



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ  
«ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»**

**«Απομόνωση ιθαγενών στελεχών εντομοπαθογόνων  
μυκήτων προς αξιοποίηση τους στον βιολογικό έλεγχο  
φορέων μυκητιακών ασθενειών σε δασικά δένδρα»**

**ΚΑΛΤΣΟΥΔΑ ΕΛΙΣΑΒΕΤ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Επιβλέπων  
Ζαχαρούλα Γκόνου-Ζάγκου  
Επ. καθηγήτρια συστηματικής & οικολογίας μυκήτων**

**ΑΘΗΝΑ 2021**



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ  
«ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»**

**«Απομόνωση ιθαγενών στελεχών εντομοπαθογόνων  
μυκήτων προς αξιοποίηση τους στον βιολογικό έλεγχο  
φορέων μυκητιακών ασθενειών σε δασικά δένδρα»**

**ΚΑΛΤΣΟΥΔΑ ΕΛΙΣΑΒΕΤ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Επιβλέπων  
Ζαχαρούλα Γκόνου-Ζάγκου  
Επ. καθηγήτρια συστηματικής & οικολογίας μυκήτων**

**ΑΘΗΝΑ 2021**



**Τριμελής Επιτροπή:**

**Ζαχαρούλα Γκόνου - Ζάγγου Επίκουρη Καθηγήτρια (επιβλέπουσα)**

**Αλέξανδρος Σαββίδης Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό**

**Δημήτριος Χατζηνικολάου Αναπληρωτής Καθηγητής**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:	4
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Μύκητες	8
1.2 Εντομοπαθογόνοι μύκητες	9
1.3 <i>Paecilomyces</i>	10
1.4 <i>Beauveria</i>	12
1.5 <i>Metarhizium anisopliae</i>	14
ΣΤΟΧΟΙ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	16
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	17
2.1 Δειγματοληψία	17
2.2 Επεξεργασία χόματος	18
2.3 Θρεπτικά υποστρώματα για τον εμβολιασμό και την ανάπτυξη μυκήτων	18
2.4 Χημικά και ρυθμιστικά διαλύματα	19
2.5 Απομόνωση μυκήτων σε 3 θρεπτικά υποστρώματα	21
2.6 Απομόνωση στελεχών	21
2.7 Μορφολογική μελέτη στελεχών	21
2.8 Μικροσκοπική μελέτη στελεχών	22
2.9 Κριτήρια επιλογής στελεχών για μοριακή μελέτη	22
2.10 Προετοιμασία για την μοριακή μελέτη των στελεχών	22
2.11 Επεξεργασία αποτελεσμάτων αλληλούχισης	27
2.12 Πειράματα in vivo με προνύμφες του εντόμου <i>Tenebrio molitor</i>	28
2.13 Μολυσματικότητα ενάντια στη λάρβα <i>T. Molitor</i>	28
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	30
3.1 Θρεπτικά υποστρώματα	30
3.2 Απομόνωση στελεχών	32
3.3 Απομόνωση αποικιών	35
3.4 Χαρακτηρισμός αποικιών	35
3.5 Μοριακή ανάλυση	49
3.6 Πείραμα in vivo λαρβών του γένους <i>Tenebrio molitor</i>	52
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	61

<b>4.1</b>	<b>Θρεπτικά υποστρώματα</b>	<b>61</b>
<b>4.2</b>	<b>Απομόνωση στελεχών</b>	<b>61</b>
<b>4.3</b>	<b>Μοριακή ανάλυση</b>	<b>61</b>
<b>4.4</b>	<b>Πείραμα in vivo λαμβών του γένους <i>Tenebrio molitor</i></b>	<b>62</b>
<b>4.5</b>	<b>Συζήτηση</b>	<b>62</b>
<b>4.6</b>	<b>Περιορισμοί</b>	<b>62</b>
<b>4.7</b>	<b>Μελλοντική έρευνα</b>	<b>63</b>
	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>64</b>

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Μετά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Γκόνου Ζαχαρούλα, κύρια επιβλέπουσα της διπλωματικής, για την σωστή καθοδήγηση.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Ιωάννα Πυρρή και τον κύριο Αλέξανδρο Σαββίδη, καθώς βοήθησαν αρκετά για την ολοκλήρωση της διπλωματικής με την επίβλεψη τους και την διαρκή προσφορά της βοήθειας τους σε οποιαδήποτε απορία ή προβληματισμό και αν προέκυψε.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Σωτήρη Αμίλη, για την πολύτιμη βοήθεια του στο τμήμα των μοριακών αναλύσεων ο οποίος ήταν επίσης πρόθυμος να προσφέρει την βοήθεια του και σε οποιοδήποτε άλλο τμήμα της διπλωματικής εργασίας.

Επιπροσθέτως θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Παναγιώτη Τσόπελα όπου βοήθησε στη συλλογή του χόματος. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φοιτητές Γιώργο Ζωχίο, ο οποίος δουλεύει επίσης με εντομοπαθογόνους μύκητες επομένως υπήρξε αμοιβαία συνεισφορά και συνεργασία, τον Ρωμανό Αντονόπουλο όπου μου παραχώρησε τις κάμπιες από την κάνναβη, και τις φοιτήτριες Άρτεμις Σπανού και Αντζελίνα Κεφαλίδου για την στήριξή τους, καθώς και τον Γιώργο Παπαδόπουλο για την στήριξη του και την βοήθεια του στην συλλογή των δειγμάτων του χόματος.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εξάπλωση ασθενειών δασικών δένδρων που οφείλονται σε μύκητες γίνεται συχνά με τη βοήθεια εντόμων. Η μορφολογία του σώματος, καθώς και η αναπαραγωγική συμπεριφορά τους είναι προσαρμοσμένη ώστε να διευκολύνεται ο ρόλος αυτός. Στην παρούσα εργασία έγινε απομόνωση σε καθαρή καλλιέργεια εντομοπαθογόνων μυκήτων από το έδαφος περιοχών στις οποίες δέντρα *Platanus orientalis* και *Cupressus sempervirens* έχουν προσβληθεί από μύκητες. Της απομόνωσης προηγήθηκαν πειράματα για την επιλογή του πλέον επιλεκτικού θρεπτικού υποστρώματος για την ανάπτυξη των μυκήτων. Ακολούθησε μελέτη των μακροσκοπικών και μικροσκοπικών μορφολογικών χαρακτηριστικών των στελεχών και προσδιορισμός τουλάχιστον σε επίπεδο γένους. Η πλειονότητα των στελεχών που απομονώθηκαν ανήκουν κυρίως σε είδη των γενών *Beauveria*, *Paecilomyces* αλλά και σπανιότερα όπως του *Auxarthron*. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν στελέχη για τα οποία ο προσδιορισμός δεν ήταν δυνατόν να επιτευχθεί, κυρίως λόγω της απουσίας αναπαραγωγικών δομών. Έτσι έγινε μοριακή ανάλυση των στελεχών με ενίσχυση της περιοχής ITS του ριβοσωμικού DNA. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν πειράματα επιμόλυνσης σε προνύμφες του εντόμου *Tenebrio molitor*, με την χρήση εναιωρήματος σπορίων από επιλεγμένα στελέχη των απομονωθέντων στελεχών.

**Λέξεις κλειδιά:** εντομοπαθογόνοι μύκητες, επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα, μορφολογική μελέτη μοριακός χαρακτηρισμός

## ABSTRACT

It is quite common fungal diseases of forest trees to be disseminated with the aid of insects. Their body morphology as well as their reproduction is well adapted to serve this role. In the present work, isolation of entomopathogenic fungi in pure culture was performed from soil samples. The samples came from sites where trees of *Platanus orientalis* and *Cupressus sempervirens* were infected with fungi. Experiments to highlight the most selective medium were preceded. The isolated strains were studied morphologically and identified up to genus level. Most of the strains belong to species of the common genera *Beauveria*, *Paecilomyces* and to the quite rare *Auxarthron*. It is worth mentioning that some strains, which are considered interesting, could not be identified, mainly due to the absence of reproductive organs. Thus, the molecular characterization of the strains was executed, where it was performed with the amplification of the ITS sequence. Finally, contamination experiments were performed on larvae of the insect *Tenebrio molitor* with the utilization of spore suspension from selected strains.

**Key words:** entomopathogenic fungi, selective medium, morphological study, molecular characterization



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Μύκητες

Οι μύκητες είναι μια από τις πιο επιτυχημένες μορφές ζωής καθώς έχουν κατορθώσει να αναπτυχθούν σε κάθε είδος περιβάλλοντος. Από την στιγμή που δεν φωτοσυνθέτουν, δεν έχουν ανάγκη την ύπαρξη της ηλιακής ενέργειας και έτσι είναι ικανοί να αναπτυχθούν ακόμα και σε σκοτεινούς βιότοπους χωρίς να περιορίζονται από θέμα κατεύθυνσης ή υποστρώματος. Επιπροσθέτως, παράγουν μεγάλους αριθμούς σπορίων τα οποία απελευθερώνονται και διασπείρονται με μεγάλη αποτελεσματικότητα, γεγονός που βοηθάει στην αναπαραγωγή τους. Συνεπώς, κάθε οικοσύστημα είτε βρίσκεται σε νερό ή αέρα ή έδαφος περιέχει ένα μεγάλο αριθμό μυκήτων.

Οι μύκητες μπορούν να δράσουν ως:

- ✓ Σαπροτροφικοί οργανισμοί: σε συνδυασμό με κάποια βακτήρια αποσυνθέτουν νεκρά φυτικά και ζωικά υπολείμματα του εδάφους. Με την διαδικασία αυτή οι πολύπλοκες οργανικές ενώσεις των υπολειμμάτων μετατρέπονται σε πιο απλές ουσίες, οι οποίες απορροφώνται από τους μύκητες και έτσι εντάσσονται ξανά στον κύκλο της έμβιας ύλης.
- ✓ Παράσιτα: αναπτύσσονται εις βάρος άλλων οργανισμών, οι οποίοι ονομάζονται ξενιστές, και τους είναι χρήσιμοι για την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών. Είναι ικανοί να παρασιτούν σε άλλους μύκητες, ανώτερα φυτά, φύκη και ζωικούς οργανισμούς. Στον άνθρωπο είναι ικανοί να προκαλέσουν δερματομυκώσεις (π.χ. τριχοφυτίαση), είτε διασυστημικές μυκώσεις (π.χ. κρυπτοκοκκίωση, ιστοπλασμώση).
- ✓ Συμβιωτικοί οργανισμοί: έχουν αναπτυχθεί διακεκριμένες βιολογικές σχέσεις με φύκη, ανώτερα φυτά και έντομα. Από την συνύπαρξη μυκήτων (ασκομυκήτων) με τα φύκη (χλωροφλυκή) προκύπτουν οι λειχήνες. Οι μύκητες που συνυπάρχουν με τα έντομα αναπτύσσονται είτε στον εντερικό σωλήνα των εντόμων (ενδοσυμβιωτικοί) είτε στις φωλιές των εντόμων (εξωσυμβιωτικοί). Άλλη μία επιτυχημένη συνύπαρξη των μυκήτων είναι οι μυκόρριζες, η συμβίωση δηλαδή των μυκήτων με ανώτερα φυτά. Η συμβίωση αυτή παίζει σημαντικό ρόλο για τα φυτά που αναπτύσσονται σε εδάφη που δεν είναι πλούσια σε θρεπτικά συστατικά, καθώς οι υφές των μυκήτων μαζεύουν ιόντα και οργανώνουν την διακίνηση τους στις ρίζες των φυτών.

- ✓ Αρπακτικοί μύκητες: συγκροτούν μια ομάδα μυκήτων όπου αιχμαλωτίζουν πρωτόζωα, νηματοειδής σκώληκες και άλλους ασπόνδυλους οργανισμούς και τρέφονται από αυτούς αφού τους σκοτώσουν.

Γενικότερα, οι μύκητες θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως ευκαρυωτικοί, ετερότροφοι οργανισμοί όπου αποτελούνται από έναν θαλλό που ονομάζεται μυκήλιο το οποίο περιέχει διακλαδισμένα σωληνοειδή νημάτια, που καλούνται υφές, και κυτταρικό τοίχωμα του οποίου κύριο συστατικό είναι η χιτίνη. Οι μύκητες αναπαράγονται τόσο αγενώς όσο και εγγενώς και παράγουν σπόρια ποικίλων μορφών και στις δυο περιπτώσεις. Ο αγενής τρόπος αναπαραγωγής καλείται αλλιώς και σωματικός ή βλαστικός και κατά την διάρκεια του δεν ενώνονται πυρήνες. Γενικά έχει μεγάλη σημασία από πλευράς διασποράς ενός είδους, καθώς στην διαδικασία αυτή συμπεριλαμβάνεται η παραγωγή μεγάλου αριθμού σπορίων και επίσης ο αγενής πολλαπλασιασμός χαρακτηρίζεται από μεγάλη επαναληψιμότητα σε αντίθεση με τον εγγενή.

## 1.2 Εντομοπαθογόνοι μύκητες

Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση του πληθυσμού των ζιζανίων συμπεριλαμβάνοντας και τα έντομα δασικών και αγροτικών περιβαλλόντων. Αναμορφικοί μύκητες από τα φύλλα *Beauveria*, *Isaria* και *Metarhizium* έχουν την μεγαλύτερη πιθανότητα για την χρήση του βιολογικού ελέγχου (Brownbridge, 2006; Vega et al., 2009; Zimmermann, 2008). Περίπου 150 σκευάσματα βασισμένα στους εντομοπαθογόνους μύκητες έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται ή είναι υπό κατασκευή από το 2007. Επιτυχημένα εντομοκτόνα που έχουν παραχθεί από μύκητες βασισμένα στην ικανότητα τους να μολύνουν και να σκοτώσουν έντομα παρέχουν μακροπρόθεσμη προστασία. Η παρουσία συγκεκριμένων εντομοπαθογόνων μυκήτων σε ένα περιβάλλον μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης της ικανότητας τους να επιβιώσουν στο περιβάλλον αυτό. Το γεγονός αυτό μπορεί να φανεί χρήσιμο για την επιλογή τους ως παράγοντες βιοελέγχου καθώς τα ιθαγενή κυρίαρχα στελέχη είναι πιο κατάλληλοι αντίπαλοι. Το έδαφος θεωρείται να είναι το πιο κατάλληλο περιβάλλον για τους συγκεκριμένους μύκητες επειδή απελευθερώνουν τα μολυσματικά σπόρια τους εκεί και παραμένουν στο έδαφος για ένα μεγάλο μέρος του κύκλου ζωής τους. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για να απομονωθούν οι μύκητες από το έδαφος είναι δύο:

- Μέθοδος με δόλωμα χρησιμοποιώντας *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) ή άλλα έντομα που είναι σχετικά απλά και ευαίσθητα

- Μέθοδοι επίστρωσης χρησιμοποιώντας διάφορα μέσα επιλογής είναι ιδιαίτερα χρήσιμες, όταν η ποσοτικοποίηση είναι απαραίτητη ή όταν το είδος της εισαγωγής δεν είναι έδαφος (π.χ. αέρας ή μέρη από φυτά).

Η ύπαρξη και η κατανομή των εντομοπαθογόνων μυκήτων στο έδαφος έχουν ευρέως μελετηθεί . Παράγοντες όπως γεωγραφική τοποθεσία, κλίμα, περιβάλλον, υψόμετρο και pH του εδάφους ή οργανικές ουσίες επιδρούν στην παρουσία των διάφορων ειδών των μυκήτων και η απόκριση του κάθε είδους διαφέρει. Το *Metarhizium anisopliae* έχει χαρακτηριστεί ως αγροτικό είδος. Σπανίζει στους αγρούς αλλά συναντάται συχνά σε δασικά οικοσυστήματα. Άλλα όπως η *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin μπορεί να κατοικήσει σε ένα μεγάλο εύρος οικοσυστημάτων. Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες μπορούν να θεωρηθούν ως βιολογικά εντομοκτόνα που δρουν μέσω επαφής επειδή κυρίως εισβάλλουν στον ξενιστή διαπερνώντας τον εξωσκελετό. Κατά τα πρώτα στάδια της μόλυνσης τα κονίδια κολλούν στην επιφάνεια από γενικούς υδροφοβικούς και ηλεκτροστατικούς μηχανισμούς. Συγκεκριμένα στελέχη παράγουν βλενώδεις ουσίες όπου βοηθούν την απορρόφηση των σπορίων και ξεκινούν την διάλυση του εξωσκελετού. Στο στάδιο αυτό έχουν βρεθεί τόσο παρεμποδιστές όσο και προωθητές της βλάστησης στην επιφάνεια του ξενιστή. Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες εισχωρούν στον εξωσκελετό. Αφού οι μύκητες έχουν εισέλθει στην κοιλότητα του εντόμου, δημιουργούν διαφορετική δομή κυττάρων η οποία μοιάζει πιο πολύ με μορφή ζύμης και ονομάζονται σωματία υφών. Αυτά τα κύτταρα συνήθως αναφέρονται ως βλαστοσπόρια όταν παράγονται τεχνητά σε μέσα καλλιέργειας. Βασισμένα στην μυκητιακή απομόνωση, αυτά τα κύτταρα μπορούν να εισέλθουν στο υπόλοιπο έντομο μέσω μια διαδικασίας ειδικού ιστού αλληλούχησης και τελικά προκαλούν μουμιοποίηση του εντόμου, καθώς επίσης είναι ικανά να εκκρίνουν και τοξικές ενώσεις, που ονομάζονται δευτερογενείς μεταβολίτες.

Αυτές οι ουσίες μπορούν είτε να διευκολύνουν την εισβολή των μυκήτων ή να δρουν ως ανοσοκατασταλτικές ενώσεις παρέχοντας ανθεκτικότητα ενάντια στην άμυνα του ξενιστή.

### 1.3 *Paecilomyces*

Το γένος *Paecilomyces* αναθεωρήθηκε από τον Samson (1974), ο οποίος αναγνώρισε και όρισε 31 είδη και χώρισε το γένος σε δύο τμήματα. Το τμήμα *Paecilomyces* περιέχει μέλη τα οποία είναι συχνά θερμόφιλα, τα τέλεια στάδια έχουν τοποθετηθεί στα *ascomycetous genera Talaromyces* and *Thermoascus*. Ο τομέας *Isarioidea* περιέχει μεσόφιλα, συμπεριλαμβανομένων μερικών γνωστών εντομοπαθογόνων ή νηματοφάγων ειδών όπως *Paecilomyces farinosus*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Paecilomyces amoeneroseus*,

*Paecilomyces lilacinus*, *Paecilomyces javanicus* και *Paecilomyces tenuipes* Η ταξινόμηση των χαρακτηριστικών αυτών βασίζεται σε μορφολογικά χαρακτηριστικά, τα οποία συχνά είναι πολύ υποκειμενικά, με σαφή προσδιορισμό των ειδών που είναι εξαιρετικά δυσλειτουργικά. Επιπλέον, οι μορφολογικές διαφορές που παρατηρούνται ίσως είναι προϊόν μεταλλάξεων ή μέσω/ καλλιιεργητικών αποτελεσμάτων και έτσι δεν είναι πάντα αξιόπιστοι χαρακτήρες. Ορισμοί μερικών εντομοπαθογόνων ή νηματοφάγων (nematophagous) ειδών του *Paecilomyces* υποβάλλονται σε αμφιβολίες όταν συγκρίνονται οι κλασσικές μέθοδοι ταυτοποίησης με την ανάλυση των γενετικών δεικτών. Οι περιορισμοί των παραδοσιακών τεχνικών αναγνώρισης υποδεικνύουν ότι οι εναλλακτικοί μέθοδοι πρέπει να αναπτυχθούν για την ταυτοποίηση των δεδομένων αυτών.

Συγκριτική ανάλυση πληροφοριών γονιδιακής αλληλουχίας ριβοσωματικού RNA (rDNA) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αποσαφήνιση των φυσικών εξελικτικών σχέσεων σε ένα ευρύ ταξινομικό φάσμα. Ριβοσωμικά γονίδια RNA τυπικά υπάρχουν σαν επαναλαμβανόμενες ομάδες που περιλαμβάνουν κωδικές περιοχές, όπου έχουν διατηρηθεί σε μεταβαλλόμενους βαθμούς, καθώς επίσης και υψηλώς αποκλίνουσες διαχωριστικές περιοχές. Αυτές οι περιοχές ή εσωτερικές ενδομεταγραφόμενες αλληλουχίες (ITS) έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στη συστηματική μυκήτων. Στην περίπτωση του γένους *Paecilomyces*, η ανάλυση των αλληλουχιών της μικρής και μεγάλης υπομονάδας, του γονιδίου rRNA έχει ήδη δείξει την πολυφυλετικότητα του γένους (Obornik et al., 2001).

Ο μύκητας *P. lilacinus* (Thom) Samson, ένα παράσιτο του αυγού των νηματωδών, χρησιμοποιείται επί του παρόντος ως παράγοντας βιολογικού ελέγχου έναντι διαφόρων φυτικών παρασιτικών νηματωδών, ιδιαίτερα το στέλεχος 251 του *P. lilacinus* για το οποίο είναι διαθέσιμος ένας εμπορικός σχηματισμός (Kiewnick et al., 2002; Brand et al., 2004). Ο *P. lilacinus* κατάφερε να ελέγξει επιτυχώς τον νηματώδη *Meloidogyne Incognita* στην πατάτα και στην τομάτα σε συνθήκες πεδίου και στις μπανάνες σε συνθήκες θερμοκηπίου. Αντίθετα, έχει αναφερθεί ότι ο *P. lilacinus* δεν ήταν αποτελεσματικός έναντι του *Meloidogyne Javanica* στον καπνό σε μικροπόρους. Πρέπει να σημειωθεί ότι το *P. lilacinus* εφαρμόστηκε ως μοναδικός παράγοντας βιολογικού ελέγχου έναντι του *Meloidogyne spp.* τόσο σε επιτυχή όσο και σε ανεπιτυχή πειράματα. Το *P. lilacinus* γενικώς εξειδικεύεται στην παρασιτοποίηση στατικών σταδίων νηματωδών, ιδιαίτερα αυγών νηματωδών. Επιπλέον, ο *P. lilacinus* εφαρμόστηκε μαζί με τον υποχρεωτικό βακτηριακό ανταγωνιστή *Pasteuria penetrans* κατάφερε να ελέγχει το *M. Incognita* σε *Okra* και τον χειμερινό βίκο καλύτερα από οποιονδήποτε από τους δύο ανταγωνιστές μόνο.

Το *P. lilacinus*, ένας νηματοειδής μύκητας, που βρίσκεται στο έδαφος, σε βλάστηση υπό σήψη, σάουρες και εργαστήρια (ως αερομεταφερόμενος ρύπος), είναι μια σπάνια αιτία ανθρώπινης νόσου. Οι περισσότερες περιπτώσεις ασθένειας που προκαλείται από το γένος *Raecilomyces* συμβαίνουν σε ασθενείς που έχουν υποστεί βλάβη στο ανοσοποιητικό σύστημα, σε ξένες συσκευές ή σε εμφυτεύματα ενδοφθάλμιων φακών. Σπάνια έχει αναφερθεί ασθένεια σε ανοσοκατασταλμένους ξενιστές χωρίς κάποιον προσδιορισμένο παράγοντα κινδύνου. Με ανασκόπηση που έλαβε χώρα αποδεικνύεται ότι οι αναφορές των λοιμώξεων του *P. lilacinus* σε ανοσοκατασταλμένους ξενιστές έχουν γίνει συχνότερες τα τελευταία χρόνια. Αυτή η τάση δείχνει ότι το *P. lilacinus* μπορεί να είναι ένα αναδυόμενο παθογόνο. Η πηγή μόλυνσης στις περισσότερες περιπτώσεις, δεν είναι εύκολα αναγνωρίσιμη. Το *P. lilacinus* έχει απομονωθεί ως καλοήθης συμβιωτικός οργανισμός στα νύχια των ανοσοεπαρκών ξενιστών. Σε μερικές περιπτώσεις, ωστόσο, ο *P. lilacinus* είναι παθογόνος και έχει εμπλακεί ως αιτία ονυχομυκητίασης σε έναν ανοσοκατασταλμένο ενήλικα. Όλες οι απομονώσεις του γένους *Raecilomyces* θα πρέπει να δοκιμαστούν για ευαισθησία από μύκητες, αφού τα κλινικά απομονωμένα στελέχη του *P. lilacinus* εμφανίζουν συχνά σημαντική αντοχή.

#### 1.4 *Beauveria*

Η *Beauveria* (Bals.) Vuill. (*Ascomycota: Hypocreales*) είναι ένα κοσμοπολίτικο γένος απλοειδές, με μεγάλη σημασία για τον ρόλο του ως παθογόνο εντόμων και για την παραγωγή ενεργών μεταβολιτών .

Ο Agostino Bassi (1835) πρώτος χαρακτήρισε την *Beauveria* ως τον αιτιώδη παράγοντα του mal del segno ή την ασθένεια του σημείου, επίσης γνωστή ως calcinaccio ή cannellino στην Ιταλία και λευκό muscardino στη Γαλλία, η οποία προκάλεσε οικονομικά καταστρεπτική επιδημία εγχώριων μεταξοσκωλήκων στη νότια Ευρώπη κατά τη διάρκεια του 18ου και τον 19ο αιώνα. Στις σπουδές του με τη *Beauveria*, ο Bassi ήταν ο πρώτος που απέδειξε ότι τα μικρόβια μπορούν να δράσουν ως μεταδοτικά παθογόνα των ζώων, παρέχοντας ένα σημαντικό προηγούμενο στη γενετική θεωρία της νόσου. Η πρώτη ταξινομική αναγνώριση του μύκητα μουσκαρδίνης προτάθηκε από τον Balsamo-Crivelli ο οποίος αναγνώρισε τις ανακαλύψεις του Bassi με την ονομασία αυτού του παθογόνου *Botrytis bassiana*. Το γένος *Beauveria*, ωστόσο, δεν περιεγράφηκε επισήμως μέχρι τις αρχές του 20ου αιώνα από τον Vuillemin, ο οποίος χαρακτήρισε το *Botrytis bassiana* Bals.-Criv. ως τύπο είδους.

Έχουν διεξαχθεί αρκετές αναθεωρητικές μελέτες της *Beauveria* για την αξιολόγηση των μορφολογικών εννοιών των ειδών. Σήμερα, οι ερευνητές ακολουθούν γενικά τους Macleod (1954) και Hoog (1972) και ταξινομούν τα περισσότερες περιβαλλοντικές απομονώσεις της *Beauveria* σε *B. bassiana* ή *B. brongniartii*, μια πρακτική που αντικατοπτρίζεται στα σύγχρονα κείμενα και τα κλειδιά για την αναγνώριση των ειδών.

Αν και οι βιολογικώς σχετικές έννοιες ειδών και τα ρητά κριτήρια αναγνώρισης ειδών δεν έχουν ακόμη οριστεί για το *Beauveria*, πρόσφατες μελέτες μοριακής και πολιτιστικής προέλευσης έδωσαν γνώση σχετικά με τη φυλογενετική θέση και την αναπαραγωγική βιολογία αρκετών ειδών. Μια φυλογονία του rDNA από τους Sung et al. (2001) υποστηρίζει μια μοναδική εξελικτική προέλευση του *Beauveria* μέσα στην υποοικογένεια *Cordycipitoideae* της *Clavicipitaceae* και ότι η τελειομορφή *C. scarabaeicola* είναι φωλιασμένη μέσα στη *Beauveria* και είναι συγγενική του *B. caledonica*. Στελέχη που απομονώνονται από διάφορα είδη *Cordyceps* παράγουν αναμορφικές *Beauveria*, αποδεικνύοντας σαφώς ότι ορισμένα είδη *Beauveria* είναι σεξουαλικά. Αυτά τα είδη *Cordyceps* περιλαμβάνουν *C. Bassiana*, *C. brongniartii*, *C. staphylinidaecola* και *C. sobolifera*. Μαζί τα μοριακά φυλογενετικά και πολιτισμικά δεδομένα υποστηρίζουν την προέλευση του *Cordyceps* στην οικογένεια *Beauveria*.

Τα κονίδια της *Beauveria bassiana* είναι αποτελεσματικά στη θανάτωση των προνυμφών των κουνουπιών όταν εφαρμόζονται ως κονιδιακή σκόνη στην επιφάνεια του νερού των τοποθεσιών αναπαραγωγής (Clark et al., 1968). Τα κονίδια είναι υδρόφοβα, με αποτέλεσμα να επιπλέουν στην επιφάνεια του νερού και να έρχονται σε επαφή με τις προνύμφες των κουνουπιών που τρέφονται κάτω από την επιφάνεια, αν και οι Miranpuri & Khachatourians (1991) βρήκαν το κεφάλι εξίσου σημαντικό μέρος μόλυνσης. Σε εργαστηριακές δοκιμές ο μύκητας αποδείχτηκε μολυσματικός κατά των προνυμφών των *Culex pipiens*, *Culex tarsalis*, *Culex tritaeniorhynchus* και *Anopheles albimanus*, αλλά ήταν αναποτελεσματική ενάντια στα *Aedes aegypti*, *Ochlerotatus sierrensis* και *Culex quinquefasciatus*. Τα ευπαθή είδη ήταν επιρρεπή σε λοίμωξη μόνο λίγο μετά την αλλαγή δέρματος. Εάν η μόλυνση παρατηρήθηκε λίγο πριν την αλλαγή δέρματος, το μυκήλιο χάθηκε μέσα στο δέρμα. Μελέτες σε οπές δέντρων που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με βλαστοκονίδια ( $5 \times 10^3$  ή  $5 \times 10^5$  κονίδια  $\text{ml}^{-1}$  νερό) του *B. brongniartii* έδωσαν μειώσεις μεταξύ 53 εως 71% των αναδυόμενων ενηλίκων *O. sierrensis*. Οι εργαστηριακές μελέτες έδειξαν ότι εκτός από τον *O. sierrensis*, ο μύκητας ήταν παθογόνος για τις προνύμφες των *Aedes aegypti*, *Ochlerotatus dorsalis*, *Ochlerotatus hexodontus* Dyar, *C. pipiens*, *C. tarsalis* και *Culiseta*

*incidens*. Εκτός από τις μολύνσεις των προνυμφών, ο μύκητας αποδείχθηκε επίσης μολυσματικός για τα ενήλικα κουνούπια, αν και δεν έχουν αναφερθεί ενήλικα κουνούπια που έχουν μολυνθεί από *Beauveria*. Η υγρασία θεωρείται ένας από τους κρίσιμους παράγοντες που επηρεάζουν το αποτέλεσμα τόσο των εργαστηριακών όσο και των δοκιμών πεδίου με το *Beauveria bassiana*. Οι Clark et al. (1968) αναφέρουν μια μελέτη από τους Hart & MacLeod (1955), οι οποίοι βρήκαν βέλτιστη βλάστηση των κονιδίων *Beauveria* που εμφανίζονται σε σχετικές υγρασίες άνω του 94%. Η μόλυνση δεν φαίνεται να εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Για τα κονίδια, ωστόσο, οι υψηλές θερμοκρασίες μπορεί να είναι επιβλαβείς, ειδικά σε συνδυασμό με συνθήκες υψηλής υγρασίας. Τα αποτελεσματικά στάδια του μύκητα κατά των προνυμφών είναι κονίδια και βλαστοκονίδια, με το τελευταίο στάδιο να είναι πολύ πιο παθογόνο. Το *B. brongniartii* θεωρήθηκε ως πιθανός παράγοντας βιολογικού ελέγχου, δεδομένου ότι αυτό το είδος είναι παθογόνο για προνύμφες πολλαπλών ειδών κουνουπιών, συμπεριλαμβανομένων των *Ae. aegypti*, *O. dorsalis*, *O. hexodontus* και *O. sierrensis*. Ωστόσο, οι μεγάλες δόσεις που απαιτούνται για σημαντικά ποσοστά θνησιμότητας των προνυμφών των κουνουπιών δεν θεωρήθηκαν πρακτικές. Επιπλέον, ένα άλλο πρόβλημα σχετικά με τη χρήση του *Beauveria* θα είναι η ασφάλειά του όσον αφορά τα σπονδυλωτά. Έχει αναφερθεί ευαισθησία από άτομα που επανειλημμένα εκτέθηκαν σε τεράστιες ποσότητες παρασκευασμάτων κονιδίων *B. bassiana*. Ωστόσο, οι μακροχρόνιες δοκιμές τρωκτικών με κονίδια *B. bassiana*, συμπεριλαμβανομένων των δοκιμών εισπνοής, υποδόριων ενέσεων και δοκιμών στοματικής τοξικότητας, δεν εμφάνισαν δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία.

Σήμερα, η *Beauveria* (κυρίως το γένος *bassiana*), χρησιμοποιείται ως εντομοκτόνο για τον έλεγχο του πληθυσμού των εντόμων. Για παράδειγμα στην Κίνα περίπου ένα εκατομμύριο εκτάρια τον χρόνο θεραπεύονται με *B. bassiana* για να ελεγχθούν από δασικά έντομα όπως η κάμπια του πεύκου *Dendrolimus punctatus*. Το μυκητιακό παθογόνο του βρίσκεται επίσης υπό έρευνα και επηρεάζει τα κουνούπια που εξαπλώνουν την ελονοσία. Η *B. bassiana* είναι επίσης ενεργή ενάντια στις προνύμφες του *Ae. aegypti*, του κύριου φορέα του δάγκειου πυρετού, του κίτρινου πυρετού, του chikungunya και του zika πυρετού. Τα τρέχοντα αποτελέσματα υποστηρίζουν τη χρήση της *B. bassiana* ως δυνητικού παράγοντα βιοελέγχου κατά της *Ae. Aegypti*.

### **1.5 *Metarhizium anisopliae***

Ο *Metarhizium anisopliae*, ο παράγοντας της ασθένειας της πράσινης μουσκαρδίνης των εντόμων, παλαιότερα γνωστός ως *Entomophthora anisopliae* (βασιονύμιο), είναι ένας μύκητας που αναπτύσσεται φυσικά σε εδάφη σε όλο τον κόσμο και προκαλεί ασθένεια σε

διάφορα έντομα ενεργώντας ως παράσιτο. Είναι ο πιο σημαντικός εντομοπαθογόνος μύκητας. Ο μύκητας έχει μαζική ανάπτυξη σε τεχνητά μέσα καλλιέργειας και παράγει άφθονα κονίδια, αλλά τα κονίδια φυτρώνουν μόνο σε επαφή με τον ξενιστή τους. Ο ακριβής τρόπος δράσης του *M. anisopliae* στους νηματώδεις είναι ακόμα άγνωστος, αλλά είναι πιθανόν παρόμοιος με άλλους μύκητες με κολλώδη σπόρια ή κονίδια. Τα κονίδια βλασταίνουν, παρασιτούν και σκοτώνουν, με άμεση διείσδυση και παραγωγή των μολυσματικών υφών μέσα στο σώμα των νηματωδών. Πριν από οποιαδήποτε άμεση επίθεση στον ξενιστή, ο μύκητας παράγει δεστρουξίνη Α και δεστρουξίνη Β που μπορεί να σκοτώσει τον ξενιστή. Οι Kershaw et al., (1999) και οι Hsiao & Ko (2001) ανέφεραν ότι αυτός ο μύκητας παράγει ορισμένα κυκλικά πεπτίδια, δεστρουξίνες που μπορεί να παίζουν ρόλο στην παθογένειά του. Υπάρχουν μερικές αναφορές για την επίδραση του *M. anisopliae* στους νηματώδεις. Ο βιολογικός έλεγχος νηματωδών ζαχαροκάλαμου με χρήση *Penicillium oxalicum* και *M. anisopliae* έχει μελετηθεί από τον Zorilla (2001). Έχει αναφέρει τη σημαντική ανασταλτική επίδραση του *M. anisopliae* στον πληθυσμό νηματωδών που μελετήθηκε. Η επίδραση αυτού του μύκητα έναντι του *Rotylenchulus reniformis* έχει αναφερθεί από τους Sharma & Bhargava(2008). Ανέφεραν ότι η εφαρμογή αυτού του βιοπαράγοντα μείωσε τον τελικό πληθυσμό αυτού του φυτικού παρασιτικού νηματώδους καθώς και ορισμένων ειδών νηματωδών που ζουν ελεύθερα. Σε μια έρευνα στην περιοχή Boyer Ahmad στο Ιράν, παρατηρήθηκαν ορισμένοι φυσικά μολυσμένοι νηματώδεις από *M. anisopliae* (Ghayedi & Abdollahi, 2013).



## **ΣΤΟΧΟΙ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως στόχο την απομόνωση και την αναγνώριση εντομοπαθογόνων μυκήτων από το έδαφος, όπως και την εύρεση του καταλληλότερου θρεπτικού, επιλεκτικού υποστρώματος για την ανάπτυξη τους.

Ένας ακόμα στόχος είναι η μορφολογική μελέτη τους, καθώς και ο μοριακός τους χαρακτηρισμός. Τέλος, ελέγχθηκε η μολυσματικότητα επιλεγμένων στελεχών σε λάρβες εντόμων.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Δειγματοληψία

Δείγματα χόματος συλλέχθηκαν από τρεις διαφορετικές περιοχές:

Περιοχή δειγματοληψίας 1: Αχέροντας όπου πάρθηκε δείγμα από έδαφος όπου βρισκόταν το φυτό *Plantanus orientalis* (πλάτανος) από τον κύριο Τσόπελα Π. στις 22/01/2019.

Περιοχή δειγματοληψίας 2: στην Καισαριανή από την κυρία Γκόνου Ζ. από το έδαφος του φυτού *Cupressus sempervirens* (κυπαρίσσι) όπου πραγματοποιήθηκε στις 27/03/2019.

Περιοχή δειγματοληψίας 3: στον Βοτανικό κήπο του Διομήδους (Χαϊδάρι, Ιερά Οδός 403) από το έδαφος φυτών *C. sempervirens* όπου πραγματοποιήθηκε στις 11/04/2019.

Όλα τα δείγματα λήφθηκαν περιμετρικά από το δένδρο μέχρι σε απόσταση 50 cm (Εικόνα 2.1). Πριν γίνει η κάθε δειγματοληψία απομακρύνθηκαν τυχόν φύλλα ή πέτρες από την επιφάνεια του εδάφους και η συλλογή χόματος δεν ξεπερνούσε τα 5-10 εκατοστά σε βάθος (Fernandes et al., 2010).



**Εικόνα 2.1:** Φωτογραφία που λήφθηκε κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας

Τα δένδρα, από την ριζόσφαιρα των οποίων έγινε η δειγματοληψία, θεωρήθηκαν ότι είχαν ασθενήσει (Tiberi et al., 2016) καθώς παρατηρήθηκαν ξεραμένα μέρη τα οποία οφείλονται σε προσβολή από έντομα (Εικόνα 2.2). Το χώμα τοποθετήθηκε σε πλαστικά σακουλάκια μέχρι να μεταφερθεί στο εργαστήριο.



**Εικόνα 2.2:** Δέντρο *C. Sempervirens* που πιθανολογείται ότι έχει ασθενήσει, καθώς παρατηρήθηκε η ξεραμένη κορυφή

## 2.2 Επεξεργασία χώματος

Από το χώμα που συλλέχθηκε απομακρύνθηκαν τυχόν ρίζες δέντρων και πέτρες και στην συνέχεια υπέστη ξήρανση στους 35 °C για 48 ώρες για να απομακρυνθούν βακτήρια του γένους *Enterobacter*. Αφού τελειώσει η διαδικασία της ξήρανσης το χώμα περνάει από κοσκίνισμα μέχρι να φτάσει στην μορφή σκόνης. Στην συνέχεια παρασκευάστηκε Water agar WA (1 g. agar στο l) όπου για να υπάρξει ομοιόμορφη κατανομή του υλικού θερμάνθηκε και μοιράστηκε σε κωνικές φιάλες των 500 ml. Πιο συγκεκριμένα :

- ✓ Στην πρώτη κωνική φιάλη τοποθετήθηκαν 100 ml WA
- ✓ Στην δεύτερη κωνική φιάλη τοποθετήθηκαν 80 ml WA
- ✓ Στην Τρίτη κωνική φιάλη τοποθετήθηκαν 90 ml WA
- ✓ Στην τέταρτη κωνική φιάλη τοποθετήθηκαν 80 ml WA

Στην συνέχεια οι κωνικές φιάλες κλείστηκαν με βαμβάκι και αλουμινόχαρτο και αποστειρώθηκαν (121°C, 1 atm, 20 min). Μετά το πέρας της αποστείρωσης το WA πρέπει να κρυώσει. Από το κοσκινισμένο πλέον χώμα ζυγίζονται 5 g, όπου τοποθετούνται σε κωνική φιάλη με 100 ml αποστειρωμένο WA, το μείγμα πρέπει να ανακινηθεί πολύ καλά προκειμένου να ομογενοποιηθεί πλήρως. Στην δεύτερη κωνική φιάλη τοποθετούνται 20 ml από την πρώτη κωνική φιάλη, στην τρίτη κωνική τοποθετούνται 10 ml από την δεύτερη και στην τέταρτη κωνική 20 ml από την τρίτη κωνική φιάλη έτσι ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή για το εμβόλιο αραιώση 1/5000.

## 2.3 Θρεπτικά υποστρώματα για τον εμβολιασμό και την ανάπτυξη μυκήτων

Τα θρεπτικά υλικά όπου χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των μυκήτων είναι:

**Potato Dextrose Agar με Yeast Extract (PDAY)** (PDA 39 g/l και yeast extract 1 g/l) για να επιτευχθεί η παρατήρηση και η σύγκριση της ανάπτυξης των μυκήτων σε σχέση με τα θρεπτικά υποστρώματα που περιέχουν αντιβιοτικά. Το pH ρυθμίστηκε στο 6,9. (Fernandes et al., 2010).

**Potato Dextrose Agar με Yeast Extract, Dodine και Gentamicin (PDAY+D)**(PDA 39 g/l, yeast extract 1 g/l, dodine 40 ml/l και gentamicin 0.6 ml/l) για να επιτευχθεί η εκλεκτική ανάπτυξη εντομοπαθογόνων μυκήτων έτσι ώστε να διευκολυνθεί και η μετέπειτα απομόνωση τους. Το pH ρυθμίστηκε στο 6,9 (Fernandes et al., 2010).

**Potato Dextrose Agar με Yeast Extract, Gentamicin, Thiambendazole, Cycloheximide, και Chloramphenicol (CTC)** (PDA 39 g/l, yeast extract 1 g/l, gentamicin 0.6 ml/l, thiambendazole 0.001 g/l, cycloheximide 0.25g/l και chloramphenicol 0,5 g/l) για να επιτευχθεί η εκλεκτική ανάπτυξη εντομοπαθογόνων μυκήτων έτσι ώστε να διευκολυνθεί και η μετέπειτα απομόνωση τους. Το pH ρυθμίστηκε στο 6,9 (Fernandes et al. 2010). Οι περιοριστικοί παράγοντες τοποθετήθηκαν κατά την διάρκεια παρασκευής του θρεπτικού και στην συνέχεια ακολούθησε αποστείρωση για 20 λεπτά στους 121°C.

**Potato Dextrose Agar (PDA)** (PDA 39 g/l), για την διατήρηση των στελεχών που απομονώθηκαν.

**Water agar (WA) (1 g/l)** για την επεξεργασία του χώματος και τον εμβολιασμό για την μορφολογική μελέτη χρησιμοποιήθηκε προκειμένου το χώμα να διαλυθεί, έτσι ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή αραιώση (1/5000) και για να δημιουργηθεί εναίωρημα σπορίων των προς μελέτη στελεχών, το οποίο στην συνέχεια εμβολιάστηκε σε PDAY.

**Malt extract broth (εκχύλισμα βύνης, MEB) (20g/l)** για την μοριακή μελέτη τα στελέχη που επιλέχθηκαν αναπτύχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια malt extract broth (20g/l).

#### **2.4 Χημικά και ρυθμιστικά διαλύματα**

- ✓ Ντοντίνη (Dodine) χρησιμοποιήθηκε ως περιοριστικός παράγοντας για την επίτευξη ανάπτυξης εντομοπαθογόνων μυκήτων. 0,4 ml/l (v/v) . Η ντοντίνη διατηρήθηκε στο δοχείο της σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (Fernandes et al., 2010).
- ✓ Γενταμισίνη (Gentamicin) χρησιμοποιήθηκε ως περιοριστικός παράγοντας για την επίτευξη ανάπτυξης εντομοπαθογόνων μυκήτων.0.25 g/l (w/v) (Fernandes et al., 2010).

- ✓ Θιαμπενταζόλη (Thiambendazole) χρησιμοποιήθηκε ως περιοριστικός παράγοντας για την επίτευξη ανάπτυξης εντομοπαθογόνων μυκήτων 0.001 g/l (w/v) (Fernandes et al., 2010).
- ✓ Κυκλοεξιμίδιο (Cycloheximide) χρησιμοποιήθηκε ως περιοριστικός παράγοντας για την επίτευξη ανάπτυξης εντομοπαθογόνων μυκήτων 0.25 g/l (w/v) (Fernandes et al., 2010).
- ✓ Χλωραμφενικολη (chloramphenicol) χρησιμοποιήθηκε ως περιοριστικός παράγοντας για την επίτευξη ανάπτυξης εντομοπαθογόνων μυκήτων 0.5 g/l (w/v) (Fernandes et al., 2010).
- ✓ Υγρό άζωτο για το σπάσιμο των κυττάρων.
- ✓ Extraction buffer. Περιέχει: Tris -HCl 0.2 M pH=8, SDS 1%, EDTA 1mM pH=8 .
- ✓ Φαινόλη 3M με pH5,3 (800 ml) για τον καθαρισμό του DNA.
- ✓ Χλωροφόρμιο για τον καθαρισμό του DNA κατά την διάρκεια απομόνωσης του.
- ✓ CH<sub>3</sub>COONa 1/10 του συνολικού όγκου του δείγματος (80 ml).
- ✓ Ισοπροπανόλη 3M για την απομόνωση του DNA.
- ✓ Αιθανόλη 70% (v/v) για την απομάκρυνση της ισοπροπανόλης.
- ✓ Φλοξίνης για την χρώση σπορίων, υφών και κονιδιογόνων κυττάρων στην μικροσκοπική ανάλυση.
- ✓ Διάλυμα τριμεθυλοαμινομεθαμίνης (TAE) (50x) για παρασκευή ηλεκτροφορητικού μέσου. Περιέχει: 242 g Tris-acetate και 57.1 ml οξικού οξέος (100 %) σε 100ml διαλύματος EDTA 0.5 M (pH=8.0). Πλήρωση του διαλύματος μέχρι τα 1l με απεσταγμένο νερό (<http://cshprotocols.cshlp.org> 10)
- ✓ Διάλυμα TAE (1x) ως ηλεκτροφορητικό μέσο. Περιέχει: 20ml διαλύματος TAE (50x)  
σε 980 ml απεσταγμένου νερού (<http://cshprotocols.cshlp.org> 11).
- ✓ Διάλυμα Βρωμιούχου Αιθιδίου για χρώση των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης κατά την ηλεκτροφόρηση. Περιέχει (g/l): 10 mg/ml βρωμιούχο. Αιθίδιο (Sigma) σε αποστειρωμένο και απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα αυτό είναι εξαιρετικά τοξικό. Το φιαλίδιο, όπου φυλάχθηκε το διάλυμα καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο και διατηρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Για την ηλεκτροφόρηση φορτώθηκε όγκος ίσος με 3 ml σε κάθε φιάλη με το λιωμένο πήκτωμα αγαρόζης, ζητούμενης συγκέντρωσης.

- ✓ 0,05% (w/v) Tween80: για την δημιουργία εναιωρήματος σπορίων των μυκήτων προκειμένου να μολυνθούν οι λάρβες.
- ✓ 3 % (v/v) NaClO: για να αποστειρωθούν οι λάρβες.

## **2.5 Απομόνωση μυκήτων σε 3 θρεπτικά υποστρώματα**

Συγκρίθηκαν τρία θρεπτικά υποστρώματα προκειμένου να διαπιστωθεί πιο είναι το καταλληλότερο. Αρχικά εμβολιάστηκαν με χόμα διαλυμένο σε W.A. (αραίωση 1/5000) τρυβλία τα οποία περιείχαν PDAY και τρυβλία που περιείχαν PDAY και dodine. Επίσης δοκιμάστηκε και ο όγκος του εμβολίου (W.A. με το χόμα) καθώς κάποια τρυβλία εμβολιάστηκαν με 0,5 ml και άλλα με 1 ml εναιωρήματος χόματος. Σε επόμενο πείραμα παρασκευάστηκε και το θρεπτικό με PDAY και CTC και εμβολιάστηκε επίσης με 0,5 ml και 1 ml εμβολίου. Η απομόνωσή μυκήτων έγινε σε PDAY.

## **2.6 Απομόνωση στελεχών**

Εφόσον έχει ξεκινήσει η ανάπτυξη στα εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα γίνεται επιλογή μυκήτων και γίνεται εκ νέου καλλιέργεια σε PDAY για περεταίρω μελέτη. Απομονώθηκαν στελέχη με διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά από την ίδια περιοχή και στελέχη με ίδια μορφολογικά χαρακτηριστικά από διαφορετικές περιοχές προκειμένου να γίνει σύγκριση. Τα στελέχη που απομονώθηκαν, για να συντηρηθούν εμβολιάστηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν PDA, οι οποίοι τοποθετήθηκαν σε θάλαμο με θερμοκρασία 4°C.

## **2.7 Μορφολογική μελέτη στελεχών**

Για την μορφολογική μελέτη στελεχών, προστέθηκαν σε αποστειρωμένα σωληνάκια erpedorf με 500μl αποστειρωμένου WA (η αποστείρωση έγινε στους 121 °C για 20 min). Από καθαρή καλλιέργεια του προς μελέτη στελέχους, με βελόνα που έχει αποστειρωθεί σε φλόγα και στην συνέχεια εμβαπτίσθηκε σε οινόπνευμα (η διαδικασία επαναλαμβάνεται 2-3 φορές) λαμβάνεται μικρή ποσότητα μυκηλίου και τοποθετείται μέσα στο erpedorf με το W.A. Πάνω στο erpedorf αναγράφεται ο κωδικός του στελέχους και στην συνέχεια το διάλυμα ανακινείται καλά με vortex. Με την χρήση αυτόματης πιπέτας λαμβάνεται μικρή ποσότητα από το εναιώρημα και μια με δύο σταγόνες τοποθετούνται στο κέντρο ενός τρυβλίου που περιέχει

PDAY με προσοχή χωρίς να διασκορπιστούν σταγονίδια στο υπόλοιπο θρεπτικό για να αποφευχθεί η ανάπτυξη δευτερογενών αποικιών. Η επώαση έγινε στους 30 °C. Η μέτρηση της διαμέτρου και η παρατήρηση των αποικιών έγινε στις 3, 7, 14, 30 μέρες ανάπτυξης.

## **2.8 Μικροσκοπική μελέτη στελεχών**

Για την μικροσκοπική μελέτη των στελεχών, χρησιμοποιήθηκαν καθαρές απομονωμένες καλλιέργειες των μυκήτων. Το παρασκεύασμα δημιουργήθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες, μαζί με μία σταγόνα φλοξίνης. Το παρασκεύασμα τοποθετήθηκε στο μικροσκόπιο και με την βοήθεια της φλοξίνης τα σπόρια, οι υφές και τα κονιδιογόνα κύτταρα καθίστανται ευδιάκριτα. Για να επιτευχθεί η μέτρηση των χαρακτηριστικών αυτών τοποθετήθηκε μία σταγόνα κεδρέλαιο στο μέρος της καλυπτρίδας όπου βρίσκεται το παρασκεύασμα και χρησιμοποιήθηκε μεγέθυνση 1000\*. Για τον διαχωρισμό των στελεχών τα κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κυρίως το σχήμα των σπορίων και των κονιδιογόνων κυττάρων.

## **2.9 Κριτήρια επιλογής στελεχών για μοριακή μελέτη**

Από τα στελέχη που απομονώθηκαν και αναπτύχθηκαν σε PDAY στους 35 °C επιλέχθηκαν για μοριακή μελέτη όλα τα στελέχη των γενών στα οποία παρατηρήθηκε μεγάλη ποικιλομορφία στα μορφολογικά χαρακτηριστικά. Τα στελέχη αυτά επιλέχθηκαν προκειμένου να προσδιοριστεί το είδος και να διαπιστωθεί αν οι μορφολογικές διαφορές υποδηλώνουν διαφορετικό είδος.

## **2.10 Προετοιμασία για την μοριακή μελέτη των στελεχών**

Όσον αφορά την μοριακή μελέτη, τα στελέχη που επιλέχθηκαν, αναπτύχθηκαν σε PDAY, και την έβδομη μέρα μετά τον εμβολιασμό ακολούθησε η καλλιέργειά τους MEB. Παρασκευάστηκε MEB σε κωνικές φιάλες των 100 ml Έτσι, τοποθετήθηκε μικρή ποσότητα από MEB των κωνικών φιαλών σε κάθε τρυβλίο και με την βοήθεια σπάτουλας, η επιφάνεια του μυκηλίου υπέστη απόξεση με σκοπό να απελευθερωθούν σπόρια. Η ποσότητα του MEB με τα σπόρια τοποθετείται ξανά πίσω στην κωνική φιάλη η οποία σκεπάζεται με αλουμινόχαρτο. Η διαδικασία αυτή έγινε υπό ασηπτικές συνθήκες. Ακολούθησε επώαση των στελεχών για 48 ώρες στους 25° C με ανάδευση (180 rpm).

Μετά την πάροδο των 48 ωρών από τον εμβολιασμό έγινε διαχωρισμός του μυκηλίου από το θρεπτικό με bluetex. Κατά την διαδικασία αυτή τοποθετείται ένα χωνί μέσα σε κωνική φιάλη και μέσα στο χωνί τοποθετείται το bluetex. Στην συνέχεια το δείγμα με το MEB, τοποθετείται μέσα στο bluetex. Το υγρό θρεπτικό φεύγει από τους πόρους μέσα στην κωνική φιάλη. Το bluetex συγκρατεί το μυκήλιο, το οποίο πρέπει να στραγγισθεί πολύ καλά σε διηθητικό χαρτί πιέζοντάς το. Στο τέλος της διαδικασίας το απομονωμένο μυκήλιο τυλίχθηκε σε αλουμινόχαρτο με τον κωδικό του κάθε δείγματος να αναγράφεται επάνω και διατηρήθηκε στους -25 °C μέχρι να ολοκληρωθεί η διαδικασία για όλα τα στελέχη.

Ακολούθησε σπάσιμο κυττάρων με υγρό άζωτο. Σε γουδί όπου περιέχει ήδη υγρό άζωτο βάζουμε το παγωμένο μυκήλιο, (το οποίο είχε μεταφερθεί από τον καταψύκτη στον πάγο του εργαστηρίου μέσα σε υγρό άζωτο) και με αργές και κυκλικές κινήσεις γίνεται το σπάσιμο των κυττάρων. Στην συνέχεια το προϊόν (σε μορφή σκόνης) συλλέγεται σε σωλήνες Eppendorf και σε κάθε σωλήνα προστίθενται 800 µl extraction buffer. Κάθε σωλήνας αναδεύεται καλά με vortex και ακολουθεί επώαση για μισή ώρα στον πάγο. Προστίθενται 800 µl διαλύματος φαινόλης και γίνεται καλή ανάδευση με vortex (1 λεπτό) και στην συνέχεια γίνεται φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 5 λεπτά στα 12000 rpm. Στο προϊόν δημιουργούνται 2 φάσεις, και με προσοχή η υδατική (πάνω) φάση μεταφέρεται σε νέο Eppendorf με την βοήθεια αυτόματης πιπέτας, στο οποίο προστίθεται ίσος όγκος, με αυτόν του δείγματος, χλωροφορμίου. Ακολουθεί πάλι καλή ανάδευση με vortex (1 λεπτό) και τα δείγματα φυγοκεντρώνονται για 5 λεπτά στις 12000 rpm. Δημιουργούνται ξανά 2 φάσεις, και με την αυτόματη πιπέτα λαμβάνεται η πρώτη φάση και μεταφέρεται σε νέο Eppendorf. Προστίθεται ίσος όγκος ισοπροπανόλης και το 1/10 του όγκου CH<sub>3</sub>COONa 3 M pH 5.3. Ακολουθεί ομαλή ανακίνηση με το χέρι και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 12000 rpm. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 200 µl αιθανόλη 70% (v/v). Γίνεται φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 12000 rpm. Η αιθανόλη απορρίπτεται πλήρως και το κάθε δείγμα αφήνεται να στεγνώσει στους 50 °C για 20 λεπτά. Τέλος προστίθενται 50 µl απεσταγμένου νερού για να γίνει αναδιάλυση των δειγμάτων. Το τελικό προϊόν χρησιμοποιήθηκε για PCR προκειμένου να γίνει ενίσχυση της ITS περιοχής η οποία είναι περιοχή αναγνώρισης των μυκήτων καθώς περιλαμβάνει τις περιοχές 18S και 28ITS.

Οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της ITS περιοχής σχεδιάστηκαν εργαστηριακά και μαζί με τις αλληλουχίες τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1. Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε βάση της εργασίας Molecular and immunochemical phylogeny of *Verticillium* species (Pantou MP et al. 2005).



**Πίνακας 2.1:** Αλληλουχία και συγκέντρωση εκκινητών

Όνομασία εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή	Συγκέντρωση
18ITS1 (forward)	CCT.GGT.GGT.TTC.TTT.TCC	10 $\mu$ mol
18ITS2 (reverse)	GTC.CCT.GCC.CTT.TGT.A	10 $\mu$ mol

Η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε για την PCR είναι η Thermo Scientific Phire Green Hot Start II DNA Polymerase με κωδικό εγχειριδίου MAN0012386. Το mastermix (2x) που χρησιμοποιήθηκε περιείχε Phire thermo polymerase, dNTPs Deoxynoycleotide Solution Mix, Green buffer, Αποστειρωμένο νερό (Πίνακας 2.3). Ο τελικός όγκος κάθε αντίδρασης ήταν 20  $\mu$ l (Πίνακας 2.4).

**Πίνακας 2.2:** Συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR

Συστατικά για mastermix	Απαιτούμενη ποσότητα	Stock διαλυμάτων	Ποσότητα που προστέθηκε
Phire thermo polymerase		200 $\mu$ L	40 $\mu$ l
dNTPs Deoxynoycleotide Solution Mix	10 mM		50 $\mu$ l
Green buffer		Περιέχει 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> )	400 $\mu$ l
Αποστειρωμένο νερό	-	-	510 $\mu$ l
Συνολικός όγκος			1000 $\mu$ l

**Πίνακας 2.3:** Συστατικά αντίδρασης για την PCR

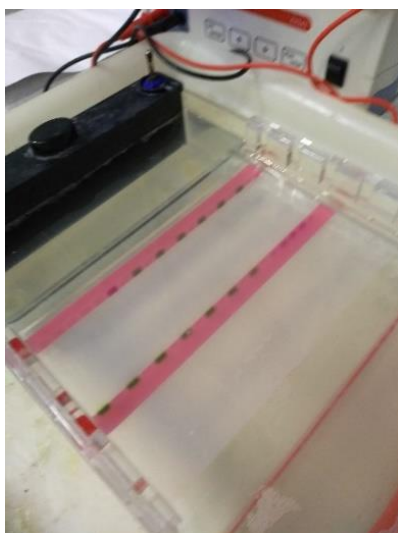
<b>Συστατικό PCR</b>	<b>Ποσότητα που προστέθηκε</b>
Mastermix	10 $\mu$ l
Αποστειρωμένο νερό	7 $\mu$ l
DNA	1 $\mu$ l
Reverse primer	1 $\mu$ l
Forward primer	1 $\mu$ l
Συνολικός όγκος αντίδρασης	20 $\mu$ l

Αρχικά το δείγμα θερμάνθηκε για 5 λεπτά στους 95°C και στη συνέχεια ακολούθησαν 35 κύκλοι για την ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας (ITS περιοχή). Επομένως ακολούθησε η αποδιάταξη του γενωμικού υλικού στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα, στη συνέχεια οι εκκινητές της αντίδρασης σχημάτισαν δεσμούς υδρογόνου με τις συμπληρωματικές θέσεις στο γενετικό υλικό σε θερμοκρασία στους 48°C για 45 δευτερόλεπτα, και τέλος και μια επώαση σε θερμοκρασία 72°C για 1 λεπτό επέτρεψε τον σχηματισμό των νέων αλυσίδων με τη δράση της πολυμεράσης. Μετά το πέρας των 35 κύκλων για να ολοκληρωθεί η αντίδραση και να ολοκληρωθούν τυχόν αντιδράσεις, το δείγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία 72 °C για 2 λεπτά και τέλος τα δείγματα διατηρήθηκαν στους 10°C μέχρι να γίνει η ηλεκτροφόρηση (Πίνακας 2.4).

**Πίνακας 2.4: Πρόγραμμα PCR**

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Αριθμός Κύκλων
Επώαση	95	5 λεπτά	
Αποδιάταξη	95	30 δευτερόλεπτα	
Σχηματισμός δεσμών υδρογόνου	48	45 δευτερόλεπτα	x 35
Σχηματισμός αλυσίδων	72	1 λεπτό	
Τελική επώαση	72	2 λεπτά	
Διατήρηση δειγμάτων	10		

Για τα προϊόντα της αντίδρασης ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (Εικόνα 2.3). Ως μέσο ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα TAE (1X) και για την επιτυχή χρώση των προϊόντων προστέθηκε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (3ml). Τα προϊόντα φορτώθηκαν στα πηγάδια του πηκτώματος αφήνοντας ανάμεσα από κάθε προϊόν ένα πηγάδι κενό προκειμένου να διευκολυνθεί το κόψιμο που θα ακολουθήσει. Επιπλέον στο πρώτο πηγάδι προστέθηκε μάρτυρας μοριακού βάρους 1000 bp της εταιρείας biolabs. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε συνθήκες 100 V για 30 λεπτά. Οι ζώνες που δημιουργήθηκαν παρατηρήθηκαν και κόπηκαν με αποστειρωμένο νυστέρι στην UV και στην συνέχεια τοποθετήθηκαν σε Eppendorf τα οποία φυλάχθηκαν στους -20°C μέχρι να γίνει ο καθαρισμός.



**Εικόνα 2.3:** Προετοιμασία για την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης

Τέλος έγινε καθαρισμός των προϊόντων της αντίδρασης με την χρήση τυποποιημένης δοκιμασίας (Makerey Nagel 740609.50). Τέλος το προϊόν που λήφθηκε, φωτομετρήθηκε προκειμένου να υπολογιστεί η συγκέντρωση του DNA στο κάθε δείγμα. Προκειμένου να σταλούν τα δείγματα για αλληλούχιση, η τελική συγκέντρωση έπρεπε να είναι 20 ng/μl και ο όγκος του δείγματος 30 μl. Επομένως μέσω του τύπου  $C1V1=C2V2$  υπολογίστηκε ο όγκος του κάθε δείγματος που έπρεπε να παρθεί. Ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώθηκε με αποστειρωμένο νερό.

### **2.11 Επεξεργασία αποτελεσμάτων αλληλούχισης**

Εφόσον λήφθηκαν οι αλληλουχίες και τα χρωματογραφήματα των δειγμάτων DNA που είχαν σταλεί για αλληλούχιση ακολούθησε η επεξεργασία τους με το πρόγραμμα MEGA X.

Αφού ανοιχτεί το πρόγραμμα στην επιλογή align επιλέγεται το edit/view sequencer files. Επιλέγεται μια αλληλουχία από forward primer και στην συνέχεια στην επιλογή data, επιλέγεται το export fasta file και γίνεται αποθήκευση της FASTA μορφής στην εφαρμογή σημειωματάριο. Στην συνέχεια ακολουθεί η ίδια διαδικασία για την αντίστοιχη αλληλουχία του reverse primer με την μόνη διαφορά ότι πριν γίνει το export fasta file πρέπει στο edit να επιλεγθεί το reverse compliment. Οι αλληλουχίες αποθηκεύονται στο ίδιο αρχείο. Σε δεύτερο στάδιο στις αλληλουχίες που έχουν ανοιχθεί στο MEGA X ελέγχονται για το πόσο καθαρά φαίνονται οι κορυφές και ότι είναι λάθος διορθώνεται. Στην αρχή και στο τέλος κάθε αλληλουχίας υπάρχει πιθανότητα να μην φαίνονται πολύ καθαρά οι κορυφές επομένως το σημείο που δεν είναι ξεκάθαρο επιλέγεται και αντιγράφεται. Στο αρχείο του σημειωματάρριου

βρίσκεται το σημείο αυτό και διαγράφεται από την αλληλουχία. Στο τρίτο βήμα γίνεται αναζήτηση στο διαδίκτυο του προγράμματος BLAST N. Όταν ανοίξει το πρόγραμμα επιλέγεται το align two or more sequences και στο πάνω πλαίσιο μεταφέρεται η διορθωμένη αλληλουχία του forward primer με αντιγραφή και επικόλληση και στο κάτω πλαίσιο μεταφέρεται η διορθωμένη αλληλουχία του reverse primer με τον ίδιο τρόπο. Επιλέγεται επίσης το somewhat similar sequences (BLASTN) και γίνεται BLAST. Αφού βγει το αποτέλεσμα επιλέγεται το alignments. Περίπου από την μέση της αλληλουχίας επιλέγεται μια κοινή αλληλουχία και στην συνέχεια ακολουθεί η αντιγραφή της στο έγγραφο που είναι αποθηκευμένες οι αλληλουχίες στην συνέχεια γίνεται επικόλληση. Αρχικά το τμήμα της αλληλουχίας βρίσκεται στην αλληλουχία του forward primer. Η αλληλουχία διατηρείται από την αρχή μέχρι και το επιλεγμένο τμήμα και το υπόλοιπο διαγράφεται. Στην συνέχεια πάλι δίνεται η εντολή control f και επικόλληση προκειμένου η αλληλουχία να βρεθεί και στον reverse primer. Στην αλληλουχία αυτή διαγράφεται η αρχή ως και το επιλεγμένο τμήμα, και τελικά τα δύο τμήματα που κρατήθηκαν ενώνονται. Στο τελευταίο στάδιο η νέα πλέον αλληλουχία μεταφέρεται με αντιγραφή και επικόλληση στο πρόγραμμα blast. Εφόσον βγουν τα αποτελέσματα επιλέγεται ο οργανισμός που πληροί τα καλύτερα κριτήρια.

## **2.12 Πειράματα in vivo με προνύμφες του εντόμου *Tenebrio molitor***

Οι δοκιμές διεξήχθησαν σε πληθυσμό από λάρβες του είδους *T. molitor* που είχαν περίπου το ίδιο μέγεθος. Οι λάρβες του ίδιου μεγέθους συλλέχθηκαν και η επιφάνεια τους αποστειρώθηκε. Η κάθε λάρβα εμβαπτίστηκε ξεχωριστά για 3 δευτερόλεπτα σε διάλυμα 3 % (v/v) NaClO και αμέσως μετά ξεπλύθηκαν 3 φορές σε αποστειρωμένο νερό. Τέλος οι λάρβες τοποθετήθηκαν σε διηθητικό χαρτί για να στεγνώσουν (Sandala D., Bohatá A. 2019). Η παρασκευή εναιωρήματος σπορίων έγινε με την προσθήκη 0,05% (w/v) Tween80 σε τρυβλία με τις ανεπτυγμένες αποικίες. Το μυκήλιο υπέστη απόξεση για να απελευθερωθούν τα σπόρια και στην συνέχεια φυλάχθηκε σε αποστειρωμένη γυάλινη φιάλη μέχρι την μόλυνση.

## **2.13 Μολυσματικότητα ενάντια στη λάρβα *T. Molitor***

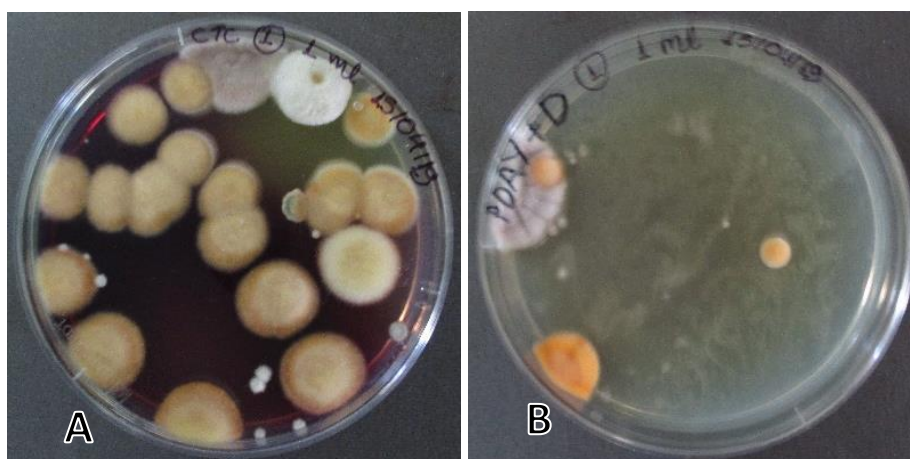
Για την μελέτη συλλέχθηκαν και αποστειρώθηκαν λάρβες του γένους *T. molitor*. 18 λάρβες βυθίστηκαν μεμονωμένα μέσα σε εναιώρημα σπορίων που περιείχε  $1,0 * 10^7 \text{ ml}^{-1}$  σπόρια για 3 δευτερόλεπτα και άλλες 3 λάρβες βυθίστηκαν σε διάλυμα 0,05% (w/v) Tween80, ως μάρτυρας. Το πλεόνασμα του εναιωρήματος στεγνώθηκε γρήγορα με αναρρόφηση από το

διηθητικό χαρτί. Οι λάρβες τοποθετήθηκαν ξεχωριστά σε τρυβλία σε 3 επαναλήψεις. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε τσάντες πολυαιθυλενίου για να αποτρέψουν την απώλεια νερού κατά την διάρκεια της επώασης. Η θνησιμότητα και η μυκητιακή ανάπτυξη αξιολογήθηκαν μετά τις 4 μέρες για πρώτη φορά και μετά καθημερινά μέχρι την 8<sup>η</sup> μέρα.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

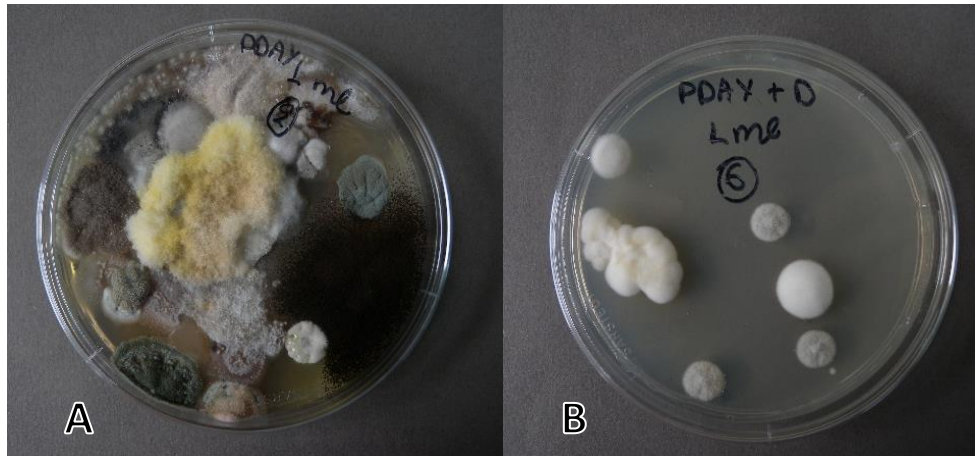
#### 3.1 Θρεπτικά υποστρώματα

Για την απομόνωση των μυκήτων, χρησιμοποιήθηκαν τρία θρεπτικά μέσα, PDAY, PDAY+D, και CTC. Καθώς έγινε σύγκριση των θρεπτικών μέσων που χρησιμοποιήθηκαν για την καλύτερη ανάπτυξη των εντομοπαθογόνων μυκήτων, τόσο το PDAY+D ( PDAY+Dodine )όσο και το CTC (PDAY+chloramphenicol, thiambendazole, cycloheximide) αποδείχτηκαν αποτελεσματικά στην εκλεκτική ανάπτυξη των εντομοπαθογόνων μυκήτων αποτρέποντας την ανάπτυξη μυκήτων που αναπτύσσονται γρηγορότερα. Μεταξύ των δύο μέσων που περιείχαν τα αντιβιοτικά καλύτερο θεωρήθηκε το CTC καθώς επέτρεψε την ανάπτυξη μυκήτων του γένους *Auxathron*, ενώ στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε dodine οι μύκητες του γένους αυτού αναπτύχθηκαν ελάχιστα (Εικόνα 3.1). Στα τρυβλία που περιείχαν PDAY αναπτύχθηκαν ελάχιστες αποικίες εντομοπαθογόνων μυκήτων οι οποίες ήταν σχεδόν αδύνατο να απομονωθούν και να καλλιεργηθούν εκ νέου, καθώς είχαν καλυφθεί από άλλους μύκητες ταχύτερης ανάπτυξης (π.χ. ζυγομύκητες) (Εικόνα 3.2). Επίσης αφού συγκρίθηκαν δύο ποσότητες εμβολίου χόματος 0,5 και 1 ml, καλύτερη ποσότητα εμβολίου αποφασίστηκε ότι είναι το 1 ml καθώς δίνει περισσότερες αποικίες, επομένως μπορεί να υπάρξει καλύτερη συγκρισιμότητα και ανάμεσα στα δείγματα των χωμάτων που προέρχονται από διαφορετικές περιοχές και δένδρα. Σε πείραμα που έλαβε χώρα με χώμα του οποίου η δειγματοληψία είχε προηγηθεί περίπου ένα μήνα πριν, χωρίς να φυλαχθεί στο ψυγείο και χρησιμοποιήθηκε dodine που είχε φυλαχθεί από προηγούμενο πείραμα σε κωνική φιάλη κλεισμένη με parafilm δεν υπήρξε ιδιαίτερη ανάπτυξη εντομοπαθογόνων μυκήτων (Εικόνα 3.1).



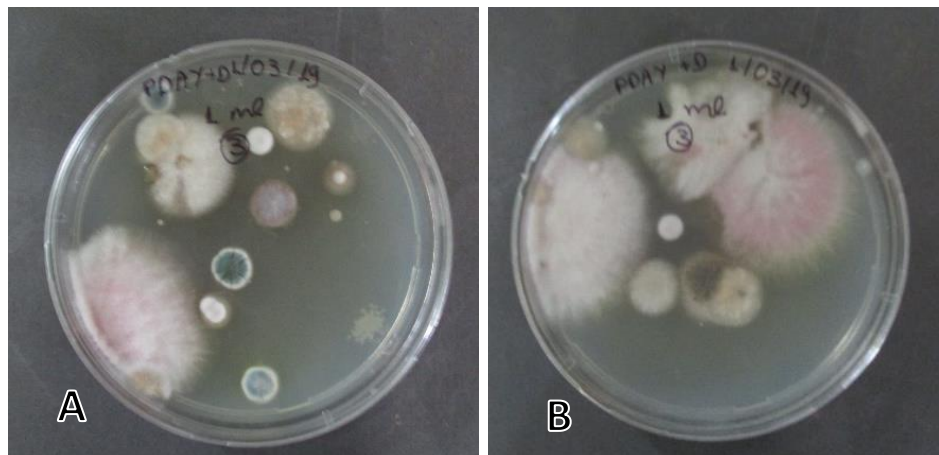
Εικόνα 3.1 (A+B): Σύγκριση τρυβλίων σχετικά με την ανάπτυξη του γένους *Auxathron*

Στην εικόνα 3.1A παρατηρείται η ανάπτυξη του γένους με εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα CTC ενώ στην εικόνα 3.1B παρατηρείται η ανάπτυξη του γένους, με εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα PDAY+D



**Εικόνα 3.2 (A+B): Σύγκριση των 2 θρεπτικών υποστρωμάτων**

Στην εικόνα 3.2A παρουσιάζεται θρεπτικό υπόστρωμα PDAY χωρίς κάποιο αντιβιοτικό. Στην εικόνα 3.2B παρουσιάζεται θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει PDAY+D.



**Εικόνα 3.3 (A+B): Αδυναμία ανάπτυξης εντομοπαθογόνων μυκήτων σε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα PDAY +D όπου η dodine είχε μείνει για μεγάλο χρονικό διάστημα σε κωνική φιάλη κλεισμένη με parafilm και η δειγματοληψία του χόματος για τον εμβολισμό είχε γίνει περίπου ένα μήνα πριν.**



### 3.2 Απομόνωση στελεχών

Από τον εμβολιασμό του χώματος και μετά από τις κατάλληλες αραιώσεις (1/5000), απομονώθηκαν στελέχη του γένους *Beauveria*, *Raecilomyces* καθώς και κάποια άλλα γένη που δεν μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν μορφολογικά ή μικροσκοπικά (Πίνακας 3.1).

**Πίνακας 3.1:** Στελέχη που απομονώθηκαν

ATHUM	ΚΩΔΙΚΟΣ	ΓΕΝΟΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΒΛΑΣΤΗΣΗ	ΣΥΛΛΟΓΗ ΧΩΜΑΤΟΣ	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ
10117	ΚΕ4	<i>Beauveria bassiana</i>	Αχέροντας	<i>P. orientalis</i>	Π.Τσόπελας	Ζ.Γκόνου
10118	ΚΕ8	<i>Απροδιόριστο 1</i>	Αχέροντας	<i>P. orientalis</i>	Π.Τσόπελας	Ζ.Γκόνου
10119	ΚΕ13	<i>Raecilomyces Sp.</i>	Αχέροντας	<i>P. orientalis</i>	Π.Τσόπελας	Ζ.Γκόνου
10120	ΚΕ21	<i>Clonostachys rosea</i>	Αχέροντας	<i>P. orientalis</i>	Π.Τσόπελας	Ζ.Γκόνου
10121	ΚΕ42	<i>Beauveria tenella</i>	Αχέροντας	<i>P. orientalis</i>	Π.Τσόπελας	Ζ.Γκόνου
10122	ΚΕ43	<i>Απροδιόριστο 2</i>	Αχέροντας	<i>P. orientalis</i>	Π.Τσόπελας	Ζ.Γκόνου
10123	ΚΕ45	<i>B.bassiana</i>	Αχέροντας	<i>P. orientalis</i>	Π.Τσόπελας	Ζ.Γκόνου
10124	ΚΕ51	<i>Raecilomyces Sp.</i>	Αχέροντας	<i>P. orientalis</i>	Π.Τσόπελας	Ζ.Γκόνου
10125	ΚΕ52	<i>B.tenella</i>	Αχέροντας	<i>P. orientalis</i>	Π.Τσόπελας	Ζ.Γκόνου
10126	ΚΕ53	<i>B.tenella</i>	Αχέροντας	<i>P. orientalis</i>	Π.Τσόπελας	Ζ.Γκόνου
10127	ΚΕ55	<i>B. tenella</i>	Αχέροντας	<i>P. orientalis</i>	Π.Τσόπελας	Ζ.Γκόνου
10128	ΚΕ57	<i>Raecilomyces Sp.</i>	Αχέροντας	<i>P. orientalis</i>	Π.Τσόπελας	Ζ.Γκόνου

10129	KE130	<i>Paecilomyces Sp.</i>	Αχέροντας	<i>P. orientalis</i>	Π.Τσόπελας	Ε. Καλτσούδα
10130	KE134	<i>B. bassiana</i>	Αχέροντας	<i>P. orientalis</i>	Π.Τσόπελας	Ε. Καλτσούδα
10131	KE200	<i>Phoma herbarum</i>	Καισαριανή	<i>C. sempervirens</i>	Ζ.Γκόνου	Ε. Καλτσούδα
10132	KE202	<i>P. herbarum</i>	Καισαριανή	<i>C. sempervirens</i>	Ζ.Γκόνου	Ε. Καλτσούδα
10133	KE203	<i>Paecilomyces Sp.</i>	Καισαριανή	<i>C. sempervirens</i>	Ζ.Γκόνου	Ε. Καλτσούδα
10134	KE204	<i>B. bassiana</i>	Καισαριανή	<i>C. sempervirens</i>	Ζ.Γκόνου	Ε. Καλτσούδα
10135	KE207	<i>Paecilomyces Sp</i>	Καισαριανή	<i>C. sempervirens</i>	Ζ.Γκόνου	Ε. Καλτσούδα
10151	KE208	<i>Cephalotrichum asperulum</i>	Βοτανικός κήπος Διομήδους	<i>C. sempervirens</i>	Ε. Καλτσούδα	Ε. Καλτσούδα
10136	KE209	<i>B. bassiana</i>	Βοτανικός κήπος Διομήδους	<i>C. sempervirens</i>	Ε. Καλτσούδα	Ε. Καλτσούδα
10137	KE210	<i>Auxathron ostraviense</i>	Βοτανικός κήπος Διομήδους	<i>C. sempervirens</i>	Ε. Καλτσούδα	Ε. Καλτσούδα
10138	KE212	<i>A. ostraviense</i>	Βοτανικός κήπος Διομήδους	<i>C. sempervirens</i>	Ε. Καλτσούδα	Ε. Καλτσούδα

10139	KE213	<i>Beauveria</i> <i>Sp.</i>	Βοτανικός κήπος Διομήδους	<i>C.</i> <i>sempervirens</i>	Ε. Καλτσούδα	Ε. Καλτσούδα
10140	KE214	<i>Απροσδιόριστο</i> <i>3</i>	Βοτανικός κήπος Διομήδους	<i>C.</i> <i>sempervirens</i>	Ε. Καλτσούδα	Ε. Καλτσούδα
10141	KE215	<i>Paecilomyces</i> <i>Sp</i>	Βοτανικός κήπος Διομήδους	<i>C.</i> <i>sempervirens</i>	Ε. Καλτσούδα	Ε. Καλτσούδα
10142	KE216	<i>Paecilomyces</i> <i>Sp</i>	Βοτανικός κήπος Διομήδους	<i>C.</i> <i>sempervirens</i>	Ε. Καλτσούδα	Ε. Καλτσούδα
10143	KE217	<i>C. rosea</i>	Βοτανικός κήπος Διομήδους	<i>C.</i> <i>sempervirens</i>	Ε. Καλτσούδα	Ε. Καλτσούδα
10144	KE219	<i>Paecilomyces</i> <i>Sp</i>	Βοτανικός κήπος Διομήδους	<i>C.</i> <i>sempervirens</i>	Ε. Καλτσούδα	Ε. Καλτσούδα
10145	KE220	<i>Paecilomyces</i> <i>Sp</i>	Βοτανικός κήπος Διομήδους	<i>C.</i> <i>sempervirens</i>	Ε. Καλτσούδα	Ε. Καλτσούδα
10146	KE221	<i>Paecilomyces</i> <i>Sp</i>	Αχέροντας	<i>P. orientalis</i>	Π.Τσόπελας	Ζ.Γκόνου
10147	KE222	<i>B. bassiana</i>	Βοτανικός κήπος Διομήδους	<i>C.</i> <i>sempervirens</i>	Ε. Καλτσούδα	Ε. Καλτσούδα
10148	KE227	<i>B. bassiana</i>	Αχέροντας	<i>P. orientalis</i>	Π.Τσόπελας	Ε. Καλτσούδα

10149	KE229	<i>B. tenella</i>	Καισαριανή	<i>C. sempervirens</i>	Z.Γκόνου	Ε. Καλτσούδα
10150	KE233	<i>B. tenella</i>	Καισαριανή	<i>C. sempervirens</i>	Z.Γκόνου	Ε. Καλτσούδα

### 3.3 Απομόνωση αποικιών

Από τις αποικίες που απομονώθηκαν έγινε διαχωρισμός σε εντομοπαθογόνους μύκητες και μη. Γενικά, μετά τον εμβολιασμό του χώματος έγινε απομόνωση εντομοπαθογόνων μυκήτων με παρόμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά προκειμένου να συγκριθούν, αλλά και με διαφορετικά χαρακτηριστικά. Από τους μύκητες που δεν κατατάσσονται στην κατηγορία των εντομοπαθογόνων μυκήτων απομονώθηκαν κάποιοι οι οποίοι δεν μπορούσαν να προσδιοριστούν μορφολογικά προκειμένου να γίνει προσδιορισμός έστω του γένους είτε μικροσκοπικά, είτε μοριακά, καθώς και να μελετηθούν περαιτέρω χαρακτηριστικά. Από εντομοπαθογόνους μύκητες απομονώθηκαν κυρίως γένη *Beauveria* και *Paecilomyces*. Όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν, διατηρήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν PDAY και φυλάχθηκαν στους -20°C. Από το γένος *Paecilomyces* παρατηρήθηκε ίδια μορφολογία στην αποικία με την διαφορά ότι άλλαζε χρωματικά το κάτω μέρος της αποικίας:

- ✓ Στην πρώτη κατηγορία παρατηρήθηκε υποκίτρινο χρώμα με καφέ σκούρο στο κέντρο της αποικίας
- ✓ Στην δεύτερη κατηγορία παρατηρήθηκε κόκκινο χρώμα
- ✓ Και στην τρίτη αποικία παρατηρήθηκε κίτρινο χρώμα

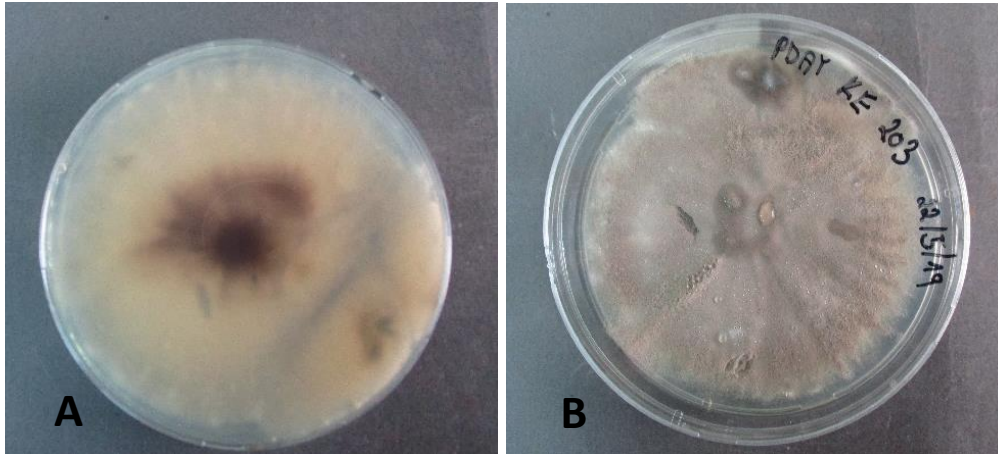
Όσον αφορά το γένος *Beauveria* παρατηρήθηκαν αρκετές μορφολογικές διαφορές.

### 3.4 Χαρακτηρισμός αποικιών

ATHU-M 10119 (KE13), ATHU-M 101124 (KE51), ATHU-M 10129(KE130), ATHU-M 10133 (KE203): *Paecilomyces sp.*

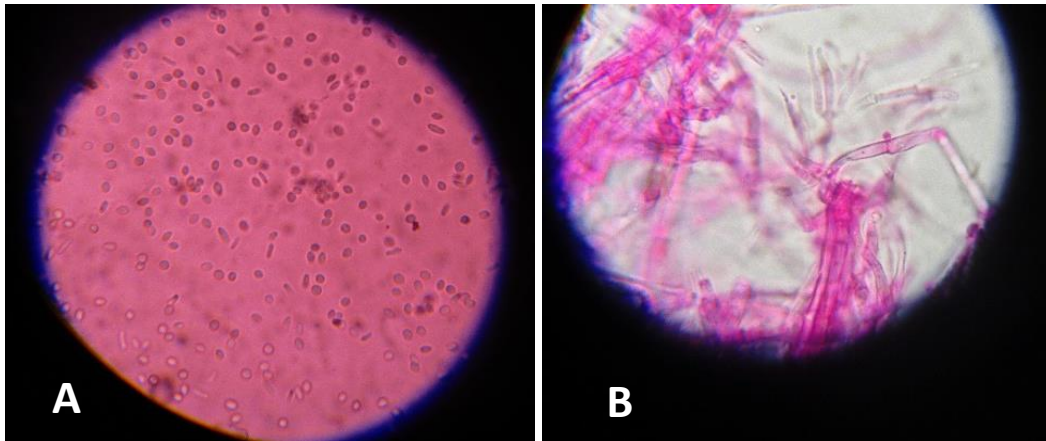
Δείγματα: στο έδαφος, *Platanus orientalis* Αχέροντας Παναγιώτης Τσοπελας ATHU-M 10119 (KE13), ATHU-M 101124 (KE51), ATHU-M 10129(KE130) • ATHU-M 10133 (KE203): έδαφος *Cupressus Supervirens*. Καισαριανή Z. Γκόνου

Μορφολογικά: **αποικία** με αργό ρυθμό ανάπτυξης **μυκήλιο** χαρακτηριστικό ροζ-μωβ χρώμα, και κοκκώδη υφή, κάτω **επιφάνεια υποστρώματος** υπόλευκο χρώμα στο κέντρο της αποικίας καφέ σκούρο (Εικόνα 3.4).



**Εικόνα 3.4 (A+B):** Μορφολογικά χαρακτηριστικά της πρώτης κατηγορίας *Raecilomyces*, όπου το κάτω μέρος του μυκηλίου είναι μπεζ.

- ✓ (ATHU-M 10119)KE13:Μικροσκοπικά: **σπόρια**, επιμήκη 4-5 \* 1.5-2 μm και σφαιρικά (2.1-)2,5(-2,8-)3\*(1.8-)2(-2.1) από τμήμα του παρασκευάσματος στην άκρη του μυκηλίου, ενώ σε παρασκεύασμα από το κέντρο του μυκηλίου παρουσία κυρίως σφαιρικών σπορίων (2.1-ν)2.5-3\*(1.5-)2(-2.2) και ελάχιστα επιμήκη. **Υφές:** 2-2.1 μm **κονιδιογόνα κύτταρα** :5- 6-7 \* 2 μm (εικόνα 3.5 A, B).
- ✓ ATHU-M101124 KE51:Μικροσκοπικά: **Σπόρια** (2.2-)2.5(-2.8)-3\* 2(-2.1-)(-2.2-)(-2.5) μm, **Υφές:**(1.5)-2-3 μm. **Κονιδιογόνα:**5-6\*1,5-2 μm.
- ✓ (ATHU-M 10129): KE130 Μικροσκοπικά Το παρασκεύασμα από το άκρη της αποικίας: **Σπόρια:** σφαιρικά (2.5-)3\*2-2.5(-2.8) και επιμήκη 4-5\*1(-1.2-)(-1.5). Τμήμα του μυκηλίου από το κέντρο, απουσία από επιμήκη σπόρια, ενώ τα σφαιρικά :(2,5-)3\*(1,8-)2(-2.1) μm. **Υφές** (1.5-)(-1.2)-1.8-2 μm, **κονιδιογόνα κύτταρα** 8-2μm..
- ✓ ATHU-M 10133 (KE203):Μικροσκοπικά: **Σπόρια** σφαιρικά 2,8-3\*2(-2,1) και επιμήκη 4(-4.2-)(-6-)\*(1-)1.2(-1.5). Από παρασκεύασμα από την άκρη της αποικίας παρουσία μόνο σφαιρικών σπορίων (2.2-)(-2.5-)3\*(1.8-)2 μm. **Υφές** (2,2-)3 μm **κονιδιογόνα κύτταρα** 6(-7-)(-8)\*2(-2.1) μm.



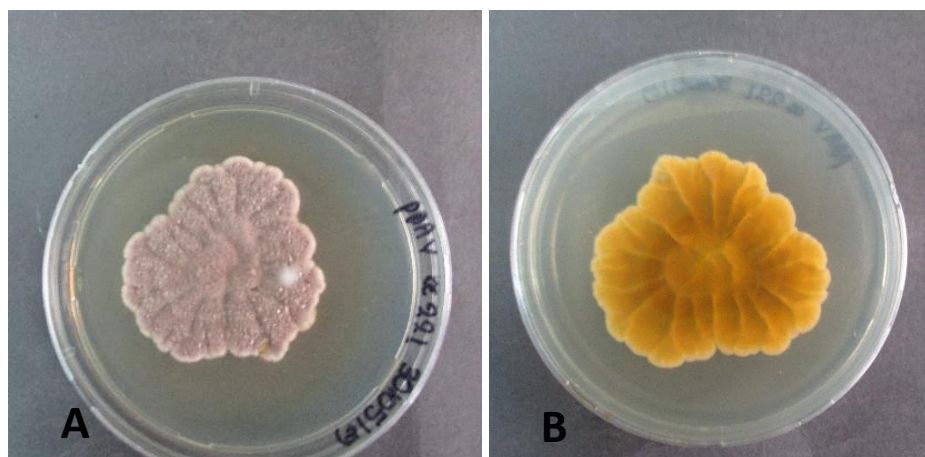
**Εικόνα 3.5 (A+B):** Μικροσκοπική μελέτη *Paecilomyces* sp.:

A) Σπόρια *Paecilomyces* sp.. επιμήκη και σφαιρικά B) Κονιδιογόνα κύτταρα *Paecilomyces* sp..

ATHU-M 10128 (KE 57), ATHU-M 10146(KE221), ATHU-M 10135(KE207), ATHU-M 10142 (KE216): *Paecilomyces* sp.:

Δειγмата: έδαφος *P. orientalis*, Αχέροντας Π. Τσόπελας, ATHU-M 10128 (KE 57), ATHU-M 10146(KE221)• έδαφος, *C. Supervirens*, Βοτανικός κήπος Διομήδους (Χαϊδάρι) Ε. Καλτσούδα ATHU-M 10135(KE207), ATHU-M 10142 (KE216)

Μορφολογικά: Αποικία με αργό ρυθμό ανάπτυξης μυκήλιο ροζ-μωβ χρώμα και κοκκώδη υφή, πιεσμένο στην επιφάνεια του υποστρώματος, κάτω επιφάνεια υποστρώματος κίτρινο χρώμα (Εικόνα 3.6).



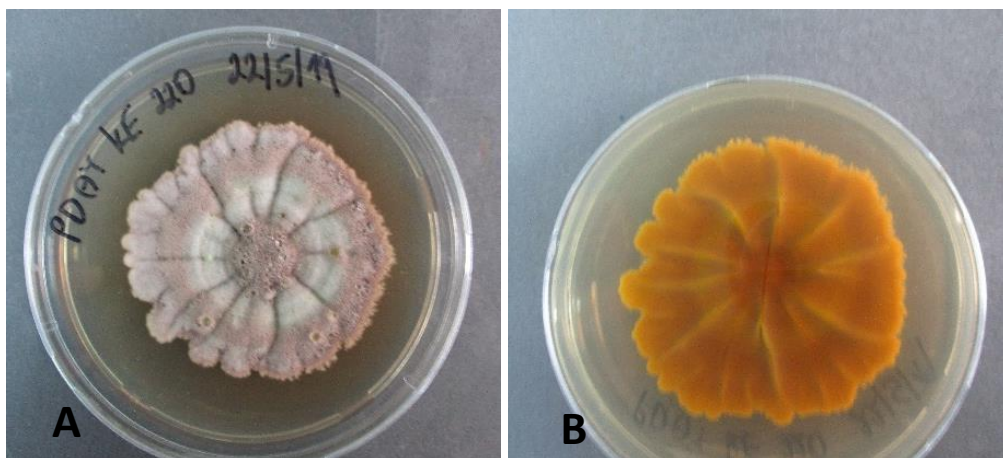
**Εικόνα 3.6 (A+B):** Κατηγορία του γένους *Paecilomyces* η οποία παρουσιάζει κίτρινο χρώμα στην κάτω όψη του τρυβλίου

- ✓ ATHU-M 10128 (KE57):Μικροσκοπικά: **Σπόρια** (2-)3-4\*(1.8-)(-2.2-)(-2.5-)3 μm, υφές (1,5-)1.8-2 μm **κονιδιογόνα κύτταρα** (4-)(-5-)7-\*2-2,5 μm.
- ✓ ATHU-M 10135(KE207): Μικροσκοπικά: παρασκεύασμα από την άκρη της αποικίας: **σπόρια** σφαιρικά 2.2(-2.8-)3\* (1.8-)2(-2.1)μm και επιμήκη (4-)4.8-5\*(1.2-)1.5-2 μm. Σε παρασκεύασμα από το κέντρο της αποικίας **σπόρια** σφαιρικά (2-)2.2-2.5(-2.8-)3\*(1.2-)(-1.5-)1.8-2 μm. **Υφές** (1.2-) (-1.8-)2μm, **κονιδιογόνα κύτταρα** 6(-7-)8\*1-1.2(-1.5-)2-2.1 μm.
- ✓ ATHU-M 10142 (KE216) Μικροσκοπικά: παρασκεύασμα από την άκρη της αποικίας **σπόρια** σφαιρικά (2.5-)3-3.2(-3.5)\*2-2.5-3 μm και επιμήκη (7-)(-8-)(-10-)(-11)\*2(-2.5-)3(-3.1-)(-3.5) παρασκεύασμα από το κέντρο της αποικίας, σφαιρικά: 2-2.5-3\*(1.5-)(-1.8-)2(-2.1-)2.5 μm και επιμήκη: (5-)(-6-)(-10-)(-13-)(-14)\*2-(2.5)-3-(4). **Υφές** (1-)(1.2)-1.5-2 μm, **κονιδιογόνα κύτταρα** (5-)(-5.5-)6(-7-)(-7.3) \* 1.2-2(-3) μm.
- ✓ ATHU-M 10146(KE221): Μικροσκοπικά: **Σπόρια** σφαιρικά και επιμήκη ελαφρώς ελλειψοειδές σχήμα, στο κέντρο σφαιρικά: 2-2.1(-2.2-)(-2.5-)(-3) \* (1,5-)1.8 -2-2,2 μm, επιμήκη: 4(-5-)(-8) \* 1.2-2 μm και στην άκρη σφαιρικά: (2,1-)(-2.2-)(-2.5-)2.8-3 \* 2(-2.1-)(-2.5) μm, επιμήκη: 4(-5) \* 1.2-2(-2.1) μm). **Υφές** (1.5-)2(-2.1) μm **κονιδιογόνα κύτταρα** 6(-6.5-)(-7) \*(1.8-)2 μm.

ATHU-M 10141 (KE 215), 10144 (KE 219), 10145(KE220) *Paecilomyces sp.*

Δείγματα *C. sempervirens* Βοτανικός κήπος Διομήδους (Χαϊδάρη) Ε. Καλτσούδα ATHU-M 10141 (KE 215), 10144 (KE 219), 10145(KE220)

Μορφολογικά: Αποικία με αργό ρυθμό ανάπτυξης ροζ- μωβ χρώμα και κοκκώδη υφή πιεσμένο στην επιφάνεια του υποστρώματος, κάτω επιφάνεια υποστρώματος χρώμα (Εικόνα 3.7).



**Εικόνα 3.7 (A+B):** Απεικόνιση τρίτης κατηγορίας μυκήτων όπου το κάτω μέρος της αποικίας φαίνεται πιο κοκκινωπό

- ✓ ATHU-M 10141 (KE 215):Μικροσκοπικά: σε παρασκεύασμα από την άκρη της αποικίας **σπόρια** σφαιρικά  $(2,1-)2.5(-2.8-)3*(1.9-)2-2,8$  μm και επιμήκη  $3(-3.2-)4-5*1.5-(1.8)$  μm.. Από το παρασκεύασμα του κέντρου παρουσία επίσης από σφαιρικά  $2-2.2-2.5*1,5-1.8-2$  μm και επιμήκη  $(3-)3.2(-3.5-)(-3.8)*1-1,2$  μm σπόρια. **Υφές** 2-3 μm , **κονιδιογόνα κύτταρα**  $6-7*(1.2-)(-1.8-)2$  μm.Υπαρξη συννημάτων.
- ✓ ATHU-M 10144 (KE 219): Μικροσκοπικά: Σε παρασκεύασμα από την άκρη της αποικίας **σπόρια** σφαιρικά  $2,5-3 * (1,8-)2-2,5$  μm και επιμήκη  $4-5(-5.2-)(-5.5-)(9) * (1,1-)(-1.2-)1.8(-2)$  μm, σε παρασκεύασμα από το κέντρο της αποικίας **σπόρια** μόνο σφαιρικά  $(2-)2.5-3*1,5-1.8-2(-2.1)$  και ελάχιστα επιμήκη. **Υφές**  $(1,1-)(-1,3-)(-1,5-)(-1,8-)2$  μm **κονιδιογόνα κύτταρα**  $(6,9-)7-8-9 * 1,5(-1,8-)2$  μm.
- ✓ 10145(KE220)Μικροσκοπικά: **Σπόρια** σφαιρικά και επιμήκη σε παρασκεύασμα από το κέντρο σφαιρικά:  $(2.1-)(-2.2-)2.5-3 *(1.8-)2$  μm, επιμήκη:  $(3-)(-3.2-)(-3.5-)(-3.8-)4(-5)*1-1.2$  και από την άκρη της αποικίας σφαιρικά:  $(2.1)(-2-)3 * 2-2,1$  επιμήκη:  $(3.3-)(-3.8-)4(-4.8-)(-4.9) *0.8-2.1$  μm ). **Υφές**  $(1.5-)2(-2.1-)(-2.2-)3$  μm **κονιδιογόνα κύτταρα**  $(6-)(-7-)(-8-)(-9-)(-10) *(1.3-)1,8(-1.9-)2(-2.1)$  μm.

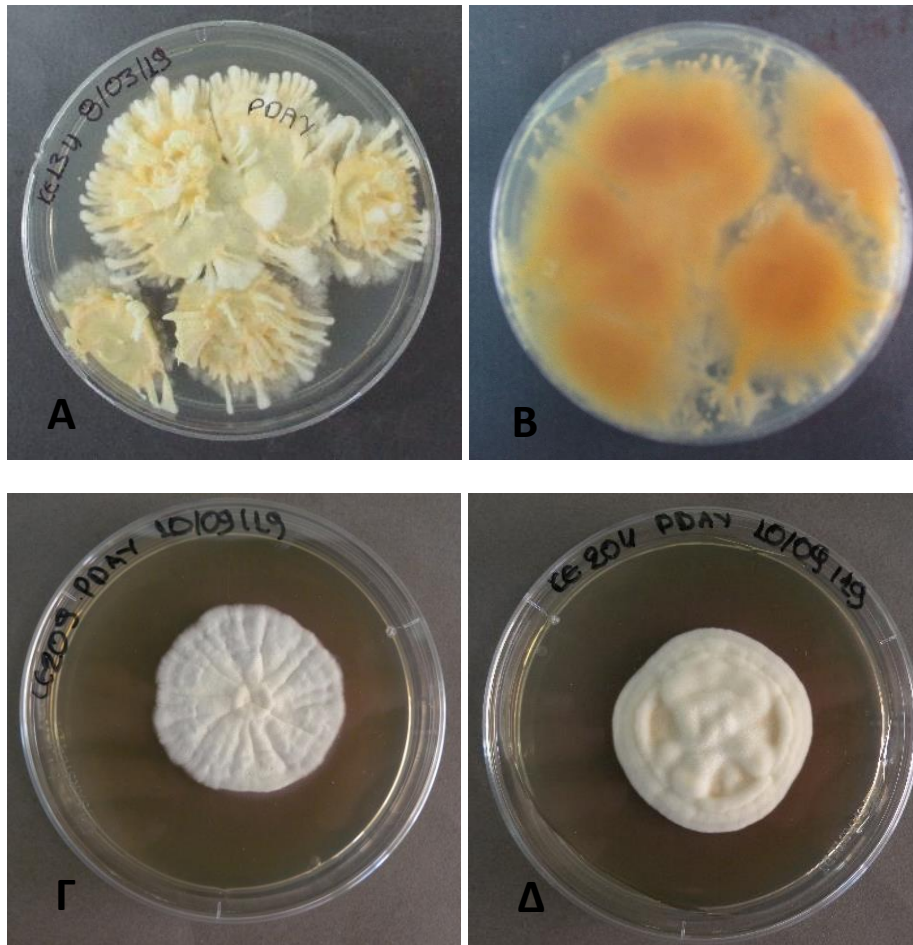
ATHU-M 10117 (KE4), ATHU-M 10123(KE45), ATHU-M 10130(KE 134) ATHU-M 10134 (KE 204), ATHU-M 10134 (KE209), ATHU-M 10147 (KE222) ATHU-M 10148 (KE227): B. bassiana:

Δείγματα: έδαφος, *P. orientalis*, Αχέροντας Π.Τσόπελας, ATHU-M 10117 (KE4), ATHU-M 10123(KE45), ATHU-M 10130(KE 134) ATHU-M 10148 (KE227)• έδαφος *C. sempervirens* Καισαριανή Ζ. Γκόνου έδαφος ATHU-M 10134 (KE 204)• *C. sempervirens* Βοτανικό κήπο Διομήδους (Χαϊδάρη) Ε. Καλτσούδα ATHU-M 10134 (KE209), ATHU-M 10147 (KE222)

Μορφολογικά: Αποικία με αργό ρυθμό ανάπτυξης. Στις τρεις πρώτες μέρες **διάμετρος** 1,5 εκατοστά περίπου, με χνουδωτή **υφή**, λευκό **χρώμα**. Στις 7 μέρες **διάμετρος** της αποικίας 2,6 εκατοστά, **χρώμα** λευκό προς την άκρη και κιτρινωπό προς το κέντρο. Η **υφή** της αποικίας βελούδινη και ελαφρώς διογκωμένη προς το κέντρο. Περιμετρικά της αποικίας σκουρόχρωμος μεταβολίτης παρόντας, **απόσταση** του μεταβολίτη από την αποικία 0,6 εκατοστά. Στις 14 μέρες ανάπτυξης το **χρώμα** της αποικίας κιτρινωπό (4D ΚΑΙ 3C) και προς την άκρη λευκό. Αποικία υπερυψωμένη σε σχέση με το θρεπτικό μέσο, και τόσο στο κάτω μέρος της αποικίας όσο και περιμετρικά, κόκκινος μεταβολίτης σε απόσταση περίπου 0,8 εκατοστά παρόντας. **Υφή** βελούδινη. Στον ένα μήνα ανάπτυξης **διάμετρος** της αποικίας 5,5 εκατοστά, **χρώμα** κιτρινωπό, ύπαρξη κίτρινων σταγονιδίων στο πάνω μέρος του μυκηλίου. Μυκηλιακές δεσμίδες σε σχήμα ακτίνων κατά μήκος του μυκηλίου. Μυκήλιο πιεσμένο στο θρεπτικό, σε ορισμένα



στελέχη παρουσία συννημάτων (Εικόνα 3.8) ενώ σε άλλα απουσία αυτών. Σε στελέχη με συννήματα, ταχύτερη ανάπτυξη συννημάτων παρουσία άλλων αποικιών. (Εικόνα 3.9).



**Εικόνα 3.8 (A+B+Γ+Δ):**Μορφολογικές διαφορές του γένους *B.bassiana*

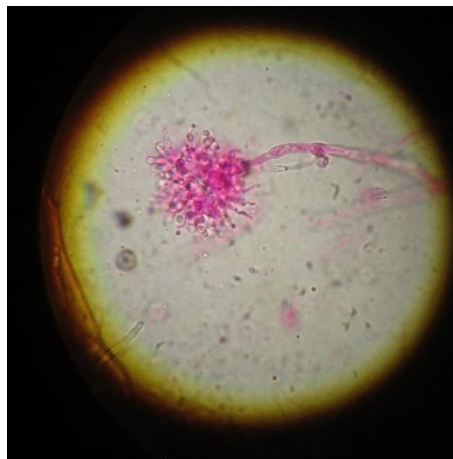


**Εικόνα 3.9:** Παρατήρηση ταχύτερης ανάπτυξης συννημάτων όταν υπάρχει ανταγωνισμός ανάπτυξης

- ✓ ΑΤΗΥ-Μ 10117 (ΚΕ4) Μικροσκοπικά **Σπόρια** κυρίως σφαιρικά (2.5-3)(-3.2)\*2(-2.1-)(-2.9-) $3 \mu\text{m}$  αλλά και ελάχιστα, πιο επιμήκη 4-5\*2-2.5  $\mu\text{m}$ . **Υφές** 2.5(-2.9-) $3(-3.5-)(-4) \mu\text{m}$  **κονιδιογόνα κύτταρα** 5(-7)\*(1,5-) $2 \mu\text{m}$  εκ των οποίων τα περισσότερα μεμονωμένα και όχι σε συμπλέγματα (εικόνα 3.10). Σε κάποια από τα κονιδιογόνα κύτταρα απουσία ραχίδων ενώ μέγεθος μετρηθέντων 2-5  $\mu\text{m}$  οδοντωτού σχήματος (εικόνα 3.11).

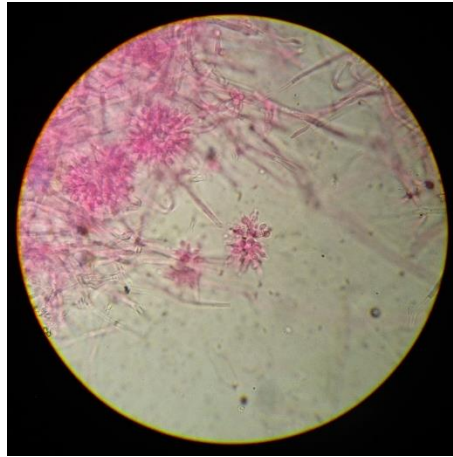


**Εικόνα 3.10:** Μεμονωμένα κονιδιογόνα κύτταρα *beauveria*



**Εικόνα 3.11:** Απεικόνιση κονιδιογόνων κυττάρων σε συμπλέγματα με οδοντωτές ραχίδες

- ✓ ΑΤΗΥ-Μ 10123(ΚΕ45) Μικροσκοπικά: **Σπόρια** σφαιρικά (2-)2.5-3\*2(-2.2-)2.5  $\mu\text{m}$ . **Υφές** 1.2-1.5(-1.8-) $2(-3) \mu\text{m}$  **κονιδιογόνα κύτταρα** είναι 3-3.3-3.5\*2-2.5. Πολλά από τα κονιδιογόνα κύτταρα δεν είχαν ραχίδες, ενώ όσες μετρήθηκαν είχαν μέγεθος, 2  $\mu\text{m}$ , οδοντωτού σχήματος (εικόνα 3.12).



**Εικόνα 3.12:** Μικροσκοπική απεικόνιση των κονιδιογόνων κυττάρων του στελέχους ΕΚ45, όπου τα κονιδιογόνα κύτταρα δεν αναπτύσσουν ραχίδες, και όσες παρατηρήθηκαν είναι μικρού μεγέθους

- ✓ ΑΤΗΥ-Μ 10130(ΚΕ 134):Μικροσκοπικά: **Σπόρια** σφαιρικά, κάποια ελαφρώς πιο επιμήκη σχηματίζοντας μια μύτη σε ένα από τα δύο άκρα 2.2-3(-3.5)\*2.1(-2.5-)3 μm. **Υφές** 2.5-(2.9)-3 μm **κονιδιογόνα κύτταρα** (2.5)-3\* (1.8-)2(-2.5-)3 μm. Στα περισσότερα από αυτά παρουσία ραχίδων, οδοντωτού σχήματος 1-2 μm.
- ✓ ΑΤΗΥ-Μ 10134 (ΚΕ 204) **Σπόρια** σφαιρικά/ subsherial με μέγεθος (2,9-)3-3.1-(3.5)\*(2.5-)2.9-3 μm **υφές** (2.1-)2,5-3 μm. Στα **κονιδιογόνα κύτταρα** παρουσία 3-4 υαλώδων κυττάρων μαζί με μέγεθος 3(-4) \*(1.8-)(-1.9)-2-2.5, ορισμένα φέροντας **ράχες** οδοντωτού σχήματος και μεγέθους (1-)2-3 μm.
- ✓ ΑΤΗΥ-Μ 10134 (ΚΕ209): Παρουσία από επιμήκη **σπόρια** μεγέθους (3)-4-(5)\*(2,8)-3-(4) μm και σφαιρικά σπόρια με μέγεθος 2-2.2-(3)\*(1,8)-2-(2,2) μm. **Υφές** (1.5)-2 μm. Κονιδιογόνα κύτταρα 2-(3)-(4)\*(1,5)-1,8-2 μm με ράχες οδοντωτού σχήματος μεγέθους (3)-(4,8) μm.
- ✓ ΑΤΗΥ-Μ 10147 (ΚΕ222): **Σπόρια** σφαιρικά/ subsherial σχηματίζοντας μύτη σε μία από τις δύο πλευρές τους με μέγεθος 3-3,1(-3.2-)(-3.5-)(-4)\*(2.5-)(-2.8+)3(-3.5). **Υφές** (1.5-)(-1,8-)2(-2.5) μm. **Κονιδιογόνα κύτταρα** 3-4\*(2-)2.5-2.8-3 στην πλειοψηφία τους σε συμπλέγματα, παρουσία και μεμονωμένων. Ράχες οδοντωτού σχήματος 2-3 μm, απουσία ραχίδων ορισμένα κονιδιογόνα κύτταρα.
- ✓ ΑΤΗΥ-Μ10148 (ΚΕ227): Σπόρια ελαφρώς επιμήκη, με μύτη στην μία πλευρά (2.1-)2,5-2.8-3(-3.1)\*2-2,5(-2.8-)(-2.9) μm. **Υφές** (1.5-)1.8-2(-2.1-)(-2.2-)3 μm. Κονιδιογόνα κύτταρα συνήθως σε μορφή συμπλεγμάτων, παρουσία και μεμονωμένων φιαλιδίων, με μέγεθος (3.5-)4-5\*(1.8-)2(-2,2-)(-2.5) μm. Επιπλέον απουσία ραχίδων από ορισμένα κονιδιογόνα κύτταρα μεγέθους μετρηθέντων (2-)(-4-)(-5-)(-15)\*0.5-0.8-1 μm.

Βάση της εργασίας phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria* (Rhener et al) οι μετρήσεις των σπορίων για την *B. bassiana* είναι 2-3\*2-3

ATHU-M 10121 (KE42), ATHU-M 10125(KE 52) ATHU-M 10126 (KE 53) ATHU-M 10127 (KE 55), ATHU-M 10149(KE 229), ATHU-M 10150 (KE 233): *B. tenella*:

Δείγματα: έδαφος, *P. orientalis* Αχέροντας Π. Τσόπελας, ATHU-M 10121 (KE42), ATHU-M 10125(KE 52) ATHU-M 10126 (KE 53) ATHU-M 10127 (KE 55), ATHU-M 10149(KE 229), ATHU-M 10150 (KE 233)

Μορφολογικά: Αποικία με αργό ρυθμό ανάπτυξης Κατά τις πρώτες 3 μέρες ελαχιστη ανάπτυξη Κατά την πάροδο των 7 ημερών **διάμετρος** της αποικίας 1,7 εκατοστά **χρώματος** λευκού καθώς με υφή βελούδινη, αποικία βυθισμένη στο υπόστρωμα. Στις 14 μέρες ανάπτυξης **διάμετρος** αποικίας 3,8 εκατοστά, χρώμα κίτρινο προς το κέντρο και λευκό στις άκρες ( 2B, 3C) με μυκηλιακές δεσμίδες σε ακτινωτή διάταξη με παράλληλη παρουσία μεταβολίτη μόνο περιμετρικά της αποικίας σε απόσταση 0,5 εκατοστά. **Υφή** βελούδινη και αποικία κοντά στο υπόστρωμα. Μετά από ένα μήνα ανάπτυξης **διάμετρος** 7 εκατοστά. Προς το κέντρο **χρώμα** ροζ, (εικόνα 3.13). **Υφή** βελούδινη κάτω επιφάνεια υποστρώματος πορτοκαλί.

- ✓ ATHU-M 10121 (KE42)Μικροσκοπικά: Σπόρια σφαιρικά- subshpherical 2.8(-2.9-)3\*2-2.1-2.2-2.5(-2,8) μm, υφές (1-)-1.2-2(2.1) μm. Κονιδιογόνα κύτταρα, μερικά μεμονωμένα, 3-4\*(1.5-)(-1.8-)-2 μm ράχες 2-3 μm οδοντωτού σχήματος. Σε ελάχιστα κονιδιογόνα κύτταρα απουσία ραχίδων
- ✓ ATHU-M 10125(KE 52)Μικροσκοπικά: Σπόρια σφαιρικά (1.5-)(-1.8-)-2.5-2.8-(2.9)-3\*2-2.2-(3) μm υφές (1.2-)(-1,5-)(-1.9-)-2-3 μm. Κονιδιογόνα κύτταρα παρατηρήθηκαν 2-4 υαλώδη κύτταρα στην σειρά (2.7)-3-4\*(1.8-)-2 μm ράχες (1.2-)(-1.8-)(-2) μm οδοντωτό σχήμα. Απουσία ραχίδων από μερικά κονιδιογόνα κύτταρα
- ✓ ATHU-M 10126 (KE 53) Μικροσκοπικά: **Σπόρια** σφαιρικά 2.5(-2.7-)-3-3.2(-3.5)\*(2.1-)-2.2-2.5-2,8-3 μm υφές (2-)(-2.5-)(-2.8-)-3 μm. **Κονιδιογόνα** κύτταρα 3-3.5-4\*2-2.5 μm, παρουσία υαλώδων κύτταρων. **Ράχες** 1(-1.2-)-2 μm.
- ✓ ATHU-M 10127 (KE 55)Μικροσκοπικά: **Σπόρια** σφαιρικά (2.2-)-3(-3.2)\*(2,2-)-2.5(-2.7-)(-2,9-)-3 μm υφές (2.2-)-2.5-3 μm. **Κονιδιογόνα** κύτταρα σε μορφή συμπλεγμάτων 3(-3.5-)-4-5\*2-3 μm. Σε ορισμένα απουσία **ραχίδων**, μέγεθος αυτών (1-)(-2-)-8 μm
- ✓ ATHU-M 10149(KE 229): Μικροσκοπικά: **Σπόρια** σφαιρικά μεγέθους 2(-2,1-)(-2,2-)(-2,5)\*(1,5-)-1,8-2 μm υφές (1,5-)(-1,8-)-2(-2,1-)(-2,5) μm. **Κονιδιογόνα κύτταρα** σε μορφή συμπλεγμάτων μεγέθους 2-2,5(-2,8-)-3\*(1,5-)(-1,8-)-2-2,1 μm και ορισμένα φέροντας ράχες οδοντωτού σχήματος με μέγεθος 1,5(-1,8-)-2(-2,8) μm.

- ✓ ATHU-M 10150 (KE 233) Σπόρια σφαιρικά, με μέγεθος  $2(-2,2-)2,5(-2,8-)3*1,5-1,8-2(-2,2)$  μm και υφές  $(1,5-)(-1,8-)2(-2,5)$  μm. **Κονιδιογόνα κύτταρα** με μορφή συμπλεγμάτων και μέγεθος  $3-3,5*2-2,8$  μm κάποια τα οποία φέροντας ράχες οδοντωτού σχήματος με μέγεθος  $(1,8-)2$  μm.



**Εικόνα 3.13:** *Beauveria* όπου φέρει χαρακτηριστικές ακτίνες σε όλο το μήκος της αποικίας

Βάση της εργασίας Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria* (Rhener et al) οι μετρήσεις των σπορίων για την *B. tenella* είναι  $2-3*1,5-2,5$

ATHU-M 10139(KE213): *Beauveria Sp.*

Δείγματα: έδαφος, *P. orientalis* Αχέροντας Π. Τσόπελας, ATHU-M 10139(KE213)

Κατά τις πρώτες 4 μέρες υπήρχε ελάχιστη ανάπτυξη. Στις 7 μέρες ανάπτυξης η διάμετρος 2,4 εκατοστά έχοντας λευκό χρώμα και βελούδινη υφή. Παρατηρήθηκε η παραγωγή κόκκινου μεταβολίτη του οποίου η απόσταση από την αποικία είναι 0,8 εκατοστά. Στις 14 μέρες ανάπτυξης η διάμετρος της αποικίας 4,1 εκατοστά, με βελούδινη υφή και χρώμα λευκό προς το κέντρο και κίτρινο προς τις άκρες. Αποικία κοντά σχετικά στο υπόστρωμα ενώ κάτω και περιμετρικά της αποικίας υπάρχει κόκκινος μεταβολίτης με απόσταση 0,8 εκατοστά από την αποικία. Στον ένα μήνα ανάπτυξης η διάμετρος της αποικίας είναι 6,1 εκατοστά χρώματος μεζ και με βελούδινη υφή (Εικόνα 3.14). Η αποικία βρίσκεται κοντά στο θρεπτικό και το κάτω μέρος της είναι πορτοκαλί.

- ✓ ATHU-M 10139(KE213): Σπόρια σφαιρικά με μέγεθος  $3(-3,1-)(-3,2-)(-3,5-)*2,5(-2,8-)$  μm. Υφές  $2(-2,2-)(-2,5-)(-2,9-)-3$  μm. **Κονιδιογόνα κύτταρα** ελάχιστα μεμονωμένα και χωρίς ράχες με μέγεθος  $3(-4)*2(-2,1-)(-2,2-)2,8(-3)$  ράχες  $1,8-2$  μm.





**Εικόνα 3.14:** Μορφολογική απεικόνιση του στελέχους *Beauveria* sp.

ATHU-M 10120 (KE 21) ATHU-M 10143 (KE 217) *C. rosea*

Δείγματα: έδαφος, *P. orientalis* Αχέροντας Π. Τσόπελας, ATHU-M 10120 (KE 21)• έδαφος, *C. Supervirens*, Βοτανικός κήπο Διομήδους (Χαϊδάρι) Ε. Καλτσούδα, ATHU-M 10143 (KE 217)

Μορφολογικά: Αποικία με αργό ρυθμό ανάπτυξης. Κατά τις 4 πρώτες μέρες **διάμετρος** αποικίας 2 εκατοστά υφή κοκκώδης , χρώματος λευκού. Στις 7 μέρες ανάπτυξης **διάμετρος** αποικίας 3,1 εκατοστά, με χρώμα κίτρινο προς το κέντρο και λευκό προς τις άκρες, και χνουδωτή υφή. Προσκολλημένη αποικία στο υπόστρωμα με μυκηλιακές δεσμίδες σε ακτινωτή αλλά και κυκλική διάταξη .Παραγωγή κίτρινου μεταβολίτη με απόσταση από την αποικία 5 εκατοστά. Στις 14 μέρες ανάπτυξης **διάμετρος** της αποικίας 6,1 εκατοστά, με μπεζ **χρώμα** (2B) και χνουδωτή **υφή**. Ένα μήνα μετά τον εμβολιασμό **διάμετρος** της αποικίας 7,7 εκατοστά, υφή κοκκώδης (Εικόνα 3.15, 3.16).



**Εικόνα 3.15:** Μορφολογική απεικόνιση του στελέχους ATHU-M 10120



**Εικόνα 3.16:** Μορφολογική απεικόνιση του στελέχους ATHU-M 10143

- ✓ ATHU-M 10120 (KE 21) μικροσκοπικά :**Σπόρια** επιμήκη και ελλειψοειδή μεγέθους 3,5-7,2\*2-4 μm **υφές** 2-3,9 μm **κονιδιογόνα κύτταρα** σε ομάδες με φιαλίδια μεγέθους 6-15,5\*1,8-3,5 μm.
- ✓ ATHU-M 10143 (KE 217) μικροσκοπικά: **Σπόρια** επιμήκη με μέγεθος 4-5(-6)\*2-2,7(-3-)(-3,2) μm. **Υφές** (1-)2(-2,5-)(-2,7-)(-3) **κονιδιογόνα κύτταρα** (15-)(-16-)(-18-)20\*1-1,2(-1,7-)(-2)

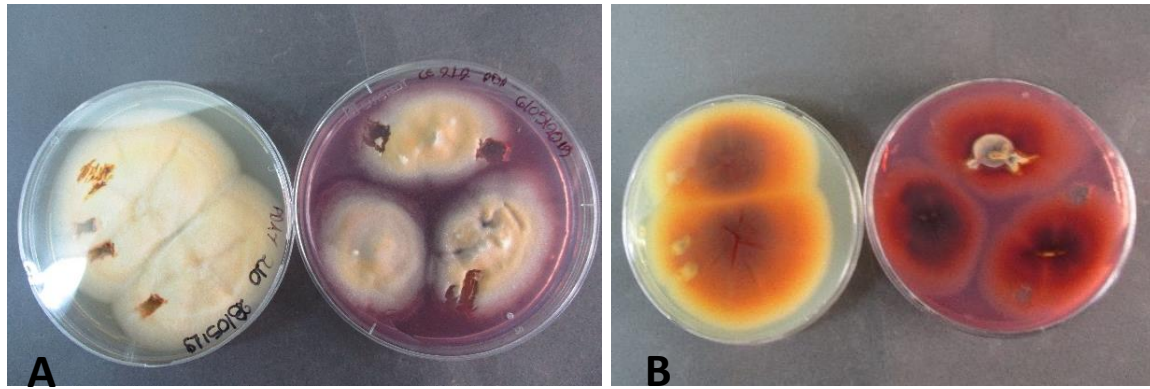
ATHU-M 10137( KE210), ATHU-M 10132 (KE212) *A. ostraviense*:

Δείγματα: έδαφος, *C. sempervirens* Βοτανικός κήπος Διομήδους (Χαϊδάρι) Ε. Καλτσούδα, ATHU-M 10137( KE210), ATHU-M 10132 (KE212)

Μορφολογικά: Αποικία με αργό ρυθμό ανάπτυξης, πορτοκαλί **χρώματος** με βελούδινη **υφή**. παρουσία έντονου κόκκινου μεταβολίτη, σε μεγάλο μέρος της επιφάνειας του τρυβλίου (εικόνα 3.18). Κατά την απομόνωση σε PDA απουσία κόκκινου μεταβολίτη στο στέλεχος ATHU-M 10137 ενώ στο στέλεχος ATHU-M 10132 παρουσία από τις πρώτες μέρες ανάπτυξης. (εικόνα 3.17 A,B). Στην συνέχεια παρουσία κόκκινου μεταβολίτη και στο στέλεχος ATHU-M 10137.

ATHU-M 10137( KE210), ATHU-M 10132 (KE212) μικροσκοπικά: KE210, 212 μικροσκοπικά: Απουσία **σπορίων** και **κονιδιογόνων κύτταρων**. **Υφές** (1,1-)(-1,3-)1,5(-1,8-)2(-2,2) μm.

Στην εργασία Species of Fungi of the Genus Auxarthron on Insects (IRENA MAJCHROWICZ 1966) γίνεται αναφορά του γένους Auxathron ως εντομοπαθογόνος μύκητας.



**Εικόνα 3.17 (A+B): Σύγκριση στελεχών 210-212 ως προς τον μεταβολίτη**



**Εικόνα 3.18:** Παραγωγή μεταβολίτη από τον μύκητα του γένους *Aukathron* στην επιφάνεια του τρυβλίου που εμβολιάστηκε με χώμα

ATHU-M 10131 (KE200), ATHU-M 10132 (KE202): *P. herbarum*

Δείγματα: έδαφος, *C. Supervirens*, Καισαριανή Ζ. Γκόνου, ATHU-M 10131 (KE200), ATHU-M 10132 (KE202)

Μορφολογικά: Αποικία με αργό ρυθμό ανάπτυξης γκρι σκούρου **χρώματος** με τραχιά **υφή**.

ATHU-M 10131 (KE200):Μικροσκοπικά: **Σπόρια** σφαιρικά εκ των οποίων ορισμένα παρεμβόλημα και μερικά υαλώδη, μέγεθος 7(-7,5-)8(-8,2-)(-9)\*(6,5-)(-6,8-)7-7,2(-8) μm. Υφές 2-3 μm με παρούσες τομές αποκοπής των σπορίων.

ATHU-M 10132 (KE202) Μικροσκοπικά: **Σπόρια** σφαιρικά, (6-)(-6,2-)(-7-)8(-9) \* 6(-7,2-)(-7,8-)(-8,5-)(-9,8) μm σχηματίζοντας υαλώδη κύτταρα. **Υφές** (2-)(-2,8-)3(-3,2-)(-3,5-)(-4) μm φέροντας τομές αποκοπής των σπορίων.

ATHU-M 10151 (KE208): *C. asperulum*



Δείγμα: έδαφος, *C. Supervirens*, Βοτανικός κήπος Διομήδους (Χαϊδάρι), Ε. Καλτσούδα ΑΤΗU-M 10151 (ΚΕ208)

Μορφολογικά: Αποικία σκούρου πράσινου **χρώματος** με τραχιά, κοκκώδη **υφή**, συχνά παρουσία λευκού μυκηλίου στο κέντρο της αποικίας.

Μικροσκοπικά: **Σπόρια:** 5-5,2(-5,5)-6(-7)\*4,8-5 subsherial, με τραχιά **υφή**, **υφές** (1,5-)2-(2,3) κονιδιογόνα κύτταρα 5-7-8\*2-3

ΑΤΗU-M 10140 (ΚΕ214) ΑΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΤΟ 3:

Δείγματα: έδαφος, *C. Supervirens*, Καισαριανή Ζ. Γκόνου. ΑΤΗU-M 10140 (ΚΕ214)

Μορφολογικά: Αποικία με αργό ρυθμό ανάπτυξης αρχικά, **χρώματος** λευκού και στην συνέχεια αποκτώντας καφέ χρώμα παρουσία κίτρινου μεταβολίτη. Τραχιά **υφή** (εικόνα 3.19)

Μικροσκοπικά: **Σπόρια** σφαιρικά και ελαφρώς παραλληλόγραμμα με μέγεθος (3-)(-3,1-)3,2-3,5(-3,8)\*3(-3,1)μm **υφές** (1-)(-1,1-)1,2(-1,3-)1,5-1,8 απουσία από **κονιδιογόνα κύτταρα**.



**Εικόνα 3.19:** Μορφολογική απεικόνιση του μύκητα ΑΤΗU-M 10140 (ΚΕ214)

ΑΤΗU-M 10118 (ΚΕ8), ΑΤΗU-M 10122 (ΚΕ43) ΑΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΤΟ 1,2:

Δείγματα: έδαφος, δάσος *P. orientalis* Αχέροντας Π.Τσόπελας ΑΤΗU-M 10118 (ΚΕ8), ΑΤΗU-M 10122 (ΚΕ43)

Μορφολογικά Αποικία με αργό ρυθμό ανάπτυξης χρώμα μαύρο-γκρι

ΑΤΗU-M 10118 (ΚΕ8), Μικροσκοπικά: **Σπόρια** επιμήκη και ελαφρώς ελλειψοειδή με μέγεθος (4,8-)5-5,1\*1,5(-1,8-)2(-2,1). **Υφές** (1,5-)2(-2,1-)(-2,5) τραχιά υφή **κονιδιογόνα κύτταρα** 7(-10-)(-18-)(-20)\*(1-)(1,2-)(-1,5-)2

ΑΤΗU-M 10122 (ΚΕ43): Μικροσκοπικά: Τα **σπόρια** είναι επιμήκη και έχουν μέγεθος (4-)(-4,8-)5(-5,2)\*1,1-)(-1,8-)2(-2,1) και οι **υφές** έχουν πλάτος (1,2-)1,8-2-2,2 και τα **κονιδιογόνα κύτταρα** έχουν μέγεθος 10(-12-)5-(-19-)(-20)\*(1,5-)2(-3)

### 3.5 Μοριακή ανάλυση

Τα στελέχη που στάλθηκαν για μοριακή ανάλυση ήταν στελέχη του γένους *Beauveria* και άλλα στελέχη τα οποία δεν μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν μορφολογικά και μικροσκοπικά. Τα στελέχη του γένους *Beauveria* επιλέχθηκαν για μοριακή ανάλυση λόγω της μεγάλης ποικιλομορφίας, προκειμένου να ταυτοποιηθεί εάν τα διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά υποδηλώνουν διαφορετικό είδος. Η ταυτοποίηση έγινε βάση της αλληλουχίας ITS όπου θεωρείται περιοχή αναγνώρισης των μυκήτων (Εικόνα 3.20).



**Εικόνα 3.20:** Αποτελέσματα που λήφθηκαν από την PCR. Τα παράγωγα είχαν μήκος περίπου 700-800 βάσεις και συγκρίθηκαν με ladder 1000 βάσεων

Η σύγκριση των αλληλουχιών που λήφθηκαν συγκρίθηκαν με τις αλληλουχίες που έχουν κατατεθεί στην τράπεζα NCBI μέσω του προγράμματος BLAST. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 3.2:

**Πίνακας 3.2:** Καταγραφή των αποτελεσμάτων βάση πλησιέστερων στελεχών μετά την μοριακή ταυτοποίηση

Κωδικός ATHUM	Κωδικός πλησιέστερου στελέχους τράπεζας	Υψηλότερη φυλλογενετική ομοιότητα	Αριθμός νουκλεοτιδίων	Ποσοστό ταυτότητας

10117	MH864518.1	<i>B. bassiana</i> strain CBS 127308	703	100%
10120	MH869057.1	<i>C. rosea</i> strain CBS 376.55	1224	100%
10121	MH864341.1	<i>B. tenella</i> strain CBS 126934	706	100%
10123	MH864518.1	<i>B.bassiana</i> strain CBS 127308	703	100%
10125	MH864341.1	<i>B. tenella</i> strain CBS 126934	706	100%
10126	MH864341.1	<i>B. tenella</i> strain CBS 126934	706	100%
10127	MH864341.1	<i>B. tenella</i> strain CBS 126934	706	100%
10130	MH864518.1	<i>B.bassiana</i> strain CBS 127308	703	100%
10131	AY337712.1	<i>P. herbarum</i> 18S ribosomal RNA gene	2291	100%
10134	JN195741	<i>B. bassiana</i> isolate	752	86%

10151	MH860272	<i>C. asperulum</i> strain CBS 582.71	681	100%
10136	MH864518.1	<i>B. bassiana</i> strain CBS 127308	703	100%
10137	MG807334.1	<i>Auxathron</i> <i>ostraviense</i> culture MUT<ITA>	559	100%
10138	MG807334.1	<i>A. ostraviense</i> culture MUT<ITA>	559	100%
10143	MH864507	<i>C. rosea</i> strain CBS 127294	702	100%
10147	MH864518	<i>B. bassiana</i> strain CBS 127308	703	100%
10148	JN195742	<i>B. bassiana</i> isolate	760	96.72%
10149	MH864341	<i>B. tenella</i> strain CBS 126934	706	100%
10150	MH864341	<i>B.tenella</i> strain CBS 126934	706	100%

### 3.6 Πείραμα in vivo λαρβών του γένους *Tenebrio molitor*

Για το συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν λάρβες του εντόμου *T. molitor* οι οποίες είχαν περίπου το ίδιο μέγεθος και μολύνθηκαν από τα εξής στελέχη με εναιώρημα σπορίων: ATHU-M 10117 (KE4), ATHU-M 10150 (KE233), ATHU-M 10123 (KE45) όπου έχουν ταυτοποιηθεί ως *Beauveria*, ATHU-M 10138 (KE212) όπου έχει ταυτοποιηθεί ως *Auxathron*, ATHU-M 10145 (KE220) ταυτοποιήθηκε ως *Paecilomyces*, και ATHU-M10143 (KE217) ταυτοποιημένο ως *Clonostachys*. Ακόμα χρησιμοποιήθηκε ένα ακόμα δείγμα που οι λάρβες δεν μολύνθηκαν από κάποιον μύκητα, ως control. Σε κάθε γένος μολύνθηκαν τρεις λάρβες που τοποθετήθηκαν ξεχωριστά η κάθε μια σε γυάλινα τρυβλία.

Η παρακολούθηση τους ξεκίνησε την τέταρτη μέρα, και παρατηρήθηκαν ζωντανές λάρβες στα στελέχη ATHU-M 10150 (KE233), ATHU-M10143 (KE217), και ATHU-M 10145 (KE220). Στα υπόλοιπα στελέχη οι νεκρές λάρβες δεν είχαν εμφανίσει κάποιο μυκήλιο στην επιφάνεια τους, εκτός από μία λάρβα του στελέχους ATHU-M 10117 (KE4) η οποία εμφάνισε πολύ μικρή ποσότητα μυκηλίου.

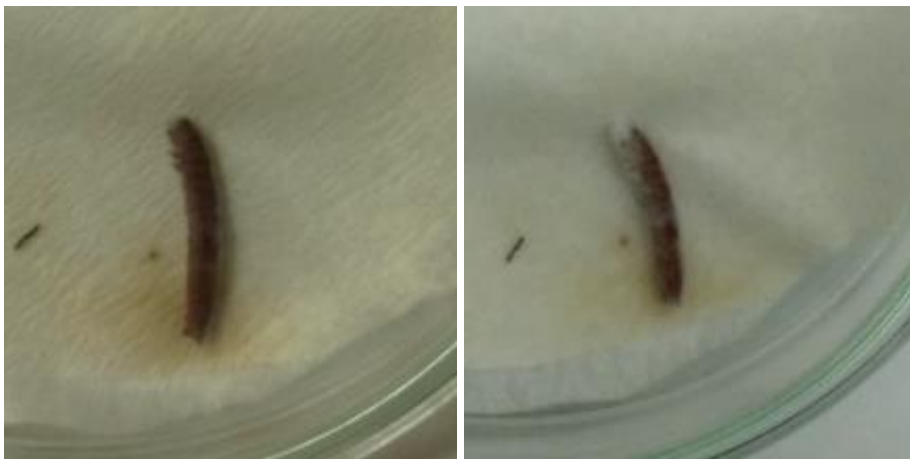
Μόλυνση λάρβας με το στέλεχος ATHU-M 10117. Από τη 4<sup>η</sup> μέρα μόλυνσης η λάρβα είναι νεκρή και παρατηρείται μικρή ποσότητα μυκηλίου στην επιφάνειά της.





**Εικόνα 3.21-3.25:** 4<sup>η</sup> -8<sup>η</sup> μέρα μόλυνσης των λαρβών με το στέλεχος *ATHU-M 10117*

Μόλυνση λάρβας με το στέλεχος *ATHU-M 10123*. Από τη 4<sup>η</sup> μέρα μόλυνσης η λάρβα είναι νεκρή και από την 5<sup>η</sup> μέρα παρατηρείται ο σχηματισμός μυκηλίου στην επιφάνειά της.





**Εικόνα 3.26-3.30:** 4<sup>η</sup>- 8<sup>η</sup> μέρα μόλυνσης των λαρβών με το στέλεχος *ATHU-M 10123*

Μόλυνση λάρβας με το στέλεχος *ATHU-M 10143*. Από τη 5<sup>η</sup> μέρα μόλυνσης η λάρβα είναι νεκρή αλλά δεν παρατηρείται ο σχηματισμός μυκηλίου στην επιφάνειά της.





**Εικόνα 3.31-3.35:** 4<sup>η</sup>- 8<sup>η</sup> μέρα μόλυνσης των λαμβών με το στέλεχος *ATHU-M 10143*

Μόλυνση λάρβας με το στέλεχος *ATHU-M 10138*. Από τη 5<sup>η</sup> μέρα μόλυνσης η λάρβα είναι νεκρή αλλά δεν παρατηρείται ο σχηματισμός μυκηλίου στην επιφάνειά της.

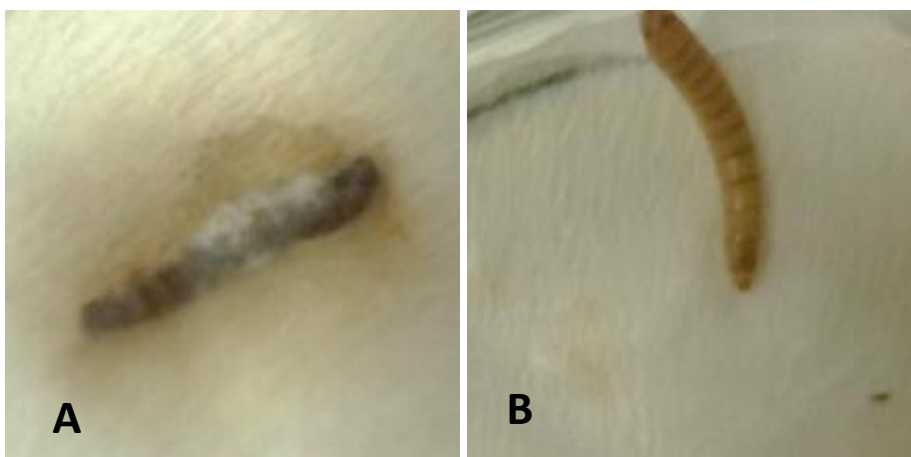


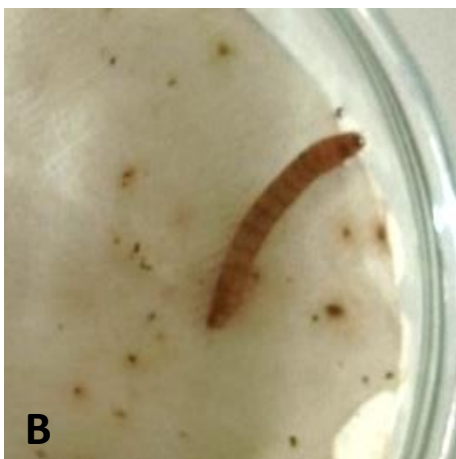
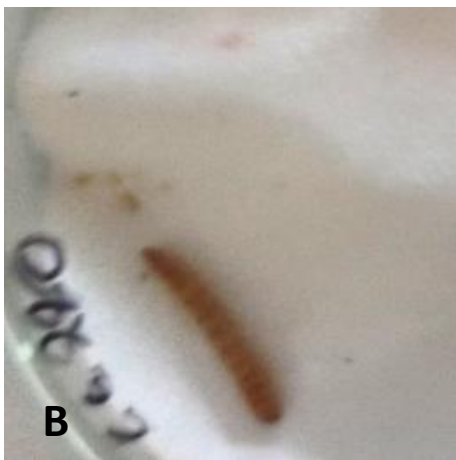
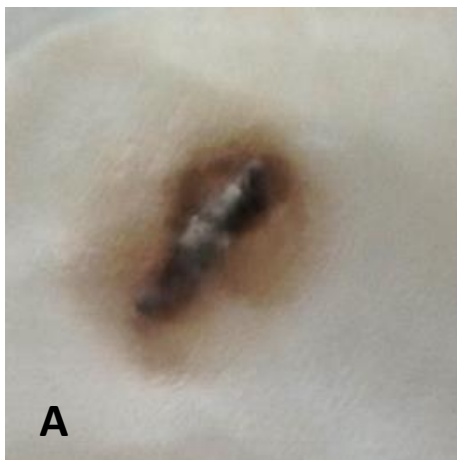
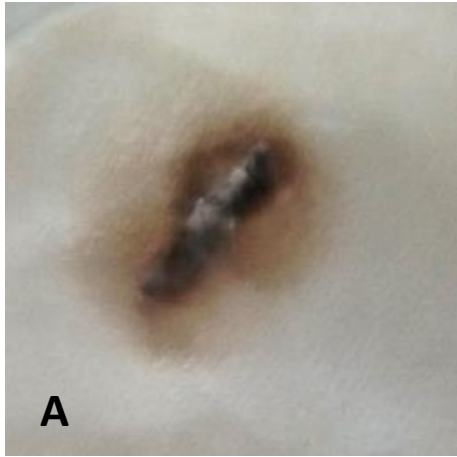


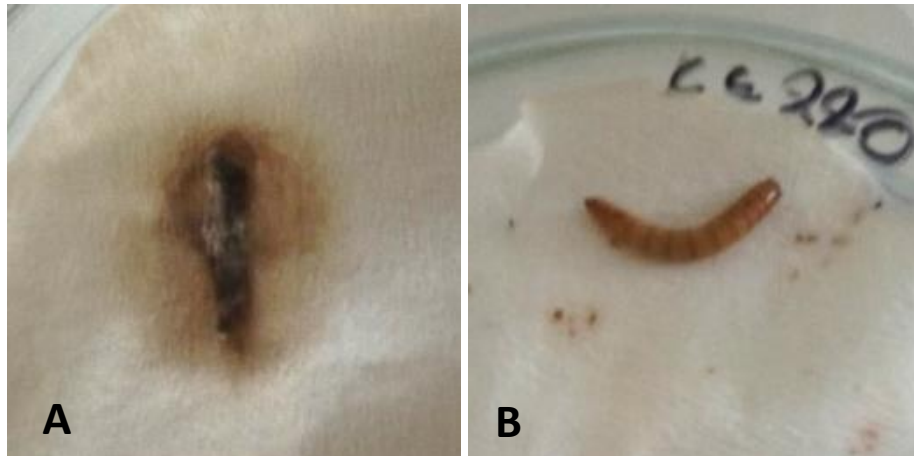


**Εικόνα 3.36-3.40:** 4<sup>η</sup>- 8<sup>η</sup> μέρα μόλυνσης των λαρβών με το στέλεχος *ATHU-M 10138*

Μόλυνση λάρβας με το στέλεχος *ATHU-M 10145*. Από τη 4<sup>η</sup> μέρα μόλυνσης οι δύο λάρβες είναι νεκρές καθώς παρατηρείται και ο σχηματισμός μυκηλίου στην επιφάνεια τους αλλά η μία συνεχίζει να ζει μέχρι την όγδοη μέρα όπου είναι εμφανώς εξασθενημένη

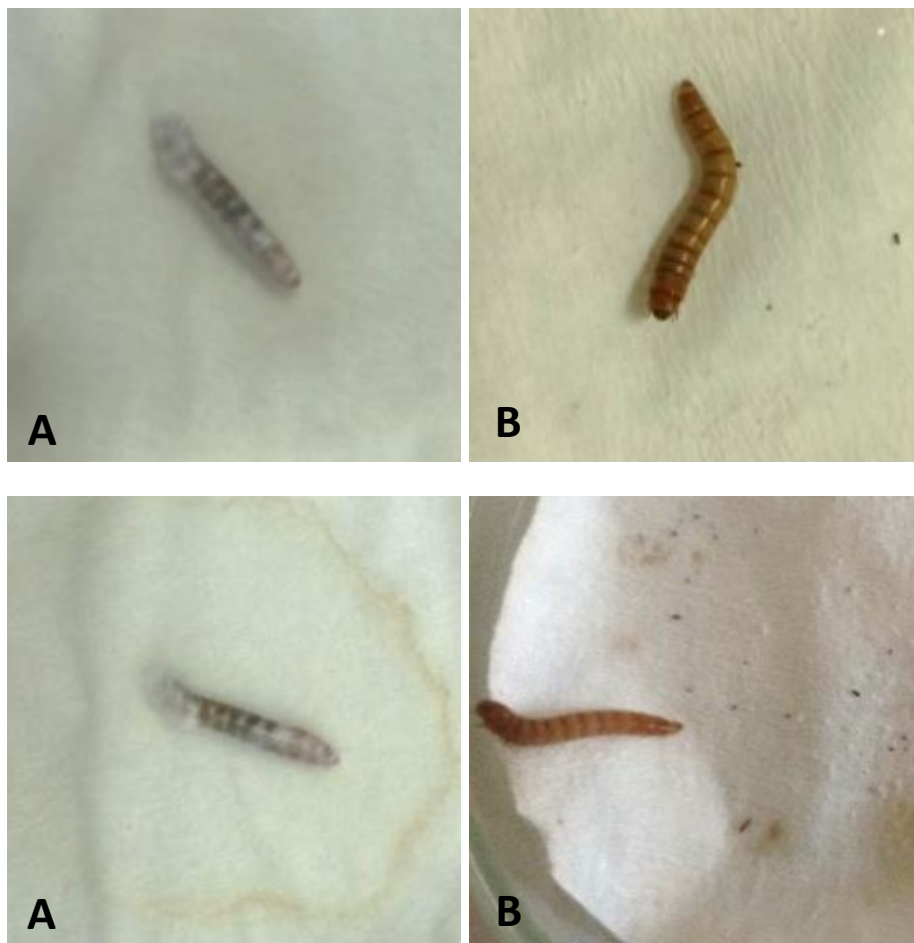


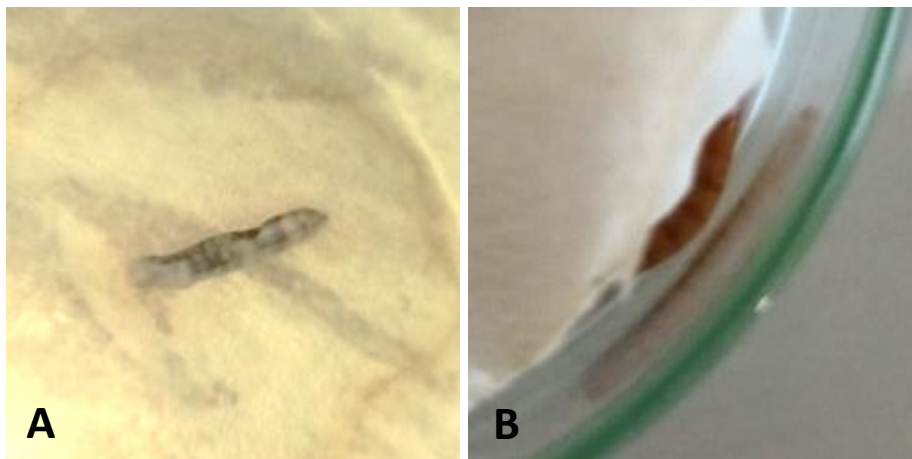
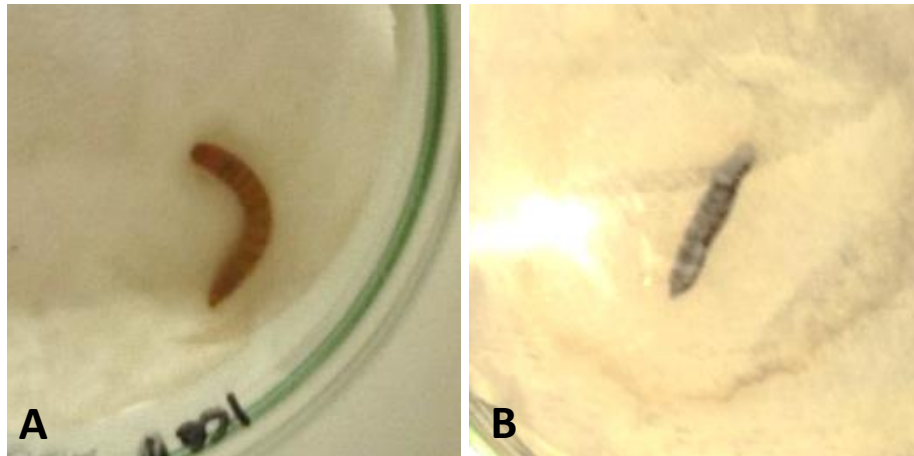




**Εικόνα 3.41-3.45 (A + B):** 4<sup>η</sup>-8<sup>η</sup> μέρα μόλυνσης των λαρβών με το στέλεχος *ATHU-M 10145*.  
 Στις εικόνες *A* η λάρβα έχει καλυφθεί με μυκήλιο ενώ στις *B* η λάρβα ζει.

Μόλυνση λάρβας με το στέλεχος *ATHU-M 10150*. Από τη 4<sup>η</sup> μέρα μόλυνσης οι λάρβες είναι νεκρές καθώς παρατηρείται και ο σχηματισμός μυκηλίου στην επιφάνεια της αλλά η μία συνεχίζει να ζει μέχρι την όγδοη μέρα όπου είναι εμφανώς εξασθενημένη





**Εικόνα 3.42-3.46 (A + B):** 4<sup>η</sup>-8<sup>η</sup> μέρα μόλυνσης των λαρβών με το στέλεχος KE233. Στις εικόνες A η λάρβα έχει καλυφθεί με μυκήλιο ενώ στις B η λάρβα ζει.

Σε μία λάρβα από αυτές του control παρατηρήθηκε ελαφρώς ανάπτυξη μυκηλίου από το οποίο έγινε παρασκευάσμα αλλά δεν ταυτοποιήθηκε. Επιπλέον έγιναν παρασκευάσματα και

από τις υπόλοιπες λάρβες που είχαν καλυφθεί με μυκήλιο προκειμένου να ταυτοποιηθεί ότι το στέλεχος με το οποίο μολύνθηκαν είναι όντως το στέλεχος που αναπτύσσεται στην επιφάνεια τους.

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Θρεπτικά υποστρώματα

Συγκριτικά με τα δύο θρεπτικά μέσα καλύτερη ανάπτυξη εμφάνισε το CTC καθώς αναπτύχθηκαν μύκητες του γένους *Auxarthron* (ασκομύκητες, *onygenales*) οι οποίοι παρουσιάζουν χαρακτηριστικό κόκκινο μεταβολίτη, ενώ στο θρεπτικό που περιείχε dodine η ανάπτυξη ήταν ελάχιστη έως καθόλου (1-2 αποικίες/τρυβλίο). Επιπλέον, σε άλλο πείραμα, όπου έγινε παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος με dodine το οποίο είχε κρατηθεί σε κωνική φιάλη κλεισμένη με παραφιλμ, παρατηρήθηκε ότι ίσως έχασε την δράση της, εφόσον στα τρυβλία υπήρξε μεγάλη ανάπτυξη ζυγομυκήτων και πολύ λιγότερη εντομοπαθογόνων μυκήτων, με αποτέλεσμα τα τρυβλία να μην διαφέρουν πολύ από τα τρυβλία που περιείχαν PDAY. Επίσης πρέπει να υπογραμμιστεί ότι το χόμα που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα δεν επεξεργάστηκε αμέσως μετά την δειγματοληψία, αλλά φυλάχτηκε για ένα διάστημα περίπου 20 ημερών.

### 4.2 Απομόνωση στελεχών

Όσον αφορά τις αποικίες που απομονώθηκαν ανήκουν κυρίως στα γένη *Paecilomyces* και *Beauveria*. Το γένος *Paecilomyces* δεν εμφάνισε σημαντικές μορφολογικές διαφορές, εκτός από την κάτω πλευρά του τρυβλίου που υπήρχε διαφορά στον χρωματισμό του θρεπτικού υποστρώματος, κρεμ με καφέ στο κέντρο της αποικίας, κίτρινο και κόκκινο. Το ενδιαφέρον σημείο είναι η μικροσκοπική μελέτη κατά την οποία παρατηρήθηκαν τόσο επιμήκη όσο και σφαιρικά σπόρια. Το γένος *Beauveria* παρουσίασε αρκετές μορφολογικές διαφορές καθώς απομονώθηκαν στελέχη:

- ✓ που στα άκρα της αποικίας φέρουν χαρακτηριστικούς σχηματισμούς, συννήματα κίτρινου χρώματος και βελούδινης υφής με μεσαίου μεγέθους σπόρια.
- ✓ με ανοιχτές κίτρινες-λευκές αποικίες όπου έχουν βελούδινη υφή, (συνήθως παράγουν κόκκινο μεταβολίτη).
- ✓ Με ροζ αποικίες πιο υπερυψωμένες στο κέντρο και μικρότερα σπόρια.

### 4.3 Μοριακή ανάλυση

Βάσει της μοριακής ανάλυσης μόνο δύο στελέχη *Beauveria* (*B. Bassiana* και *B. Tenella*) απομονώθηκαν γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι μορφολογικές διαφορές δεν οδηγούν απαραίτητα σε διαφορετικά γένη.

Η μοριακή ανάλυση για τα υπόλοιπα στελέχη, έλαβε χώρα καθώς δεν μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν σε επίπεδο είδους με βεβαιότητα.

#### **4.4 Πείραμα in vivo λαρβών του γένους *Tenebrio molitor***

Όσον αφορά το πείραμα με τις λάρβες του *T. molitor* παρατηρήθηκε ότι οι λάρβες που μολύνθηκαν με γένη των μυκήτων *Beauveria* άρχισαν αρκετά νωρίς να εμφανίζουν μυκήλιο στην επιφάνεια τους εκτός από το στέλεχος ATHU-M 10150 (KE233) όπου μία λάρβα από τις τρεις έμεινε ζωντανή μέχρι το τέλος του πειράματος. Επιπροσθέτως το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και το στέλεχος του *Paecilomyces* με την διαφορά ότι έμειναν δύο λάρβες ζωντανές μέχρι και την έβδομη μέρα. Στα στελέχη ATHU-M 10138 (KE212) και ATHU-M10143 (KE217), οι λάρβες δεν επέζησαν παρόλα αυτά όμως δεν εμφάνισαν μυκήλιο στην επιφάνεια τους.

#### **4.5 Συζήτηση**

Η παθογένεια των μυκήτων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες που σχετίζονται με τη βλαστική ικανότητα, το ποσοστό ανάπτυξης και την παραγωγή σπορίων, μεταξύ άλλων παραγόντων (Safavi et al., 2007; Pedrini, 2008). Ο τρόπος με τον οποίο ο μύκητας αλληλεπιδρά με τον ξενιστή είναι το κλειδί για τη γνώση του τελικού αποτελέσματος της διαδικασίας μόλυνσης (Molnár et al., 2010). Οι ιδιότητες που υπάρχουν επιτρέπουν την επιλογή στελεχών με τα βέλτιστα χαρακτηριστικά για να επιτευχθούν αποτελεσματικά αποτελέσματα ελέγχου. Ωστόσο, ο μύκητας πρέπει επίσης να είναι ειδικός για τον ξενιστή, λοιμογόνος και προσαρμοσμένος σε ένα περιφερειακό περιβάλλον (De la Rosa et al., 2002). Από αυτή την άποψη, η εξερεύνηση για τοπικές απομονώσεις είναι ζωτικής σημασίας για τη δημιουργία μακροπρόθεσμων, αποτελεσματικών και βιώσιμων προγραμμάτων βιολογικού ελέγχου.

#### **4.6 Περιορισμοί**

Στην παρούσα έρευνα δεν υπήρξαν ιδιαίτεροι περιορισμοί. Ο χρόνος αποτέλεσε έναν περιοριστικό παράγοντα όπως συμβαίνει σε όλες τις έρευνες αλλά ελήφθησαν όλα τα απαραίτητα μέτρα προκειμένου να μην αποτελέσει εμπόδιο και επηρεάσει τα αποτελέσματα που προέκυψαν.

#### **4.7 Μελλοντική έρευνα**

Η έρευνα θα μπορούσε να επεκταθεί σε διαφορετικά περιβάλλοντα προκειμένου να εντοπιστεί αν υπάρχουν διαφορές καθώς και για διαφορετικά χρονικά πλαίσια.



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ainsworth, G.C. (1973). Agostino Bassi, 1773-1856. *Nature*, 177, 255-257.
- Alves, R. T., Bateman, R. P., Gunn, J., Prior, C., & Leather, S. R. (2002). Effects of different formulations on viability and medium-term storage of *Metarhizium anisopliae* conidia. *Neotropical entomology*, 31, 91-99.
- Bidochka, M. J., McDonald, M. A., Leger, R. J. S., & Roberts, D. W. (1994). Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Current genetics*, 25(2), 107-113.
- Bowman, B. H., Taylor, J. W., Brownlee, A. G., Lee, J., Lu, S. D., & White, T. J. (1992). Molecular evolution of the fungi: relationship of the Basidiomycetes, Ascomycetes, and Chytridiomycetes. *Molecular biology and evolution*, 9(2), 285-296.
- Brand, D., Roussos, S., Pandey, A., Zilioli, P. C., Pohl, J., & Soccol, C. R. (2004). Development of a bionematicide with *Paecilomyces lilacinus* to control *Meloidogyne incognita*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 118(1), 81-88.
- Cantone, F. A., & Vandenberg, J. D. (1998). Intraspecific diversity in *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycological Research*, 102(2), 209-215.
- Chapman, H. C. (1974). Biological control of mosquito larvae. *Annual review of entomology*, 19(1), 33-59.
- Clark, T. B., Kellen, W. R., Fukuda, T., & Lindegren, J. E. (1968). Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 11(1), 1-7.
- Coates, B. S., Hellmich, R. L., & Lewis, L. C. (2002). *Beauveria bassiana* haplotype determination based on nuclear rDNA internal transcribed spacer PCR-RFLP. *Mycological Research*, 106(1), 40-50.
- Cravanzola, F., Piatti, P., Bridge, P. D., & Ozino, O. I. (1997). Detection of genetic polymorphism by RAPD-PCR in strains of the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii* isolated from the European cockchafer (*Melolontha* spp.). *Letters in Applied Microbiology*, 25(4), 289-294.
- Darbro, J. M., Johnson, P. H., Thomas, M. B., Ritchie, S. A., Kay, B. H., & Ryan, P. A. (2012). Effects of *Beauveria bassiana* on survival, blood-feeding success, and fecundity of *Aedes aegypti* in laboratory and semi-field conditions. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 86(4), 656.

- Davide, R. G., & Zorilla, R. A. (1985). Evaluation of a fungus *Paecilomyces lilacinus* for the biological control of root-knot nematodes *Meloidogyne incognita* on okra as compared with nematicide Isazofos. *Philippine Agriculturist*, 68(4), 493-500.
- Driver, F., Milner, R. J., & Trueman, J. W. (2000). A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological research*, 104(2), 134-150.
- Dube, B., & Smart Jr, G. C. (1987). Biological control of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Pasteuria penetrans*. *Journal of nematology*, 19(2), 222.
- Dunn, P. H., & Mechalas, B. J. (1963). Potential of *beauveria bassiana* (balsamo) vuillemin as a microbial insecticide. *Journal of Insect Pathology*, 5(4), 451.
- Feng, M. G., Poprawski, T. J., & Khachatourians, G. G. (1994). Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol science and technology*, 4(1), 3-34.
- Fernandes, É. K., Keyser, C. A., Rangel, D. E., Foster, R. N., & Roberts, D. W. (2010). CTC medium: A novel dodecane-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. *Biological control*, 54(3), 197-205.
- Ferron, P. (1978). Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual review of entomology*, 23(1), 409-442.
- Ferron, P. (1981). *Pest control by the fungi Beauveria and Metarhizium. Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. Academic Press.
- Ferron, P., Fargues, J., & Riba, G. (1991). Fungi as microbial insecticides against pests. In: Arora, D.K/, Ajello, L., Mukerji, K.G. (eds.). *Handbook of applied mycology* (pp. 665-706). Vol. 2. Humans, animals and insects. New York: Marcel Dekker.
- Geetha, I., & Balaraman, K. (1999). Effect of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* on larvae of three species of mosquitoes. *Indian Journal of Experimental Biology*, 37, 1148-1150.
- Gillespie, A.T. & Moorehouse, E.R. (1989). The use of fungi to control pests of agricultural and horticultural importance. In Whipps, J.M. & Lumsden, R.D. (eds.). *Biotechnology of fungi for improving plant growth*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Glare, T. R., & Inwood, A. J. (1998). Morphological and genetic characterisation of *Beauveria* spp. from New Zealand. *Mycological Research*, 102(2), 250-256.
- Gutierrez-Rodero, F., Moragon, M., de la Tabla, V. O., Mayol, M. J., & Martin, C. (1999). Cutaneous hyalohyphomycosis caused by *Paecilomyces lilacinus* in an

- immunocompetent host successfully treated with itraconazole: case report and review. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(11), 814-818.
- Hart, M. P., & MacLeod, D. M. (1955). An apparatus for determining the effects of temperature and humidity on germination of fungous spores. *Canadian Journal of Botany*, 33(4), 289-292.
- Hegedus, D. D., & Khachatourians, G. G. (1993). Identification of molecular variants in mitochondrial DNAs of members of the genera *Beauveria*, *Verticillium*, *Paecilomyces*, *Tolyposcladium*, and *Metarhizium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(12), 4283-4288.
- Hegedus, D. D., & Khachatourians, G. G. (1993). Construction of cloned DNA probes for the specific detection of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in grasshoppers. *Journal of Invertebrate Pathology*, 62(3), 233-240.
- Hegedus, D. D., & Khachatourians, G. G. (1996). Identification and Differentiation of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* Using Polymerase Chain Reaction and Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis. *Journal of Invertebrate Pathology*, 67(3), 289-299.
- Hegedus, D. D., & Khachatourians, G. G. (1996). Detection of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* within Infected Migratory Grasshoppers (*Melanoplus sanguinipes*) Using Polymerase Chain Reaction and DNA Probe. *Journal of Invertebrate Pathology*, 67(1), 21-27.
- Hewlett, T. E., Dickson, D. W., Mitchell, D. J., & Kannwischer-Mitchell, M. (1988). Evaluation of *Paecilomyces lilacinus* as a biocontrol agent of *Meloidogyne javanica* on tobacco. *Journal of nematology*, 20(4), 578.
- Hibbett, D.S. (1992). Ribosomal RNA and fungal systematics. *Trans Mycol Soc Jap.*, 33, 533-556.
- Hoog, G.S. de. (1972). The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. *Stud Mycol*, 1, 1-41.
- Hoog, G.S. de. (1978). Notes some fungicolous Hyphomycetes and their relatives. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 10(1), 33-81.
- Hoog, G.S. de. & Rao, V. (1975). Some new hyphomycetes. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 8(2), 207-212.
- Humber, RA. (1997). Fungi: identification. In Lacey, L. (ed.). *Manual of techniques in insect pathology* (pp. 153-185). San Diego: Academic Press.

- Ignoffo, C. M., Garcia, C., Alyoshina, O. A., & Lappa, N. V. (1979). Laboratory and field studies with Boverin: a mycoinsecticidal preparation of *Beauveria bassiana* produced in the Soviet Union. *Journal of Economic Entomology*, 72(4), 562-565.
- Jatala, P., Kaltenbach, R., Bocangel, M., Devaux, A. J., & Campos, R. (1980, January). Field application of *paecilomyces-lilacinus* for controlling *meloidogyne-incognita* on potatoes. *Journal of Nematology*, 12(4), 226-227.
- Jonathan, E. L., & Rajendran, G. (2000). Biocontrol potential of the parasitic fungus *Paecilomyces lilacinus* against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in banana. *Journal of Biological Control*, 14(2), 67-69.
- Kiewnick, S., Lueth, P., & Sikora, R. A. (2002). Development of a biocontrol product based on *Paecilomyces lilacinus* (strain 251). *Phytopathology*, 92, S41-S42.
- Kobayasi, Y., & Shimizu, D. (1980). *Cordyceps* species from Japan 2. *Bulletin of the National Science Museum, Tokyo, Series B, Botany*, 6(3), 77-96.
- Kosir, J. M., MacPherson, J. M., & Khachatourians, G. G. (1991). Genomic analysis of a virulent and a less virulent strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, using restriction fragment length polymorphisms. *Canadian journal of microbiology*, 37(7), 534-541.
- Li, Z., Li, C., Huang, B., & Fan, M. (2001). Discovery and demonstration of the teleomorph of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., an important entomogenous fungus. *Chinese Science Bulletin*, 46(9), 751-753.
- Liu, Z. Y., Liang, Z. Q., Whalley, A. J. S., Liu, A. Y., & Yao, Y. J. (2001). A new species of *Beauveria*, the anamorph of *Cordyceps sobolifera*. *Fungal Diversity*, 7, 61-70.
- Lopez-Perez, M., Rodriguez-Gomez, D., & Loera, O. (2015). Production of conidia of *Beauveria bassiana* in solid-state culture: current status and future perspectives. *Critical reviews in Biotechnology*, 35(3), 334-341.
- MacLeod, D. M. (1954). Investigations on the Genera *Beauveria* vuill, and *Tritirachium* Limber. *Canadian Journal of Botany*, 32(6), 818-890.
- Majchrowicz, I. (1966). Species of fungi of the genus *Auxarthron* on insects. *Journal of Invertebrate Pathology*, 8(4), 431-432.
- Martez, J. L., Acosta, N., Betancourt, C., Vicente, N., & Rodriguez, R. (1996). *Biological control of Meloidogyne incognita in tomato in Puerto Rico*. Nematropica (USA).
- Maurer, P., Couteaudier, Y., Girard, P. A., Bridge, P. D., & Riba, G. (1997). Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. *Mycological Research*, 101(2), 159-164.

- McCoy, C.W. (1990). Entomogenous fungi as microbial pesticides. In Baker, R.R. & Dunn, P.E. (eds.). *New directions in biological control* (pp. 139-159). New York: A. R. Liss.
- Miranpuri, G. S., & Khachatourians, G. G. (1991). Infection sites of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 59(1), 19-27.
- Neuvéglise, C., & Brygoo, Y. (1994). Identification of group-I introns in the 28s rDNA of the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii*. *Current genetics*, 27(1), 38-45.
- Neuveglise, C., Sarfati, J., Latge, J. P., & Paris, S. (1996). Afut 1, a retrotransposon-like element from *Aspergillus fumigatus*. *Nucleic acids research*, 24(8), 1428-1434.
- Oborník, M., Jirku, M., & Dolezel, D. (2001). Phylogeny of mitosporic entomopathogenic fungi: Is the genus *Paecilomyces* polyphyletic. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(9), 813-819.
- Pantou MP, Strunnikova OK, Shakhnazarova VY, Vishnevskaya NA, Papalouka VG, Typas MA. (2005). Molecular and immunochemical phylogeny of *Verticillium* species. *Mycol Res* 109:889–902
- Pace, N. R., Olsen, G. J., & Woese, C. R. (1986). Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell (Cambridge)*, 45(3), 325-326.
- Petch, T. (1926). Entomogenous Fungi. Additions and Corrections, ii. *Transactions of the British Mycological Society*, 11, 3-4.
- Pinnock, D. E., Garcia, R., & Cubbin, C. M. (1973). *Beauveria tenella* as a control agent for mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 22(2), 143-147.
- Poprawski, T. J., Riba, G., Jones, W. A., & Aioun, A. (1988). Variation in isoesterase profiles of geographical populations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolated from *Sitona* weevils (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology*, 17(2), 275-279.
- Rakotonirainy, M. S., Dutertre, M., Brygoo, Y., & Riba, G. (1991). rRNA sequence comparison of *Beauveria bassiana*, *Tolyposcladium cylindrosporum*, and *Tolyposcladium extinguens*. *Journal of invertebrate pathology*, 57(1), 17-22.
- Rehner, S. A., Minnis, A. M., Sung, G. H., Luangsa-ard, J. J., Devotto, L., & Humber, R. A. (2011). Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103(5), 1055-1073.
- Saberhagen, C., Klotz, S. A., Bartholomew, W., Drews, D., & Dixon, A. (1997). Infection due to *Paecilomyces lilacinus*: a challenging clinical identification. *Clinical Infectious Diseases*, 25(6), 1411-1413.

- Samson, R. A. (1974). Paecilomyces and some allied hyphomycetes. *Studies in mycology*, 6, 1-119.
- Samson, R. A., & Evans, H. C. (1982). Two new Beauveria spp. from South America. *Journal of Invertebrate Pathology*, 39(1), 93-97.
- Sandala D., Bohatá A. (2019). Influence of temperature on development and virulence of entomopathogenic Metarhizium anisopliae.
- Sandhu, S. S., Rajak, R. C., & Agarwal, G. P. (1993). Studies on prolonged storage of Beauveria bassiana conidia: effects of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against chickpea borer, Helicoverpa armigera. *Biocontrol Science and Technology*, 3(1), 47-53.
- Schaerffenberg, B. (1964). Biological+ environmental conditions for development of mycoses caused by Beauveria+ Metarrhizium. *Journal of Insect Pathology*, 6(1), 8.
- Shapshak, P., Somboonwit, C., Foley, B. T., Alrabaa, S. F., Wills, T., & Sinnott, J. T. (2015). Zika virus. In *Global Virology I-Identifying and Investigating Viral Diseases* (pp. 477-500). Springer, New York, NY.
- Shimazu, M., Mitsuhashi, W., & Hashimoto, H. (1988). Cordyceps brongniartii sp. nov., the teleomorph of Beauveria brongniartii. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, 29(323), 30.
- Shimizu, S., & Aizawa, K. (1988). Serological classification of Beauveria bassiana. *Journal of Invertebrate Pathology*, 52(2), 348-353.
- Sosamma, V. K., Geetha, S. M., & Koshy, P. K. (1994). Effect of the fungus, Paecilomyces lilacinus on the burrowing nematode, Radopholus similis infesting betel vine. *Indian Journal of Nematology*, 24(1), 50-53.
- Steinhaus, E.A. (1963). *Insect pathology: an advanced treatise*. Vol. 2. New York: Academic Press.
- St Leger, R. J., Allee, L. L., May, B., Staples, R. C., & Roberts, D. W. (1992). World-wide distribution of genetic variation among isolates of Beauveria spp. *Mycological Research*, 96(12), 1007-1015.
- Sung, G. H., Spatafora, J. W., Zare, R., Hodge, K. T., & Gams, W. (2001). A revision of Verticillium sect. Prostrata. II. Phylogenetic analyses of SSU and LSU nuclear rDNA sequences from anamorphs and teleomorphs of the Clavicipitaceae. *Nova Hedwigia*, 72(3-4), 311-328.

- Tan, Y., & Ekramoddoullah, A. K. (1991). Immunochemical characterization of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 57(2), 269-276.
- Tanada, Y. & Kaya, H.K. (1993). *Insect pathology*. San Diego: Academic Press.
- Tiberi, S., Sotgiu, G., D'Ambrosio, L., Centis, R., Arbex, M. A., Alarcon Arrascue, E., ... & Migliori, G. B. (2016). Effectiveness and safety of imipenem-clavulanate added to an optimized background regimen (OBR) versus OBR control regimens in the treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases*, 62(9), 1188-1190.
- Tiberi, S., D'Ambrosio, L., De Lorenzo, S., Viggiani, P., Centis, R., Sotgiu, G., ... & Migliori, G. B. (2016). Ertapenem in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: first clinical experience. *European Respiratory Journal*, 47(1), 333-336.
- Tigano-Milani, M. S., Honeycutt, R. J., Lacey, L. A., Assis, R., McClelland, M., & Sobral, B. W. (1995). Genetic variability of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates revealed by molecular markers. *Journal of Invertebrate Pathology*, 65(3), 274-282.
- Tigano-Milani, M. S., Samson, R. A., Martins, I., & Bruno, W. (1995). DNA markers for differentiating isolates of *Paecilomyces lilacinus*. *Microbiology*, 141(1), 239-245.
- Villanueva, L. M., & Davide, R. G. (1984). Evaluation of several isolates of soil fungi for biological control of root-knot nematodes. *Philippine Agriculturist*, 67(4), 361-371.
- Wang, C., Fan, M., Li, Z., & Butt, T. M. (2004). Molecular monitoring and evaluation of the application of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* in southeast China. *Journal of Applied Microbiology*, 96(4), 861-870.
- Westenfeld, F., Alston, W. K., & Winn, W. C. (1996). Complicated soft tissue infection with prepatellar bursitis caused by *Paecilomyces lilacinus* in an immunocompetent host: case report and review. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(6), 1559-1562.
- Zaki, M. J., & Maqbool, M. A. (1991). Combined efficacy of p4steurl4 penetrans and other biocontrol, agents on the control, of root-knot nematode on okra. *Pak. J. Nematol*, 9(1), 49-52.
- Καψανακη -Γκότση Ε. (2004). *Χερσαία Φυτά & Μύκητες. Α' Μύκητες. Σημειώσεις μαθήματος, Αθήνα*