιμάκωση των προβλημάτων που προκαλούνται από τα υπολείμματα των φυτοφαρμάκων, την ανάπτυξη αντοχής των επιβλαβών οργανισμών και την απώλεια ωφέλιμων οργανισμών μη στόχων. Η έντονη χρήση χημικών, έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε μία ή σε περισσότερες κατηγορίες εντομοκτόνων, σε περισσότερα από 500 είδη αρθροπόδων εντόμων (Kumar & Kalita, 2017). Ακόμα, οι περιβαλλοντικοί και επισιτιστικοί κανονισμοί αποτελούν εμπόδιο για την ανάπτυξη νέων εντομοκτόνων, τόσο από άποψη χρόνου όσο και κόστους. Περίπου 140.000 εντομοκτόνες ενώσεις πρέπει να ελεγχθούν ώστε να βρεθεί μία ένωση, η οποία θα πληροί τους κανονισμούς και μπορεί να χρειαστούν περισσότερα από \$250 εκατομμύρια και 8-12 χρόνια πριν αναπτυχθεί και καταχωρηθεί ένα νέο εντομοκτόνο (Omkar, 2016).

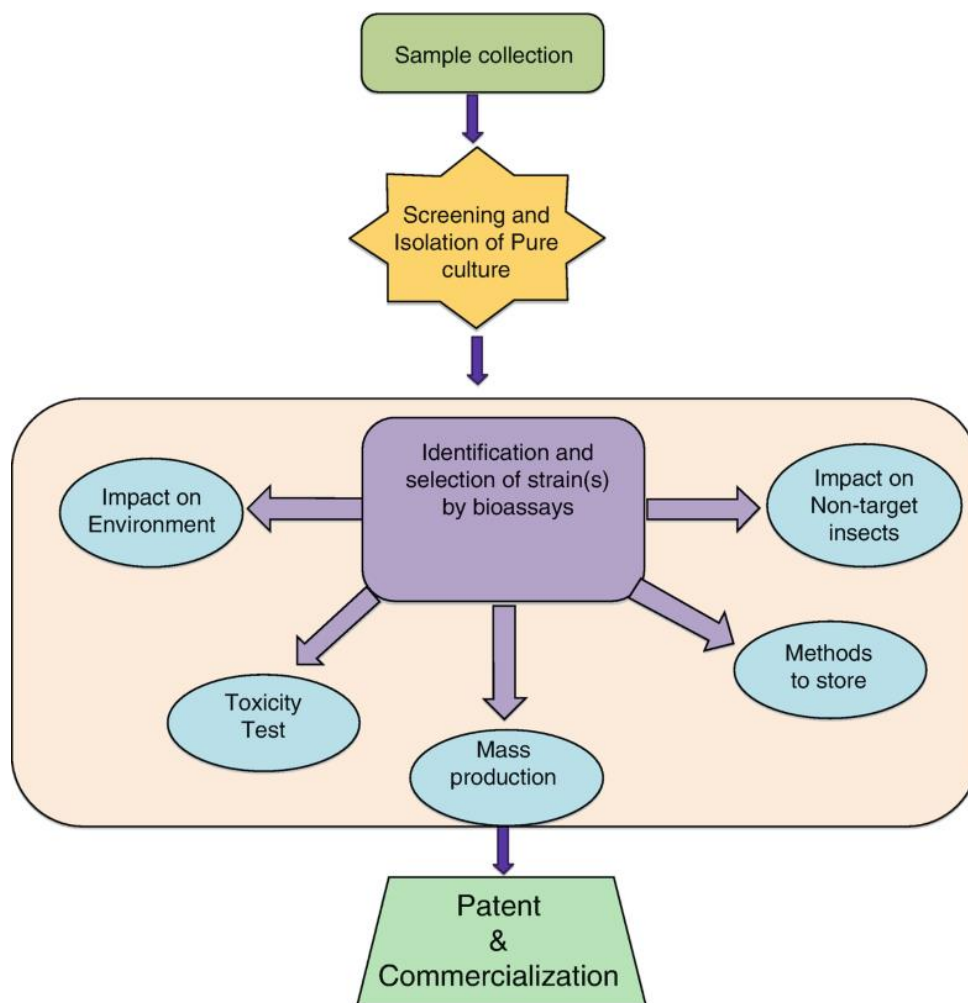
Για να αντιμετωπιστούν οι κίνδυνοι που σχετίζονται με τα χημικά φυτοφάρμακα, υπάρχει η ανάγκη να εφαρμοστεί μία φιλική προς το περιβάλλον προσέγγιση, όπως είναι η ανάπτυξη βιολογικών φυτοφαρμάκων, τα οποία προέρχονται από φυσικά υλικά που απαντώνται στη φύση, όπως φυτά, ζώα, μικροοργανισμούς ή τα προϊόντα τους. Οι προσεγγίσεις αυτές είναι αποτελεσματικές, βιοαποικοδομήσιμες και έχουν λιγότερες επιπτώσεις στο περιβάλλον. Ο όρος «**βιο-φυτοφάρμακο – βιοπαρασιτοκτόνο**» είναι παραπλανητικός, καθώς ο μικροβιακός παράγοντας δεν εξαλείφει απαραίτητα τους επιβλαβείς οργανισμούς, αλλά καταστείλει και επιτρέπει στην καλλιέργεια να αναπτύξει επαρκώς κάποια επιβλαβή επίδραση προς το παράσιτο, ώστε να μην επηρεαστεί η καλλιέργεια (Crump et al., 1999; Hynes & Boyetchko, 2006).

Στις μέρες μας, τα φυτοφάρμακα βιολογικής προέλευσης κεντρίζουν συνεχώς το ενδιαφέρον, λόγω των μικρών περιβαλλοντικών επιπτώσεων που προκαλούν και θα

μπορούσαν να υποκαταστήσουν πλήρως ή μερικώς τα συμβατικά φυτοφάρμακα. Έτσι θα μειωνόταν η συχνότητα εμφάνισης ανοχής στα συμβατικά φυτοφάρμακα και θα αυξανόταν η δημόσια επίγνωση-συνείδηση για την επικινδυνότητα της χρήσης τους στο περιβάλλον αλλά και στην υγεία. Κάποιες δημοφιλείς στρατηγικές Ολοκληρωμένης Αντιμετώπισης Επιβλαβών Οργανισμών (IPM), εφαρμόζουν έναν συνδυασμό χημικής και βιολογικής προστασίας των καλλιεργειών. Η χρήση ενός βιολογικού προϊόντος, την κατάλληλη χρονική στιγμή, μπορεί να μειώσει τη συνολική ανάγκη για χημικά φυτοφάρμακα (Sarwar, 2005). Αναπτύσσονται επίσης και βιολογικά φυτοφάρμακα που περιέχουν παράγοντες ελέγχου παρασίτων, χημικά ανάλογα βιοχημικών ενώσεων όπως φερομόνες, ρυθμιστικούς παράγοντες εντόμων, κ.α. τα οποία είναι περισσότερο φιλικά προς το περιβάλλον, σε σχέση με τα συνθετικά φυτοφάρμακα. Η χρήση μικροβιακών παραγόντων ελέγχου προσφέρει μία πιο ρεαλιστική προσέγγιση σε σύγκριση με τα χημικά φυτοφάρμακα, καθώς είναι μία οικολογικά συμβατή μέθοδος (Koul & Cuperus, 2007; Koul et al., 2008).

Τα βιοπαρασιτοκτόνα ταξινομούνται σε διάφορες κατηγορίες: Τα μικροβιακά φυτοφάρμακα που αποτελούνται από εντομοπαθογόνα βακτήρια (π.χ. *Bacillus thuringiensis*), μύκητες (π.χ. *Beauveria bassiana*), ή ιούς (π.χ. *Baculovirus*) συμπεριλαμβανομένων και των μεταβολιτών τους, εντομοπαθογόνοι νηματώδεις και πρωτόζωα.

Η μεγαλύτερη ομάδα βιο-παρασιτοκτόνων ευρέος φάσματος, προέρχεται από μία μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών όπως βακτήρια, μύκητες, ιούς και νηματώδεις. Είναι αποτελεσματικά κατά των παρασίτων, δεν εμφανίζουν επιβλαβείς επιδράσεις σε οργανισμούς μη στόχους και είναι ασφαλή για το περιβάλλον. Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται εγγύς των φυτών μπορεί να είναι είτε επιβλαβείς ή ωφέλιμοι. Οι ασθένειες των φυτών προκαλούνται από επιβλαβείς μικροοργανισμούς και έχουν οδηγήσει σε τεράστιες απώλειες της παραγωγής των καλλιεργειών. Από την άλλη πλευρά, οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί αυξάνουν την γονιμότητα του εδάφους και βοηθούν στον έλεγχο των παρασίτων. Διαφορετικοί ωφέλιμοι μικροοργανισμοί μπορούν να απομονωθούν, να δοκιμαστούν και να εμπορευματοποιηθούν έτσι ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μεγαλύτερη κλίμακα (Εικ. 1).



Εικόνα 1. Διάγραμμα ροής που περιγράφει τα βήματα που ακολουθούνται για τον έλεγχο και την ανάπτυξη μικροβιακών φυτοφαρμάκων (Singh et al., 2019).

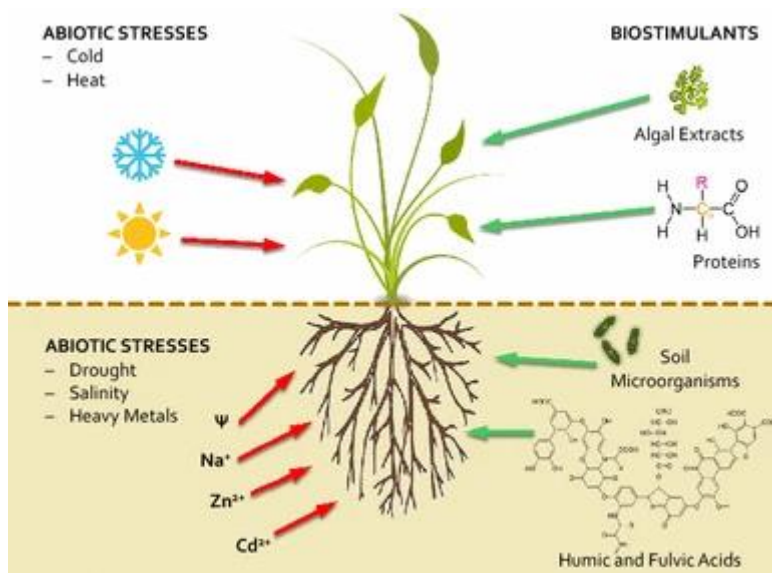
1.2. ΒΙΟΔΙΕΓΕΡΤΕΣ ΦΥΤΩΝ

Ο όρος «βιοδιεγέρτης» ορίστηκε για πρώτη φορά από τους Kauffman και τους συνεργάτες του το 2007 ως εξής: «οι βιοδιεγέρτες είναι υλικά, εκτός από λιπάσματα, που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών όταν αυτά εφαρμοστούν σε μικρές ποσότητες». Αξίζει να αναφερθεί ότι η προσθήκη των λέξεων «εκτός των λιπασμάτων», είναι σύμφωνη με την περιγραφή των Zhang και Schmidt, αλλά δεν περιλαμβανόταν ρητά στον αρχικό τους ορισμό. Οι Kauffman et al., το 2007 προσπάθησαν να συνοψίσουν τι είναι οι βιοδιεγέρτες, εισάγοντας μια ταξινόμηση: «Οι βιοδιεγέρτες είναι διαθέσιμοι σε διάφορες συνθέσεις και με ποικίλα συστατικά, αλλά γενικά ταξινομούνται σε τρεις μεγάλες ομάδες με βάση την πηγή και το περιεχόμενό τους. Αυτές οι ομάδες περιλαμβάνουν τις χουμικές ενώσεις (HS), τα προϊόντα που περιέχουν ορμόνες (HCP) και τα προϊόντα που περιέχουν αμινοξέα (ACP). Τα HCPs, όπως τα εκχυλίσματα φυκιών, περιέχουν αναγνωρίσιμες ποσότητες ενεργών ουσιών ανάπτυξης φυτών, όπως αυξίνες, κυτοκινίνες ή τα παράγωγά τους».

Κατά τα επόμενα χρόνια, ο όρος «βιοδιεγέρτες» χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο από την επιστημονική βιβλιογραφία, διευρύνοντας το εύρος των ουσιών και των τρόπων δράσης τους (Calvo et al., 2014; Halpern, et al., 2015). Στην πραγματικότητα, ο «βιοδιεγέρτης» χρησιμοποιήθηκε για να περιγραφεί οποιαδήποτε ωφέλιμη ουσία για

τα φυτά, χωρίς να είναι θρεπτικά συστατικά, φυτοφάρμακα ή βελτιωτικά εδάφους. Εν μέρη, οι βιοδιεγέρτες ορίζονται πρώτα από το τι δεν είναι, χαράσσοντας ένα όριο μεταξύ βιοδιεγερτών και άλλων ευρέως χρησιμοποιούμενων κατηγοριών ουσιών, όπως λιπάσματα και φυτοφάρμακα, που εφαρμόζονται σε φυτά και καλλιέργειες. Σε ένα δεύτερο στάδιο, αποδείχθηκε ότι οι θετικές δράσεις που αποδίδονται στα χημικά βιοδιεγερτικά (φυσικής ή συνθετικής προέλευσης) – προαγωγή της ανάπτυξης, ρύθμιση της ανάπτυξης και των ποιοτικών χαρακτηριστικών, αυξημένη ανοχή στο περιβαλλοντικό στρες – μπορούν επίσης να παραδοθούν από βακτήρια και μύκητες. Για παράδειγμα, τα PGPRs ή τα «ριζοβακτήρια που προάγουν την φυτική ανάπτυξη» χαρακτηρίζονται από ευεργετικές επιδράσεις στα φυτά, χωρίς να είναι θρεπτικά συστατικά, φυτοφάρμακα ή βελτιωτικά εδάφους. Όπως και οι χημικές ουσίες, η φύση τους (δηλαδή η ταξινομική τους κατάσταση σε αυτή την περίπτωση) μπορεί να είναι πολύ διαφορετική και η κατηγορία PGPR να ορίζεται με βάση τα γεωργικά/κηπευτικά προϊόντα της. Τα «βιολιπάσματα» και οι «βιολογικοί παράγοντες» χρησιμοποιούνται επίσης για την περιγραφή των PGPR, που αναφέρονται στις αναμενόμενες γεωργικές/κηπευτικές αποδόσεις.

Παρά τις πρόσφατες προσπάθειες αποσαφήνισης του ρυθμιστικού καθεστώτος των βιοδιεγερτών, δεν υπάρχει πουθενά στον κόσμο κάποιος νομικός ή ρυθμιστικός ορισμός των φυτικών βιοδιεγερτών. Η κατάσταση αυτή αποκλείει έναν λεπτομερή κατάλογο και την κατηγοριοποίηση των ουσιών και των μικροοργανισμών που καλύπτονται από την έννοια. Παρόλα αυτά, ορισμένες μεγάλες κατηγορίες αναγνωρίζονται ευρέως από επιστήμονες, ρυθμιστικούς φορείς και ενδιαφερόμενους (Calvo et al., 2014; Halpern et al., 2015), καλύπτοντας τόσο ουσίες όσο και μικροοργανισμούς. Οι μικροοργανισμοί περιλαμβάνουν ωφέλιμα βακτήρια, κυρίως PGPRs, και ωφέλιμους μύκητες. Μπορούν να ζουν ελεύθερα, στη ριζόσφαιρα ή ενδοφυτικά.



Εικόνα 2. Αριστερά απεικονίζονται τα είδη του αβιοτικού στρες που καταπονούν τα φυτά και δεξιά τα είδη των βιοδιεγερτών και η περιοχή δράσης τους στο φυτό (Van Oosten et al., 2017).

• ΧΟΥΜΙΚΑ ΚΑΙ ΦΟΥΛΒΙΚΑ ΟΞΕΑ

Οι χουμικές ενώσεις (HS), είναι φυσικά συστατικά της οργανικής ύλης του εδάφους, που προέρχονται από την αποσύνθεση φυτικών, ζωικών και μικροβιακών υπολειμμάτων, αλλά και από τη μεταβολική δραστηριότητα των μικροβίων του εδάφους που τα χρησιμοποιούν ως υποστρώματα. Τα HS αποτελούνται από ετερογενείς ενώσεις, που αρχικά κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με το μοριακό τους βάρος και τη διαλυτότητά τους, σε χουμίνες, χουμικά οξέα και φουλβικά οξέα. Οι ενώσεις αυτές εμφανίζουν πολύπλοκες δυναμικές σύνδεσης/διάσπασης σε υπερμοριακά κolloειδή, οι οποίες επηρεάζονται από τις ρίζες των φυτών μέσω της απελευθέρωσης πρωτονίων και εκκριμάτων. Οι χουμικές ουσίες και τα σύμπλοκά τους στο έδαφος, προκύπτουν επομένως από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της οργανικής ύλης, των μικροβίων και των ριζών των φυτών. Πριν από οποιαδήποτε απόπειρα χρήσης των χουμικών ουσιών, για την προώθηση της φυτικής ανάπτυξης και της απόδοσης των καλλιεργειών θα πρέπει πρώτα να προηγείται η βελτιστοποίηση των αλληλεπιδράσεων αυτών, ώστε να επιτευχθούν τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Αυτό εξηγεί γιατί η εφαρμογή χουμικών ουσιών- διαλυτών κλασμάτων χουμικών και φουλβικών οξέων-φαίνεται ασυνεπής, αλλά συνολικά έχει θετικά αποτελέσματα στην φυτική ανάπτυξη. Μια πρόσφατη μετα-ανάλυση τυχαίας επίδρασης των HS που εφαρμόστηκαν σε φυτά (Rose et al., 2014), απέδειξε μια συνολική αύξηση του ξηρού βάρους κατά $22 \pm 4\%$ για τους βλαστούς και κατά $21 \pm 6\%$ για τις ρίζες.

Η μεταβλητότητα των επιδράσεων των HS οφείλεται στην πηγή των HS, στις περιβαλλοντικές συνθήκες, στο παραλαμβάνον φυτό, στη δόση και στον τρόπο εφαρμογής των HS (Rose et al., 2014). Όσον αφορά τις πηγές των χουμικών ενώσεων, εξάγονται από φυσική χουμοποιημένη οργανική ύλη (π.χ. από τύρφη ή ηφαιστειακά εδάφη), από κομπόστ και vermicomposts ή από κοιτάσματα ορυκτών (π.χ. λεοναρδίτης, μια οξειδωμένη μορφή του λιγνίτη). Επιπλέον, τα αγροτικά υποπροϊόντα, αντί να αποσυντίθενται στο έδαφος ή με κομποστοποίηση, υπόκεινται σε ελεγχόμενη διάσπαση και οξείδωση με χημικές διεργασίες, οδηγώντας σε «ουσίες που μοιάζουν με χουμικά», τα οποία προτείνονται ως υποκατάστατα των φυσικών HS (Eyheraguibel et al., 2008).

Οι χουμικές ενώσεις έχουν αναγνωριστεί εδώ και αρκετό καιρό, ως βασικοί παράγοντες της γονιμότητας του εδάφους, που δρουν στις φυσικές, φυσικοχημικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητες του εδάφους. Οι περισσότερες βιοδιεγερτικές επιδράσεις των HS αναφέρονται στη βελτίωση της θρέψης των ριζών, μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Μία από αυτές είναι η αυξημένη πρόσληψη μακρο- και μικρο- θρεπτικών συστατικών, λόγω της αυξημένης ικανότητας ανταλλαγής κατιόντων του εδάφους που περιέχονται στο πολυανιονικό HS και της αυξημένης διαθεσιμότητας φωσφόρου από το HS που παρεμποδίζει την κατακρήμιση του φωσφορικού ασβεστίου. Μια άλλη σημαντική συμβολή των HS στη θρέψη των ριζών είναι η διέγερση των H^+ -ATPασών της πρωτοπλασματικής μεμβράνης, οι οποίες μετατρέπουν την ελεύθερη ενέργεια που απελευθερώνεται από την υδρόλυση του ATP σε ένα διαμεμβρανικό ηλεκτροχημικό δυναμικό που χρησιμοποιείται για την πρόσληψη νιτρικών και άλλων θρεπτικών συστατικών. Επιπροσθέτως, η άντληση πρωτονίων από τις ATPάσες της πρωτοπλασματικής μεμβράνης συμβάλλει στη χαλάρωση του κυτταρικού τοιχώματος, στη μεγέθυνση των κυττάρων και στην ανάπτυξη οργάνων (Jindo et al., 2012). Οι HS

φαίνεται να ενισχύουν την αναπνοή και τη δράση τους ως ινβερτάση, παρέχοντας υποστρώματα άνθρακα. Μία επιπλέον δράση τους ως βιοδιεγέρτες είναι ότι δρουν προστατευτικά ενάντια στο στρες. Ο μεταβολισμός των φαινυλοπροπανοειδών είναι κεντρικός στην παραγωγή φαινολικών ενώσεων, που εμπλέκονται στον δευτερογενή μεταβολισμό και σε ένα ευρύ φάσμα αντιδράσεων στο στρες. Οι χουμικές ενώσεις υψηλής μοριακής μάζας έχουν αποδειχθεί ότι ενισχύουν τη δραστηριότητα των βασικών ενζύμων αυτού του μεταβολισμού σε φυτά αραβοσίτου υδροπονικής καλλιέργειας, υποδηλώνοντας διαφοροποίηση της απόκρισης στο στρες από τις HS (Olivares et al., 2015; Schiavon et al., 2010).

- **ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΕΣ ΑΖΩΤΟΥΧΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ**

Τα μείγματα αμινοξέων και πρωτεϊνών λαμβάνονται με χημική και ενζυμική υδρόλυση των πρωτεϊνών από αγρο-βιομηχανικά υποπροϊόντα, τόσο από υπολείμματα φυτικών πηγών (υπολείμματα καλλιέργειών) όσο και ζωικών αποβλήτων (π.χ. κολλαγόνο, επιθηλιακούς ιστούς) (Calvo et al., 2014; Halpern et al., 2015). Η χημική σύνθεση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή μεμονωμένων ή μικτών ενώσεων. Άλλα αζωτούχα μόρια περιλαμβάνουν βεταΐνες, πολυαμίνες και «μη πρωτεϊνικά αμινοξέα», τα οποία είναι διαφοροποιημένα στα ανώτερα φυτά αλλά ελάχιστα χαρακτηρισμένα ως προς τον φυσιολογικό και οικολογικό τους ρόλο (Vranova et al., 2011).

Έχει αποδειχθεί ότι οι ενώσεις αυτές παίζουν πολλαπλούς ρόλους ως βιοδιεγέρτες στην φυτική ανάπτυξη (Calvo et al., 2014; Halpern et al., 2015). Οι άμεσες επιδράσεις τους στα φυτά, περιλαμβάνουν τη ρύθμιση της πρόσληψης και της αφομοίωσης του αζότου (N), μέσω της ρύθμισης των ενζύμων που εμπλέκονται στην αφομοίωση του αζότου (N) και των δομικών γονιδίων τους και μέσω της δράσης τους στο σηματοδοτικό μονοπάτι αφομοίωσης αζότου (N) στις ρίζες. Μέσω της ρύθμισης των ενζύμων του κύκλου του Krebs, συμβάλλουν επίσης στον μεταβολισμό του άνθρακα (C) και του αζότου (N). Οι ορμονικές δραστηριότητες αναφέρονται επίσης σε σύνθετα προϊόντα υδρόλυσης πρωτεϊνών και ιστών (Colla et al., 2014). Υπάρχουν επίσης αναφορές για τις επιδράσεις των χηλικών συμπλόκων για ορισμένα αμινοξέα (όπως η προλίνη), στην προστασία των φυτών από τα βαρέα μέταλλα αλλά και στην συμβολή τους στην κινητικότητα και την προσληψη μικροθρεπτικών συστατικών. Η αντιοξειδωτική δράση προσδίδεται από την αναζήτηση ελεύθερων ριζών από ορισμένες αζωτούχες ενώσεις, συμπεριλαμβανομένης της γλυκίνης βεταΐνης και της προλίνης, οι οποίες συμβάλλουν στον μετριασμό του περιβαλλοντικού στρες.

Οι έμμεσες επιδράσεις στην θρέψη και την ανάπτυξη των φυτών, είναι επίσης σημαντικές στη γεωργική πρακτική, όταν τα υδρολύματα πρωτεϊνών εφαρμόζονται σε φυτά και εδάφη. Τα προϊόντα υδρόλυσης πρωτεϊνών είναι γνωστό ότι αυξάνουν τη μικροβιακή βιομάζα και τη δραστηριότητα τους, την αναπνοή του εδάφους και γενικά, τη γονιμότητα του εδάφους. Οι δράσεις χηλοποίησης και συμπλοκοποίησης συγκεκριμένων αμινοξέων και πεπτιδίων θεωρείται ότι συμβάλλουν στη διαθεσιμότητα και την απόκτηση θρεπτικών συστατικών από τις ρίζες (du Jardin, 2015).

• ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΦΥΚΙΩΝ ΚΑΙ ΑΡΩΜΑΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Η χρήση φρέσκων φυκιών ως πηγή οργανικής ύλης και ως λίπασμα αποτελεί αρχαία τακτική στην γεωργία, αλλά τα βιοδιεγερτικά τους αποτελέσματα καταγράφηκαν μόλις πρόσφατα. Το γεγονός αυτό προέτρεψε την εμπορική χρήση εκχυλισμάτων φυκιών και καθαρών ενώσεων, που περιλαμβάνουν τους πολυσακχαρίτες λαμιναρίνη, αλγινικά και καραγενάνες και τα προϊόντα διάσπασής τους. Άλλα συστατικά που συμβάλλουν στην προαγωγή της φυτικής ανάπτυξης περιλαμβάνουν μικρο- και μακροθρεπτικά συστατικά, στερόλες, ενώσεις που περιέχουν άζωτο (N) όπως βεταΐνες και ορμόνες (Craigie, 2011; Khan et al., 2009). Τα περισσότερα είδη φυκιών ανήκουν στη φυλή των φαιοφυκών με κύρια γένη τα *Ascophyllum*, *Fucus*, *Laminaria*, αλλά οι καραγενάνες προέρχονται από ροδοφύκη, τα οποία αντιστοιχούν σε μια ξεχωριστή φυλογενετική γραμμή (du Jardin, 2015).

Τα φύκη δρουν στα εδάφη και στα φυτά (Craigie et al., 2008; Craigie, 2011; Khan et al., 2009). Μπορούν να εφαρμοστούν σε εδάφη, σε υδροπονικά διαλύματα ή διαφυλλικά. Στα εδάφη, οι πολυσακχαρίτες τους συμβάλλουν στο σχηματισμό γέλης, στην κατακράτηση του νερού και στον αερισμό του εδάφους. Οι πολυανιονικές ενώσεις συμβάλλουν στη δέσμευση και την ανταλλαγή κατιόντων, κάτι που είναι επίσης ενδιαφέρον για τη δέσμευση των βαρέων μετάλλων και για την αποκατάσταση του εδάφους. Επίσης προωθούν τα βακτήρια που προάγουν την φυτική ανάπτυξη και τους ανταγωνιστές των παθογόνων σε κατασταλτικά εδάφη, μέσω της ενίσχυσης της μικροχλωρίδας του εδάφους. Στα φυτά φαίνεται να λειτουργούν ως λίπασμα, μέσω της παροχής μικρο- και μακροθρεπτικών συστατικών. Επιπλέον εμφανίζουν ορμονικές επιδράσεις, καθώς επιδρούν στη βλάστηση των σπόρων, στην εγκατάσταση των φυτών και στην περαιτέρω ανάπτυξη και αύξηση. Σε εκχυλίσματα φυκιών έχουν εντοπιστεί ορμόνες όπως κυτοκίνη, αυξίνη, αψισικό οξύ, γιββερέλινες, καθώς και άλλες κατηγορίες ορμονικών ενώσεων, όπως στερόλες και πολυαμίνες (Craigie, 2011). Επίσης στα εκχυλίσματα φυκιών εμπεριέχονται αντιοξειδωτικές ενώσεις καθώς και ρυθμιστές ενδογενών γονιδίων, που ανταποκρίνονται σε συνθήκες στρες (Calvo et al., 2014).

Οι αρωματικές ενώσεις (botanicals) είναι ουσίες που προέρχονται από φυτά, τα οποία χρησιμοποιούνται σε φαρμακευτικά και καλλυντικά προϊόντα, ως συστατικά τροφίμων, καθώς και ως φυτοπροστατευτικές ενώσεις (Seiber et al., 2014). Σε σύγκριση με τα φύκη, οι βιοδιεγερτικές τους δράσεις είναι λιγότερο γνωστές, ενώ η προσοχή εστιάζεται μέχρι στιγμής στις παρασιτοκτόνες ιδιότητες τους. Ωστόσο, φαίνεται να υπάρχουν ευκαιρίες να χρησιμοποιηθούν και ως βιοδιεγερτικά (Ertani et al., 2013) (Ziosi et al., 2012). Επιπλέον, είναι γνωστό ότι τα φυτά ενός οικοσυστήματος αλληλεπιδρούν μέσω φυτοδραστικών ενώσεων, γνωστά ως αλληλοχημικά. Παρόλο που η αμειψισπορά, οι ενδιάμεσες καλλιέργειες και η εδαφοκάλυψη χρησιμοποιούνται σε πρώτη φάση για την εκμετάλλευση των αλληλοχημικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των φυτών (ονομάζεται αλλοπάθεια), θα πρέπει να δοθεί περαιτέρω προσοχή σε αυτές τις χημικές αλληλεπιδράσεις για την ανάπτυξη νέων βιοδιεγερτών.

• ΧΙΤΟΖΑΝΗ ΚΑΙ ΑΛΛΑ ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΗ

Η χιτοζάνη είναι μια αποακετυλιωμένη μορφή του βιοπολυμερούς χιτίνης, που παράγεται φυσικά και βιομηχανικά. Οι φυσιολογικές επιδράσεις των oligομερών

χιτοζάνης στα φυτά, είναι τα αποτελέσματα της ικανότητας της πολυκατιονικής ένωσης να δεσμεύει ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών συστατικών, συμπεριλαμβανομένου του DNA, της πρωτοπλασματικής μεμβράνης και των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος, αλλά και να δεσμεύει ειδικούς υποδοχείς που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των αμυντικών γονιδίων, με παρόμοιο τρόπο με τους διεγέρτες της φυτικής άμυνας (El Hadrami et al., 2010; Hadwiger, 2013; Katiyar et al., 2015; Yin et al., 2010). Η χιτίνη και η χιτοζάνη χρησιμοποιούν ξεχωριστούς υποδοχείς και σηματοδοτικά μονοπάτια. Η δέσμευση της χιτοζάνης σε περισσότερο ή λιγότερο συγκεκριμένους κυτταρικούς υποδοχείς έχει σαν συνέπεια τη συσσώρευση υπεροξειδίου του υδρογόνου και τη διαρροή Ca^{2+} στο κύτταρο, προκαλώντας μεγάλες φυσιολογικές αλλαγές, καθώς είναι οι βασικοί παράγοντες στη σηματοδότηση της απόκρισης στο στρες και στην ρύθμιση της ανάπτυξης. Κατά συνέπεια, οι γεωργικές εφαρμογές της χιτοζάνης που έχουν αναπτυχθεί όλα αυτά τα χρόνια, εστιάζουν στην προστασία των φυτών από παθογόνους μύκητες, αλλά οι ευρύτερες γεωργικές χρήσεις σχετίζονται με την ανοχή στο αβιοτικό στρες (ξηρασία, αλατότητα, ψυχρό στρες) και σε ποιοτικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τον πρωτογενή και δευτερογενή μεταβολισμό. Το κλείσιμο των στομάτων που προκαλείται από τη χιτοζάνη μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από το ABA (Iriti et al., 2009), συμμετέχει στην προστασία του φυτού από το περιβαλλοντικό στρες.

Αρκετά πολυ- και ολιγομερή βιολογικής προέλευσης ή (ημι-) συνθετικές παραλλαγές χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο στη γεωργία ως διεγέρτες της άμυνας των φυτών, συμπεριλαμβανομένων των πολυσακχαριτών φυκιών που έχουν ήδη αναφερθεί (π.χ. λαμιναρίνη από φαιοφύκη) (du Jardin, 2015).

• ΑΝΟΡΓΑΝΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Τα χημικά στοιχεία που προάγουν την φυτική ανάπτυξη και μπορεί να είναι απαραίτητα για συγκεκριμένα είδη, αλλά δεν απαιτούνται από όλα τα φυτά, ονομάζονται ευεργετικά στοιχεία (Pilon-Smits et al., 2009). Τα πέντε κύρια ωφέλιμα στοιχεία είναι το Al, το Co, το Na, το Se και το Si, που υπάρχουν στα εδάφη και στα φυτά ως διαφορετικά ανόργανα άλατα και ως αδιάλυτες μορφές όπως το άμορφο πυρίτιο ($SiO_2 \cdot nH_2O$) στα είδη Gramineae.

Στην επιστημονική βιβλιογραφία αναφέρονται πολλές ευεργετικές επιδράσεις των ανόργανων στοιχείων στην προαγωγή της φυτικής ανάπτυξης, στην ποιότητα των φυτικών προϊόντων και στην ανοχή στο αβιοτικό στρες. Οι επιδράσεις αυτές περιλαμβάνουν την ακαμψία του κυτταρικού τοιχώματος, την ωσμωρύθμιση, την μειωμένη διαπνοή από εναποθέσεις κρυστάλλων, τη θερμική ρύθμιση μέσω ανάκλασης ακτινοβολίας, την ενζυμική δραστηριότητα από συμπαραγόντες, τη θρέψη των φυτών μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλα στοιχεία κατά τη διάρκεια της πρόσληψης και της κινητικότητάς, την αντιοξειδωτική προστασία, τις αλληλεπιδράσεις με συμβιώτες, παθογόνα και την απόκριση στην φυτοφαγία, την προστασία από την τοξικότητα των βαρέων μετάλλων, την σύνθεση και την σηματοδότηση των φυτικών ορμονών (Pilon-Smits et al., 2009).

Τα ανόργανα άλατα των ευεργετικών και βασικών στοιχείων -χλωριούχα, φωσφορικά, φωσφορώδη, πυριτίου και ανθρακικά άλατα- έχουν χρησιμοποιηθεί ως μυκητοκτόνα (Delioropoulos et al., 2010). Παρόλο που ο τρόπος δράσης τους δεν έχει πλήρως

αποσαφηνιστεί, οι ανόργανες ενώσεις επηρεάζουν την οσμωτική, την pH-μετρική και την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση, τη σηματοδότηση ορμονών και τα ένζυμα που εμπλέκονται στην απόκριση στο στρες (π.χ. υπεροξειδάσες) (du Jardin, 2015).

• ΩΦΕΛΙΜΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ

Οι μύκητες αλληλεπιδρούν με τις ρίζες των φυτών με διάφορους τρόπους, αναπτύσσοντας από σχέσεις συμβίωσης (δηλαδή όταν και οι δύο οργανισμοί ζουν σε άμεση επαφή μεταξύ τους και δημιουργούν αμοιβαίες επωφελείς σχέσεις) έως παρασιτικές (Behie & Bidochka, 2014). Οι μυκόριζες είναι μία ετερογενής ταξινομική ομάδα που δημιουργούν σχέσεις συμβίωσης με πάνω από το 90% όλων των φυτικών ειδών. Μεταξύ των διαφορετικών μορφών φυσικών αλληλεπιδράσεων και ταξινόμησης, η μυκόρριζα που σχηματίζει δομές Arbuscule (AMF), είναι ένας ευρέως διαδεδομένος τύπος ενδομυκόρριζας που σχετίζεται με καλλιεργητικά και κηπευτικά φυτά, όπου οι μυκητιακές υφές των ειδών Glomeromycota διεισδύουν στα κύτταρα του φλοιού της ρίζας και σχηματίζουν διακλαδισμένες δομές που ονομάζονται arbuscules (Genre, 2010; Behie et al., 2014). Υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον ως προς τη χρήση της μυκόρριζας για την προώθηση της βιώσιμης γεωργίας, λαμβάνοντας υπόψη τα ευρέως αποδεκτά οφέλη των συμβιωτικών σχέσεων στην αποτελεσματικότητα της θρέψης (τόσο για τα μακροθρεπτικά συστατικά, ιδιαίτερα για τον φωσφόρο (P), όσο και για τα μικροθρεπτικά συστατικά), στο ισοζύγιο νερού, στη βιοτική και αβιοτική προστασία των φυτών από το στρες (Augé, 2001; Gianinazzi et al., 2010; Hamel et al., 2007; Harrier et al., 2004; Siddiqui et al., 2008; van der Heijden et al., 2004). Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν επίσης την ύπαρξη υφικών δικτύων που δεν διασυνδέουν μόνο τον μύκητα με το φυτό, αλλά και τα επιμέρους φυτά μέσα σε μία φυτική κοινότητα. Αυτό θα μπορούσε να έχει σημαντικές οικολογικές και γεωργικές επιπτώσεις, καθώς υπάρχουν ενδείξεις ότι οι μυκητιακοί αγωγοί επιτρέπουν τη σηματοδότηση μεταξύ των φυτών (Johnson & Gilbert, 2015; Simard, et al., 2012).

Τα προϊόντα με βάση τους μύκητες που εφαρμόζονται στα φυτά για την προώθηση της αποτελεσματικότητας της θρέψης, της ανοχής στο στρες, της απόδοσης των καλλιεργειών και της ποιότητας του προϊόντος, θα πρέπει να εμπίπτουν στην έννοια των βιοδιεγερτών. Οι σημαντικότεροι περιορισμοί στη χρήση τους είναι η τεχνική δυσκολία μετάδοσής των AMF σε μεγάλη κλίμακα, λόγω του βιοτροφικού τους χαρακτήρα (Dalpré & Monreal, 2004) και η έλλειψη κατανόησης των καθοριστικών παραγόντων των ιδιαιτεροτήτων του ξενιστή και της πληθυσμιακής δυναμικής των μυκοριζικών κοινοτήτων στα αγροοικοσυστήματα. Ωστόσο, άλλα μυκητιακά ενδόφυτα, όπως το *Trichoderma* spp. (Ascomycota) και *Sebacinales* (Basidiomycota, με *Piriformospora indica* ως πρότυπο οργανισμό), διαφέρουν από τα μυκόρριζικά είδη, μπορούν να ζήσουν τουλάχιστον ένα μέρος του κύκλου ζωής τους μακριά από το φυτό, να αποικίσουν τις ρίζες και να μεταφέρουν θρεπτικά συστατικά στους ξενιστές τους (Behie and Bidochka, 2014). Έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον, τόσο ως φυτικά εμβόλια που πολλαπλασιάζονται πολύ εύκολα *in vitro*, όσο και ως πρότυποι οργανισμοί για την ανάλυση των μηχανισμών μεταφοράς θρεπτικών ουσιών μεταξύ των ενδοσυμβιωτών μυκήτων και των ξενιστών τους. Μερικοί από αυτούς τους μύκητες, κυρίως οι *Trichoderma* spp., έχουν μελετηθεί εκτενώς και έχουν χρησιμοποιηθεί για τις βιοπαρασιτοκτόνες (μυκοπαρασιτικές) και βιοελεγχόμενες ικανότητές τους (επαγωγέας αντοχής σε ασθένειες) και έχουν αξιοποιηθεί ως πηγές ενζύμων από βιοτεχνολογικές

βιομηχανίες (Mukherjee et al., 2012; Nicolás et al., 2014). Υπάρχουν πειστικά στοιχεία ότι επάγονται επίσης πολλές αποκρίσεις των φυτών, συμπεριλαμβανομένης της αυξημένης ανοχής στο αβιοτικό στρες, της αποτελεσματικότητας της χρήσης θρεπτικών ουσιών και της ανάπτυξης και μορφογένεσης οργάνων (Colla et al., 2015; Shoshitaishvili et al., 2010). Με βάση αυτές τις επιδράσεις, αυτά τα μυκητιακά ενδόφυτα μπορούν να θεωρηθούν ως βιοδιεγερτικά, αν και επί του παρόντος στη γεωργία χρησιμοποιούνται ως βιοπαρασιτοκτόνα.

• ΩΦΕΛΙΜΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Ενώ τα φυτά είναι γνωστό ότι δημιουργούν συμβιωτικές σχέσεις με τα βακτήρια, οι γνώσεις μας για αυτές τις σχέσεις υπό αβιοτικό στρες είναι στοιχειώδης. Βακτήρια με τη δυνατότητα να δράσουν ως βιοδιεγερτικά έχουν απομονωθεί από έναν αριθμό οικοσυστημάτων με αλατούχα, αλκαλικά, όξινα και άνυδρα εδάφη. Αυτά τα βακτήρια ανήκουν σε πολλά γένη, όπως *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas* και *Bacillus*. Τα μέλη αυτών των γενών έχουν αναπτύξει στρατηγικές για να προσαρμοστούν και να ευδοκιμήσουν κάτω από αντίξοες συνθήκες (Selvakumar et al., 2009; Upadhyay et al., 2009). Μεταξύ των προσαρμογών, οι πιο σύνηθες είναι η αλλαγή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος και η ικανότητα συσσώρευσης υψηλών συγκεντρώσεων διαλυτών ουσιών, επιτρέποντας έτσι την ενισχυμένη κατακράτηση νερού και την αυξημένη ανοχή στην οσμωτική και ιοντική καταπόνηση. Η σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος μεταβάλλεται μέσω του εμπλουτισμού του από εξωπολυσακχαρίτες (EPS) και λιποπολυσακχαρίτες-πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες-λιπίδια που σχηματίζουν ένα προστατευτικό βιοφίλμ στην επιφάνεια της ρίζας (Sandhya et al., 2009; Zahran, 1999). Τα εμβολιασμένα εδάφη με ριζοβακτήρια που προάγουν την φυτική ανάπτυξη (PGPR) μπορούν να βελτιώσουν τις αποκρίσεις του φυτού στο αβιοτικό στρες. Ένας αριθμός πρόσφατων ανασκοπήσεων έχει καλύψει εκτενώς τις προστατευτικές επιδράσεις του *Rhizobium* έναντι του αβιοτικού στρες στα φυτά (Gopalakrishnan et al., 2015). Η ενισχυμένη ανάπτυξη που καθορίζεται από αυτά τα βακτήρια σχετίζεται με το υψηλό επίπεδο IAA, το οποίο έχει αποδειχθεί ότι μειώνει το στρες σε συνθήκες υψηλής αλατότητας (Egamberdiyeva, 2009) και την παραγωγή EPS που μπορεί να βοηθήσουν στη διατήρηση μιας ενυδατικής μεμβράνης γύρω από τις ρίζες ή/και να βοηθήσουν στην αποκατάσταση των ευνοϊκών διαβαθμίσεων του υδατικού δυναμικού υπό συνθήκες έλλειψης νερού. Οι λειτουργίες αυτές, έχουν αποδειχθεί χρήσιμες υπό συνθήκες αλατούχου στρες (Paul & Lade, 2014), ακραίων θερμοκρασιών, pH, αλατότητας και ξηρασίας (Gopalakrishnan et al., 2015; Kaushal & Wani, 2015).

1.3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ

Βιολογική καταπολέμηση στην εντομολογία ορίζεται ως η χρήση ενός βιοτικού παράγοντα για τη μείωση ή την αποτροπή των ανεπιθύμητων συνεπειών που προκαλούνται από έναν άλλον οργανισμό, που αναπτύσσει συνήθως παρασιτική σχέση με το φυτό-ξενιστή (Eilenberg et al., 2001). Οι βιολογικοί παράγοντες- βιοτικοί παράγοντες- και οι διαδικασίες που εμπλέκονται στην βιολογική καταπολέμηση, περιλαμβάνουν μη μολυσματικά ή μειωμένης μολυσματικότητας άτομα ή πληθυσμούς ανάμεσα στα παθογόνα είδη, ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς και χειρισμούς των φυτών ξενιστών, ώστε να αυξηθεί η ανθεκτικότητά τους στο παθογόνο (Alabouvette et al., 2006).

Τέσσερις διαφορετικοί τύποι βιολογικού ελέγχου είναι γνωστοί: ο φυσικός, ο διατηρητέος-συντηρήσιμος, ο κλασσικός και ο ενισχυτικός βιολογικός έλεγχος (Eilenberg et al., 2001; Cock et al., 2010). Ο φυσικός βιολογικός έλεγχος, είναι μία διεργασία του οικοσυστήματος όπου ο πληθυσμός των παρασιτικών οργανισμών μειώνεται από την ύπαρξη των φυσικών ωφέλιμων οργανισμών. Αυτό συμβαίνει σε όλα τα οικοσυστήματα του κόσμου χωρίς καμία ανθρώπινη παρέμβαση και από οικονομική άποψη, είναι η μεγαλύτερη συμβολή του βιολογικού ελέγχου στη γεωργία (Waage & Greathead, 1988). Ο συντηρητικός βιολογικός έλεγχος, περιλαμβάνει ανθρώπινες ενέργειες, που προστατεύουν και διεγείρουν την απόδοση των φυσικών εχθρών που απαντώνται στη φύση και εφαρμόζεται κυρίως για τον έλεγχο των παρασίτων. Ο βιολογικός έλεγχος των ασθενειών των φυτών, εστιάζει στον ρόλο του φυσικού μικροβιώματος στην καταστολή των φυτικών ασθενειών στο έδαφος και στα υπολείμματα των καλλιεργειών. Επίσης εστιάζει στον ρόλο του φυσικού μικροβιώματος που εντοπίζεται μέσα και πάνω στα φυτά, στην παροχή ανθεκτικότητας σε μόλυνση από παράσιτα και παθογόνα (Mendes et al., 2011). Κατά την κλασσική βιολογική καταπολέμηση, οι φυσικοί εχθροί συλλέγονται από μια περιοχή εξερεύνησης (συνήθως η περιοχή προέλευσης του παρασίτου) και στη συνέχεια απελευθερώνονται σε περιοχές όπου το παράσιτο είναι διεισδυτικό, συχνά με αποτέλεσμα τη μόνιμη μείωση του πληθυσμού των παρασίτων και τεράστια οικονομικά οφέλη. Στον ενισχυτικό βιολογικό έλεγχο (ABC), οι φυσικοί εχθροί (παράσιτα, αρπακτικά ή μικροοργανισμοί) εκτρέφονται μαζικά σε μεγάλους αριθμούς και έπειτα απελευθερώνονται, είτε για να επιτευχθεί ο άμεσος έλεγχος των παρασίτων σε καλλιέργειες με σύντομο κύκλο παραγωγής, είτε για τον έλεγχο των παρασίτων κατά τη διάρκεια πολλών γενεών σε καλλιέργειες με μακροχρόνιο κύκλο παραγωγής (Cock et al., 2010; Parnell et al., 2016; van Lenteren, 2012).

Οι κύριες εφαρμογές των βιολογικών παραγόντων είναι: α) Η βιολογική καταπολέμηση των ασπόνδυλων επιβλαβών οργανισμών με τη χρήση θηρευτών, παρασιτικών και παθογόνων οργανισμών, β) Η βιολογική καταπολέμηση των ζιζανίων, χρησιμοποιώντας φυτοφάγους οργανισμούς και παθογόνους παράγοντες και γ) Η βιολογική καταπολέμηση των φυτοπαθογόνων, με τη χρήση ανταγωνιστικών μικροοργανισμών και της επαγωγής της άμυνας των φυτών.

Η βιολογική καταπολέμηση των επιβλαβών εντόμων περιλαμβάνει τη χρήση ζωντανών οργανισμών για τη μείωση των πληθυσμών του παρασίτου (Eilenberg et al., 2001). Στους ζωντανούς πληθυσμούς περιλαμβάνονται παρασιτικά έντομα ή αρπακτικά και εντομοπαθογόνους μικροοργανισμούς όπως μύκητες, βακτήρια, ιούς και πρωτόζωα. Αν και οι εντομοπαθογόνοι μύκητες μελετώνται περισσότερο από 100 χρόνια, η αποτελεσματικότητά τους στο πεδίο και η εμπορική τους έγκριση περιορίζονται λόγω της ευαισθησίας τους στο υπεριώδες φως (UV ακτινοβολία) και στην χαμηλή υγρασία, και λόγω των προβλημάτων που εμφανίζονται κατά την εφαρμογή τους στο πεδίο, την προσέγγιση του οργανισμού στόχου και την απουσία των αναλύσεων κόστους/οφέλους. Με βάση την εμπειρία αυτή, η χρήση εντομοπαθογόνων μικροοργανισμών με τρόπο ανάλογο των χημικών εντομοκτόνων (δηλαδή με ψεκασμό), διεγείρει το ενδιαφέρον για περαιτέρω έρευνα των επιπτώσεων της χρήσης των εντομοπαθογόνων μυκήτων ως ενδόφυτα στα έντομα ή και στα παθογόνα των φυτών, καθώς και στο φυτό (Vega, 2018).

Σε αντίθεση με τα χημικά φυτοφάρμακα, οι βιολογικοί παράγοντες, συνήθως δεν επηρεάζουν δυσμενώς την υγεία του ανθρώπου και των ζώων. Έχουν βέβαια σημειωθεί μερικές σπάνιες δυσμενείς επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία, λόγω αλλεργικών αντιδράσεων που εμφάνισε, σε ορισμένους οργανισμούς, το προσωπικό που εργαζόταν στις εγκαταστάσεις παραγωγής. Επίσης δεν δρουν σε οργανισμούς μη στόχους, αυξάνουν την δραστηριότητα των περισσότερων φυσικών εχθρών που εντοπίζονται στο ίδιο οικοσύστημα, αυξάνουν την βιοποικιλότητα των διαχειριζόμενων οικοσυστημάτων και παρατηρείται επιπλέον, μείωση των υπολειμμάτων των φυτοφαρμάκων. Πολλοί βιολογικοί παράγοντες μπορούν να εφαρμοστούν με συμβατικό εξοπλισμό, να παραχθούν με τεχνητά μέσα και να αποθηκευτούν για εκτεταμένες χρονικές περιόδους. Όπως οι φυσικοί εχθροί των αρthropόδων, πολλά εντομοπαθογόνα είναι ειδικά για ορισμένα είδη ή ομάδες παρασίτων εντόμων και μερικά έχουν τη δυνατότητα να παρέχουν μακροπρόθεσμο έλεγχο. Υπάρχουν επίσης ορισμένα μειονεκτήματα, τα οποία συνδέονται κυρίως με την εμμονή τους, την ταχύτητα θανάτωσης, την ειδικότητα (πολύ μεγάλη ή πολύ στενή περιοχή ξενιστών) και το κόστος παρασκευής τους σε σχέση με τα συμβατικά χημικά εντομοκτόνα (Lacey et al., 2001).

1.4. ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΟΙ ΕΝΤΟΜΟΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ

Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες, που συχνά θεωρούνται αποκλειστικά ως παθογόνα εντόμων, έχουν μελετηθεί για πάνω από εκατό χρόνια χωρίς όμως να αξιοποιηθούν πλήρως οι δυνατότητές τους ως αποτελεσματικοί βιολογικοί παράγοντες και κυρίως υπό συνθήκες πεδίου (Vega et al., 2009). Ένας αυξανόμενος αριθμός πρόσφατων μελετών αποδεικνύει ότι οι εντομοπαθογόνοι μύκητες παίζουν και άλλους ρόλους στη φύση, εκτός από τη δράση τους ως βιοπαρασιτοκτόνα. Στους ρόλους αυτούς συμπεριλαμβάνεται ο ενδοφυτισμός, ο ανταγωνισμός μεταξύ των φυτικών ασθενειών, η προώθηση της ανάπτυξης των φυτών και ο αποικισμός της ριζόσφαιρας. Αυτοί οι πρόσφατα αναδυόμενοι, αλλά όχι πλήρως κατανοητοί, οικολογικοί ρόλοι παρέχουν ευκαιρίες για πολλαπλή χρήση των εντομοπαθογόνων μυκήτων σε στρατηγικές ολοκληρωμένης διαχείρισης παρασίτων (IPM) (Vega et al., 2009; Lacey et al., 2015).

Ο όρος ενδόφυτο χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον de Bary (1866) και αναφέρεται ευρέως σε οποιοδήποτε οργανισμό εντοπίζεται σε ζωντανούς ιστούς αυτότροφων οργανισμών. Τα φυτά αποικίζονται συνήθως από ένα ευρύ φάσμα ενδοφυτικών μικροοργανισμών, όπως βακτήρια και μύκητες. Οι ενδοφυτικοί αυτοί μικροοργανισμοί, αποικίζουν τους εσωτερικούς φυτικούς ιστούς για τουλάχιστον ένα μέρος του κύκλου ζωής τους, χωρίς να προκαλούν ορατά εξωτερικά συμπτώματα νόσου (όπως καθυστερημένη ανάπτυξη, αποχρωματισμό, αλλοίωση κ.α.) (Wilson, 1995). Έχουν βρεθεί εκατοντάδες φυτά που αποικίζονται από ενδοφυτικούς μύκητες, συμπεριλαμβανομένων πολλών οικονομικά σημαντικών γεωργικών προϊόντων, όπως το σιτάρι (Larran et al., 2002), η μπανανιά (Pocasangre et al., 2000), η σόγια (Pocasangre et al., 2000) και η τομάτα (Larran et al., 2001). Έχουν αποδοθεί αρκετοί ρόλοι στους ενδοφυτικούς μύκητες, συμπεριλαμβανομένης της προστασίας των φυτών από τα φυτοφάγα έντομα, τα νηματώδη που παρασιτούν τα φυτά και τους φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς (Vega, 2008), ενώ σε αντάλλαγμα αυτά λαμβάνουν από τον ξενιστή τους θρεπτικά συστατικά (Saikkonen et al., 2004).

Η διείσδυση και η ανάπτυξη του εντομοπαθογόνου μύκητα *B. bassiana* στους φυτικούς ιστούς, περιεγράφηκε για πρώτη φορά από τους Wagner και Lewis (Wagner & Lewis, 2000). Αρχικά, τα κονίδια σχηματίζουν βλαστικά σωληνάκια, τα οποία σταδιακά επιμηκύνονται σε υφές, οι οποίες εισέρχονται στα φυτά είτε μέσω φυσικών ανοιγμάτων είτε απευθείας, με τη βοήθεια των ενζύμων και της μηχανικής πίεσης μέσω των επιδερμικών κυτταρικών τοιχωμάτων. Όσον αφορά τα έντομα, οι διαδικασίες μόλυνσης περιλαμβάνουν την προσκόλληση και την βλάστηση των κονιδίων, και τη διαφοροποίηση του απρεσσορίου (Apressorium), γεγονότα που συνδέονται στενά με τις μυκοστατικές και θρεπτικές ενώσεις που εντοπίζονται στην επιδερμίδα του εντόμου.

Οι πιο μελετημένοι ενδοφυτικοί μύκητες είναι τα ενδόφυτα αγρωστωδών (grass endophytes) του γένους *Neotyphodium* (*Clavicipitaceae*), οι οποίοι σχηματίζουν στενή σχέση με τα φυτά-ξενιστές τους, λόγω της διασυστηματικής μετάδοσης του ενδοφυτικού μύκητα μέσω των κονιδίων όσο και στην παραγωγή ειδικών αλκαλοειδών τοξινών για τα έντομα (ενδοφυτικοί μύκητες Τάξης I) (Rodriguez et al., 2009). Σε μεγαλύτερη αφθονία εντοπίζονται τα λιγότερο εξειδικευμένα ενδόφυτα, που αποικίζουν είτε υπέργειους είτε υπόγειους φυτικούς ιστούς του ξενιστή. Τα περισσότερα είδη EPF ανήκουν στις υποδιαιρέσεις Zygomycota και Ascomycota και μέχρι στιγμής μόνο στην τελευταία κατηγορία έχουν αναφερθεί ενδοφυτικά εντομοπαθογόνα είδη της τάξης Hygrocreales. Τα ενδοφυτικά εντομοπαθογόνα θα πρέπει να ταξινομηθούν ως ενδόφυτα Τάξης II, επειδή έχουν βρεθεί ότι αποικίζουν τόσο υπέργειους όσο και υπόγειους ιστούς των αντίστοιχων φυτών ξενιστών τους (Rodriguez et al., 2009).

Αν και είναι ευρέως διαδεδομένοι και υπάρχουν σε μεγάλη ποικιλομορφία τόσο στα φυσικά όσο και στα γεωργικά οικοσυστήματα και εντοπίζονται σε όλα τα φυτικά όργανα (όπως φύλλα, κλαδιά, μίσχοι, καρποί, ρίζες), δεν έχει εκτιμηθεί επαρκώς ο ρόλος των ενδοφύτων στη διαμόρφωση των αλληλεπιδράσεων φυτού-περιβάλλοντος και ιδιαίτερα των αλληλεπιδράσεων με τα φυτοφάγα έντομα. Βέβαια υπάρχουν μερικές μελέτες που δείχνουν ότι ορισμένοι ενδοφυτικοί μύκητες δρουν ως εντομοπαθογόνοι παράγοντες, μολύνοντας προνύμφες λεπιδοπτέρων, αφίδες, θρίπες και άλλα έντομα που προκαλούν μεγάλες καταστροφές στην παγκόσμια γεωργία. Επίσης μολύνουν συγκεκριμένους ξενιστές και ενέχουν ελάχιστο ή καθόλου κίνδυνο σε οργανισμούς μη στόχους ή σε ωφέλιμα έντομα (Akutse et al., 2014).

Εκτός από την άμεση δράση του βιολογικού ελέγχου κατά των εντόμων, μέσω του ψεκάσμου του φυλλώματος ή της εφαρμογής στο έδαφος, έχει καθιερωθεί ευρέως ότι οι εντομοπαθογόνοι μύκητες μπορούν επίσης να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στη μείωση της φυτοφαγίας μετά τον αποικισμό των φυτών ως ενδόφυτα. Για παράδειγμα, οι Bing και Lewis ανέλυσαν την ενδοφυτική ανάπτυξη του *B. bassiana* στο καλαμπόκι (Bing & Lewis, 1991; Bing & Lewis, 1992). Οι παραπάνω ερευνητές δεν απέδειξαν μόνο τον ενδοφυτικό αποικισμό των φυτικών ιστών του καλαμποκιού από τον μύκητα αυτό αλλά ανέφεραν και υψηλή θνησιμότητα των προνυμφών της πυραλίδας του αραβόσιτου (*Ostrinia nubilalis* Hbn.), όταν αυτά τράφηκαν από φυτά που είχαν αποικιστεί από τον ενδοφυτικό μύκητα. Επίσης, ο αποικισμός των φυτών από τον *B. bassiana* έχει αναφερθεί ότι μειώνει τη ζημιά που προκαλείται από το λεπιδοπτερό *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae) σε φυτά τομάτας, του κολεοπτέρου

Cosmopolites sordidus Germar (Coleoptera: Curculionidae) στην μπανάνα (Akello et al., 2008a, 2008b)· από το υμενόπτερο *Iraella luteipes* Thompson (Hymenoptera: Cynipidae) σε παπαρούνα (Quesada-Moraga et al., 2009)· και του κολεοπτέρου *Apion corchori* Marshall (Coleoptera: Curculionidae) σε γιούκα (Biswas et al., 2013). Έχουν επίσης αναφερθεί και άλλοι εντομοπαθογόνοι μύκητες ως ενδόφυτα, όπως: το *Verticillium* (=Lecanicillium) *lecanii* (Zimm.) Viégas στην οικογένεια των φυτών Araceae, οι *V. lecanii* και *Paecilomyces farinosus* (Holmsk.) Brown & Smith (=Isaria farinosa) στο φλοιό του *C. caroliniana* (Bills and Polishook, 1991), *Paecilomyces* sp. στο *Musa acuminata* (Cao et al., 2002) και στο ρύζι (Tian et al., 2004).

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ο παροδικός ενδοφυτικός αποικισμός των φυτών από τους *B. bassiana* και *M. brunneum*, μετά την διαφυλλική εφαρμογή των κονιδίων, μπορεί να προκαλέσει επιπλέον θνησιμότητα στις προνύμφες του λεπιδοπτέρου *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) (Resquín-Romero et al., 2016) και στις νύμφες του ημιπτέρου *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) (Garrido-Jurado et al., 2017). Έτσι, η συνδυασμένη δράση των διαφυλλικών ψεκασμών και του ενδοφυτικού αποικισμού θα μπορούσε να βελτιώσει τη συνολική αποτελεσματικότητα των εμπορικά διαθέσιμων μυκητοκτόνων που βασίζονται σε αυτούς τους μύκητες. Θα μπορούσε επίσης να βοηθήσει να ξεπεραστούν ορισμένοι περιορισμοί που σχετίζονται με την τοπική εφαρμογή των μυκοπααρασιτοκτόνων, όπως ο εμβολιασμός ή την επιλογή της δοσολογίας, τις δυσμενείς επιπτώσεις των αβιοτικών παραγόντων και τις πιθανές επιδράσεις σε οργανισμούς μη στόχους (Lacey, et al., 2015).

Υπάρχουν επίσης ενδείξεις, ότι ορισμένοι ενδοφυτικοί εντομοπαθογόνοι μύκητες, ιδιαίτερα το *B. bassiana* και το *Lecanicillium* spp. (πρώην *Verticillium lecanii*), εμφανίζουν ανταγωνιστική δράση έναντι φυτικών παθογόνων. Αυτό το επιπλέον χαρακτηριστικό, τους κάνει να έχουν μια πολλά υποσχόμενη δυνατότητα να αναπτυχθούν ως βιοπαρασιτοκτόνα για πολλαπλούς σκοπούς στις στρατηγικές IPM (Goettel et al., 2008; Vega et al., 2009; Ownley, Gwinn et al., 2010). Για παράδειγμα το στέλεχος του *B. bassiana* 11-98, που εφαρμόζεται για την επεξεργασία των σπόρων, έχει αναφερθεί ότι καταστέλλει το σάπισμα που προκαλείται από τα παθογόνα του εδάφους *Rhizoctonia solani* Kuhn (Basidiomycota: Cantharellales) και *Pythium myriotylum* Drechsler (Oomycota: Pythiales), στην τομάτα και στα φυτά βαμβακιού (Ownley et al., 2008). Η προ-επεξεργασία των φυτών βαμβακιού με το ίδιο στέλεχος *B. bassiana* οδήγησε επίσης σε μειωμένη σοβαρότητα της βακτηριακής προσβολής που προκαλείται από το *Xanthomonas axonopodis* pv. *Malvacearum* (Xam) (Ownley et al., 2008). Πιο πρόσφατα, αρκετά στελέχη του *B. bassiana*, συμπεριλαμβανομένου του στελέχους ATCC 74040, που είναι το δραστικό συστατικό του εμπορικού σκευάσματος Naturalis, βρέθηκε ότι μειώνουν σημαντικά τη συχνότητα εμφάνισης και τη σοβαρότητα της νόσου, του ιού του κίτρινου μωσαϊκού των κολοκυθιών (ZYMV, γένος Potyvirus, οικογένεια Potyviridae) στην κολοκυθιά (Jaber & Salem, 2014) και του περονόσπορου που προκαλείται από το *Plasmopara viticola* (Berk. and Curt.) Berl. και de Toni. (Oomycota: Peronosporaceae) στο αμπέλι (Jaber L., 2015) μετά από εμβολιασμό των φυτών με εναιωρήματα που περιείχαν κονίδια των υπό εξέταση στελεχών. Αντίθετα, οι προηγούμενες μελέτες έχουν διερευνήσει κυρίως την ανταγωνιστική δράση των απομονώσεων του *Lecanicillium* spp. κατά των φυτικών

παθογόνων με τη χρήση εργαστηριακών και όχι *in planta* βιοδοκιμών. Μέχρι σήμερα, λίγες μόνο μελέτες έχουν αναφέρει τον βιολογικό έλεγχο των φυτοπαθογόνων από το ενδόφυτο *Lecanicillium* spp. (Ownley et al., 2010).

Οι ενδοφυτικοί εντομοπαθογόνοι μύκητες μπορούν να καταστείλουν άμεσα τα φυτοπαθογόνα μέσω του μυκοπαρασιτισμού, του ανταγωνισμού για τις οικοθέσεις και για τα θρεπτικά συστατικά και μέσω της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών. Ο μυκοπαρασιτισμός, που ορίζεται ως η αλληλεπίδραση μεταξύ ενός παρασιτικού μύκητα και ενός μύκητα ξενιστή, έχει μελετηθεί εκτενώς για ορισμένους εντομοπαθογόνους μύκητες, ιδιαίτερα για είδη του γένους *Trichoderma* (Steyaert et al., 2003) και *Lecanicillium* (Ownley et al., 2010). Η αλληλεπίδραση αυτή χαρακτηρίζεται κυρίως από τον σχηματισμό περιελιγμένων υφικών δομών γύρω από τις υφές του μύκητα ξενιστή, κάτι που έχει παρατηρηθεί για ένα ενδοφυτικό στέλεχος του *B. bassiana* έναντι του *P. myriotylum* (Griffin, 2007). Ο μυκοπαρασιτισμός περιλαμβάνει επίσης διείσδυση στο κυτταρικό τοίχωμα λόγω της παραγωγής λυτικών ενζύμων που διασπούν τα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος (Zeilinger et al., 1999) και την απελευθέρωση αντιβιοτικών που διαπερνούν τις διάτρητες υφές και εμποδίζουν την επανεμφάνιση -σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος του ξενιστή (Lorito et al., 1996) και την ανάπτυξη του υφικού κυτταροπλάσματος του ξενιστή (Inbar et al., 1996). Μέχρι σήμερα, η διαδικασία μυκοπαρασιτισμού από εντομοπαθογόνους μύκητες (π.χ. *Lecanicillium* spp. και *Trichoderma* spp.) έχει περιγραφεί διεξοδικά *in vitro*, αλλά μένει να αποδειχτεί και *in planta*.

Ο ανταγωνισμός για τον χώρο και τα θρεπτικά συστατικά πιθανόν να είναι ο μηχανισμός βιοελέγχου που λειτουργεί κατά των *R. solani* (Ownley et al., 2004) (Griffin, 2007) και *P. viticola* (Jaber, 2015) σε φυτά που έχουν αποικιστεί ενδοφυτικά από τον *B. bassiana*. Ο φυτικός αποικισμός από τον *B. bassiana* επιβεβαιώθηκε σε φυτά αμπέλου με μειωμένη συχνότητα εμφάνισης και σοβαρότητας των συμπτωμάτων περονόσπορου πριν από την προσβολή των φυτών από τον παθογόνο παράγοντα (*P. viticola*) (Jaber, 2015). Ο αποικισμός των φυτικών ιστών από ενδοφυτικούς μύκητες περιλαμβάνει διάφορα στάδια, συμπεριλαμβανομένης της αναγνώρισης του ξενιστή, της βλάστησης των σπορίων, της διείσδυσης στην επιφάνεια του φυτού και του αποικισμού των ιστών (Petrini, 1991). Μόλις εγκατασταθεί επιτυχώς ο αποικισμός των μυκήτων στους φυτικούς ιστούς, ο μύκητας καταλαμβάνει μια θέση και η επιβίωσή του εξαρτάται από τα θρεπτικά συστατικά που παρέχονται από το φυτό ξενιστή. Δεδομένου ότι ο ενδοφυτικός μύκητας αποικίζει πρώτος το φυτό, πιθανότατα να εξαντλεί τους πόρους του φυτού ξενιστή, αφήνοντας κανένα διαθέσιμο για το φυτικό παθογόνο που θα επιχειρήσει να το προσβάλει. Αν όμως το παθογόνο αποικίσει το φυτό πριν από το ενδόφυτο, μπορεί να μετατοπίσει την αλληλεπίδραση ενδόφυτου-παθογόνου από την καταστολή της νόσου στη διευκόλυνση της νόσου (Adame-Álvarez et al., 2014). Ο αρχικός ενδοφυτικός αποικισμός προάγει επίσης την παραγωγή λιγνίνης και την εναπόθεση επιπλέον κυτταρικού τοιχώματος ως μηχανική αμυντική απόκριση, αποτρέποντας ή περιορίζοντας τη μόλυνση από τα παθογόνα των φυτών που προκαλούν ασθένειες (Schulz & Boyle, 2005).

Τα αντιβιοτικά που παράγονται από δευτερογενείς μεταβολίτες, έχουν αναφερθεί ως ένας από τους μηχανισμούς με τους οποίους οι εντομοπαθογόνοι μύκητες παρέχουν προστασία έναντι φυτοπαθογόνων και εντόμων που προκαλούν ασθένειες (Ownley et

al., 2010). Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες είναι μια πλούσια πηγή δευτερογενών μεταβολιτών με αντιμικροβιακή, εντομοκτόνο και κυτταροτοξική δράση (Gibson et al., 2014). Για παράδειγμα, ο *B. bassiana* παράγει πολυάριθμους δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως η μποβερισίνη, η μασσιανίνη, οι μποβερολίδες, οι μασσιανολίδες, η ωοσπορείνη, η μασσιανολόνη (Ownley et al., 2010). Από αυτές τις ενώσεις, η μποβερισίνη έχει ευρεία και πολλαπλά σημαντική βιοδραστικότητα και μπορεί επίσης να παραχθεί από διάφορα εντομοπαθογόνα γένη μυκήτων, όπως τα *Paecilomyces*, *Isaria* και *Fusarium* (Wang and Xu, 2012). Η μποβερισίνη παράγεται κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας ζωμού από το στέλεχος *B. bassiana* 11–98 (Leckie et al., 2008), ένα ενδοφυτικό στέλεχος που βρέθηκε ότι καταστέλλει την ριζοκτόνια που προκαλείται από το *R. solani* και το *P. myriotylum* στην ντομάτα και το βαμβάκι (Ownley et al., 2004, 2008; Clark & et al., 2006; Griffin, 2007). Ωστόσο, η δευτερογενής ένωση του μύκητα εξακολουθεί να ανιχνεύεται στα φυτά που έχουν αποικιστεί από τον *B. bassiana* στις αναγκαίες συγκεντρώσεις ώστε να κατασταλούν οι αντίστοιχοι φυτοπαθογόνοι μύκητες *in planta*. Ομοίως, η παραγωγή αρκετών άλλων δευτερογενών μεταβολιτών με αντιμικροβιακή δράση από ενδοφυτικούς εντομοπαθογόνους μύκητες έχει μέχρι στιγμής αναφερθεί μόνο σε *in vitro* μελέτες (Wainwright et al., 1986; Lee et al., 2005; Carollo, et al., 2010; Sasan & Bidochka, 2013). Οι περισσότεροι, αν όχι όλοι οι μύκητες είναι ικανοί να αποικίζουν ιστούς τουλάχιστον από ορισμένα είδη φυτών. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του φυτού-ξενιστή και του απομονωμένου ενδοφυτικού εντομοπαθογόνου μύκητα (EPPF), θα μπορούσαν να είναι είτε ωφέλιμες τόσο για το φυτό όσο και για τον EPPF, είτε ουδέτερες ή ανταγωνίστηκες.

Οι ωφέλιμοι ενδοφυτικοί μύκητες που αποικίζουν τα φυτά, αναγνωρίζονται αρχικά ως πιθανοί εισβολείς και ενεργοποιείται η ανοσολογική απόκριση. Σε μεταγενέστερο στάδιο, επάγονται τα γονίδια JA και ET, που εμπλέκονται τόσο στην βιοσύνθεση ορμονών όσο και στη σηματοδότηση (Vos et al., 2015). Η διαφοροποίηση της έκφρασης των γονιδίων, αποκάλυψε ότι η ευεργετική αυτή αλληλεπίδραση μύκητα-φυτού στοχεύει σε πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες που εμπλέκονται στην αντοχή έναντι των φυτοφάγων οργανισμών (Brotman et al., 2013). Επιπλέον έχει αναφερθεί η συμμετοχή πολλών ROS επαγωγίμων γονιδίων και γονιδίων που κωδικοποιούν MAP κινάσες. Ο ενδοφυτικός αποικισμός μπορεί επίσης να ενισχύσει την φυτική ανάπτυξη, επιτρέποντας στο φυτό να αντισταθμίσει την βιομάζα που χάνεται λόγω των φυτοφάγων (McKinnon et al., 2017).

Η επαγόμενη συστημική άμυνα (ISR), που ως γνωστόν ενεργοποιείται από οφέλημα μικρόβια, έχει αναδειχθεί ως ένας σημαντικός μηχανισμός με τον οποίο ολόκληρο το φυτό προετοιμάζεται για να ενισχύσει την άμυνά του ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα φυτικών παθογόνων και παρασιτικών εντόμων (Pieterse et al., 2014). Η ενεργοποίηση της ISR μαρτυράται από την μείωση των συμπτωμάτων της νόσου σε μέρη του φυτού που εντοπίζονται μακριά από το σημείο όπου είναι ενεργός ο παράγοντας επαγωγής της. Αυτό έχει αποδειχθεί σε σπορόφυτα βαμβακιού που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *B. bassiana* 11-98 με ριζοπότισμα. Δεκατρείς ημέρες αργότερα ακολούθησε η προσβολή του φυλλόματος από το παθογόνο βακτήριο *Xanthomonas* spp. Ο εμβολιασμός της ρίζας με τον εντομοπαθογόνο μύκητα *B. bassiana* είχε ως αποτέλεσμα να μειώσει σημαντικά τη σοβαρότητα της βακτηριακής νόσου στα φύλλα των εμβολιασμένων φυτών σε σύγκριση με τα μη επεξεργασμένα φυτά ελέγχου. Επιπλέον,

ο εμβολιασμός με τον *B. bassiana* ήταν εξίσου αποτελεσματικός με τη θεραπεία με 2,6-διγλωρο-ισονικωτινικό οξύ, μια χημική ουσία που επάγει τη συστημική άμυνα έναντι των φυτικών παθογόνων (Griffin, 2007; Ownley et al., 2008). Ο αποικισμός της χουρμαδιάς από τα *B. bassiana* και *Lecanicillium* spp. είχε ως αποτέλεσμα την θετική ρύθμιση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην φυτική άμυνα και στην απόκριση στο στρες (Gómez-Vidal et al., 2009), προκαλώντας έτσι μια «κατάσταση εγρήγορσης» με την οποία τα φυτά θα μπορούσαν να επιτύχουν ταχύτερη και ισχυρότερη ενεργοποίηση της ανοχής σε ένα ευρύ φάσμα παθογόνων, εντόμων και αβιοτικού στρες (Jaber & Ownley, 2017). Η καταστολή ή η καθυστερημένη εμφάνιση των συμπτωμάτων θεωρείται επίσης ως ένας μηχανισμός ISR έναντι των φυτοπαθογόνων, συμπεριλαμβανομένων των ιών (Fraser, 1979) και ήταν εμφανής σε φυτά κολοκύθας που αποικίστηκαν ταυτόχρονα από διάφορα στελέχη *B. bassiana* και στη συνέχεια προσβλήθηκαν με ZYMV (Jaber and Salem, 2014). Άλλοι μηχανισμοί ISR που εμπλέκονται στην ιογενή μόλυνση περιλαμβάνουν την αναστολή του πολλαπλασιασμού ή της συσσώρευσης του ιού (Lobenstein, 1972). Οι δοκιμές Sandwich ELISA διπλού αντισώματος (DASELISA) ανίχνευαν χαμηλές συγκεντρώσεις ZYMV σε φυτά που ήταν εμβολιασμένα με *B. bassiana*, και δεν εμφάνιζαν προφανώς συμπτώματα σε σύγκριση με τα φυτά ελέγχου. Αυτό έδειξε χαμηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού του ιού και συνεπώς μικρότερη συσσώρευση σε αυτά τα φυτά (Jaber & Salem, 2014).

Εκτός από την διασυστημική άμυνα ISR, οι ενδοφυτικοί μύκητες μπορούν να διεγείρουν την παραγωγή βιοδραστικών δευτερογενών μεταβολιτών από το φυτό (Hartley et al., 2015), οι οποίοι είναι μια ομάδα ενώσεων που παίζουν σημαντικό ρόλο στην προσαρμογή των φυτών στο περιβάλλον τους (Bourgau et al., 2001). Μεταξύ αυτών των ενώσεων είναι οι φυτοαλεξίνες με αντιμυκητιακές, αντιβακτηριακές και αντικαρκινικές ιδιότητες, που βοηθούν στην προστασία των φυτών από τα παθογόνα. Η ποσότητα των ισοφλαβονοειδών φυτοαλεξινών αυξήθηκε σημαντικά στα φυτά σόγιας που εμβολιάστηκαν με *M. anisopliae* σε σύγκριση με τα φυτά ελέγχου (Khan, et al., 2012). Η συγκέντρωση της τερπενοειδούς φυτοαλεξίνης καψιδιόλη σε εμβολιασμένα με *Trichoderma harzianum* Rifai φυτά πιπεριάς ήταν περισσότερο από επτά φορές μεγαλύτερη από ότι στα μη εμβολιασμένα φυτά ελέγχου, και έτσι σημειώθηκε ως ένας από τους παράγοντες που ευθύνονται για την καθυστερημένη ανάπτυξη της βλάβης που προκαλείται από το *Phytophthora capsici* Leonian (Oomycota: Peronosporales) (Ahmed et al., 2000). Πιο πρόσφατα, ο αποικισμός των φυτών τομάτας από τον *B. bassiana* βρέθηκε να έχει μεγαλύτερη επίδραση στη συσσώρευση των τερπενοειδών σε σύγκριση με τον αποικισμό από τον αρβώδη μυκόρριζικό μύκητα *Rhizophagus intraradices* (Shrivastava et al., 2015).

Οι ενδοφυτικοί εντομοπαθογόνοι μύκητες μπορούν να συμβάλουν στην προστασία του φυτού-ξενιστή τους έναντι των παθογόνων μέσω της ενίσχυσης της φυτικής ανάπτυξης. Ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών έχει δείξει την ικανότητα αρκετών εντομοπαθογόνων μυκήτων να προάγουν την φυτική ανάπτυξη μετά από τον ενδοφυτικό τους αποικισμό (Garcia et al., 2011; Sasan & Bidochka, 2012; Lopez & Sword, 2015; Jaber & Enkerli, 2017). Η αυξημένη ανάπτυξη των φυτών, λόγω του αποικισμού τους από τους ενδοφυτικούς μύκητες, έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή διαφόρων παραγόντων αβιοτικού και βιοτικού στρες, συμπεριλαμβανομένων των

φυτικών ασθενειών (Kuldau & Bacon, 2008). Αυτό έχει αποδειχθεί σε φυτά κολοκύθας που αποικίστηκαν από τον *B. bassiana* ενάντια στο ZYMV (Jaber and Salem, 2014). Όταν προσβλήθηκαν με ZYMV, τα εμβολιασμένα φυτά με τον *B. bassiana* όχι μόνο εξέφρασαν μειωμένη συχνότητα εμφάνισης και σοβαρότητας της νόσου, αλλά ήταν επιπλέον πιο εύρωστα και αναπτύχθηκαν πιο γρήγορα σε σύγκριση με τα μη εμβολιασμένα φυτά ελέγχου. Το ίδιο έχει αποδειχθεί σε φυτά που είχαν αποικιστεί από τον *M. robertsii* και εκτέθηκαν στον *F. solani*. Τα εμβολιασμένα με *M. robertsii* φυτά έδειξαν μία πιο υγιή ανάπτυξη και μειωμένους δείκτες ασθένειας σε σύγκριση με τα μη αποικισμένα φυτά (Sasan and Bidochka, 2013). Πράγματι, ο εμβολιασμός των φυτών με εντομοπαθογόνους μύκητες (π.χ. *B. bassiana* και *Lecanicillium* spp.) επάγει την παραγωγή πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη φωτοσύνθεση και τον ενεργειακό μεταβολισμό καθώς και με την άμυνα των φυτών και τις αντιδράσεις στο στρες, που θα μπορούσαν να ενισχύσουν την φυτική ανάπτυξη και την αντίσταση στις ασθένειες (Gómez-Vidal et al., 2009). Η ενισχυμένη ανάπτυξη που παρατηρείται σε αποικισμένα από εντομοπαθογόνους μύκητες φυτά μπορεί επίσης να οφείλεται στην παραγωγή φυτοορμονών ή σιδηροφόρων (δηλαδή, χαμηλού μοριακού βάρους χηλικές ενώσεις σιδήρου που συντίθενται από μικροοργανισμούς). Για παράδειγμα, το *M. anisopliae* έχει αποδειχθεί ότι επάγει την παραγωγή φυτοορμονών σε εμβολιασμένα φυτά σόγιας (Khan et al., 2012), ενώ τα *M. robertsii* και *B. bassiana* έχουν βρεθεί ότι παράγουν σιδηροφόρες ενώσεις υπό συνθήκες καλλιέργειας με χαμηλά αποθέματα σιδήρου (Krasnoff et al., 2012; Jirakkakul et al., 2015). Επιπλέον, η προώθηση της φυτικής ανάπτυξης από τους ενδοφυτικούς εντομοπαθογόνους μύκητες θα μπορούσε να οφείλεται στην αυξημένη πρόσληψη θρεπτικών ουσιών (όπως ο σίδηρος) από φυτά που έχουν αποικιστεί από τον *B. bassiana* (Sánchez-Rodríguez et al., 2015) ή στην ικανότητα μεταφοράς του αζώτου που προέρχεται από έντομα πίσω στα φυτά όπως αναφέρεται για τον *B. bassiana* και διάφορα είδη *Metarhizium* (Behie and Bidochka, 2014). Αξίζει να σημειωθεί ότι η ικανότητα πολλών ειδών εντομοπαθογόνων μυκήτων, συμπεριλαμβανομένων των *B. bassiana*, *B. brongniartii* και *M. brunneum*, να προάγουν την ανάπτυξη των φυτών μετά τον ενδοφυτικό αποικισμό τους, εξαρτάται από τη μέθοδο που χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό των φυτών με τα στελέχη των μυκήτων (Jaber and Enkerli, 2016, 2017). Όταν χρησιμοποιήθηκε ψεκασμός του φυλλώματος των φυτών φασολιάς με τους εντομοπαθογόνους μύκητες, όλα τα δοκιμασμένα στελέχη ενίσχυσαν αρκετές φυτικές παραμέτρους που μετρήθηκαν 7 ημέρες μετά τον εμβολιασμό (7 dpi) αλλά όχι τη 14 dpi (Jaber and Enkerli, 2017). Αντίθετα, ο εμβολιασμός των φυτών φασολιάς με *M. brunneum* και *B. bassiana* ενίσχυσε σταθερά την ανάπτυξη των φυτών έως και την 28 dpi όταν χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της επεξεργασίας των σπόρων με τους μύκητες (Jaber and Enkerli, 2016). Η τελευταία μελέτη καταδεικνύει περαιτέρω ότι η επεξεργασία των σπόρων για 2 ώρες με εναιωρήματα κονιδίων, δεν ήταν αρκετός ώστε να έχει ως αποτέλεσμα το εξέχον αποτέλεσμα ενίσχυσης της ανάπτυξης των φυτών που παρατηρήθηκε όταν οι σπόροι επεξεργάστηκαν για 16 ώρες. Ομοίως, το *M. anisopliae* δεν προώθησε την ανάπτυξη των φυτών τομάτας όταν χρησιμοποιήθηκε ο χαμηλότερος ρυθμός εμβολιασμού (8×10^7 κονίδια/ml) (Garcia et al., 2011). Η μέθοδος, ο ρυθμός και η διάρκεια εμβολιασμού θα πρέπει επομένως να λαμβάνονται υπόψη, όταν επιχειρείται η καθιέρωση ενδοφυτικών εντομοπαθογόνων μυκήτων ως προαγωγοί φυτικής ανάπτυξης (Jaber and Enkerli, 2017).

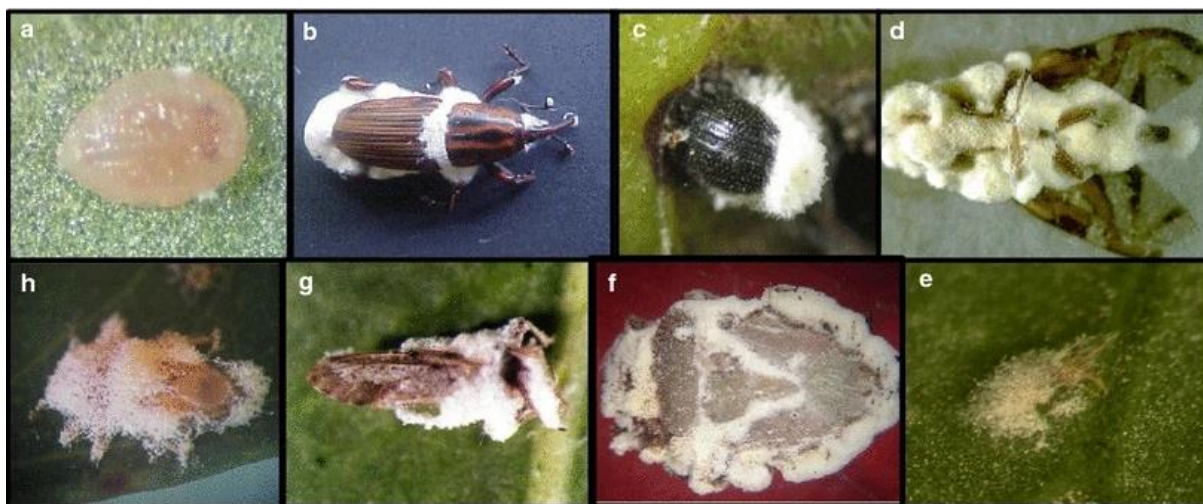
1.4.1. Ο εντομοπαθογόνος μύκητας *Beauveria bassiana*

Το 1835, ανακαλύφθηκε από τον Agostino Bassi (Lord, 2005), όπου νεκρά έντομα είχαν εμφανίσει «λευκή μουσκαρδίνη-white muscardine». Ο μύκητας ονομάστηκε στη συνέχεια από τους Bassi και Vuillemin ως *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) και αποτελεί την αναμορφική κατάσταση του *Cordyceps bassiana*, της τέλειας μορφής του ασκομύκητα του γένους Clavicipitaceae. Η πλήρης κατάταξη του *B. bassiana*, σύμφωνα με τους (Sung et al., 2006) και (Halouane, 2008) είναι η εξής:

- Βασίλειο: Fungi
- Φύλλο: Ascomycota
- Κλάση: Sordariomycetes
- Τάξη: Hypocreales
- Οικογένεια: Clavicipitaceae / Cordicipitaceae ή ophiocordicipitaceae
- Γένος: *Beauveria*
- Είδος: *Beauveria bassiana*

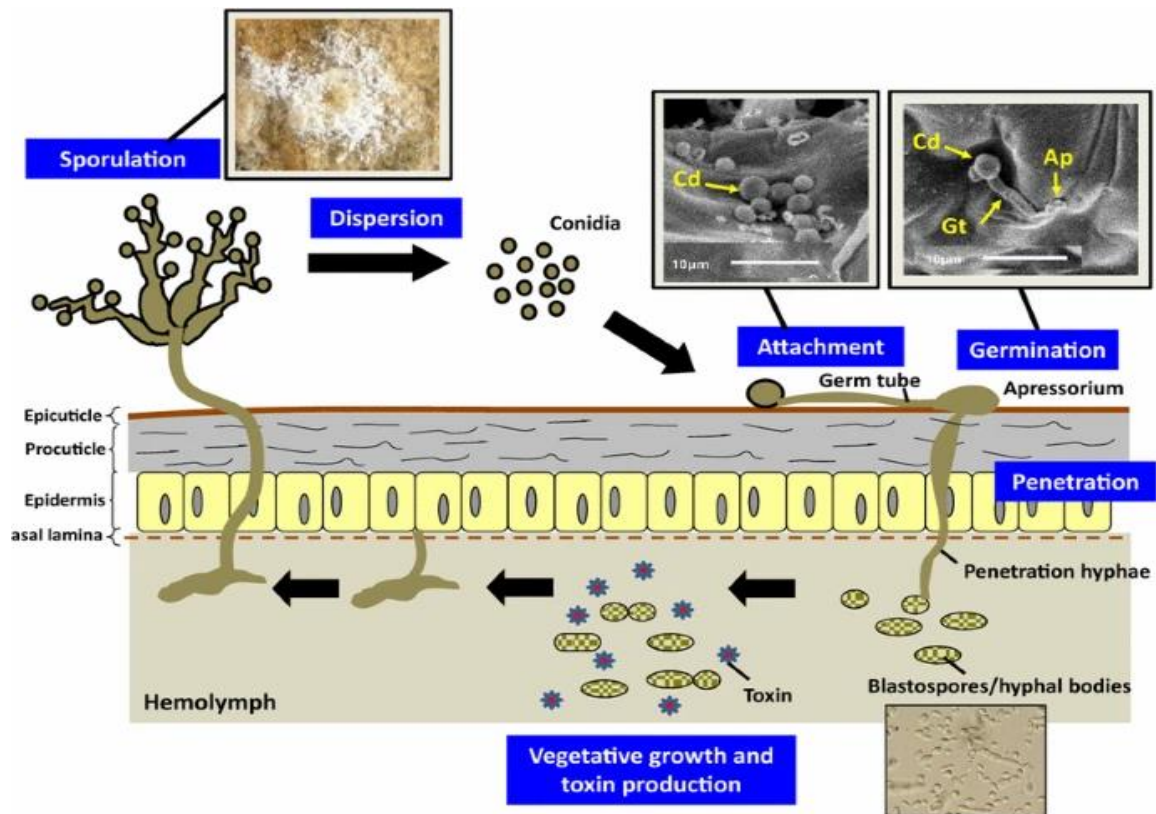
Ο εντομοπαθογόνος μύκητας *B. bassiana* εμφανίζει έναν πολύ-λειτουργικό τρόπο ζωής, καθώς μπορεί να υπάρχει σε ποικίλα οικολογικά περιβάλλοντα όπως το χώμα, τα φυτά και τα έντομα. Ο μύκητας επιβιώνει ως σαπρόφυτο στο έδαφος με τη μορφή μυκηλίου ή ως κονίδια έως ότου προσκολληθούν σε έναν κατάλληλο και συμβατό ξενιστή του μικρο-περιβάλλοντος που τον περιβάλλει ή να αποικίσει φυτά ως ενδόφυτο (Behie et al., 2015; Imoulan et al., 2017).

Ο μύκητας αυτός αποτελεί ένα πολύ γνωστό, ευρέος φάσματος παθογόνο των αρthropόδων, με ικανότητα να μολύνει περισσότερα από 700 διαφορετικά είδη ξενιστών (Εικόνα 3). Ο εντομοπαθογόνος μύκητας *B. bassiana* έχει βρεθεί ως εντομοπαθογόνο στις τάξεις των εντόμων Ημίπτερα (*Picromerus bidens*, *Anthocoris nemorum*), Ομόπτερα (*Eulecanium* spp.), Λεπιδόπτερα (*Hepialus* spp., *Hypocrita jacobaea*, *Cydia nigricans*), Κολεόπτερα (*Lathrobium brunniipes*, *Calvia quattuordecimguttata*, *Phytodectra olivacea*, *Otiiorhynchus sulcatus*, *Sitona lineatus*, *S. sulcifrons*, *S. macularius*, *S. hispidulus*, *Anthonomus pomorum*, *Hylaster ater*), Υμενόπτερα (*Ichneumonidae*, *Lasius fuliginosus*, *Vespula* spp., *Bombus pratorum*), Δίπτερα (*Leria serrata*), Αιμόπτερα, Ορθόπτερα, Ισόπτερα, Σιφονόπτερα, Θυσανόπτερα, Νευρόπτερα, Δερμάπτερα, Εμβιόπτερα και σε 13 είδη Acarina, τα οποία είναι κατανεμημένα σε επτά γένη και έξι οικογένειες.

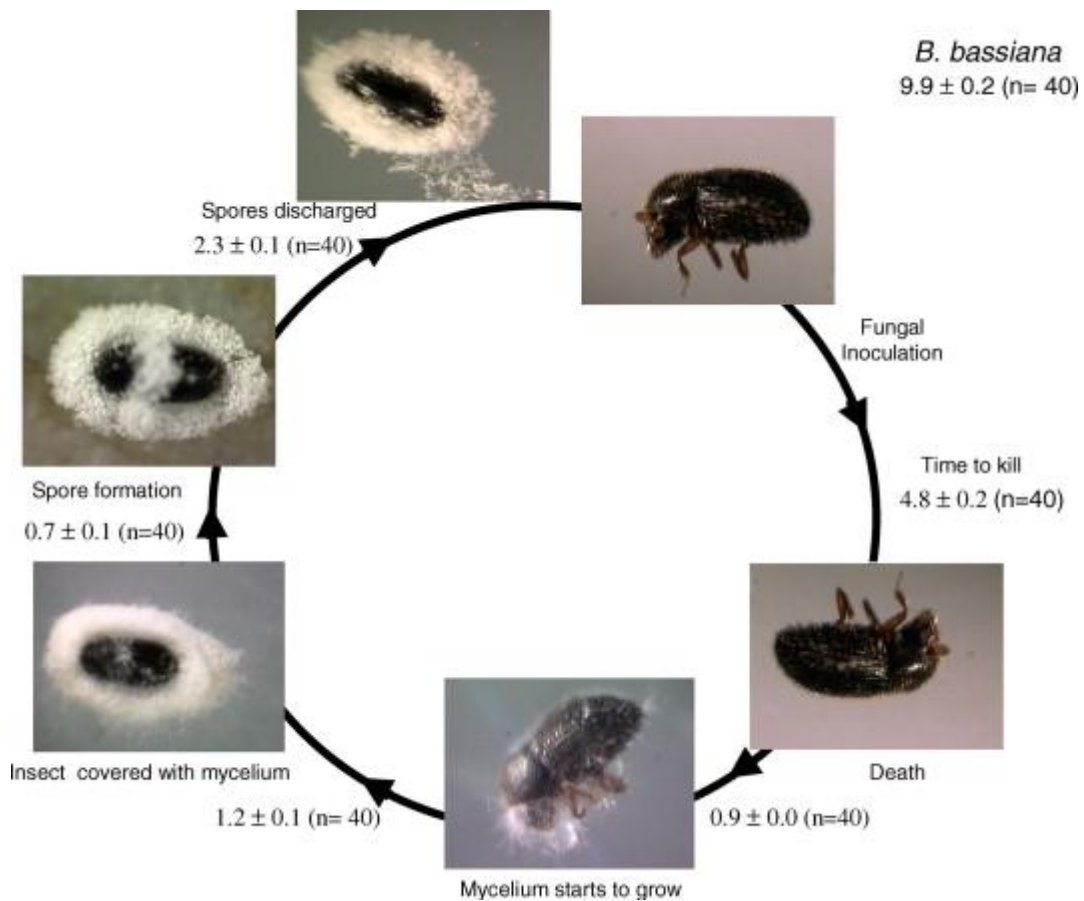


Εικόνα 3. Απεικόνιση του ευρέος φάσματος μολυσμένων αρthropόδων από το *Beauveria bassiana* s.l.: a) Νύμφη του αλευρώδη (Silverleaf whitefly) *Bemisia tabaci* βιότυπου B (Credits: Gabriel M. Mascarin), b) *Metamasius hemipterus* (Credits: Rogério B. Lopes), c) *Hyphotenemus hampei* (Credits: Gabriel M. Mascarin), d) *Anastrepha fraterculus* (Credits: Gabriel M. Mascarin), e) το άκαρι *Tetranychus urticae* (Credits: Gabriel M. Mascarin), f) *Nezara viridula* (Credits: Gabriel M. Mascarin), g) *Diaphorina citri* (Credits: Luiz F. L. Padulla), h) *Thaumastocoris peregrinus* (Credits: Gabriel M. Mascarin) (Mascarin & Jaronski, 2016).

Τα είδη του *Beauveria* ενδείκνυνται ως πιθανοί παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης επιβλαβών εντόμων λόγω: α) του εξαιρετικά ποικίλου φάσματος ξενιστών, β) μπορεί πολύ εύκολα να παραχθεί μαζικά, γ) του αξιοσημείωτου μηχανισμού μόλυνσης των εντόμων (Imoulan et al., 2017). (Εικ. 4) Συνήθως τα κονίδια διασπείρονται μέσω του ανέμου, της βροχής ή ακόμα και με τη βοήθεια αρthropόδων φορέων, βοηθώντας τον μύκητα να μολύνει το έντομο-ξενιστή. Η μόλυνση ξεκινάει μέσω της προσκόλλησης των κονιδίων στην επιδερμίδα του ξενιστή με φυσικές δυνάμεις. Το κονίδιο εκβλαστάνει και διεισδύει στα στρώματα της επιδερμίδας, με τον συνδυασμό της μηχανικής πίεσης και της αποικοδόμησης των επιδερμικών συστατικών μέσω έκκρισης ενζύμων όπως πρωτεάσες, εστεράσες, λιπάσες και χιτινάσες (Goettel et al., 1989; Pedrini et al., 2007; Pedrini et al., 2013). Ο μύκητας εισβάλλει προοδευτικά στο αιμόκοιλο (hemocoel-ανοικτό κυκλοφορικό σύστημα) του εντόμου μέσω της τραυματισμένης επιδερμίδας. Όταν οι αναπτυσσόμενες υφές φτάσουν στην πλούσια σε θρεπτικά συστατικά αιμόλεμφο, ο μύκητας μπορεί να εκβλαστήσει σε μονοκύτταρα βλαστοσπόρια, που είναι εξειδικευμένες δομές για να πολλαπλασιάζονται γρήγορα και να εκμεταλλεύονται τα θρεπτικά συστατικά, να αποικίζουν τους εσωτερικούς ιστούς και να αποφεύγουν το ανοσοποιητικό σύστημα του εντόμου (Valero-Jiménez et al., 2016). Κατά τον αποικισμό παράγονται μία ποικιλία τοξικών μεταβολιτών (αντιμικροβιακά πεπτίδια), τα οποία συμμετέχουν στην καταστολή του ανοσοποιητικού του ξενιστή και συνοδεύεται από την καταστροφή των εσωτερικών ιστών και την εξάντληση των θρεπτικών συστατικών, οδηγώντας τελικά στον θάνατο του εντόμου-ξενιστή. Λόγω εξάντλησης των θρεπτικών του αιμοκοιλίου, οι υφές αναδύονται και αναπτύσσουν κονίδια στην επιφάνεια του νεκρού εντόμου, με αποτέλεσμα τη μουμιοποίηση του εντόμου ξενιστή (Hajek & Leger, 1994; Goettel et al., 2010)(Εικ. 5). Το *B. bassiana* θεωρείται ένας περιβαλλοντικά ασφαλής βιολογικός παράγοντας, με μηδενική ή ελάχιστη επικινδυνότητα για την ανθρώπινη υγεία και γενικά είναι ασφαλής για οργανισμούς μη-στόχους (Zimmermann, 2007).



Εικόνα 4. Απεικόνιση του βιολογικού κύκλου του *B. bassiana* στην επιδερμίδα ενός εντόμου (Mascarin & Jaronski, 2016).



Εικόνα 5. Ο βιολογικός κύκλος του εντομοπαθογόνου μύκητα *Beauveria bassiana* (ημέρες, μέσος όρος \pm SE) των ενήλικων κολεοπτέρων και περιλαμβάνει τις μέρες έως (1) τον θάνατο του εντόμου, (2) την ανάπτυξη του μυκηλίου, (3) την κάλυψη του νεκρού εντόμου από το μυκήλιο, (4) τον σχηματισμό σπορίων και (5) τον διασκορπισμό των σπορίων (Vega, 2008).

Τα είδη του μύκητα *Beauveria* παράγουν μία σειρά εντομοκτόνων μεταβολιτών όπως η μη-ριβοσωμική πεπτιδική συνθετάση (NRPS) (Xiao et al., 2012), η μποβερικίνη (Grove & Pople, 1980; Wang & Xu, 2012), η βασιανολίδη (Kanaoka et al., 1978), βασιακρινίνη (Quesada-Moraga et al., 2004), διπικολινικό οξύ και οξαλικό οξύ (Bidochka & Khachatourians, 1991). Ωστόσο οι ενώσεις αυτές παράγονται κατά τις διεργασίες μόλυνσης, ενώ είναι άγνωστο αν οι ενώσεις αυτές παράγονται κατά τον αποικισμό των φυτών ή αν η κατάποσή τους μπορούν να επηρεάσουν τα έντομα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι σε αντίθεση με τα αερομεταφερόμενα κονίδια, όταν υπάρχει έλλειψη υδρόφοβων συστατικών ή υδρόφοβων στρωμάτων, τότε η αλληλεπίδραση μεταξύ ξενιστή-παθογόνου γίνεται μέσω της ανάπτυξης ηλεκτροστατικών φορτίων στην επιφάνεια του βλαστοπόρου (Holder et al., 2007). Έχει αποδειχθεί ότι τα βλαστοσπόρια του *Beauveria* είναι εξίσου ή και περισσότερο μολυσματικά σε σύγκριση με τα κονίδια για την καταπολέμηση πολλών επιβλαβών αρθροπόδων (Holder et al., 2007; Mascarin et al., 2015a).

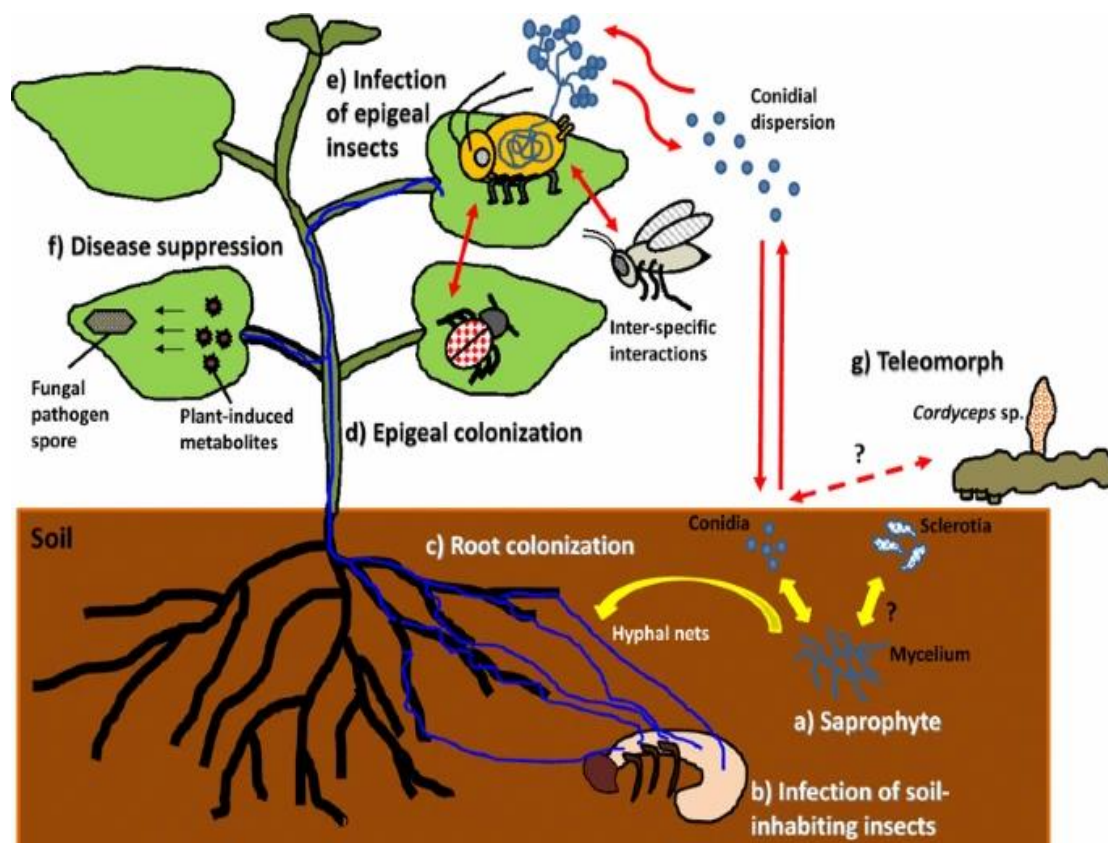
Ο εντομοπαθογόνος μύκητας *B. bassiana* έχει τη δυνατότητα να συμμετέχει στις αλληλεπιδράσεις μύκητα-φυτού. Η μεγαλύτερη πλειοψηφία των ανώτερων αγγειακών φυτών αποικίζονται από ενδοφυτικούς μύκητες (Saikkonen et al., 1998; Arnold & Lewis, 2005), συμπεριλαμβανομένου των ειδών *Clavicipitaceae* που περιέχονται στο Hypocreales (White et al., 2002). (Εικ. 6) Ο ενδοφυτικός τρόπος ζωής του μύκητα, περιλαμβάνει την αποίκιση των ριζών και των εναέριων οργάνων του φυτού ξενιστή, όπως: φύλλα, βλαστούς και καρπούς, χωρίς να προκαλεί κάποια ζημιά στο φυτό.

Οι αρνητικές επιδράσεις των ενδοφυτικών μυκήτων (Hypocreales: Clavicipitaceae) στα φυτοφάγα έντομα, οφείλονται στην παραγωγή μεταβολιτών από τους μύκητες, οι οποίοι μπορούν να επηρεαστούν από περιβαλλοντικούς παράγοντες, την παρουσία μυκορριζών και θρεπτικών συστατικών. Έρευνες που έγιναν πάνω στον εντομοπαθογόνο μύκητα *B. bassiana* ως ενδόφυτο στον αραβόσιτο, φανέρωσαν μειωμένες προσβολές-επιδρομές από το λεπιδόπτερο *O. nubilalis*, που θα μπορούσαν να οφείλονται στην παρουσία μεταβολιτών ή αντιβίωσης, που παράγονται από τον μύκητα και προκαλούν αποτροπή της σίτισης. Η πρόταση αυτή βασίζεται στην απουσία μόλυνσης των ατόμων *O. nubilalis* από τον μύκητα, όταν αυτά τράφηκαν από τα φυτά που είχαν αποικιστεί από τον υπό μελέτη ενδοφυτικό μύκητα. Η έλλειψη κονιδίων του *B. bassiana* σε αποικισμένα φυτά, υποδηλώνει έναν τρόπο δράσης που περιλαμβάνει την αποτροπή σίτισης ή την παραγωγή αντιβίωσης. Εάν υπήρχαν σπόρια, θα μπορούσε να είναι δυνατή η *per os* μόλυνση, αν και η διάκριση μεταξύ της πραγματικής μόλυνσης *per os* και της μόλυνσης λόγω των κονιδίων που ήρθαν σε επαφή με την επιδερμίδα των εντόμων θα μπορούσε να γίνει δύσκολα (Vega, 2008).

Ο μύκητας αυτός αποικίζει μία μεγάλη ποικιλία καλλιεργούμενων φυτών, όπως το κακάο (*Theobroma cacao*) (Posada & Vega, 2005), το καλαμπόκι (*Zea mays*) (Bing & Lewis, 1992), τη φαρμακευτική οπιούχα παπαρούνα (*Papaver somniferum*) (Quesada-Moraga et al., 2006), τον καφέ (*Coffea* spp.), την τομάτα (*Lycopersicon esculentum*)

και την πατάτα (Quesada-Moraga et al., 2006). Επίσης, ο εντομοπαθογόνος μύκητας *Beauveria bassiana* έχει βρεθεί ότι αποικίζει και είδη δέντρων όπως *Carpinus caroliniana*, την χουρμαδιά, τη λεύκη και την κουκουναριά (Ownley et al., 2008).

Υπάρχουν ενδείξεις ότι ο ενδοφυτικός αποικισμός του *B. bassiana* προτείνει ως πιθανό μηχανισμό βιολογικής καταπολέμησης των φυτοπαθογόνων οργανισμών, τον ανταγωνισμό για χώρο και θρεπτικά. Αυτό υποδηλώνει ότι ο εντομοπαθογόνος μύκητας, εμφανίζει μία πολλά υποσχόμενη δυνατότητα να αναπτυχθεί ως βιοπαρασιτοκτόνο πολλαπλών χρήσεων κατά τις στρατηγικές IPM. Σε *in vitro* δοκιμές που έχουν πραγματοποιηθεί, αποδείχθηκε ότι ο εντομοπαθογόνος μύκητας *Beauveria bassiana* μπορεί να αναστέλλει την μυκηλιακή ανάπτυξη μιας σειράς εδαφογενών και φυλλωδών φυτοπαθογόνων, συμπεριλαμβανομένων των *Gaeumannomyces graminis* var. *Tritici*, *Armillaria mellea* και *Rosellinia necatrix*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* και *Rhizoctonia solani*. Εκτός από την αναστολή της μυκηλιακής ανάπτυξης, ο εντομοπαθογόνος μύκητας *B. bassiana* προκαλεί την κυτταρική λύση των φυτοπαθογόνων ειδών *Pythium ultimum*, *P. debaryanum* και *Septoria nodorum* (Ownley et al., 2008).



Εικόνα 6. Απεικόνιση του βιολογικού κύκλου του *B. bassiana* και των πολυτροφικών αλληλεπιδράσεων με τα φυτά, τα αρθρόποδα, το έδαφος και άλλα μικρόβια σε μία υποθετική κοινότητα τοπίου: **a)** Ο σαπροφυτικός τρόπος ζωής λαμβάνει χώρα στο έδαφος όπου τα κονίδια μετατρέπονται σε μυκήλια, ενώ η ικανότητά του μύκητα να μετατρέπεται σε σκληρώτια παραμένει άγνωστη, καθώς ο πολλαπλασιασμός αυτός δεν έχει παρατηρηθεί ούτε *in vitro* ούτε υπό φυσικές συνθήκες. **b)** Το *B. bassiana* μολύνει επίσης έντομα που κατοικούν στο έδαφος και **c)** μπορεί να μεταφέρει το άζωτο από το έντομο στο φυτό λόγω του ενδοφυτικού αποικισμού των ριζών. **d)** Εάν υπάρχει η ενδοφυτική ικανότητα, το *B. bassiana* αποικίζει από κάτω προς τα πάνω τους υπέργειους φυτικούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των μίσχων, των φύλλων και των σπόρων. **e)** Τα έντομα που προσβάλουν επίγειους ιστούς μπορεί να προσβληθούν και τελικά να μολυνθούν από κονίδια του μύκητα από νεκρά σποριογόνα πτώματα, από

αερομεταφερόμενα σπόρια ή ίσως από τον ενδοφυτικό αποικισμό. **ϝ**) *In planta* καταστολή της νόσου μπορεί να λάβει χώρα με τον ενδοφυτικό αποικισμό που ενεργοποιεί την άμυνα της συστημικής αντοχής ή με άμεσο ανταγωνισμό (αντιβίωση ή ανταγωνισμό θρεπτικών συστατικών). **g**) Η τέλεια μορφή του *Beauveria* έχει αναφερθεί ότι σχετίζεται με το *Cordyceps* sp. (Mascarin & Jaronski, 2016).

1.5. Το ημίπτερο *Aphis gossypii*

Το ημίπτερο *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) (Εικ. 7), είναι ένα οικονομικά σημαντικό επιβλαβές έντομο που προσβάλλει μία ευρεία ποικιλία φυτών Cucurbitaceae παγκοσμίως (Ullah et al., 2019). Είναι ένα πολυφάγο είδος και ευρέως διαδεδομένο σε τροπικές, υποτροπικές και εύκρατες περιοχές. Αποτελεί βασικό παράσιτο του βαμβακιού, των εσπεριδοειδών και των κολοκυνθοειδών και σε εύκρατες περιοχές η παρουσία τους είναι πιο έντονη, παρασιτώντας σε πολλά λαχανικά και καλλωπιστικά φυτά στον αγρό και στο θερμοκήπιο (Leclant & Deguine, 1994). Το ημίπτερο *Aphis gossypii* προκαλεί βλάβες λόγω της άμεσης νύξης και απομύζησης από το φυτό-ξενιστή, προκαλώντας παραμόρφωση των φύλλων και των κλαδιών και έμμεσες βλάβες, είτε λόγω του μελιτώματος που εκκρίνουν, είτε λόγω της μετάδοσης ιώσεων. Η αφίδα αυτή αποτελεί φορέας 76 ιογενών ασθενειών, όπως του ιού Tristeza (TV), του Cucumber mosaic virus (CMV) και του Watermelon mosaic virus type-2 (WMV- 2), σε ένα μεγάλο φάσμα φυτών (Chan et al., 1991).

Οι αφίδες είναι μικρόσωμα έντομα και έχουν συμήθως μήκος 1-7 mm. Τα πόδια τους είναι συνήθως μακριά με διάρθρους ταρσούς και διαθέτουν επίσης μακρύ ρύγχος και κεραίες που αποτελούνται από ένα έως έξι άρθρα. Το σώμα τους είναι συνήθως μαλακό. Οι πτερωτές μορφές έχουν δύο ζεύγη διαφανών πτερυγών. Τα περισσότερα είδη είναι πολυμορφικά. Εκτός από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της υπεροικογένειας στην οποία ανήκουν, οι πιο πολλές αφίδες έχουν στο νωτιαίο τεργίτη του 5ου κοιλιακού δακτυλίου ένα ζεύγος σωληνόμορφων αποφύσεων, που ονομάζονται σιφώνια (κεράτια) και στην άκρη της κοιλιάς μια απόφυση που λέγεται ουρά (cauda). Από τα σιφώνια φίνεται η απελευθέρωση φερομόνης συναγερμού όταν η αφίδα προσβληθεί ή εκτεθεί σε κίνδυνο από κάποιο εχθρό, προκαλώντας τη διασπορά των υπολοίπων αφίδων που βρίσκονται πλησίον της (Dixon 1998).

Τα εξωτερικά μορφολογικά χαρακτηριστικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την διάκριση του αναπτυξιακού σταδίου της αφίδας. Τα αναπτυξιακά στάδια των *A. gossypii* που εκτρέφονται υπό κυμαινόμενες θερμοκρασίας μπορούν να διαχωριστούν με βάση του μήκος της κεραίας. Οι νύμφες πρώτου αναπτυξιακού σταδίου διαθέτουν τέσσερις κεραίες, ενώ του δεύτερου αναπτυξιακού σταδίου έχουν πέντε. Οι διαφορές μεταξύ των νυμφών δεύτερου και τρίτου σταδίου είναι αρκετά μικρές, αλλά υπό σταθερές θερμοκρασίες μπορούν να διαχωριστούν χρησιμοποιώντας έναν συνδυασμό χαρακτήρων (όπως μήκος σώματος, μήκος κεραίων και αριθμός βλαστών στην ουρά και την προκτική πλάκα). Οι νύμφες του τρίτου αναπτυξιακού σταδίου δεν διαθέτουν σμήριγγες στο περιθώριο της γεννητικής πλάκας, σε αντίθεση με τις νύμφες του τέταρτου. Οι νύμφες του δεύτερου σταδίου με αναπτυσσόμενα φτερά φαίνεται να έχουν ώμους, οι νύμφες τρίτου σταδίου έχουν μικρά φτερά και τα αναπτυσσόμενα φτερά είναι πλέον εμφανή στις νύμφες του τέταρτου αναπτυξιακού σταδίου (Ebert & Cartwright).

Οι αφίδες είναι άφθονες κυρίως την άνοιξη και το φθινόπωρο και γενικά σε μετρίως θερμό και υγρό κλίμα. Τα παρθενογενετικά θηλυκά αναπαράγονται ταχύτατα την άνοιξη, γιατί οι συγκεκριμένες καιρικές συνθήκες και τα άφθονα τρυφερά φύλλα και

βλαστοί ευνοούν την ανάπτυξή τους. Σε κλίματα όπως της Ελλάδας, οι θερμοί και ξηροί μήνες του καλοκαιριού δεν ευνοούν τη συνεχή αναπαραγωγή των αφίδων και οι πληθυσμοί τους τότε περιορίζονται σημαντικά. Στην Ελλάδα κατά τον μήνα Μάιο παρατηρείται ο μέγιστος του αριθμός των ειδών αφίδων όπως και των πληθυσμών τους (Tsitsipis et al., 1997). Οι αφίδες έχουν ένα μεγάλο αριθμό φυσικών εχθρών που συμβάλλουν στον έλεγχο των πληθυσμών τους. Μεταξύ των φυσικών εχθρών τους οι σπουδαιότεροι είναι τα έντομα. Μεταξύ αυτών υπάρχουν είδη Διπτέρων (Sytrhidae, Cecidomyiidae), Νευροπτέρων (Chrysopidae, Hemerobiidae), Κολεοπτέρων (Coccinellidae, Carabidae, Staphyllinidae), Υμενοπτέρων (Proctotrupidae, Chalcididae, Braconidae, Aphidiinae). Επιπλέον υπάρχουν είδη που ανήκουν στα αραχνοειδή καθώς και σε taxa μυκήτων, όπως είδη των γενών *Empusa*, *Entomophthora* και *Verticillium*.



Εικόνα 7. Το ημίπτερο *Aphis gossypii* τρίτου αναπτυξιακού σταδίου στην καλλιέργεια των φυτών πεπονιάς.

1.6 ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗΣ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ (IPM)

Η ολοκληρωμένη διαχείριση παρασίτων (IPM), αναπτύχθηκε ως απάντηση στην ανεξέλεγκτη χρήση χημικών φυτοφαρμάκων που οδήγησαν σε κρίσεις ελέγχου παρασίτων (εξάρσεις δευτερογενών παρασίτων και επιστροφή-επανεμφάνιση παρασίτων μετά την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα φυτοφάρμακα) και ενίσχυσε τα αποδεικτικά στοιχεία και την ευαισθητοποίηση σχετικά με την επίδραση της εντατικής χρήσης των φυτοφαρμάκων στην ανθρώπινη υγεία και στο περιβάλλον (FAO, 2023).

Η IPM περιλαμβάνει την προσεκτική εξέταση των διαθέσιμων τεχνικών ελέγχου παρασίτων και την επακόλουθη ενσωμάτωση των κατάλληλων μέτρων που δεν ευνοούν την ανάπτυξη των πληθυσμών των παρασίτων. Συνδυάζει βιολογικές, χημικές, φυσικές και ειδικές (με βάση την καλλιέργεια) στρατηγικές και πρακτικές διαχείρισης για την καλλιέργεια υγιών καλλιεργειών και την ελαχιστοποίηση της χρήσης χημικών φυτοφαρμάκων, μειώνοντας ή ελαχιστοποιώντας τους κινδύνους που δημιουργούν

στην ανθρώπινη υγεία και στο περιβάλλον, για μία πιο βιώσιμη διαχείριση παρασίτων (FAO, 2023).

Η IPM βασίζεται στην οικολογία, στην έννοια των οικοσυστημάτων και στον στόχο της διατήρησης των λειτουργιών του οικοσυστήματος. Προωθεί την ανάπτυξη μιας υγιούς καλλιέργειας με τη μικρότερη δυνατή διαταραχή του αγρό-οικοσυστήματος και ενθαρρύνει τους φυσικούς μηχανισμούς ελέγχου των παρασίτων. Η IPM δεν είναι μία αρχή που εφαρμόζεται αυστηρά και αυτούσια σε κάθε περίπτωση, αλλά μία φιλοσοφία που μπορεί να καθοδηγήσει τον ασκούμενο να το χρησιμοποιήσει όπως αρμόζει στην κατάσταση του. Για παράδειγμα, η ανθεκτικότητα του φυτού-ξενιστή χρησιμοποιείται αποτελεσματικά μόνο σε μερικές καλλιέργειες με ανθεκτικότητα στα παράσιτα και σε ασθένειες ή ανεκτικές ποικιλίες. Οι φερομόνες χρησιμοποιούνται ευρέως για τη διαταραχή του ζευγαρώματος, τη μαζική παγίδευση ή την παρακολούθηση ορισμένων παρασίτων λεπιδόπτερων και κολεόπτερων, αλλά όχι για πολλά ημίπτερα παράσιτα. Ενώ τα χημικά φυτοφάρμακα θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ως έσχατη λύση, μερικές φορές αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας για την πρόληψη της εξάπλωσης ορισμένων ενδημικών ή διεισδυτικών παρασίτων και ασθενειών στην περιοχή ή για την προστασία των σπόρων και των μεταμοσχεύσεων από κοινά και επίμονα προβλήματα παρασίτων (Dara, 2019).

Ο ρόλος της IPM στην βιώσιμη γεωργία είναι (FAO, 2022):

Εξασφαλίζει βιώσιμο έλεγχο επιβλαβών οργανισμών. Η ολοκληρωμένη διαχείριση παρασίτων βασίζεται στις λειτουργίες ενός οικοσυστήματος, όπως η θήρευση επιβλαβών οργανισμών, προστατεύοντας παράλληλα άλλες, όπως η επικονίαση. Συμβάλλει επίσης στην αύξηση της παραγωγικότητας του αγροκτήματος και της διαθεσιμότητας τροφίμων, μειώνοντας τις απώλειες των καλλιεργειών πριν και μετά τη συγκομιδή.

Μειώνει τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων. Η IPM συμβάλλει στην ασφάλεια των τροφίμων και του νερού, καθώς η μείωση της ποσότητας των φυτοφαρμάκων που χρησιμοποιούνται, με τη σειρά τους οδηγούν σε μείωση των υπολειμμάτων στα τρόφιμα, τις ζωοτροφές και στις φυτικές ίνες, καθώς και στο περιβάλλον.

Ενισχύει τις λειτουργίες του οικοσυστήματος. Η IPM επιδιώκει τη διατήρηση της ισορροπίας του οικοσυστήματος των εθνικών καλλιεργειών. Διατηρεί την υποκείμενη βάση των φυσικών πόρων (δηλαδή έδαφος, νερό και βιοποικιλότητα) και ενισχύει τις λειτουργίες του οικοσυστήματος (δηλαδή επικονίαση, υγρή εδάφη, ποικιλότητα ειδών).

Αυξάνει τα επίπεδα εισοδήματος. Η IPM μειώνει το κόστος παραγωγής μέσω της μείωσης των επιπέδων χρήσης φυτοφαρμάκων. Καλλιέργειες υψηλότερης ποιότητας (με λιγότερα υπολείμματα) μπορούν να επιτύχουν καλύτερες τιμές στις αγορές και να συμβάλουν στην αύξηση της κερδοφορίας των αγροτών.

Ενισχύει τις γνώσεις των αγροτών. Η IPM προωθεί την επιστασία των αγροτών, αυξάνει τις γνώσεις τους για τη λειτουργία του οικοσυστήματος, προσαρμόζοντάς τες στο τοπικό τους πλαίσιο-περιβάλλον.

Η ολοκληρωμένη διαχείριση παρασίτων διαθέτει 8 αρχές, οι οποίες είναι (EUROPEAN COMMISSION, 2022):

1. Η πρόληψη ή/και η καταστολή των επιβλαβών οργανισμών θα πρέπει να επιτυγχάνεται ή να υποστηρίζεται μεταξύ άλλων επιλογών, ιδίως με:
 - Αμειψισπορά,
 - χρήση επαρκών καλλιεργητικών τεχνικών (π.χ. προετοιμασία σποροκλίνης, ημερομηνίες και πυκνότητες σποράς, συγκαλλιέργεια, συντηρητικό όργωμα, κλάδεμα και άμεση σπορά),
 - χρήση, κατά περίπτωση, ανθεκτικών/ανεκτικών ποικιλιών και τυποποιημένων/πιστοποιημένων σπόρων και φυτευτικών υλικών,
 - χρήση ισορροπημένων πρακτικών λίπανσης, ασβεστοποίησης και άρδευσης/αποστράγγισης,
 - πρόληψη της εξάπλωσης επιβλαβών οργανισμών με μέτρα υγιεινής (π.χ. με τακτικό καθαρισμό μηχανημάτων και εξοπλισμού),
 - προστασία και ενίσχυση σημαντικών ωφέλιμων οργανισμών, π.χ. με επαρκή φυτοπροστατευτικά μέτρα ή αξιοποίηση οικολογικών υποδομών εντός και εκτός των χώρων παραγωγής.
2. Οι επιβλαβείς οργανισμοί πρέπει να παρακολουθούνται με κατάλληλες μεθόδους και εργαλεία, εφόσον είναι διαθέσιμα. Τα κατάλληλα εργαλεία θα πρέπει να περιλαμβάνουν παρατηρήσεις στο πεδίο, όπως επίσης και επιστημονικά έγκυρα συστήματα προειδοποίησης, πρόβλεψης και έγκαιρης διάγνωσης, όπου αυτό είναι εφικτό, καθώς και τη χρήση συμβουλών από επαγγελματικά καταρτισμένους συμβούλους.
3. Με βάση τα αποτελέσματα της παρακολούθησης, ο επαγγελματίας χρήστης θα πρέπει να αποφασίσει εάν και πότε θα εφαρμόσει φυτοπροστατευτικά μέτρα. Οι ισχυρές και επιστημονικά ορθές τιμές κατωφλίου αποτελούν τα βασικά στοιχεία για τη λήψη αποφάσεων. Για τους επιβλαβείς οργανισμούς θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη πριν από την επεξεργασία, τα επίπεδα κατωφλίου που ορίζονται για την περιοχή, οι συγκεκριμένες περιοχές, οι καλλιέργειες και οι ιδιαίτερες κλιματικές συνθήκες, όπου αυτό είναι εφικτό.
4. Οι βιώσιμοι βιολογικοί, φυσικοί και άλλοι μη χημικοί μέθοδοι πρέπει να προτιμώνται από τις χημικές μεθόδους, εάν παρέχουν ικανοποιητικό έλεγχο των παρασίτων.
5. Τα φυτοφάρμακα που εφαρμόζονται πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο συγκεκριμένα για τον στόχο και να έχουν τις λιγότερες παρενέργειες στην ανθρώπινη υγεία, στους οργανισμούς μη στόχους και στο περιβάλλον.
6. Ο επαγγελματίας χρήστης θα πρέπει να διατηρήσει τη χρήση φυτοφαρμάκων και άλλων μορφών παρέμβασης στα απαραίτητα επίπεδα, π.χ. με μειωμένες δόσεις, μειωμένη συχνότητα εφαρμογής ή μερικές εφαρμογές, λαμβάνοντας υπόψη ότι το επίπεδο κινδύνου στη βλάστηση είναι αποδεκτό και δεν αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης αντοχής σε πληθυσμούς επιβλαβών οργανισμών.
7. Όταν είναι γνωστός ο κίνδυνος αντοχής έναντι ενός φυτοπροστατευτικού μέτρου και όπου το επίπεδο των επιβλαβών οργανισμών απαιτεί επαναλαμβανόμενη εφαρμογή φυτοφαρμάκων στις καλλιέργειες, θα πρέπει να εφαρμόζονται οι διαθέσιμες στρατηγικές κατά της αντίστασης, για τη διατήρηση της αποτελεσματικότητας των προϊόντων. Αυτό μπορεί να περιλαμβάνει τη χρήση πολλαπλών φυτοφαρμάκων με διαφορετικούς τρόπους δράσης.

8. Με βάση τα αρχεία για τη χρήση φυτοφαρμάκων και την παρακολούθηση επιβλαβών οργανισμών, ο επαγγελματίας χρήστης θα πρέπει να ελέγχει την επιτυχία των εφαρμοζόμενων φυτοπροστατευτικών μέτρων.

1.7 ΣΚΟΠΟΣ

Το ημίπτερο *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae), είναι ένα πολυφάγο είδος και ευρέως διαδεδομένο σε τροπικές, υποτροπικές και εύκρατες περιοχές. Είναι ένα οικονομικά επιβλαβές έντομο που προκαλεί σοβαρές ζημιές στις καλλιέργειες, λόγω της άμεσης νύξης και απομύζησης από το φυτό-ξενιστή, προκαλώντας παραμόρφωση των φύλλων και των κλαδιών του και έμμεσες βλάβες, είτε από το μελίτωμα που εκκρίνουν είτε λόγω της μετάδοσης ιώσεων (Chan et al., 1991). Η χημική αντιμετώπιση του ημιπτέρου, έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας, με αποτέλεσμα την κλιμάκωση του προβλήματος. Για να αντιμετωπιστούν οι κίνδυνοι που σχετίζονται με τα χημικά φυτοφάρμακα, υπάρχει η ανάγκη να εφαρμοστεί μία πιο φιλική προς το περιβάλλον προσέγγιση, όπως οι χρήσιμα βιολογικών παραγόντων. Οι βιολογικοί παράγοντες αποικίζουν τις ρίζες του φυτού, και έχουν την ικανότητα να μειώνουν την συχνότητα εμφάνισης της νόσου, αλλά συχνά είναι πιο αποτελεσματικοί όταν χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες βιολογικού ελέγχου και διαφορετικές στρατηγικές ολοκληρωμένης αντιμετώπισης.

Σκοπός της παρούσας μελέτης, είναι η παρατήρηση της *in planta* επίδρασης των τριών στελεχών του ενδοφυτικού εντομοπαθογόνου μύκητα *Beauveria bassiana* στα φυτά πεπονιάς *Cucumis melo* ως βιολογικοί παράγοντες κατά των μυζητικών εντόμων *Aphis gossypii*, καθώς και ως βιοδιεγέρτες, ενισχύοντας την φυτική αύξηση και ανάπτυξη.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα πειράματα στα φυτά πεπονιού (*Cucumis melo* var Moonshine) έλαβαν μέρος στον αγρό που εντοπίζεται στην Κόνιτσα Ιωαννίνων, από το Μάιο έως Σεπτέμβριο του 2022. Ο αγρός περιλάμβανε πλούσια βιοποικιλότητα, γεγονός που βοήθησε στην ολοκληρωμένη παρατήρηση των σχέσεων που αναπτύσσονται μεταξύ των διάφορων εντόμων που συμβιώνουν στο ίδιο περιβάλλον.

Για τους σκοπούς του πειράματος πεδίου, αξιολογήθηκαν τρεις απομονώσεις του εντομοπαθογόνου μύκητα *Beauveria bassiana*. Αξιολογήθηκαν το στέλεχος *Beauveria bassiana* GHA 10,735% (Botanigard 10.7SC, K&N Efthymiadis Single Member S.A., Thessaloniki, Greece), το στέλεχος *B. bassiana* PPRI 5339 που περιέχεται στο EPF-βιοπαρασιτοκτόνο Velifer[®] ES (BASF SE, Florham Park, NJ, USA) (Εικ.8) και το στέλεχος *B. bassiana* που απομονώθηκε από την Αχαΐα AP0101 (Άγριο στέλεχος). Τα προϊόντα απομόνωσης διατηρήθηκαν σε τριβλία Petri σε θρεπτικό μέσο SDA (Sabouraud Dextrose Agar, Oxoid) σε θερμοκρασία 5 °C ± 1 και ανανεώνονταν κάθε μήνα.



Εικόνα 8. Απομόνωση του εμπορικού σκευάσματος Velifer (strain 5339) από προνύμφες *Trogoderma granarium* στο εργαστήριο Παραγωγικής Γεωργίας και Φυτογυείας του Τμήματος Γεωπονίας στο Πανεπιστήμιο Ιωάννινων.

2.1 Προετοιμασία του πειραματικού αγρού.

Ο πειραματικός αγρός προετοιμάστηκε για την μεταφύτευση των φυτών πεπονιάς *Cucumis melo* (Εικ. 9). Σχηματίστηκαν τέσσερις σειρές (4x8m), συμπεριλαμβανομένου του control, στις οποίες εγκαταστάθηκε ο μηχανισμός άρδευσης και έπειτα η εδαφοκάλυψη. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η μεταφύτευση των φυτών, 20 φυτά σε κάθε σειρά. Η φύτευση πραγματοποιήθηκε στα 0,80 m κατά μήκος των δύο γραμμών από κάθε τεμάχιο και οι γραμμές απέχουν μεταξύ τους 1,2 m. Ακολουθήθηκαν όλες οι απαραίτητες γεωργικές πρακτικές (άρδευση, λίπανση) και δεν έγινε περεταίρω εφαρμογή φυτοφαρμάκων. Όλα τα φυτά πεπονιού ποτίζονται καθημερινά με στάγδην άρδευση. Η λίπανση εφαρμόστηκε πριν από τη μεταφύτευση και ήταν πανομοιότυπη για όλα τα φυτά (80–100 Kgr/στρέμμα NPK 12-12-17 + 2MgO).



Εικόνα 9. Αριστερά ο πειραματικός αγρός στην Κόνιτσα. Δεξιά η προετοιμασία του πειραματικού αγρού και η μεταφύτευση των φυτών πεπονιάς.

Παρασκευάστηκαν εναιωρήματα συγκέντρωσης 10^8 κονίδια/ml για κάθε απομόνωση του EPF *B. bassiana*. Η βιωσιμότητα των κονιδίων υπολογίστηκε με βάση τον τύπο:

$$\text{Viability (\%)} = [G1 / (G1 + G2)] \times 100,$$

Όπου το G1 αναφέρεται στον αριθμό των κονιδίων που έχουν βλαστήσει, το G2 είναι ο αριθμός των μη βλαστημένων κονιδίων, ενώ το άθροισμα του G1 και G2 ισούται με 100. Έτσι, το ποσοστό βιωσιμότητας προσδιορίστηκε με τη μέτρηση συνολικά 100 κονιδίων ανά μύκητα. Στις βιοδοκιμές χρησιμοποιήθηκαν οι απομονώσεις των μυκήτων που εμφάνιζαν βιωσιμότητα $\geq 95\%$. Όσο για τις δοκιμές ελέγχου, εφαρμόστηκε διάλυμα $H_2O + \text{Tergitol NP9 } 0.05\%$. Η εφαρμογή των τριών χειρισμών και του μάρτυρα (control) ήταν τελείως τυχαία. Μόλις επιτεύχθηκε το στάδιο των τεσσάρων φύλλων, 10 mL από τα εναιωρήματα μυκήτων εφαρμόστηκαν με ριζοπότισμα στα φυτά πεπονιού.

Για να προστατέψουμε τους μικροοργανισμούς με τους οποίους έγινε ο εμβολιασμός των φυτών, από την UV-ακτινοβολία του ήλιου, τοποθετήθηκε στη βάση κάθε φυτού ένα κομμάτι από αλουμινόχαρτο για 24 ώρες, ώστε να εξασφαλιστεί η ζωτικότητα τους και να ευνοηθεί ο αποικισμός του ριζικού συστήματος (Εικ. 10).



Εικόνα 10. Ο εμβολιασμός των φυτών με εναιώρημα συγκέντρωσης 10^8 κονίδια/ml, με ριζοπότισμα και η τοποθέτηση αλουμινοχαρτου στη βάση κάθε φυτού, για την προστασία του EPF από την UV-ακτινοβολία.

Κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, εξετάζονταν ανά 15 μέρες μία σειρά από εξαρτημένες μεταβλητές, όπως ο πληθυσμός των εντόμων και η επίδραση στην ανάπτυξη των φυτών. Έγινε σχολαστική παρατήρηση του πληθυσμού των εντόμων σε κάθε φυτό, μετρώντας τον αριθμό των ατόμων των εντόμων στα φύλλα και τα άνθη. Η επίδραση των ελεγμένων ενδόφυτων στη μορφολογία και τη φυσιολογία των φυτών αξιολογήθηκε με την παρακολούθηση της ανάπτυξης, η οποία εφαρμόστηκε μετρώντας τις διαστάσεις των φυτών (x: μήκος, y: πλάτος, z: ύψος), τον αριθμό των φύλλων, των λουλουδιών και των φρούτων.

2.2 Ανίχνευση των EPF σε φύλλα του φυτού πεπονιάς

Ελήφθησαν τυχαία δείγματα φύλλων ίδιας ηλικίας από φυτά πεπονιού με τη βοήθεια αποστειρωμένου ψαλιδιού μετά το πέρας 7, 15 και 30 ημερών από την εφαρμογή των εντομοπαθογόνων μυκήτων. Τα δείγματα από τα φύλλα κόπηκαν σε κυλινδρικά κομμάτια μήκους 1cm και πάχους 0.5cm σε θάλαμο νηματικής ροής. Τα δείγματα αποστειρώθηκαν επιφανειακά με την εμβάπτισή τους σε διάλυμα 96% αιθανόλης για ένα λεπτό, στην συνέχεια σε διάλυμα 6% υποχλωριώδους νατρίου για πέντε λεπτά και τέλος πάλι σε διάλυμα 96% αιθανόλης για τριάντα δευτερόλεπτα (Mantzoukas et al., 2015).

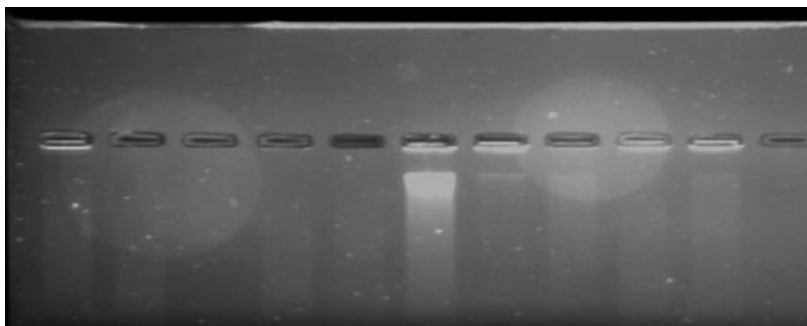
Στη συνέχεια, τα αποστειρωμένα δείγματα ιστών εντυπώθηκαν σε υπόστρωμα SDA. Οι καλλιέργειες των δειγμάτων αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα SDA στο σκοτάδι στους $25^{\circ}\text{C}\pm 2$ και σε υγρασία 80%. Ο έλεγχος της ανάπτυξης θα διαρκέσει οκτώ ημέρες. Η βλάστηση των κονιδίων των μυκήτων πάνω στους ιστούς εκτιμήθηκε με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου (40x). Ο αριθμός των φύλλων που παρουσίασαν ανάπτυξη των μυκήτων υπολογίστηκαν με το παρακάτω τύπο: Αριθμός φύλλων πεπονιού στα οποία παρουσιάστηκε μύκητας / συνολικός αριθμός δειγμάτων (φύλλων) (Rodriguez et al., 2009). Για κάθε εντομοπαθογόνο μύκητα έγιναν οκτώ επαναλήψεις, με κάθε

επανάληψη να αριθμεί οκτώ δείγματα από διάφορες περιοχές του φύλλου τα οποία τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα ανάπτυξης SDA και αναπτύχθηκαν στο σκοτάδι στους $25^{\circ}\text{C}\pm 2$ και σε υγρασία 80%.

2.3 Μοριακή Ανίχνευση των εντομοπαθογόνων μυκήτων στους ιστούς του πεπονιού.

2.3.1 Εξαγωγή ολικού γονιδιώματος των φυτών

Για την εξαγωγή του ολικού DNA εφαρμόστηκε ειδικό πρωτόκολλο εξαγωγής με τη χρήση σειράς αντιδραστηρίων NucleoSpin Plant® DNA extraction kit της εταιρείας MACHEREY – NAGEL. Αρχικά τα δείγματα από τα φύλλα πεπονιάς τεμαχίστηκαν, ομογενοποιήθηκαν με την βοήθεια υγρού αζώτου και τοποθετήθηκαν σε Eppendorf (1,5 ml). Έπειτα προστέθηκε διάλυμα κυτταρόλυσης PL1 buffer (400 μl) και ακολουθούσε επώαση για 30 λεπτά στους 65°C . Στο διάλυμα προστέθηκε ποσότητα RNάσης A (10 μl) και στη συνέχεια διάλυμα εξαγωγής (extraction buffer PC 450 μl). Ακολουθούσε φυγοκέντρηση (11.000 rpm) και το υπερκείμενο που λήφθηκε τοποθετήθηκε σε ειδικές στήλες που περιείχαν μεμβράνη πυριτίου (NucleoSpin® Plant II Column). Το DNA του φυτού προσδόθηκε στη μεμβράνη και στη συνέχεια απελευθερώθηκε από αυτή με τη βοήθεια διαλύματος κατάλληλης ιοντικής ισχύος. Η απόδοση της εξαγωγής του DNA ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγορόζης 1% 5 μl από το τελικό διάλυμα, σε διάλυμα που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο (1g/dl). Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε τάση 90 Volt για 45 min. Φωτογραφήθηκε το πήκτωμα αφού τοποθετήθηκε σε υπεριώδες φως και εκτιμήθηκε με αυτό τον τρόπο η ποσότητα και η ποιότητα του εξαγόμενου DNA (Εικ. 10).



Εικόνα 11. Φωτογραφία εξαγωγής ολικού DNA μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγορόζης και έκθεση σε υπεριώδες φως.

2.3.2 Εξαγωγή ολικού γονιδιώματος των εντομοπαθογόνων μυκήτων

Για την εξαγωγή του ολικού DNA εφαρμόστηκε ειδικό πρωτόκολλο εξαγωγής με τη χρήση σειράς αντιδραστηρίων NucleoSpin Plant® DNA extraction kit της εταιρείας MACHEREY – NAGEL. Η απομόνωση του ολικού γονιδιώματος έγιναν από 50 έως 200 mg μυκηλίου, τα οποία προηγουμένως είχαν αναμιχθεί με αιθανόλη σε Eppendorf (1,5ml) και είχαν αποθηκευτεί σε συνθήκες περιβάλλοντος. Για την κυτταρική λύση προστέθηκε άμμος (150mg) και διάλυμα κυτταρόλυσης PL1 buffer (200 μl). Στο διάλυμα προστέθηκε επίσης ποσότητα RNΑάσης A (10 μl) και ακολούθησε επώαση για 10 λεπτά στους 65°C . Στην συνέχεια προστέθηκε χλωροφόρμιο (100 μl) και αναμειχθηκε για 10 sec σε αναδευτήρα vortex. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά (20,000 rpm) και το υπερκείμενο τοποθετήθηκε σε ειδικές στήλες που περιείχαν μεμβράνη πυριτίου (NucleoSpin® Plant II Column).

2.3.3 Πολλαπλασιασμός των γονιδίων στόχων μέσω της PCR

Χρησιμοποιήθηκε το γενετικό υλικό που απομονώθηκε από τα φυτά πεπονιάς που είχαν εμβολιαστεί με τους εντομοπαθογόνους μύκητες, από τον μάρτυρα και από τα στελέχη των εντομοπαθογόνων μυκήτων, με την βοήθεια της χρήσης σειράς αντιδραστηρίων NucleoSpin Plant DNA extraction kit της εταιρείας MACHEREY – NAGEL. Το σετ εκκινητών (primers) που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση της περιοχής του μυκητιακού γονιδίου-στόχου ήταν οι ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') και ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')(Glass και Donaldson 1995).

2.3.4 Η αντίδραση της PCR

Με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) πολλαπλασιάσαμε συγκεκριμένες περιοχές των γενετικών τόπων. Οι αντιδράσεις PCR (30 L) περιλαμβάνουν 50 ng του δείγματος gDNA, 1,25 μL από κάθε ολιγονουκλεοτιδίο συγκέντρωσης 10pM, 1 μL δεσοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTP) 10 mM, 1 μL της Taq DNA πολυμεράσης (Minotech) 2 U/μL, 1,5 μL MgCl₂, και 2,5 μL από 10x PCR buffer.

Το πρωτόκολλο PCR για την ενίσχυση των τμημάτων ITS περιλαμβάνει 31 κύκλους στους 94 °C για 60 δευτερόλεπτα, στους 55 °C για 60 δευτερόλεπτα, και στους 72 °C για 90 δευτερόλεπτα, το οποίο ακολουθείται από μία τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 5 λεπτά. Τα προϊόντα της PCR διατηρούνται στους 4 °C. Η ποσότητα και η ποιότητα των προϊόντων της PCR ελέγχθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης, με χρήση 2% gel αγαρόζης με χρώση SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen), και το αποτέλεσμα οπτικοποιήθηκε με τη βοήθεια του υπεριώδους φωτός.

2.4 Εκτίμηση της φυσικής προσβολής των φυτών πεπονιάς από το ημίπτερο *A. gossypii*

Κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου του 2022, λαμβάνονταν κάθε 15 ημέρες, από τον Μάιο έως τον Σεπτέμβριο, δείγματα φύλλων από τα φυτά πεπονιάς. Συνολικά ελήφθησαν δείγματα από 80 φυτά με την μέθοδο Cluster (ομαδοποίησης). 4 ομάδες, όπου η κάθε ομάδα αποτελείτο από 20 φυτά πεπονιάς σε κάθε σημείο δειγματοληψίας. Σε κάθε δειγματοληψία, τα φύλλα που συλλέγονταν ήταν ίδιας ηλικίας και μεγέθους, από τη μέση του φυτού, με αποστειρωμένο ψαλίδι από κάθε σειρά. Η καταμέτρηση του πληθυσμού των νυμφών τρίτου-τέταρτου σταδίου της *A. gossypii* ανά φύλλο έγινε με το μάτι, με τη χρήση ενός x7 φακού Lens (optiVISOR, LightCraft, London, UK). Χρησιμοποιήσαμε την καταμέτρηση της νύμφης τρίτου σταδίου, αντί για ενήλικα άτομα και άλλες νύμφες, επειδή η αξιολόγηση της με το μάτι στο χωράφι είναι πιο πρακτική.

2.5 Στατιστική ανάλυση.

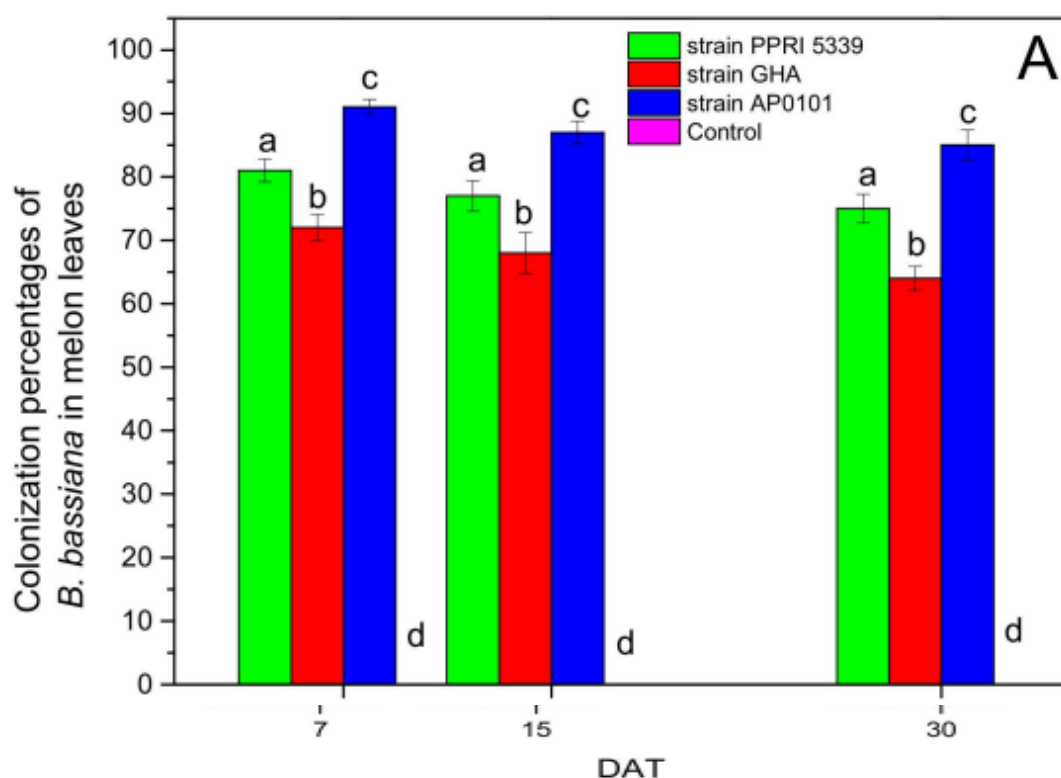
Η ανάλυση της διακύμανσης των μέσων τιμών των μορφολογικών και φυσιολογικών χαρακτηριστικών των φυτών καθώς και των πληθυσμών του εντόμου, εξετάστηκε με τη χρήση της τεχνικής της ανάλυσης της διακύμανσης ως προς τον χειρισμό και τις ημέρες (Two way Anova). Για τις μετρήσεις ανάπτυξης, του ποσοστού αποικισμού, πραγματοποιήθηκε η one-way ANOVA. Η σύγκριση των μέσων τιμών για να διαπιστωθεί αν οι διαφορές μεταξύ των υπό μελέτη παραμέτρων είναι ή όχι στατιστικά σημαντικές, έγινε με τη δοκιμή Tukey για επίπεδο σημαντικότητας P=0.05.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Απομόνωση εντομοπαθογόνου μύκητα από φύλλα πεπονιού σε υπόστρωμα SDA.

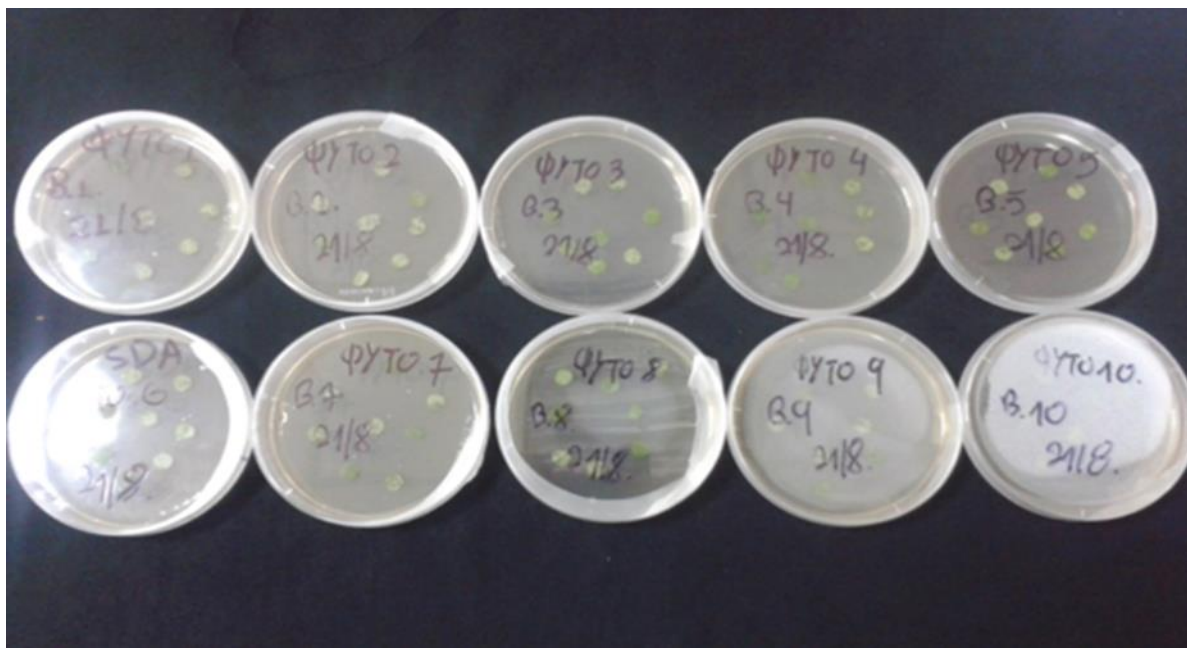
Ένα σημείο κλειδί για την επιτυχή εγκατάσταση του ενδοφυτικού βιολογικού παράγοντα είναι η ικανότητά του να αποικίζει το φυτό-ξενιστής. Έπειτα από επτά, δεκαπέντε και τριάντα ημέρες μετά τον εμβολιασμό, έγινε η αξιολόγηση των δειγμάτων από τα φύλλα που ελήφθησαν από τα φυτά πεπονιάς *Cucumis melo*, ως προς τον επιτυχή αποικισμό τους από τα τρία διαφορετικά στελέχη του *B. bassiana*. Οι φυτικοί ιστοί άρχισαν να εμφανίζουν μυκήλιο μετά το πέρας των 6 ημερών και αναπτύχθηκαν πλήρως μετά από 11 ημέρες σε θερμοκρασία 25°C±2 και σε υγρασία 80%. Μετρήθηκαν μόνο οι ιστοί που εμφάνισαν μυκήλιο. Τα πειράματα έδειξαν την ενδοφυτική ικανότητα των στελεχών *B. bassiana* στο φυτό πεπόνι (Διάγρ.1).

Μετά από τριάντα μέρες τα φύλλα πεπονιού που εμφάνισαν μυκήλιο ήταν για τον *B. bassiana* (Velifer) 75%, *B. bassiana* (GHA) 64%, *B. bassiana* (WildStrain) 85% και τέλος με τον μάρτυρα (H2O + Tergitol NP9 0.05%) 0% (Διάγρ. 1, Εικ.12). Η μελέτη για την έκφραση του γονιδίου της περιοχής ITS στα φύλλα του πεπονιού έγινε με PCR και έπειτα τα προϊόντα της PCR όλων των χειρισμών που είχαν πραγματοποιηθεί ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης. Το γονίδιο στόχος ανιχνεύτηκε στα εμβολιασμένα φυτά και δεν ανιχνεύτηκε στον μάρτυρα. Ακόμη για κάθε εφαρμογή, ακολούθησαν άλλοι δύο μεταγενέστεροι έλεγχοι αποικισμού των φύλλων του φυτού πεπονιάς για να επιβεβαιωθεί η παρουσία τους.



Διάγραμμα 1. Ο % μέσος αποικισμός των φύλλων των φυτών *C. melo* (% ± sd; n = 80 pieces/treatment). Τα εμβολιασμένα φυτά ριζοποτίστηκαν με 10ml εναιωρήματος κονιδίων του *B. bassiana* συγκέντρωσης 10⁸ κονιδία/ml στο στάδιο των τεσσάρων φύλλων, λήφθηκαν 80 δείγματα φύλλων ανά εφαρμογή, εξετάστηκαν 8 τμήματα από κάθε φύλλο, οι μέσοι όροι του ίδιου φυτού και το DAT που σημειώθηκαν

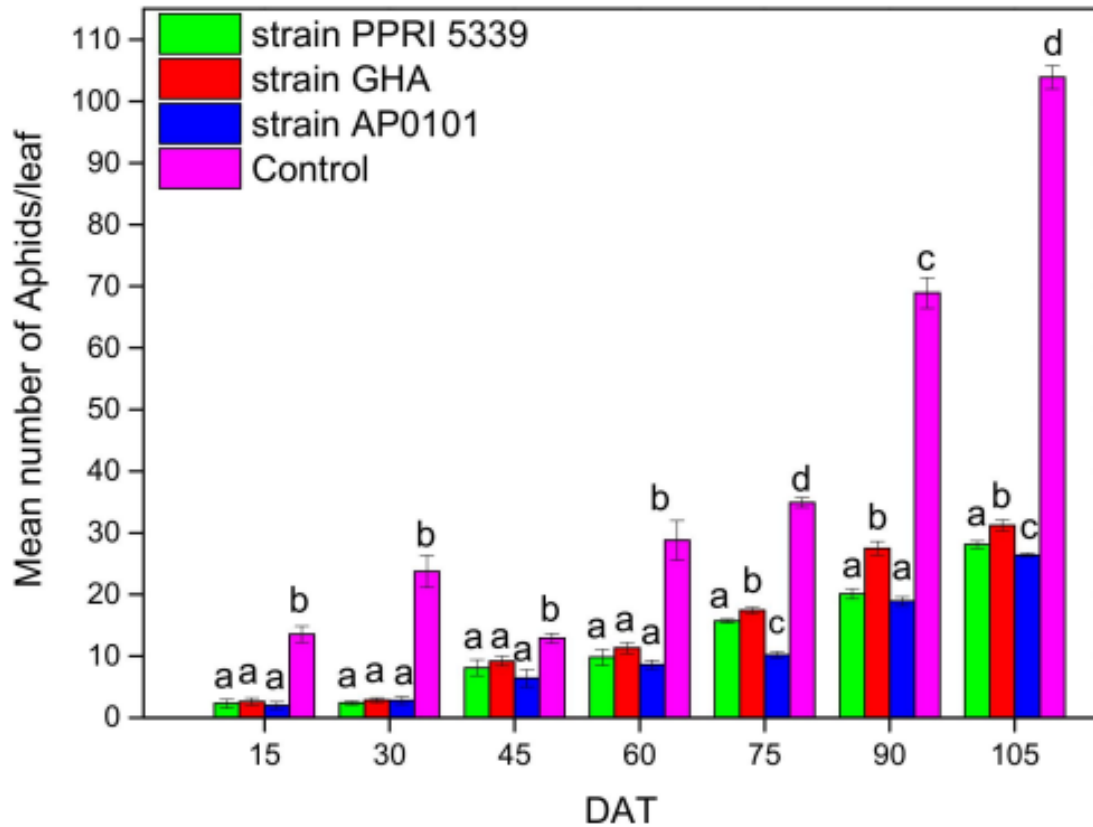
με το ίδιο γράμμα δεν διέφεραν σημαντικά (δοκιμή Tukey-Kramer, $p < 0,05$). DAT: ημέρες μετά τη θεραπεία.



Εικόνα 12. Απομόνωση εκ νέου του εντομοπαθογόνου μύκητα από αποστειρωμένα φύλλα των εμβολιασμένων φυτών σε θρεπτικό υπόστρωμα SDA στους 25 °C.

3.4 Ο πληθυσμός των αφίδων στα φυτά.

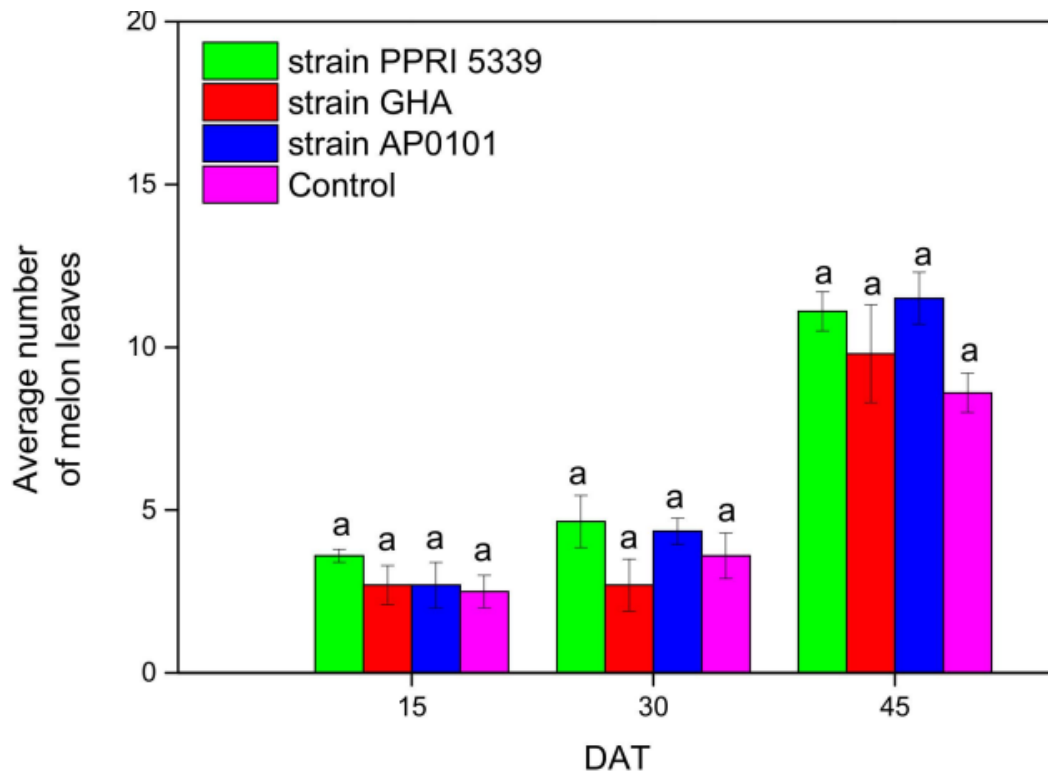
Αφού ελέγχθηκε η ικανότητα αποίκισης των φυτών πεπονιάς από τα τρία διαφορετικά στελέχη του ενδοφυτικού εντομοπαθογόνου μύκητα *Beauveria bassiana*, ακολούθησε η αξιολόγηση της ικανότητας παρασιτισμού τους από τα ημίπτερα *Aphis gossypii*. Καταγράφηκε ο μέσος πληθυσμός των νυμφών *A. gossypii* ανά εφαρμογή στην καλλιέργεια πεπονιού και αναλύθηκε στατιστικά σε σχέση με το control. Πιο συγκεκριμένα, και στις επτά δειγματοληψίες ο μέσος αριθμός των νυμφών *A. gossypii* ήταν στατιστικά σημαντικός μεταξύ των χειρισμών ($F=14.771$, $df=3.511$, $P<0.001$). Από την 1η δειγματοληψία ο μέσος αριθμός των αφίδων ήταν στατιστικά σημαντικός στα δείγματα ελέγχου σε σύγκριση με τους χειρισμούς. Όσον αφορά τη μέση μεταβολή του πληθυσμού των αφίδων ανά φύλλο κατά το τέλος του πειράματος, φαίνεται να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των χειρισμών. Μετά από 105 ημέρες, ήταν $28,1 \pm 0,6$ αφίδες για το ενδοφυτικό στέλεχος *B. bassiana* PPRI5339, $31,2 \pm 0,9$ αφίδες για το ενδοφυτικό στέλεχος *B. bassiana* GHA, $26,4 \pm 0,3$ αφίδες για τον πληθυσμό του ενδοφυτικού στελέχους *B. bassiana* APRI5339 και για το control ήταν ($H_2O + Tergitol NP9 0,05\%$) $103,9 \pm 1,9$ αφίδες (Διάγρ. 2).



Διάγραμμα 2. Ο μέσος αριθμός των νυμφών *A. gossypii* ανά εφαρμογή που εντοπίζονται στα φύλλα των φυτών *C. melo*, τα οποία έχουν εμβολιαστεί με τα ενδοφυτικά στελέχη του *B. bassiana* με 10 ml διαλύματος συγκέντρωσης 10^8 κονίδια/ml και τα φυτά ελέγχου με 10 ml H₂O + Tergitol 0.05%, σε συνθήκες πεδίου. Μετρήθηκαν μόνο οι νύμφες του 3^{ου}-4^{ου} σταδίου, κάθε σημείο μέτρησης αντιστοιχεί σε 15 ημέρες, οι μέσοι όροι της ίδιας DAT σημειώθηκαν με το ίδιο γράμμα και δεν διέφεραν σημαντικά. (Tukey-Kramer test, $p < 0.05$) (DAT=Days after Treatment).

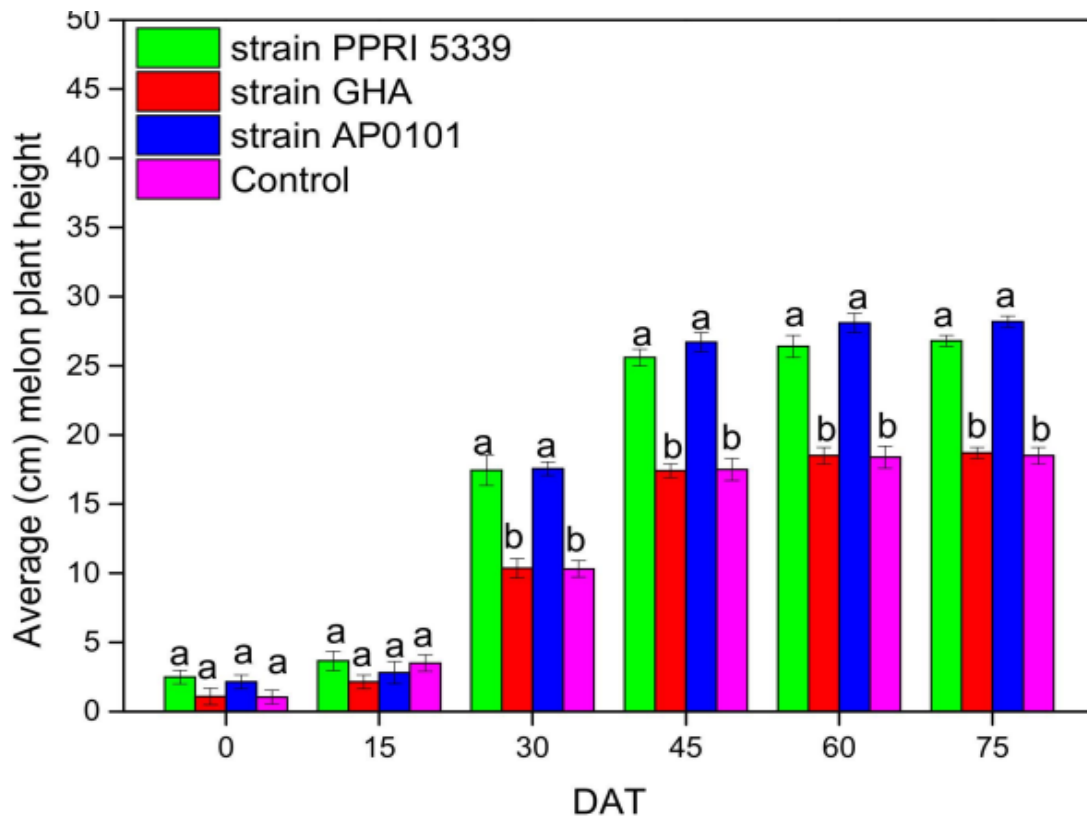
3.5 Αξιολόγηση της φυτικής ανάπτυξης.

Η αξιολόγηση των μορφολογικών και φυσιολογικών δεικτών των ελεγχόμενων φυτών βασίστηκε σε κάθετες και οριζόντιες μετρήσεις της φυτικής ανάπτυξης, του αριθμού των φύλλων, των λουλουδιών και των καρπών του *C. melo*. Τα φυτά που είχαν αποικιστεί από τον *B. bassiana* AP0101 και τον *B. bassiana* PPRI 5339, εμφάνισαν καλύτερη ανάπτυξη από τα φυτά που είχαν αποικιστεί από τον *B. Bassiana* GHA και τα φυτά ελέγχου. Τα φυτά αυτά ήταν πιο εύρωστα, με πιο πράσινο χρώμα και μεγαλύτερα σε μέγεθος, σε σύγκριση με τα φυτά των ομάδων *B. bassiana* GHA και ελέγχου, που φαινόταν πιο καταπονημένα.

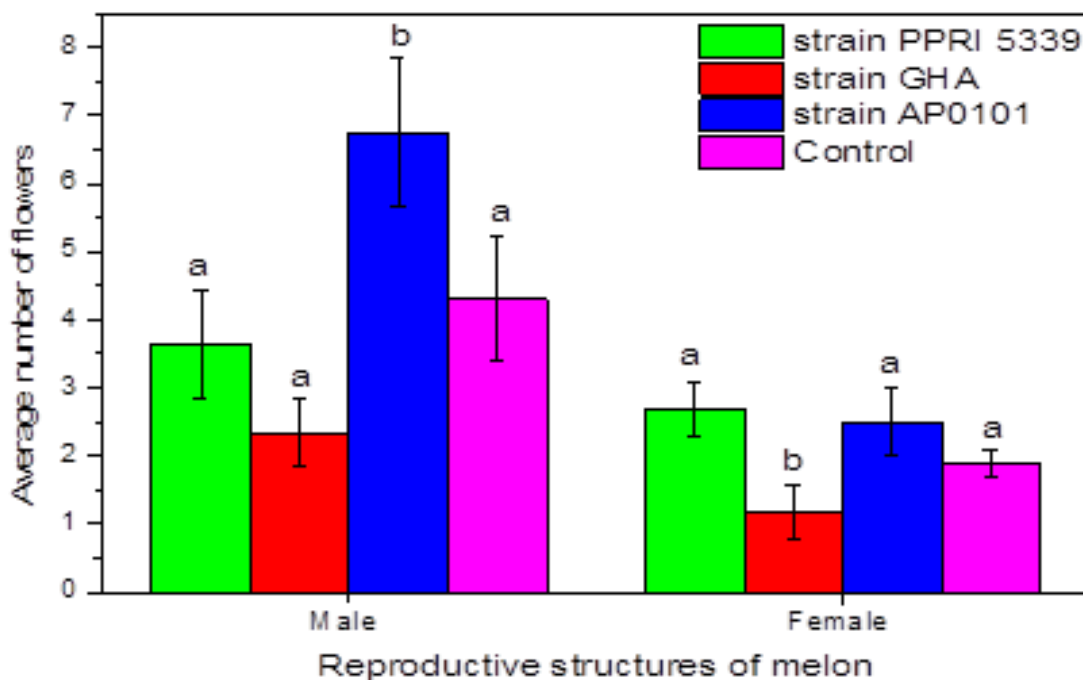


Διάγραμμα 3. Ο μέσος αριθμός των φύλλων των φυτών *C. melo* που είχαν εμβολιαστεί με 10 ml από εναιωρήματα που περιείχαν κονίδια από τα ενδοφυτικά στελέχη του *B. bassiana*, συγκέντρωσης 10^8 κονίδια/ml και τα φυτά ελέγχου με H_2O + Tergitol 0.05%, στο στάδιο του τέταρτου φύλλου, σε συνθήκες αγρού. Οι μέσοι όροι της ίδιας DAT έχουν σημειωθεί με το ίδιο γράμμα και δεν διέφεραν σημαντικά (Tukey-Kramer test, $p < 0.05$); DAT: ημέρες μετά την εφαρμογή.

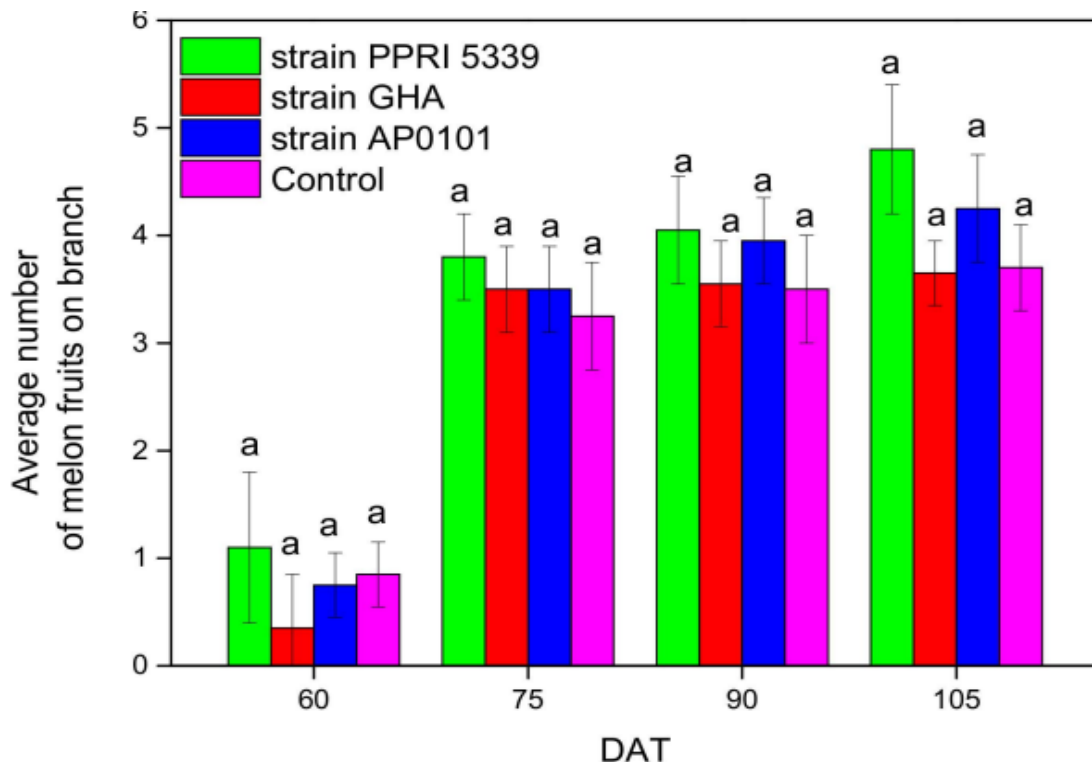
Ο αριθμός των φύλλων μετά από 45 ημέρες ήταν από $8,6 \pm 0,6$ (Control) έως $11,5 \pm 0,6$ (*B. bassiana* AP0101) χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές ($F=3,112$, $df=3,511$, $P=0,214$) (Διάγρ. 3). Το ύψος του πεπονιού μετρήθηκε από 10,5 cm (Control) έως 17,6 cm (*B. bassiana* AP0101) (Διάγραμμα 4). Από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ του ύψους των φυτών ($F=10,365$, $df=3$, $P=0,010$). Ο μέσος αριθμός των δύο διαφορετικών αναπαραγωγικών μονάδων, αρσενικών και θηλυκών, του *C. melo* καταγράφηκε ως εξής: ο αριθμός των αρσενικών λουλουδιών ανά φυτό κυμαινόταν από $2,3 \pm 0,5$ (*B. bassiana* GHA) έως $6,8 \pm 1,1$ (*B. bassiana* AP0101) και των θηλυκών λουλουδιών ανά φυτό από $1,1 \pm 0,4$ (*B. bassiana* GHA) έως $2,7 \pm 0,4$ (*B. bassiana* PPRI 5339) (Διάγρ. 5). Επίσης, στατιστικά σημαντικές διαφορές καταγράφηκαν μεταξύ των αρσενικών λουλουδιών ($F=6,766$, $df=3$, $P=0,038$) στα φυτά που εμβολιάστηκαν με τον *B. bassiana* AP0101 και των θηλυκών ανθών ($F=4,112$, $df=3$, $P=0,048$) στα φυτά που εμβολιάστηκαν με τον *B. bassiana* GHA. Επιπλέον, τα φυτά που εμβολιάστηκαν με *B. bassiana* AP0101, φάνηκε να αναπτύσσουν στατιστικά σημαντικά περισσότερα αρσενικά άνθη ($F=8,812$, $df=3,511$, $P=0,021$) (Διάγρ. 5). Τέλος, κατά την περίοδο της συγκομιδής ελήφθησαν περισσότεροι καρποί από τις ομάδες *B. bassiana* AP0101 και *B. bassiana* PPRI 5339 σε σύγκριση με τα φυτά των ομάδων *B. bassiana* GHA και Control. Ο αριθμός των καρπών ανά φυτό μετά από ένα μήνα κυμαινόταν από $3,6 \pm 0,3$ (*B. bassiana* GHA) έως $4,8 \pm 0,6$ (*B. bassiana* PPRI 5339) (Διάγρ. 6) και δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των καρπών ανά φυτό ($F=5,365$, $df=3$, $P=0,289$).



Διάγραμμα 4. Το μέσο ύψος (cm±sd) των φυτών *C. melo* που εμβολιάστηκαν, κατά το στάδιο του τέταρτου φύλλου, με τα ενδοφυτικά στελέχη των μυκήτων του *B. bassiana*, με 10ml διαλύματος συγκέντρωσης 10^8 κονιδίων/ml και τα φυτά ελέγχου με 10ml (H₂O + Tergitol 0,05%) σε συνθήκες αγρού. Οι μέσοι όροι της ίδιας DAT έχουν σημειωθεί με το ίδιο γράμμα και δεν διέφεραν σημαντικά (Tukey-Kramer test, $p < 0.05$), DAT= Days After Treatment).



Διάγραμμα 5. Ο μέσος αριθμός των αρσενικών και θηλυκών ανθέων ανά φυτό *C. melo* που εμβολιάστηκαν με τα ενδοφυτικά στελέχη μυκήτων του *B. bassiana*, με εναιώρημα συγκέντρωσης 10^8 κονιδίων/ml και των φυτών ελέγχου (H₂O + Tergitol 0,05%) σε συνθήκες αγρού. (Tukey-Kramer test, $p < 0.05$).



Διάγραμμα 6. Ο μέσος αριθμός των καρπών ανά βλαστό *C. melo* που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με τα ενδοφυτικά στελέχη μυκήτων *B. bassiana*, με 10ml εναιωρήματος συγκέντρωσης 10^8 κονιδίων/ml και των φυτών ελέγχου με 10 ml (H_2O + Tergitol 0,05%) σε συνθήκες αγρού. Οι μέσοι όροι της ίδιας DAT έχουν σημειωθεί με το ίδιο γράμμα και δεν διέφεραν σημαντικά (Tukey-Kramer test, $p < 0.05$); DAT: days after treatment – ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι κλιματικές συνθήκες της Ελλάδας είναι ιδανικές για την καλλιέργεια των φυτών πεπονιάς. Πιο συγκεκριμένα, οι γεωργοί που δραστηριοποιούνται στην περιοχή της Κόνιτσας καλλιεργούν μία συγκεκριμένη ποικιλία, την *Cucumis melo* var Moonshine. Βέβαια, οι καλλιεργητικές πρακτικές τους βασίζονται μέχρι και σήμερα σε συμβατικές μεθόδους διαχείρισης παρασίτων και λίπανσης. Η χρήση των ενδοφυτικών εντομοπαθογόνων μυκήτων (EPF), που μεταξύ των πολλών πλεονεκτημάτων που διαθέτουν, σε σύγκριση με τη χρήση των χημικών εντομοκτόνων, παίζουν ρόλο κλειδί στα προγράμματα βιώσιμης διαχείρισης των φυτικών παρασίτων (Charnley & Collins, 2007).

Ο εντομοπαθογόνος μύκητας *B. bassiana* παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον για τη γεωργία, καθώς έχει την ικανότητα να αποικίζει μια σειρά φυτικών ειδών και έχει χαρακτηριστεί για την αποτελεσματική εντομοπαθογόνο δράση του, έναντι διαφόρων παρασίτων (Jaber & Ownley, 2018). Επιπλέον μπορεί να ελέγξει αποτελεσματικά τις προσβολές από φυτοπαθογόνους μύκητες και να ενεργοποιήσει φυσιολογικούς μηχανισμούς που προάγουν την πρόσληψη θρεπτικών ουσιών και την φυτική ανάπτυξη και αυξάνουν την ανοχή στο αβιοτικό στρες και την ξηρασία (Sinno et al., 2021; Gupta et al., 2022; Quesada Moraga, 2020).

Οι αφίδες (Hemiptera: Aphididae) είναι από τα πιο καταστροφικά, για τις γεωργικές καλλιέργειες, παρασιτικά έντομα. Είναι έντομα μυζητικού χαρακτήρα και φορείς

οικονομικά σημαντικών φυτοπαθογόνων ιών, που οδηγούν σε σοβαρές απώλειες απόδοσης προσοδοφόρων καλλιεργειών (π.χ. ζαχαρότευτλα, ζαχαροκάλαμο, πατάτα και σιτάρι) (Powell et al., 2006). Ο έλεγχος των αφίδων βασίζεται κυρίως στην εφαρμογή συνθετικών φυτοφαρμάκων, συμπεριλαμβανομένων των νεονικοτινοειδών (Elbert et al., 2008). Αυτή η πρακτική όμως έχει προκαλέσει ανησυχία λόγω των δυσμενών επιπτώσεων που προκαλεί στους επικονιαστές και σε άλλους οργανισμούς μη στόχους (Goulson, 2013), στο περιβάλλον (Riedo et al., 2022), καθώς οδηγεί και στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας των αφίδων στη δραστική ουσία (Bass et al., 2014). Τα περιβαλλοντικά αυτά ζητήματα, οδήγησαν την Ευρωπαϊκή Ένωση το 2018 να περιορίσει τη χρήση των εμπορικών σκευασμάτων των νεονικοτινοειδών (όπως clothianidin, imidacloprid και thiamethoxam) (European Food Safety Authority Neonicotinoids: Risks to Bees Confirmed). Ως εκ τούτου, το ενδιαφέρον για την εφαρμογή εναλλακτικών μεθόδων ελέγχου παρασίτων στις καλλιέργειες είναι πρωταρχικής σημασίας.

Όπως προαναφέρθηκε, η ενδοφυτική ικανότητα του εντομοπαθογόνου μύκητα (EPF) δεν χρησιμεύει μόνο ως βιολογικό φυτοφάρμακο, αλλά και ως βιοδιεγέρτης προωθώντας τη φυτική και ριζική ανάπτυξη, (Behie & Bidochka, 2014) παρέχοντας θρέψη (Qui et al., 2014; Skinner et al., 2012) και αντοχή στο αβιοτικό στρες. Πολλά είδη φυτών έχει βρεθεί ότι αποικίζονται επιτυχώς από τα στελέχη του ενδοφυτικού εντομοπαθογόνου μύκητα *B. bassiana*, καθώς στο πείραμά μας και τα τρία απομονωμένα στελέχη ανιχνεύθηκαν στους φυτικούς ιστούς πεπονιού μετά από επτά, δεκαπέντε και τριάντα ημέρες από τον αρχικό εμβολιασμό (DAT). Το στέλεχος που κατέγραψε το υψηλότερο ποσοστό ενδοφυτισμού ήταν το *B. bassiana* AP0101, το οποίο ακολουθείται από το *B. bassiana* PPRI 5339 και τέλος το *B. bassiana* GHA.

Υπάρχουν λίγες διαθέσιμες αναφορές που σχετίζονται με την ενδοφυτική ικανότητα του *B. bassiana* σε φυτά πεπονιού. Ο διαφυλλικός ψεκασμός με το εναιώρημα κονιδίων οδήγησε σε 100% αποικισμό των φύλλων που ψεκάστηκαν απευθείας με τον μύκητα, αλλά μόνο 40-60% αποικισμό των μη ψεκασμένων φύλλων των ίδιων φυτών (Resquín-Romero et al., 2016; Bamisile, et al., 2018). Τα διαφορετικά ποσοστά αποικισμού των φύλλων των φυτών πεπονιάς σε σχέση με τη μελέτη μας, οφείλονται στη διαφορετική μέθοδο εμβολιασμού (το εναιώρημα κονιδίων μας εφαρμόστηκε στο έδαφος). Έχει τεκμηριωθεί καλά ότι η μέθοδος εφαρμογής αλλάζει δραστικά το επίπεδο αποικισμού (Mantzoukas & Eliopoulos, 2020). Όταν ένα άλλο μυζητικό παράσιτο, το ημίπτερο *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae), τράφηκε με φύλλα πεπονιού τα οποία είχαν αποικιστεί με τον EPF *B. bassiana*, υπέστη θνησιμότητα κατά 66,3–87,9% σε σύγκριση με τα φύλλα που δεν είχαν υποστεί επεξεργασία (Garrido-Jurado et al., 2017). Παρόμοια αποτελέσματα καταγράφηκαν επίσης σε μασητικά έντομα, τις προνύμφες του λεπιδοπτέρου *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae), όταν τράφηκαν με τα ίδια φύλλα πεπονιού (Resquín-Romero et al., 2016).

Τα ενδοφυτικά στελέχη του *B. bassiana* έχουν χαρακτηριστεί ως εξαιρετικά μολυσματικά έναντι των αφίδων, συγκεκριμένα λόγω της μείωσης του πληθυσμού, της γονιμότητας και της διατροφικής τους συμπεριφοράς, όπως των ημιπτέρων *Sitobion avenae* F. (Mahmood et al., 2019), *Aphis gossypii* Glover (Homayoonzadeh et al., 2022) (Gurulingappa et al., 2011), *Myzus persicae* Sulzer (Mantzoukas & Lagogiannis, 2019), *Aphis glycines* Matsumura (Clifton et al., 2018), *Acyrtosiphon pisum* (Harris) και

Aphis fabae Scopoli (Hemiptera: Aphididae) (Akello & Sikora, 2012). Ο αποικισμός από τον εντομοπαθογόνο μύκητα *B. bassiana* μπορεί όχι μόνο να αυξήσει τη θνησιμότητα αλλά και να αλλάξει τη συμπεριφορά σίτισης των αφίδων, όπως έχει βρεθεί για το ημίπτερο *A. gossypii* στα πεπόνια (González-Mas et al., 2019), μειώνοντας τα ποσοστά μετάδοσης ιών. Τα ενδοφυτικά στελέχη του εντομοπαθογόνου μύκητα *B. bassiana* παρουσίαζαν παρόμοια «αφιδοκτόνο» δράση στην παρούσα μελέτη σε φυτά πεπονιού (69,9–74,5% μείωση του πληθυσμού του *A. gossypii*).

Οι φυσιολογικές αλλαγές στα φυτά πυροδοτούνται όταν αποικίζονται ενδοφυτικά, όπως συμβαίνει με τη διέγερση της επαγόμενης άμυνας του φυτού που οδηγεί στην παραγωγή ιασμονικού και σαλικυλικού οξέος, τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα την απόθεση των εχθρών. Στο πείραμα πεδίου, *C. melo* – *A. gossypii*, τα φυτά που εμβολιάστηκαν με τον *B. bassiana* AP0101 εμφάνιζαν τον χαμηλότερο πληθυσμό του εντόμου και ακολουθούν τα φυτά που είχαν εμβολιαστεί με το στέλεχος *B. bassiana* PPRI 5339. Τα αποτελέσματα αυτά υπογραμμίζουν το γεγονός ότι τα δύο στελέχη που δοκιμάστηκαν είναι αναμφίβολα αποτελεσματικά, καθώς εμφάνισαν υψηλά επίπεδα ενδοφυτικής δραστηριότητας, που οδήγησαν στην προαγωγή της ανάπτυξης των φυτών και σε αυξημένη απόδοση και κατάφερε επίσης να μειώσει σημαντικά τον πληθυσμό του μυζητικού εντόμου (Jallow et al., 2008). Όσον αφορά την περίπτωση του *B. bassiana* GHA, τα αποτελέσματα δεν ήταν ανεπαρκή, καθώς ανά πάσα στιγμή ο πληθυσμός του ημιπτέρου *A. gossypii* ήταν χαμηλότερος από αυτά των φυτών ελέγχου, παρόλο που τα αποτελέσματά που προέκυψαν δεν ήταν συμβατά με τα άλλα δοκιμασμένα EPF.

Τα μυζητικά έντομα έχουν απλή δομή σώματος, τρέφονται και αναπαράγονται αποτελεσματικά, ενώ το μεγαλύτερο μέρος των προσλαμβανόμενων θρεπτικών ουσιών επενδύεται στην παραγωγή νυμφών (Ramirez-Rodriguez & Sánchez-Reña, 2016). Η μόλυνση από τα ενδόφυτα εξαρτάται από τη γενετική και περιβαλλοντική σύνθεση του πληθυσμού των εντόμων. Η οσμή ή η γεύση του φυτού-ξενιστή προέρχεται από τα θρεπτικά συστατικά και τις περιέργες ενώσεις που μετατρέπονται στα φυτοφάγα έντομα σε πολύπλοκα αισθητηριακά ερεθίσματα (Kuldau & Bacon, 2008). Αυτά τα ερεθίσματα ερμηνεύονται από το κεντρικό νευρικό σύστημα του εντόμου για να προσδιοριστεί εάν ένα συγκεκριμένο φυτό είναι κατάλληλος ξενιστής (Eastop, 1977).

Τα φυτά πεπονιάς που είχαν αποικιστεί από τους τα στελέχη του εντομοπαθογόνου μύκητα *B. bassiana* PPRI 5339 και Wild Strain είχαν διακριτές μορφολογικές και φυσιολογικές διαφορές, καθώς φαινόταν πιο εύρωστα και ανεπτυγμένα, σε αντίθεση με τα φυτά ελέγχου και τα εμβολιασμένα φυτά με το στέλεχος *B. bassiana* GHA. Όσον αφορά τους καρπούς που συγκομίστηκαν από το *C. melo*, οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές μεταξύ των εφαρμογών. Οι θετικές επιδράσεις των στελεχών του *B. bassiana* στην ανάπτυξη και την απόδοση των φυτών έχει τεκμηριωθεί καλά σε αρκετές καλλιέργειες, όπως του καφέ (Posada & Vega, 2006), του καλαμποκιού (Russo et al., 2019), της ντομάτας (Prabhukarthikeyan et al., 2014), της σόγιας (Russo et al., 2019), του κριθαριού (Veloz-Badillo et al., 2019), των κουκιών (Jaber & Enkerli, 2016), του αμπελιού (Mantzoukas et al., 2021), του καπνού (Qin et al., 2021) και του βαμβακιού (Lopez & Sword, 2015).

Έως σήμερα δεν υπήρχε διαθέσιμη αναφορά που να διερευνά την ενδοφυτική ικανότητα του εντομοπαθογόνου μύκητα *B. bassiana* GHA σε φυτά πεπονιού. Οι Donga και συνεργάτες, σε ένα πείραμα στο *Saccharum officinarum* L. ανέφεραν ότι ο εμβολιασμός με το στέλεχος *B. bassiana* GHA είχε θετική επίδραση στο ύψος του φυτού, στον αριθμό των ριζικών τριχιδίων και στο τελικό νωπό βάρος, αλλά τα αποτελέσματα δεν συγκρίθηκαν με άλλα στελέχη του *B. bassiana*. Μια πρόσφατη μελέτη για την ενδοφυτική ικανότητα του *B. bassiana* PPRI 5339 σε ριζικό σύστημα εσπεριδοειδών, ανέφερε ότι μετά από τον διαφυλλικό ψεκασμό των φυτών με το συγκεκριμένο στέλεχος, ο μύκητας απομονώθηκε εκ νέου από τις ρίζες και τα φύλλα, καθώς και από τα νεαρά αναδυόμενα φύλλα (Arnoldi et al., 2022).

Ορισμένοι EPF μπορούν ελέγξουν έμμεσα τις αφίδες και τους σχετικούς ιούς που φέρουν, μέσω της πυροδότησης της φυτικής άμυνας ISR. Έτσι, η αναγκή για τη χρήση φυτοφαρμάκων θα μειωνόταν, και ως επακόλουθο θα μειώνονταν και οι επιδράσεις τους σε οργανισμούς μη στόχους, σε οφέλημα έντομα και στο περιβάλλον (Francis et al., 2022). Ο ενδοφυτικός αποικισμός μπορεί να προκαλέσει φυσιολογικές και μορφολογικές αλλαγές στα φυτά-ξενιστές, που θα μπορούσαν να αλλάξουν την επιλογή και τη διατροφή του εντόμου (Pangesti et al., 2013; González-Mas et al., 2019).

Επίσης αξίζει να αναφερθεί ότι μπορούν να εφαρμοστούν συνδυασμοί στρατηγικών αντιμετώπισης εχθρών των φυτών, προκειμένου να ενισχυθεί η αποτελεσματικότητα των EPF. Φυσιολογικοί εχθροί όπως αρπακτικά και παράσιτα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με τον ενδοφυτικό EPF, όπως αναφέρουν οι González Mas et al., οι οποίοι ανακάλυψαν ότι η αρπακτική αποτελεσματικότητα του νευροπτέρου *Chrysoperla carnea* (Coleoptera; Chrysopidae), ως προς την αφίδα, δεν επηρεάστηκε από τον ενδοφυτισμό και επιπλέον, όταν τους δόθηκε η δυνατότητα επιλογής, προτιμούσαν τις αφίδες που είχαν τραφεί με τα φυτά που είχαν αποικιστεί με τον *B. bassiana*. Τα σκευάσματα με βάση το λάδι έχουν συμβάλει στην ανάπτυξη υγρών βιολογικών παρασκευασμάτων που περιέχουν EPF, καθώς η σύνθεσή τους ενισχύει τη διατήρηση των κονιδίων (Grijalba et al., 2018; Lopes et al., 2010). Τα σκευάσματα με βάση το λάδι έχουν δείξει θετική επίδραση με τη βελτίωση της επιβίωσης των μυκητιακών κονιδίων υπό συνθήκες αποθήκευσης (Grijalba et al., 2018; Lopes et al., 2020), ενισχύοντας τη μολυσματικότητα επιλεγμένων στελεχών EPF και ταυτόχρονα μειώνοντας την πιθανότητα εμφάνισης φυτικής βλάβης, η οποία έχει ήδη αναφερθεί στην αντιμετώπιση σημαντικών παρασίτων (Lopes et al., 2020; Vega-Aquino et al., 2010) και εφαρμόζεται στα εμπορικά σκευάσματα EPF.

Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν την αποτελεσματικότητα του εντομοπαθογόνου μύκητα *B. bassiana* στον αποικισμό των φυτών πεπονιού, ενώ προάγει την φυτική ανάπτυξη και την αντίσταση έναντι ημιπτέρου *A. gossypii*, που προκαλεί μεγάλες ζημιές στις καλλιέργειες και είναι υπεύθυνο για τη μετάδοση ιών. Αυτή η έκθεση υπογραμμίζει επίσης το γεγονός ότι οι ερευνητές και οι εταιρείες δεν πρέπει να συμβιβαστούν με τα τρέχοντα εμπορικά σκευάσματα και η έρευνα για νέα στελέχη θα πρέπει να συνεχιστεί. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματά μας, το άγριο στέλεχος του εντομοπαθογόνου μύκητα *B. bassiana* AP0101 επέδειξε μεγάλη αποτελεσματικότητα στην ικανότητα του να δρα ως ενδόφυτο, ως εντομοπαθογόνο και ως προαγωγέας της φυτικής ανάπτυξης.

Καθίσταται εμφανές ότι κατά την επόμενη δεκαετία θα αλλάξουν ριζικά οι τρόποι φυτοπροστασίας των καλλιεργειών. Αυτό αντικατοπτρίζεται ιδιαίτερα στις αποφάσεις της Ευρωπαϊκής Ένωσης στο πλαίσιο της «Πράσινης Συμφωνίας», που στοχεύει έως το 2030 την αύξηση της βιολογικής γεωργίας από 8% σε 25% και τη μείωση της χρήσης χημικών φυτοφαρμάκων κατά 50% (Fetting, 2020). Ανάμεσα σε όλες τις εναλλακτικές λύσεις για την επίτευξη των παραπάνω στόχων, η χρήση των ενδοφύτων είναι ίσως η πιο ελπιδοφόρα. Ως εκ τούτου, θα πρέπει να ενταθεί η έρευνα για την ανακάλυψη νέων στελεχών και την αξιολόγησή τους όχι μόνο στο εργαστήριο αλλά και στο πεδίο, όπως στην παρούσα μελέτη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adame-Álvarez , R., Mendiola-Soto, J., & Heil, M. (2014). Order of arrival shifts endophyte–pathogen interactions in bean from resistance induction to disease facilitation. *FEMS Microbiology Letters*, *355*(2), σσ. 100–107.
- Ahmed, A., Sa' nchez, C., & Candela, M. (2000). Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. *Eu. J. Plant Pathology*, *106*, σσ. 817-824.
- Akello , J., & Sikora, R. (2012). Systemic acropedal influence of endophyte seed treatment on *Acyrtosiphon pisum* and *Aphis fabae* offspring development and reproductive fitness. *Biol. Control*, *61*, σσ. 215–221.
- Akello, J., Dubois , T., Coyne , D., & Kyamanywab, S. (2008b). Endophytic *Beauveria bassiana* in banana (*Musa spp.*) reduces banana weevil (*Cosmopolites sordidus*) fitness and damage. *Crop Protection*, *11*, σσ. 1437-1441.
- Akello, J., Dubois, T., Coyne, D., & Kyamanywa, S. (2008a). Effect of endophytic *Beauveria bassiana* on populations of the banana weevil, *Cosmopolites sordidus*, and their damage in tissue-cultured banana plants. *Experimentalis et Applicata*, σσ. 157-165.
- Akutse , K., Fiaboe , K., Van Den Berg, J., Ekesi , S., & Maniania, N. (2014). Effects of endophyte colonization of *Vicia faba* (Fabaceae) plants on the life–history of leafminer parasitoids *Phaerotoma scabriventris* (Hymenoptera: Braconidae) and *Diglyphus isaea* (Hymenoptera: Eulophidae). *PLOS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0109965
- Alabouvette, C., Olivain, C., & Steinberg, C. (2006). Biological Control of Plant Diseases: The European Situation. *European Journal of Plant Pathology*, *114*(3), σσ. 329-341.
- Arnold , A., & Lewis, L. (2005). Ecology and evolution of fungal endophytes and their roles against insects. Στο F. Vega, & M. Blackwell, *Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution* (σσ. 74-96). Oxford University Press.
- Arnold, A., & Lewis, L. (2005). Ecology and evolution of fungal endophytes, and their roles against insects. Στο F. Vega, & M. Blachwell, *Insect-Fungal associations: Ecology and Evolution*. (σσ. 74-96). New York: Oxford Univercity Press.
- Arnoldi , M., Duren , E., Avery , P., & Rossi, L. (2022). Assessing the Endophytic Potential of a Commercially Available Entomopathogenic *Beauveria bassiana* Strain in Various Citrus Rootstocks. *Applied Microbiology*, *3*(2), σσ. 561-571.
- Augé, R. (2001). Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*, *11*, σσ. 3-42.
- Bamisile , B., Dash , C., Akutse , K., Keppanan , R., Afolabi , O., Hussain , M., . . . Wang, L. (2018). Prospects of endophytic fungal entomopathogens as biocontrol and plant growth promoting agents: An insight on how artificial inoculation methods affect endophytic colonization of host plants. *Microbiol. Res.*, *217*, σσ. 34–50.

- Bass , C., Puinean , A., Zimmer, C., Denholm, I., Field , L., Foster , S., . . . Williamson , M. (2014). The Evolution of Insecticide Resistance in the Peach Potato Aphid, *Myzus persicae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, *51*, σσ. 41–51.
- Behie, S., & Bidochka, M. (2014). Nutrient transfer in plant-fungal symbioses. *Trends in Plant Science*, *19*, σσ. 734-740.
- Behie, S., Jones, S., & Bidochka, M. (2015). Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. *Fungal Ecology*, σσ. 112-119.
- Bidochka , M., & Khachatourians , G. (1991). The implication of metabolic acids produced by *Beauveria bassiana* in pathogenesis of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *J Invertebr Pathol*, σσ. 106–117.
- Bing , L., & Lewis, L. (1992). Endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in corn: the influence of the plant growth stage and *Ostrinia nubilalis* (Hübner). *Biocontrol. Sei. Technol.*, σσ. 29-47.
- Bing , L., & Lewis, L. (1991). Suppression of *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) by endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill. *Environ. Entomol.*, σσ. 1207-1211.
- Biswas, C., Dey, P., Satpathy, S., Satya , P., & Mahapatra , B. (2013). Endophytic colonization of white jute (*Corchorus capsularis*) plants by different *Beauveria bassiana* strains for managing stem weevil (*Apion corchori*). *Phytoparasitica*, *41*, σσ. 17–21.
- Blackman , R., & Eastop , V. (2000). *Aphids on the World's Crops. An Identification And Formation Guide*. London: Second Edition. John Wiley & Sons.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, *161*(5), σσ. 839-851.
- Brotman , Y., Landau , U., Cuadros-Inostroza , A., Takayuki, T., Fernie , A., Chet , I., . . . Willmitzer , L. (2013). Trichoderma-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. *PLoS Pathog*, *4*.
- Calvo, P., Nelson, L., & Kloepper, J. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil*, *383*, σσ. 3-41.
- Carollo, C., Calil , A., Schiave, L., Guaratini, T., Roberts , D., Lopes, N., & Braga, G. (2010). Fungal tyrosine betaine, a novel secondary metabolite from conidia of entomopathogenic *Metarhizium* spp. fungi. *Fungal Biology*, *114*(5-6), σσ. 473-480.
- Chan , C., Forbes , A., & Raworth , D. (1991-3E). Aphid-transmitted viruses and their vectors of the world. *Agriculture Canada Research Branch, Tech. Bull.* , σ. 216.
- Charnley, A., & Collins, S. (2007). Entomopathogenic Fungi and Their Role in Pest Control. Στο C. Kubicek , & I. Druzhinina, *The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships* (σσ. 159-187). Berlin: Springer-Verlag.
- Cherry, A., Banito, A., Djegui, D., & Lomer, C. (2004). Suppression of the stem-borer *Sesamia calamistis* (Lepidoptera; Noctuidae) in maize following seed dressing, topical

- application and stem injection with African isolates of *Beauveria bassiana*. *International Journal of Pest Management*, 50(1), σσ. 67 - 73.
- Clark, & et al. (2006). Biological control of *Pythium myriotylum*. *Phytopathology*.
- Clifton , E., Jaronski , S., Coates , B., Hodgson , E., & Gassmann, A. (2018). Effects of endophytic entomopathogenic fungi on soybean aphid and identification of *Metarhizium* isolates from agricultural fields. *PLoS ONE*, 13.
- Cock , M., van Lenteren , J., Brodeur , J., Barratt , B., Bigler , F., Bolckmans, K., . . . Parra , J. (2010). Do new access and benefit sharing procedures under the convention on biological diversity threaten the future of biological control? *BioControl*, σσ. 199–218.
- Cock, M., van Lenteren, J., Brodeur , J., Barratt , B., Bigler, F., Bolckmans , K., . . . Parra , J. (2010). Do new access and benefit sharing procedures under the convention on biological diversity threaten the future of biological control? *BioControl*, σσ. 199–218.
- Colla, G., Roupahel, Y., Canaguier, R., Svecova, E., & Cardarelli, M. (2014). Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis. *Front. Plant Sci.*, 5, σσ. 1-6.
- Colla, G., Roupahel, Y., Di Mattia, E., El-Nakhel, C., & Cardarelli, M. (2015). Co-inoculation of *Glomus intraradices* and *Trichoderma atroviride* acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of vegetable crops. *J. Sci. Food Agric.*, 95, σσ. 1706-1715.
- Craigie, J. (2011). Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *J. Appl. Phycol.*, 23, σσ. 371-393.
- Craigie, J. (2011). Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *J. Appl. Phycol.*, 23, σσ. 371-393.
- Craigie, J., MacKinnon, S., & Walter, J. (2008). Liquid seaweed extracts identified using ¹H NMR profiles. *J. Appl. Phycol.*, 20, σσ. 665-671.
- Crump , N., Cother , E., & Ash , G. (1999). Clarifying the nomenclature in microbial weed control. *Biocontrol Sci Tech*, 9(1), σσ. 89-97.
- Culiney , T. (2014). Crop Losses to Arthropods. *Integrated Pest Management*, σσ. 201-225.
- DANNON , H., DANNON , A., DOURO-KPINDOU , O., ZINSOU , A., HOUNDETE , A., TOFFA-MEHINTO, J., . . . OLOU , B. (2020). Toward the efficient use of *Beauveria bassiana* in integrated cotton insect pest management. *Journal of Cotton Research volume*.
- Dara, S. (2019). The New Integrated Pest Management Paradigm for the Modern Age. *Journal of Integrated Pest Management*, 12(1), σσ. 1-9.
- de Bary, A. (1866). *Morphologie und Physiologie der pilze, flechten und myxomyceten*. Leipzig: Engelman.
- De Silva, N., Brooks, S., Lumyong, S., & Hyde, K. (2019). Use of endophytes as biocontrol agents. *Fungal Biology Reviews*, 33(2), σσ. 133-148.

- Deliopoulos, T., Kettlewell, P., & Hare, M. (2010). Fungal disease suppression by inorganic salts: a review. *Crop Prot.*, 29, σσ. 1059-1075.
- Dixon, A. (1998). *Aphid Ecology*. London, UK: Second Edition, Chapman and Hall.
- du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, σσ. 3-14.
- Eastop, V. (1977). Worldwide importance of aphids as virus vectors. Στο K. Harris , & K. Maramorosch, *Aphids as Virus Vectors* (σσ. 3-62). Cambridge, MA, USA: Academic Press.
- Ebert , T., & Cartwright, B. (χ.χ.). *BIOLOGY AND ECOLOGY OF APHIS GOSSYPHII GLOVER (HOMOPTERA: APHIDIDAE)*. Department of Entomology, Oklahoma State University Stillwater.
- Egamberdiyeva , D. (2009). Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat. *Acta Physiol Plant.*, 31(4), σσ. 861–4.
- Eilenberg , J., Hajek , A., & Lomer , C. (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *Biocontrol*, 46, σσ. 387–400.
- El Hadrami, A., Adam, L., El Hadrami, I., & Daayf, F. (2010). Chitosan in plant protection. *Mar. Drugs*, 8, σσ. 968-987.
- Elbert, A., Haas, M., Springer , B., Thielert , W., & Nauen , R. (2008). Applied Aspects of Neonicotinoid Uses in Crop Protection. *Pest Management Science*, 64, σσ. 1099–1105.
- Ertani, A., Schiavon, M., Muscolo, A., & Nardi, S. (2013). Alfalfa plant-derived biostimulant stimulate short-term growth of salt stressed Zea mays L. plants. *Plant Soil*, 364, σσ. 145-158.
- EUROPEAN COMMISSION. (2022). Ανάκτηση από FOOD SAFETY - IPM: https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/sustainable-use-pesticides/integrated-pest-management-ipm_en
- European Food Safety Authority *Neonicotinoids: Risks to Bees Confirmed*. . (χ.χ.). Ανάκτηση από <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/180228>
- Eyheraguibel , B., Silvestre, J., & Morard, P. (2008). Effects of humic substances derived from organic waste enhancement on the growth and mineral nutrition of maize. *Biores. Technol.*, 99, σσ. 4206-4212.
- Fetting, C. (2020). Ανάκτηση Ιανουάριος 2023, από The European Green Deal.: https://www.esdn.eu/fileadmin/ESDN_Reports/ESDN_Report_2_2020.pdf
- Food and Agriculture Organization of the United Nations . (2023). Ανάκτηση από <https://www.fao.org/pest-and-pesticide-management/ipm/integrated-pest-management/en/>
- Francis, F., Fingu-Mabola, J., & Fekih, I. (2022). Direct and Endophytic Effects of Fungal Entomopathogens for Sustainable Aphid Control: A Review. *Agriculture*, 12(12), σ. 2081.

- Fraser, R. (1979). Systemic consequences of the local lesion reaction to tobacco mosaic virus in a tobacco variety lacking the N gene for hypersensitivity. *Physiological Plant Pathology*, 14(3), σσ. 383-394.
- Garcia, J., Posadas, J., Petricari, A., & Lecuona, L. (2011). *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin promotes growth and has endophytic activity in tomato plants. *Adv. Biol. Res.*, 5, σσ. 22-27.
- Garrido-Jurado, I., Resquín-Romero, G., Amarilla, S., Ríos-Moreno, A., Carrasco, L., & Quesada-Moraga, E. (2017). Transient endophytic colonization of melon plants by entomopathogenic fungi after foliar application for the control of *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae). *Journal of Pest Science*, 90, σσ. 319–330.
- Gianinazzi, S., Gollotte, A., Binet, M.-N., van Tuinen, D., Redecker, D., & Wipf, D. (2010). Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza*, 20, σσ. 519-530.
- Gibson, & et. al. (2014). Discovering the secondary metabolite potential encoded within Entomopathogenic fungi. *Nat. Prod. Rep.*, 31, σσ. 1287-1305.
- Goettel, M., Koike, M., Kim, J., Aiuchi, D., Shinya, R., & Brodeur, J. (2008). Potential of *Lecanicillium* spp. for management of insects, nematodes and plant diseases. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(3), σσ. 256-261.
- Goettel, M., Eilenberg, J., & Glare, T. (2010). Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. Στο L. Gilbert, & S. Gill, *Insect Control: Biological and Synthetic Agents* (σσ. 387-432). London: Academic Press.
- Goettel, M., Leger, R., Rizzo, R., Staples, R., & Roberts, D. (1989). Ultrastructural localization of a cuticle degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. *J. Gen. Microbiol.*, σσ. 2233-2239.
- Gómez-Vidal, S., Salinas, J., Tena, M., & Lopez-Llorca, L. (2009). Proteomic analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) responses to endophytic colonization by entomopathogenic fungi. *Electrophoresis*, 30(17), σσ. 2996-3005.
- González-Mas, N., Sánchez-Ortiz, A., Valverde-García, P., & Quesada-Moraga, E. (2019). Effects of Endophytic Entomopathogenic Ascomycetes on the Life-History Traits of *Aphis gossypii* Glover and Its Interactions with Melon Plants. *Insects*, 10(6), σ. 165.
- Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R., Gowda, C., & Krishnamurthy, L. (2015). Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech.*, 5(4), σσ. 355–77.
- Goulson, D. (2013). An Overview of the Environmental Risks Posed by Neonicotinoid Insecticides. *J. Appl. Ecol.*, 50, σσ. 977–987.
- Griffin, M. (2007). *Beauveria bassiana*, A Cotton Endophyte With Biocontrol Activity Against Seedling Disease. Knoxville: University of Tennessee .
- Grove, J., & Pople, M. (1980). The insecticidal activity of beauvericin and the enniatin complex. *Mycopathology*, σσ. 103–105.

- Gupta , R., Keppanan , R., Leibman-Markus , M., Rav-David, D., Elad , Y., Ment , D., & Bar, M. (2022). The entomopathogenic fungi *Metarhizium brunneum* and *Beauveria bassiana* promote systemic immunity and confer resistance to a broad range of pests and pathogens in tomato. *Phytopathology*, *112*, σσ. 784–793.
- Gurulingappa , P., McGee , P., & Sword , G. (2011). Endophytic *Lecanicillium lecanii* and *Beauveria bassiana* reduce the survival and fecundity of *Aphis gossypii* following contact with conidia and secondary metabolites. *Crop Prot.*, *30*, σσ. 349–353.
- Gurulingappa , P., Sword, G., Murdoch, G., & McGee, P. (2010). Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when in planta. *Biological Control*, *55*(1), σσ. 34-41.
- Gurulingappa, P., McGee, P., & Sword, G. (2011). Endophytic *Lecanicillium lecanii* and *Beauveria bassiana* reduce the survival and fecundity of *Aphis gossypii* following contact with conidia and secondary metabolites. *Crop protection*, *3*(30), σσ. 349-353.
- Gurulingappa, P., Sword, G., Murdoch, G., & McGee, P. (2010). Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when in planta. *Biological control*, *1*, σσ. 34-41.
- Hadwiger, L. (2013). Multiple effects of chitosan on plant systems: Solid science or hype. *Plant Sci.*, *208*, σσ. 42-49.
- Hajek, A., & Leger, R. (1994). Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology*, σσ. 293-322.
- Halouane , F. (2008). Basic research on the entomopathogen *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (Ascomycota: Hypocreales): bioecology, production and application on *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) and *Locusta migratoria* (Linné, 1758) (Orthoptera, Acrididae).
- Halpern, M., Bar-Tal, A., Ofek , M., Minz , D., Muller , T., & Yermiyahu, U. (2015). The use of biostimulants for enhancing nutrient uptake. *Advances in Agronomy*, σσ. 141-174.
- Halpern, M., Bar-Tal, A., Ofek, M., Minz, D., Muller, T., & Yermiyahu, U. (2015). The use of biostimulants for enhancing nutrient uptake. *Advances in Agronomy*, *129*, σσ. 141-174.
- Hamel, C., & Plenchette, C. (2007). Mycorrhizae in Crop Production. *The Haworth Press Inc.*
- Harrier, L., & Watson, C. (2004). The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the bioprotection of plants against soil-borne pathogens in organic and/or other sustainable farming systems. *Pest Manage. Sci.*, *60*, σσ. 149-157.
- Hartley , S., Eschen, R., Horwood, J., Gange, A., & Hill, E. (2015). Infection by a foliar endophyte elicits novel arabidopside-based plant defence reactions in its host, *Cirsium arvense*. *New Phytologist*, *205*(2), σσ. 816-827.
- Holder , D., Kirkland , B., Lewis , M., & Keyhani , N. (2007). Surface characteristics of the entomopathogenic Fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana*. *Microbiology*, σσ. 3448–3457.

- Homayoonzadeh , M., Esmaeily, M., Talebi , K., Allahyarm , H., Reitz , S., & Michaud, J. (2022). Inoculation of cucumber plants with *Beauveria bassiana* enhances resistance to *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) and increases aphid susceptibility to pirimicarb. *Eur. J. Entomol.*, *119*, σσ. 1–11.
- Horsfall , J., & Cowling, E. (1978). Pathometry: the measurement of plant disease. Στο J. Horsfall, & E. Cowling, *How Disease Develops in Populations* (σσ. 124-134). Academic Press, INC.
- Horsfall, J., & Barratt, R. (1945). An Improved Grading System for Measuring Plant Diseases. *Phytopathology*, *35*, σ. 655.
- Hynes , R., & Boyetchko , S. (2006). Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. *Soil Biology and Biochemistry*, *38*(4), σσ. 845-849.
- Imoulan, A., Hussain , M., Kirk, P., Meziane, A., & Yao, Y.-J. (2017). Entomopathogenic fungus *Beauveria*: Host specificity, ecology and significance of morpho-molecular characterization in accurate taxonomic classification. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, *4*, σσ. 1204-1212.
- Iriti, M., Picchi, V., Rossoni, M., Gomarasca, S., Ludwig, N., Gargano, M., & Faoro, F. (2009). Chitosan antitranspirant activity is due to abscisic acid-dependent stomatal closure. *Environ. Exp. Bot.*, *66*, σσ. 493-500.
- Jaber , L., & Ownley, B. (2017). Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological. *Biological Control*.
- Jaber, L. (2015). Grapevine leaf tissue colonization by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* s.l. and its effect against downy mildew. *BioControl*, *60*, σσ. 103–112.
- Jaber, L., & Enkerli, J. (2016). Effect of seed treatment duration on growth and colonization of *Vicia faba* by endophytic *Beauveria bassiana* and *Metarhizium brunneum*. *Biol. Control*, *103*, σσ. 187–195.
- Jaber, L., & Enkerli, J. (2017). Fungal entomopathogens as endophytes: can they promote plant growth? *Biocontrol Science and Technology*, *27*(1), σσ. 28-41.
- Jaber, L., & Ownley, B. (2018). Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? *Biological Control*.
- Jaber, L., & Salem, N. (2014). Endophytic colonisation of squash by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) for managing Zucchini yellow mosaic virus in cucurbits. *Biocontrol Science and Technology*, *24*(10), σσ. 1096-1109.
- Jallow , M., Dugassa-Gobena , D., & Vidal, S. (2008). Influence of an endophytic fungus on host plant selection by a polyphagous moth via volatile spectrum changes. *Arthropod. Plant. Interact.*, *2*, σσ. 53–62.
- Jindo, K., Martim, S., Navarro, E., Aguiar, N., & Canellas, L. (2012). Root growth promotion by humic acids from composted and non-composted urban organic wastes. *Plant Soil*, *353*, σσ. 209-220.

- Jirakkakul, J., Cheevadhanarak, S., Punya, J., Chutrakul, C., Senachac, J., Buajarern, T., . . . Amnuaykanjanasin, A. (2015). Tenellin acts as an iron chelator to prevent iron-generated reactive oxygen species toxicity in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters*, *362*(2), σσ. 1–8.
- Johnson, D., & Gilbert, L. (2015). Interplant signalling through hyphal networks. *New Phytol.*, *205*, σσ. 1448-1453.
- Kanaoka, M., Isoga, A., Murakoshi, S., Ichinoe, M., Suzuki, A., & Tamura, S. (1978). Bassianolide, a new insecticidal cyclodepsipeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*. *Agric Biol Chem*, σσ. 629–635.
- Katiyar, D., Hemantaranjan, A., & Singh, B. (2015). Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review. *Indian J. Plant Physiol.*, *20*, σσ. 1-9.
- Kauffman, G., Kneivel, D., & Watschke, T. (2007). Effects of a biostimulant on the heat tolerance associated with photosynthetic capacity, membrane thermostability, and polyphenol production of perennial ryegrass. *Crop Sci.*, *47*, σσ. 261-267.
- Kaushal, M., & Wani, S. (2015). Plant-growth-promoting rhizobacteria: drought stress alleviators to ameliorate crop production in drylands. *Ann Microbiol.*, *66*(1), σσ. 35–42.
- Khan, A., Hamayun, M., Khan, S., Kang, S., Shinwari, Z., Kamran, M., . . . Lee, I.-J. (2012). Pure culture of *Metarhizium anisopliae* LHL07 reprograms soybean to higher growth and mitigates salt stress. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*, σσ. 1483–1494.
- Khan, W., Rayirath, U., Subramanian, S., Jitheesh, M., Rayorath, P., Hodges, D., . . . Prithiviraj, B. (2009). Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *J. Plant Growth Regul.*, *28*, σσ. 386-399.
- Koul, O., & Cuperus, G. (2007). Ecologically based integrated pest management: present concept and new solutions. Στο O. Koul, G. Cuperus, & E. Norman, *Ecologically based integrated pest management*. (σσ. 1-17). Wallingford: CABI.
- Koul, O., Cuperus, G., & Elliott, N. (2008). *Areawide pest management: theory and implementation*. Oxfordshire: CABI.
- Krasnoff, S., Keresztes, I., Donzelli, B., & Gibson, D. (2012). Metachelins, Mannosylated and N-Oxidized Coprogen-Type Siderophores from *Metarhizium robertsii*. *J. Nat. Prod.*, *77*(7), σσ. 1685–1692.
- Kuldau, G., & Bacon, C. (2008). Clavicipitaceous endophytes: Their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses. *Biological Control*, *46*(1), σσ. 57-71.
- Kumar, D., & Kalita, P. (2017). Reducing postharvest losses during storage of grain crops to strengthen food security in developing countries. *Foods*, *1*, σ. 8.
- Lacey, L., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D., Frutos, R., Brownbridge, M., & Goettel, M. (2015). Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, *132*, σσ. 1-41.

- Lacey, L., Frutos, R., Kaya, H., & Vail, P. (2001). Insect Pathogens as Biological Control Agents. *Biological Control*, σσ. 230-248.
- Larran, S., Monaco, C., & Alippi, H. (2001). Endophytic fungi in leaves of *Lycopersicon esculentum* Mill. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, σσ. 181-184.
- Larran, S., Perello, A., Simon, M., & Moreno, V. (2002). Isolation and analysis of endophytic microorganisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, σσ. 683-686.
- Leckie, B., Ownley, B., Pereira, R., Klingeman, W., & Jones, C. (2008). Mycelia and spent fermentation broth of *Beauveria bassiana* incorporated into synthetic diets affect mortality, growth and development of larval *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biocontrol Science and Technology*, 18(7), σσ. 697-710.
- Leclant, F., & Deguine, J. (1994). Aphids (Hemiptera: Aphididae). Στο G. Matthew, & J. Tunstall, *Insect pests of cotton*. (σσ. 285–323). Wallingford: CAB International.
- Lee, S., Nakajima, I., Ihara, F., Kinoshita, H., & Nihira, T. (2005). Cultivation of Entomopathogenic Fungi for the Search of Antibacterial Compounds. *Mycopathologia*, 160, σσ. 321-325.
- Lees, A. (1966). The control of polymorphism in aphids. *Advanced Insect Physiology*, 3, σσ. 207-277.
- Lobenstein, G. (1972). Localization and induced resistance in virus-infected plants. *Annual Rev. Phytopathology*, 10, σσ. 177-206.
- Lopez, D., & Sword, G. (2015). The endophytic fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Purpureocillium lilacinum* enhance the growth of cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*) and negatively affect survival of the cotton bollworm (*Helicoverpa zea*). *Biological Control*, 89, σσ. 53-60.
- Lord, J. (2005). From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control. *Journal of Invertebr. Pathol.*, σσ. 19-29.
- Lorito, M., Farkas, V., Rebuffat, S., Bodo, B., & Kubice, C. (1996). Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *Journal of Bacteriology*, 178(21), σσ. 6382-6385.
- Mahmood, Z., Steenberg, T., Mahmood, K., Labouriau, R., & Kristensen, M. (2019). Endophytic *Beauveria bassiana* in maize affects survival and fecundity of the aphid *Sitobion avenae*. *Biol. Control*, 137, σ. 104017.
- Mantzoukas, S., & Eliopoulos, P. (2020). Endophytic entomopathogenic fungi: A valuable biological control tool against plant pests. *Appl. Sci.*, 10, σ. 360.
- Mantzoukas, S., Lagogiannis, I., Mpousia, D., Ntoukas, A., Karmakolia, K., Eliopoulos, P., & Poulas, K. (2021). *Beauveria bassiana* Endophytic Strain as Plant Growth Promoter: The Case of the Grape Vine *Vitis vinifera*. *J. Fungi*, 7, σ. 142.
- Mantzoukas, S., & et al. (2015). Effects of three endophytic entomopathogens on sweetsorghum and on the larvae of the stalk borer *Sesamionagrioides*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 154, σσ. 78-87.

- Mantzoukas, S., & Lagogiannis, I. (2019). Endophytic Colonization of Pepper (*Capsicum annuum*) Controls Aphids (*Myzus persicae* Sulzer). *Applied science*, 9(11), σ. 2239.
- Mascarin, G., & Jaronski, S. (2016). The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* volume.
- Mascarin, G., Jackson, M., Kobori, N., Behle, R., & Delalibera, I. (2015a). Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. *Journal of Invertebr. Pathol.*, σσ. 11–20.
- McKinnon, A., Saari, S., Moran-Diez, M., Meyling, N., Raad, M., & Glare, T. (2017). *Beauveria bassiana* as an endophyte: a critical review on associated methodology and biocontrol potential. *BioControl*, σσ. 1–17.
- Mendes, R., Kruijt, M., De Bruijn, I., Dekkers, E., van Der Voort, M., Schneider, J., . . . Raaijmakers, J. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, σσ. 1097–1100.
- Mukherjee, P., Horwitz, B., Herrera-estrella, A., Schmoll, M., & Kenerley, C. (2012). *Trichoderma* research in the genome era. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 51, σσ. 105-129.
- Nicolás, C., Hermosa, R., Rubio, B., Mukherjee, P., & Monte, E. (2014). *Trichoderma* genes in plants for stress tolerance-status and prospects. *Plant Sci.*, 228, σσ. 71-78.
- Olivares, F., Aguiar, N., Rosa, R., & Canellas, L. (2015). Substrate biofortification in combination with foliar sprays of plant growth promoting bacteria and humic substances boosts production of organic tomatoes. *Sci. Hortic.*, 183, σσ. 100-108.
- Omkar, K. (2016). *Ecofriendly Pest Management for Food Security*. Academic Press: Cambridge.
- Ownley, B., Griffin, M., Klingeman, W., Gwinn, K., Moulton, J., & Pereira, R. (2008). *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. *Journal of Invertebrate Pathology*, 3, σσ. 267-270.
- Ownley, B., Pereira, R., Klingeman, W., Quigley, N., & Leckie, B. (2004). *Beauveria bassiana*, a Dual Purpose Dordrecht Biocontrol Organism, with Activity Against Insect Pests and Plant Pathogens. *Emerging Concepts in Plant Health Management*, σσ. 225-269.
- Ownley, B., Gwinn, K., & Vega, F. (2010). Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl*, 55, σσ. 113–128.
- Pangesti, N., Pineda, A., Pieterse, C., Dicke, M., & van Loon, J. (2013). Two-way plant-mediated interactions between root-associated microbes and insects: from ecology to mechanisms. *Front. Plant Sci.*
- Parnell, J., Berka, R., Young, H., Sturino, J., Kang, Y., Barnhart, D., & DiLeo, M. (2016). From the lab to the farm: an industrial perspective of plant beneficial microorganisms. *Front Plant Science*, σ. 1110. doi:10.3389/fpls.2016.01110
- Paul, D., & Lade, H. (2014). Plant-growth-promoting rhizobacteria to improve crop growth in saline soils: a review. *Agron Sustain Dev.*, 34(4), σσ. 737–52.

- Pedrini, N., Crespo, R., & Juárez, M. (2007). Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comp. Biochem. Physiol.*, *σσ*. 124-137.
- Pedrini, N., Ortiz-Urquiza, A., Huarte-Bonnet, C., Zhang, S., & Keyhani, N. (2013). Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction. *Front. Microbiol.*, *σ*. 24.
- Petrini, O. (1991). Fungal Endophytes of Tree Leaves. *Microbial Ecology of Leaves*, *σσ*. 179-197.
- Pieterse, C., Zamioudis, C., Berendsen, R., Weller, D., Van Wees, S., & Bakker, P. (2014). Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annual Review of Phytopathology*, *52*, *σσ*. 347-375.
- Pilon-Smits, E., Quinn, C., Tapken, W., Malagoli, M., & Schiavon, M. (2009). Physiological functions of beneficial elements. *Curr. Opin. Plant Biol.*, *12*, *σσ*. 267-274.
- Pocasangre, L., Sikora, R., Vilich, V., & Schust, R. (2000). Survey of banana endophytic fungi from Central America and screening for biological control of the burrowing
- Posada, F., & Vega, F. (2006). Inoculation and colonization of coffee seedlings (*Coffea arabica* L.) with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Mycoscience*, *47*, *σσ*. 284–289.
- Posada, F., & Vega, F. (2005). Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota : Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*). *Mycologia*, *σσ*. 1195-1200.
- Powell, G., Tosh, C., & Hardie, J. (2006). Host Plant Selection by Aphids: Behavioral, Evolutionary, and Applied Perspectives. *Annu. Rev. Entomol.*, *51*, *σσ*. 309–330.
- Prabhukarthikeyan, R., Saravanakumar, D., & Raguchannder, T. (2014). *Pest Manag. Sci.*, *70*, *σσ*. 1742–1750.
- Qin, X., Zhao, X., Huang, S., Deng, J., Li, X., Luo, Z., & Zhang, Y. (2021). Pest management via endophytic colonization of tobacco seedlings by the insect fungal pathogen *Beauveria bassiana*. *Pest Manag. Sci.*, *77*, *σσ*. 2007–2018.
- Quesada Moraga, E. (2020). Entomopathogenic fungi as endophytes: Their broader contribution to IPM and crop production. *Biocontrol Sci. Technol.*, *30*, *σσ*. 864–877.
- Quesada-Moraga, E., & Vey, A. (2004). Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Mycol Res*, *σσ*. 441–452.
- Quesada-Moraga, E., Landa, B., Muñoz-Ledesma, J., Jiménez-Díaz, R., & Santiago-Alvarez, C. (2006). Endophytic colonisation of opium poppy, *Papaver somniferum*, by an entomopathogenic *Beauveria bassiana* strain. *Mycopathologia*, *σσ*. 323-329.
- Quesada-Moraga, E., Muñoz-Ledesma, F., & Santiago-Álvarez, C. (2009). Systemic Protection of *Papaver somniferum* L. Against *Iraella luteipes* (Hymenoptera: Cynipidae) by an Endophytic Strain of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Environmental Entomology*, *38*(3), *σσ*. 723-730.

- Ramirez-Rodriguez , D., & Sánchez-Peña, S. (2016). Endophytic *Beauveria bassiana* in *Zea mays*: Pathogenicity against Larvae of Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Southwest. Entomol*, *41*, σσ. 875–878.
- Resquín-Romero , G., Garrido-Jurado , I., Delso , C., Ríos-Moreno, A., & Quesada-Moraga, E. (2016). Transient endophytic colonizations of plants improve the outcome of foliar applications of mycoinsecticides against chewing insects. *Journal of Invertebrate Pathology*, *136*, σσ. 23-31.
- Riedo, J., Herzog , C., Banerjee, S., Fenner, K., Walder , F., Van Der Heijden , M., & Bucheli, T. (2022). Concerted Evaluation of Pesticides in Soils of Extensive Grassland Sites and Organic and Conventional Vegetable Fields Facilitates the Identification of Major Input Processes. *Environ. Sci. Technol.*, *56*, σσ. 13686–13695.
- Rodriguez , R., White Jr , J., Arnold , A., & Redman, R. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles: Tansley review. *New Phytol.*, σσ. 314-330.
- Rose, M., Patti, A., Little, K., Brown, A., Jackson, W., & Cavagnaro, T. (2014). A meta-analysis and review of plant-growth response to humic substances: practical implications for agriculture. *Advances in Agronomy*, *124*, σσ. 37-89.
- Russo , M., Pelizza , S., Vianna, M., Allegrucci , N., Cabello , M., Toledo, A., . . . Scorsetti, A. (2019). Effect of endophytic entomopathogenic fungi on soybean *Glycine max* (L.) Merr. growth and yield. *J. King Saud Univ. Sci.*, *31*, σσ. 728–736.
- Russo , M., Scorsetti , A., Vianna , M., Cabello , M., Ferreri , N., & Pelizza, S. (2019). Endophytic effects of *Beauveria bassiana* on corn (*Zea mays*) and its herbivore, *Rachiplusia nu* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insects*, *10*, σ. 110.
- Saikkonen , K., Wäli , P., Helander , M., & Faeth , S. (2004). Evolution of endophyte–plant symbioses. *Trends Plant Sci.*, σσ. 275–280.
- Saikkonen , K., Faeth , S., Helander, M., & Sullivan, T. (1998). Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, σσ. 319-343.
- Sánchez-Rodríguez, A., Del Campillo, M., & Quesada-Moraga, E. (2015). *Beauveria bassiana*: An entomopathogenic fungus alleviates Fe chlorosis symptoms in plants grown on calcareous substrates. *Scientia Horticulturae*, *197*(14), σσ. 193-202.
- Sandhya , V., Ali , A., Grover , M., Reddy , G., & Venkateswarl, B. (2009). Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. *Biol Fertil Soils.*, *46*(1), σσ. 17–26.
- Sarwar , M. (2005). Biopesticides: an effective and environmental friendly insect-pests inhibitor line of action. *International Journal of Engineering and Advanced Technology*, *2*, σσ. 10–15.
- Sasan , & Bidochka, . (2012). The insect pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *American Journal of Botany*, *99*(1), σσ. 101-107.

- Sasan, R., & Bidochka, M. (2013). Antagonism of the endophytic insect pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* against the bean plant pathogen *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *35*(3), σσ. 288-293.
- Schiavon, M., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vaccaro, S., Francioso, O., & Nardi, S. (2010). High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid metabolism in maize (*Zea mays* L.). *J. Chem. Ecol.*, *36*, σσ. 662-669.
- Schulz, B., & Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological Research*, *109*(6), σσ. 661-686.
- Seiber, J., Coats, J., Duke, S., & Gross, A. (2014). Biopesticides: state of the art and future opportunities. *J. Agric. Food Chem.*, σσ. 11613-11619.
- Selvakumar, G., Joshi, P., Mishra, P., Bisht, J., & Gupta, H. (2009). Mountain aspects influence the genetic clustering of psychrotolerant phosphate solubilizing Pseudomonads in the Uttarkhand Himalayas. *Curr Microbiol.*, *59*, σσ. 432-8.
- Shah, P., & Pell, J. (2003). Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology volume*, σσ. 413-423.
- Shoresh, M., Harman, G., & Mastouri, F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu. Rev. Phytopathol.*, *48*, σσ. 21-43.
- Shrivastava, G., Ownley, B., Augé, R., Toler, H., Dee, M., Vu, A., . . . Chen, F. (2015). Colonization by arbuscular mycorrhizal and endophytic fungi enhanced terpene production in tomato plants and their defense against a herbivorous insect. *Symbiosis*, *65*, σσ. 65-74.
- Siddiqui, Z., Akhtar, M., & Futai, K. (2008). *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*. Springer.
- Simard, S., Beiler, K., Bingham, M., Deslippe, J., Philip, L., & Teste, F. (2012). Mycorrhizal networks: mechanisms, ecology and modelling. *Fungal Biol. Rev.*, *26*, σσ. 39-60.
- Singh, A., Bhardwaj, R., & Singh, I. (2019). Biocontrol Agents: Potential of Biopesticides for Integrated Pest Management. Στο B. Giri, R. Prasad, Q.-S. Wu, & A. Varma, *Biofertilizers for Sustainable Agriculture and Environment* (Τόμ. 55, σσ. 413-433).
- Sinno, J. M., Ranesi, M., Di Lelio, I., Iacomino, G., & al., e. (2021). Selection of endophytic *Beauveria bassiana* as a dual biocontrol agent of tomato pathogens and pests. *Pathogens*, *10*, σ. 1242.
- Steyaert, J., Ridgway, H., Elad, Y., & Stewart, A. (2003). Genetic basis of mycoparasitism: A mechanism of biological control by species of *Trichoderma*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, *31*(4), σσ. 281-291.
- Sung, J., Lee, J.-O., Humber, R., & et al. (2006). *Cordyceps bassiana* and production of stromata in vitro showing *Beauveria* anamorph in Korea. *Mycobiology*, *1*, σσ. 1-6.
- Tsitsipis, J., Lykouressis, D., Katis, N., Avgelis, A., Gargalianou, J., Papapanayotou, A., & Kokinis, G. (1997). Aphid species diversity demonstrated by suction trap captures in different areas in Greece. . In *Proceedings of Sixth International Symposium of Aphids, "Aphids in natural and managed ecosystems"*. Leon, Spain.

- Ullah , F., Gul , H., Desneux, N., Gao , X., & Song, D. (2019). Imidacloprid-induced hormesis effects on demographic traits of the melon aphid, *Aphis gossypii*. *Entomologia Generalis*, *10*, σσ. 1-13.
- Upadhyay, S., Singh , D., & Saikia, R. (2009). Genetic diversity of plant growth promoting rhizobacteria from rhizospheric soil of wheat under saline conditions. *Curr Microbiol.*, *59*(5), σσ. 489–96.
- Valero-Jiménez, C., Wieggers, H., Zwaan, B., Koenraadt, C., & Van Kan, J. (2016). Genes involved in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.*, σσ. 41-49.
- van der Heijden, M., Van Der Streitwolf-enge, R., Riedl, R., Siegrist, S., Neudecker, A., Boller, T., . . . Sanders, I. (2004). The mycorrhizal contribution to plant productivity, plant nutrition and soil structure in experimental grassland. *New Phytol.*, *172*, σσ. 739-752.
- van Lenteren, J. (2012). The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. *BioControl*, σσ. 1-20.
- Van Oosten, M., Pepe, O., De Pascale, S., Silletti , S., & Maggio, A. (2017). The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*.
- Vega, F. (2008). Insect pathology and fungal endophytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, *3*, σσ. 277-279.
- Vega, F. (2018). The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review. *Mycologia*, *1*, σσ. 4-30.
- Vega, F., & et al. (2009). Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology*, *2*(4), σσ. 149-159.
- Veloz-Badillo , G., Riveros-Ramírez , J., Angel-Cuapio , A., Arce-Cervantes , O., Flores-Chávez, B., Espitia-López, J., . . . Garza-López, P. (2019). The endophytic capacity of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* caused inherent physiological response in two barley (*Hordeum vulgare*) varieties. *3 Biotech*, *9*, σ. 12.
- Vos , C., De Cremer , K., Cammue , B., & De Coninck , B. (2015). The toolbox of spp. in the biocontrol of disease. *Mol Plant Pathol*, *4*, σσ. 400–412.
- Vranova , V., Rejsek, K., Skene, K., & Formanek, P. (2011). Non-protein amino acids: plant, soil and ecosystem interactions. *Plant Soil*, *342*, σσ. 31-48.
- Waage , J., & Greathead , D. (1988). Biological control: challenges and opportunities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, σσ. 111–128.
- Wagner , B., & Lewis, L. (2000). Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applications of Environmental Microbiology*, σσ. 3468-3473.
- Wainwright , M., Betts, R., & Teale, D. (1986). Antibiotic activity of oosporein from *Verticillium psalliotae*. *Transactions of the British Mycological Society*, *86*(1), σσ. 168-170.

- Wally, O., Critchley, A., Hiltz, D., Craig, J., Han, X., Zaharia, L., . . . Prithiviraj, B. (2013). Regulation of phytohormone biosynthesis and accumulation in Arabidopsis following treatment with commercial extract from the marine macroalga *ascophyllum nodosum*. *J. Plant Growth Regul.*, 32, σσ. 324-339.
- Wally, O., Critchley, A., Hiltz, D., Craigie, J., Han, X., Zaharia, L., . . . Prithiviraj, B. (2013). Erratum to: regulation of phytohormone biosynthesis and accumulation in arabidopsis following treatment with commercial extract from the marine macroalga *ascophyllum nodosum*. *J. Plant Growth Regul.*, 32, σσ. 340-341.
- Wang, Q., & Xu, L. (2012). Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review. *Molecules*, 12, σσ. 2367–2377.
- White, J., Belanger, F., Meyer, W., Sullivan, R., Bischoff, J., & Lewis, E. (2002). Clavicipitalean fungal epibionts and endophytes—development of symbiotic interactions with plants. *Symbiosis*, σσ. 201-213.
- Wilson, D. (1995). Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, σσ. 274-276.
- Xiao, G., Ying, S.-H., Zheng, P., Wang, Z.-L., Zhang, S., Xie, X.-Q., . . . Wang, C. (2012). Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Sci Rep*, σ. 483.
- Yin, H., Zhao, X., & Du, Y. (2010). Oligochitosan: a plant diseases vaccine—a review. *Carbohydr. Polym.*, 82, σσ. 1-8.
- Zahran, H. (1999). Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 63(4), σσ. 968–89.
- Zeilinger, S., Galhaup, C., Payer, K., Woo, S., Mach, R., Fekete, C., . . . Kubicek, C. (1999). Chitinase Gene Expression during Mycoparasitic Interaction of *Trichoderma harzianum* with Its Host. *Fungal Genetics and Biology*, 26(2), σσ. 131-140.
- Zhang, X., & Schmidt, R. (1997). The impact of growth regulators on the α -tocopherol status in water-stresses *Poa pratensis*. *L. Intl. Turfgrass Res. J.*, 8, σσ. 1364–1373.
- Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci Technol*, σσ. 553–596.
- Ziosi, V., Zandoli, R., Di Nardo, A., Biondi, S., Antognoni, F., & Calandriello, F. (2012). Biological activity of different botanical extracts as evaluated by means of an array of in vitro and in vivo bioassays. *Acta Hort.*, 1009, σσ. 61-66.