



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΥΚΗΤΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ
TRICHODERMA

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΑΝΑΣΤΑΣΟΠΟΥΛΟΣ ΗΛΙΑΣ
ΡΑΜΑ ΛΕΝΙΖΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2023

Περίληψη

Η ανάγκη για περιορισμό των χημικών φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον οδήγησε στη συγκεκριμένη ανασκόπηση της βιβλιογραφίας που αφορά τη μοριακή ταυτοποίηση μυκήτων του γένους *Trichodera*. Οι μύκητες αυτοί είναι γνωστοί για την βιοκτόνα δράση τους έναντι άλλων φυτό παθογόνων μυκήτων. Οι μηχανισμοί δράσης των μυκήτων του γένους τριχοδερμα επίσης αναφέρονται στην παρούσα πτυχιακή.

Στο πρώτο κεφάλαιο γίνεται αναφορά στο μύκητα *Trichoderma*. Συγκεκριμένα στα χαρακτηριστικά του, την ανάπτυξη και αναπαραγωγή του, την ταξινόμηση του και στους μηχανισμούς δράσεις του.

Στο δεύτερο κεφάλαιο γίνεται αναφορά στις μεθόδους μοριακής ταυτοποίησης γενικά και έπειτα ειδικά στο *Trichoderma* με αναφορές στις αντίστοιχες μεθόδους. Υπάρχουν αναλύσεις και συγκρίσεις των ερευνών.

Στο τρίτο κεφάλαιο έχουμε τα συμπεράσματα σύμφωνα με τα δυο προηγούμενα κεφάλαια.

Λέξεις Κλειδιά: Τριχόδερμα, Απομόνωση DNA, Μοριακή Ταυτοποίηση

Abstract

The need to limit chemical pesticides in the environment led to the specific review of the literature concerning the molecular identification of fungi of the genus *Trichoderma*. These fungi are known for their biocidal activity against other plant pathogenic fungi. The mechanisms of action of the fungi of the *Trichoderma* genus are also mentioned in this thesis.

In the first chapter, reference is made to the fungus *Trichoderma*. Specifically in its characteristics, its development and reproduction, its classification and its action mechanisms.

In the second chapter, reference is made to molecular identification methods in general and then specifically to *Trichoderma* with references to the corresponding methods. There are analyzes and comparisons of research.

In the third chapter we have the conclusions according to the two previous chapters.

Key words: *Trichoderma*, DNA Isolation, Molecular Identification

Περιεχόμενα

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 ΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ ΤΡΙΧΟΔΕΡΜΑ	7
1.1.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	8
1.1.2 ΣΗΜΑΣΙΑ	9
1.1.3 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ	10
1.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ	10
1.4 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΟΥ TRICHODERMA	12
1.5 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	15
1.6 ΧΡΗΣΗ, ΟΦΕΛΗ ΤΡΙΧΟΔΕΡΜΑΤΟΣ	18
1.7 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ	19
2. ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ	20
2.1 ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	20
2.2 ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ	21
2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ	22
2.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΡΙΧΟΔΕΡΜΑΤΟΣ	27
2.3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΡΙΧΟΔΕΡΜΑΤΟΣ	28
2.3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA	30
2.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ	33
2.4.1 ΑΝΕΠΤΥΞΑΝ ΤΥΧΑΙΑ ΕΝΙΣΧΥΜΕΝΑ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΚΑ DNA (RAPD)	33
2.4.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΗΚΟΥΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΟΥ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ RFLP	35
2.4.3 ΕΝΙΣΧΥΣΗ PCR ΤΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ITS1 ΚΑΙ ITS2	37
2.4.4 ΕΝΙΣΧΥΣΗ PCR ΤΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ITS1, ITS2 ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΟΥ TEF1	41
2.4.5 ΕΝΙΣΧΥΣΗ PCR ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ACT, CAL, tef1, las1, chi18-5	43
3.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	46
4.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	48

Πίνακας Εικόνων

ΕΙΚΟΝΑ 1: ΕΙΚΟΝΑ 1: ΤΡΟΠΟΙ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΡΙΧΟΔΕΡΜΑΤΟΣ SPP. ΣΤΑ ΦΥΤΑ. (MARTINEZ-MEDINA ET AL. 2022).....	8
ΕΙΚΟΝΑ 2: ΚΟΝΙΔΙΟΦΟΡΑ , ΦΙΑΛΙΔΙΑ ΚΑΙ ΚΟΝΙΔΙΑ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ TRICHODERMA.....	11
ΕΙΚΟΝΑ 3: ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ ΤΟΥ ΤΡΙΧΟΔΕΡΜΑΤΟΣ.	11
ΕΙΚΟΝΑ 4: ΚΟΝΙΔΙΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΟ TRICHODERMA ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΕΡΕΘΙΣΜΑΤΩΝ. (Α) ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΚΑΤΑΚΟΡΥΦΩΝ ΥΦΩΝ, (Β) ΔΙΑΚΛΑΔΩΣΗ ΥΦΩΝ, (Γ) ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΥΦΩΝ , (Δ) ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΥΑΛΙΚΩΝ ΚΟΝΙΔΙΩΝ, (Ε) ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΚΟΝΙΔΙΩΝ. (STEYAERT ET AL. 2010)	14
ΕΙΚΟΝΑ 5: ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΦΩΤΟΚΟΝΙΔΙΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ T. ATROVIRIDE. PDB, ΖΩΜΟΣ ΔΕΞΤΡΟΖΗΣ ΠΑΤΑΤΑΣ. (STEYAERT ET AL. 2010).....	14
ΕΙΚΟΝΑ 6: Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ ΤΟΥ ΤΡΙΧΟΔΕΡΜΑΤΟΣ SPP. ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΑΦΟΥ ΕΙΣΑΧΘΟΥΝ ΟΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΦΥΛΟΓΕΝΕΣΗΣ. Η ΓΚΡΙΖΑ ΓΡΑΜΜΗ ΥΠΟΔΗΛΩΝΕΙ ΤΗΝ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΗ ΑΥΞΗΣΗ ΑΡΙΘΜΟΥ ΤΩΝ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΙΜΩΝ ΕΙΔΩΝ ΣΤΟ ΚΟΝΤΙΝΟ ΜΕΛΛΟΝ. (DRUZHININA ET AL. 2006)	17
ΕΙΚΟΝΑ 7: ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΤΡΙΧΟΔΕΡΜΑΤΟΣ. (WOO ET AL. 2022)	20
ΕΙΚΟΝΑ 8: ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΟΣ ΚΑΙ ΜΙΝΙΔΟΥΡΥΦΟΡΟΣ ΣΦΑΛΜΑ! ΔΕΝ ΕΧΕΙ ΟΡΙΣΤΕΙ ΣΕΛΙΔΟΔΕΙΚΤΗΣ.	
ΕΙΚΟΝΑ 9: ΠΕΡΙΟΧΕΣ ITS ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 5.8S ΜΕ ΤΟΥΣ ΕΚΚΙΝΙΤΕΣ ITS1 ITS2. (YANG, X 2017)	41

Πίνακες

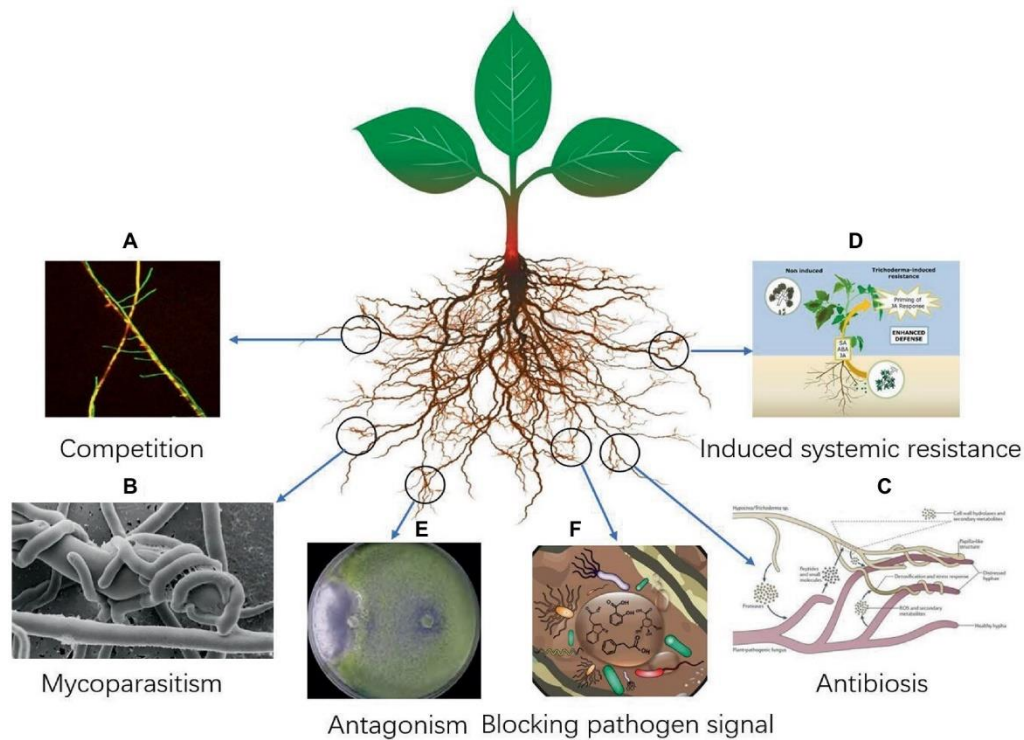
ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Η ΚΥΡΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΚΟΙΝΩΝ ΕΙΔΩΝ TRICHODERMA. (YAO ET AL. 2023) 9	9
---	---

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ ΤΡΙΧΟΔΕΡΜΑ

Το *Trichoderma*, ένας τύπος μυκήτων που απαντάται συνήθως στα οικοσυστήματα του εδάφους παγκοσμίως, εποικίζει πάνω ή ακριβώς κάτω από την επιφάνεια των ριζών των φυτών. Είναι πηγή τροφής για κάποια μικρόβια του εδάφους, τα οποία χημειοτακτικά έλκονται από το ριζικό σύστημα των φυτών. Η παρουσία υψηλού μικροβιακού πληθυσμού κοντά στις ρίζες ευνοεί την ανάπτυξη του *Trichoderma*. Το γένος μυκήτων δεν εποικίζει μόνο μέσα στις ρίζες, συγκεκριμένα στις ενδοκυτταρικές περιοχές, αλλά και κοντά στα σημεία ανάπτυξης των ριζών, προσφέροντας έτσι προστασία από τις ασθένειες των φυτών και τα έντομα. Επιπλέον, αυτοί οι μύκητες είναι οργανισμοί που ενισχύουν τη συνολική υγεία και ευρώστια των φυτών. Η ικανότητάς τους να προστατεύουν τα φυτά και να ρυθμίζουν πληθυσμούς παθογόνων σε διάφορες εδαφικές συνθήκες, έχει οδηγήσει στην εκτενή έρευνα τους. Με αποτέλεσμα την εμπορευματοποίησή τους ως βιοπαρασιτοκτόνα και βιολιπάσματα. Επιπλέον, παράγουν διάφορες βιολογικά δραστικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων των ενζύμων που αποικοδομούν τα κυτταρικά τοιχώματα και τους δευτερογενείς μεταβολίτες.

Trichoderma spp. βρίσκονται συνήθως στο έδαφος και είναι ιδιαίτερα άφθονα σε εδάφη με υψηλά επίπεδα φυτικών ριζών. Αυτοί οι μύκητες έχουν την ικανότητα να εγκαθίστανται εύκολα στις ρίζες των φυτών. Ορισμένα στελέχη *Trichoderma spp.* είναι πολύ ικανοί στον αποικισμό και την ανάπτυξη των ριζών. Αυτά τα στελέχη μπορούν να εισαχθούν στο έδαφος με διάφορες τρόπους. (Εικόνα 1) Όταν έρχονται σε επαφή με τις ρίζες των φυτών, προσκολλώνται στην επιφανειακά στη ρίζα ή στο φλοιό, ανάλογα με το συγκεκριμένο στέλεχος. Επομένως μετά από κατάλληλη επεξεργασία σπόρων με μύκητες *Trichoderma*, τα πιο αποτελεσματικά στελέχη μπορούν να ζουν στις επιφάνειες των ριζών και όταν αυτές βρίσκονται βαθιά μέσα στο έδαφος και μπορούν να παραμείνουν σε σημαντικές ποσότητες μετά την εφαρμογή έως και 18 μήνες. Ωστόσο, δεν έχουν όλα τα στελέχη αυτή την ικανότητα. Μύκητες *Trichoderma spp.* όχι μόνο αποικίζουν τις ρίζες αλλά επίσης συμμετέχουν σε παρασιτικές αλληλεπιδράσεις και αντλούν τροφή από άλλους μύκητες. Η παρουσία άφθονων και υγιών ριζών υποστηρίζει την βέλτιστη ανάπτυξη και αναπαραγωγή προκαλώντας ανοσία στο φυτό. Δηλαδή ο συνδυασμός αυτός οδηγεί στην ανάπτυξη διαφόρων μηχανισμών για την καταπολέμηση άλλων μυκήτων. Πρόσφατες μελέτες έχουν παρουσιάσει νέες προσεγγίσεις για τον βιοέλεγχο και την τόνωση της ανάπτυξης των φυτών, αποκαλύπτοντας τη συμμετοχή πολυάριθμων γονιδίων και προϊόντων γονιδίων (πρωτεϊνών) σε αυτές τις περίπλοκες διαδικασίες.



Εικόνα 1: Τρόποι εισαγωγής των στελεχών *Τριχοδέρματος spp.* στα φυτά. (Martínez-Medina et al.2022).

1.1.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Υδάτινα και χερσαία οικοσυστήματα

Αυτοί οι μύκητες παρουσιάζουν ευρεία κατανομή σε διάφορα χερσαία οικοσυστήματα, συμπεριλαμβανομένων των γεωργικών εκτάσεων, των βοσκοτόπων, των δασών, των ερήμων και των υγροτόπων. Ορισμένα είδη επιδεικνύουν μια συμβιωτική σχέση με τα φυτά, ενώ άλλα δρουν ως δευτερεύοντα παράσιτα. (Romero-Arenas et al.(2009) Επιπλέον, αυτοί οι μύκητες διαθέτουν μια αξιοσημείωτη ικανότητα αποικισμού σε ποικίλους οικοτόπους, λόγω του υψηλού αναπαραγωγικού τους δυναμικού. Επιπρόσθετα, είναι ικανά να προσαρμόζονται και να ευδοκιμούν σε σκληρές περιβαλλοντικές συνθήκες που χαρακτηρίζονται από υψηλές θερμοκρασίες, επίπεδα αλατότητας και διακυμάνσεις του pH. (Romero-Arenas et al., 2009)

1.1.2 ΣΗΜΑΣΙΑ

Αυτή η ομάδα μυκήτων παίζει καθοριστικό ρόλο στη διαχείριση των φυτοπαθογόνων μυκήτων. Είναι γνωστά για την ικανότητά τους να παράγουν τοξίνες και αντιβιοτικά που ελέγχουν αποτελεσματικά διάφορα παθογόνα. Τα προϊόντα απομόνωσης *Trichoderma* χρησιμοποιούνται ευρέως ως παράγοντες βιολογικού ελέγχου στη γεωργία και οι ερευνητικές προσπάθειες έχουν επιβεβαιώσει την αποτελεσματικότητά τους στον έλεγχο πολλών παθογόνων του εδάφους. (Romero-Arenas et al., 2009)

Name of species	Major function	Reference
<i>T. harzianum</i>	Induced systemic resistance to fungi disease and increased plant productivity; Nematode resistance; Improved plant growth and root architecture.	Srivastavikumar et al. (2016), Pivchei et al. (2019), Coppola et al. (2019)
<i>T. asperellum</i>	Antifungal activities; Plant growth promotion; Stress resistance; Enrich soil fertility	Wang H. et al. (2022), AL-Askar et al. (2021), Degani et al. (2021b)
<i>T. asperelloides</i>	Antifungal activities; Plant growth promotion; Stress resistance	Ruangwong et al. (2021a), Phooka et al. (2020), Rawaf et al. (2022)
<i>T. atroviride</i>	Fungistatic activity; plant growth promotion, Antifungal and antibacterial activities; Plant growth promotion and nutrient assimilation; Induced systemic defense responses; Stress resistance	Coppola et al. (2019), Zhang C. et al. (2022), González-López et al. (2021), Leal et al. (2021), Nawrocka et al. (2019)
<i>T. hamatum</i>	Nematode resistance; Increased plant productivity; Antibacterial and antifungal activities; Plant growth promoting	Li X. et al. (2022), Velasco et al. (2021), Buzzeo et al. (2021)
<i>T. virens</i>	Antifungal activities; Plant growth promotion	Jogatih et al. (2018), Halifu et al. (2020)
<i>T. viride</i>	Antifungal activities; Enhanced root development; Nematode resistance; Stress resistance	Al-Hazmi and Tariqjaved, (2016), Naglot et al. (2019), He et al. (2020)
<i>T. longibrachiatum</i>	Antifungal activities; Improve salt resistance; Nematode resistance; Plant growth promotion; Induced systemic defense responses	Ngo et al. (2021), Boamah et al. (2021), AL-Askar et al. (2022), Degani et al. (2021b), Yoon et al. (2019)
<i>T. glaucense</i>	Plant growth promotion; Enrich soil fertility	Bridziavienė et al., 2022
<i>T. koratense</i>	Plant growth promotion; Enrich soil fertility	Bridziavienė et al. (2022)
<i>T. volucae</i>	Induced systemic resistance	Pescador et al. (2022)
<i>T. schuiteman</i>	Plant growth promotion	Mayo Prieto et al. (2019)
<i>T. phaneroense</i>	Antifungal activities; improve plant growth and root architecture	Niangsomk et al. (2021)
<i>T. koningii</i>	Antifungal activities; Plant growth promotion	Ruangwong et al. (2021b), Yoo et al. (2022)
<i>T. citrinoviride</i>	Antifungal activities; Nematode resistance	Faris et al. (2019), Fan et al. (2020)
<i>T. rosei</i>	Antifungal activities	Horteadobler et al. (2021)
<i>T. gamsii</i>	Antifungal activities; Affected herbivore feeding behavior	Alkumbara et al. (2022), Zhou et al. (2018), Di Marco et al. (2022)
<i>T. aggressivum</i>	Fungal diseases biological control	Sánchez-Monrealinos et al. (2021)
<i>T. atrovirens</i>	Nematode resistance	Herrández et al. (2018)
<i>T. afroharzianum</i>	Plant growth promotion	Kappei et al. (2022)
<i>T. bissetii</i>	Antifungal activities	Chung et al. (2022)
<i>T. parvum</i>	Improve plant quality	Robbo et al. (2014)
<i>T. hamatum</i>	Nematode resistance	Dana et al. (2019)
<i>T. laxi</i>	Antifungal activities	Chen et al. (2021)
<i>T. strigosellum</i>	Nematode resistance; Plant growth promotion	Baita et al. (2021)
<i>T. thebisense</i>	Antifungal activities; Plant growth promotion	Ssein et al. (2021)
<i>T. erinaceum</i>	Antifungal activities; Plant growth promotion	Ssein et al. (2021)

Πίνακας 1: Η κύρια βιολογική λειτουργία των κοινών ειδών *Trichoderma*. (Yao et al. 2023)

1.1.3 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ

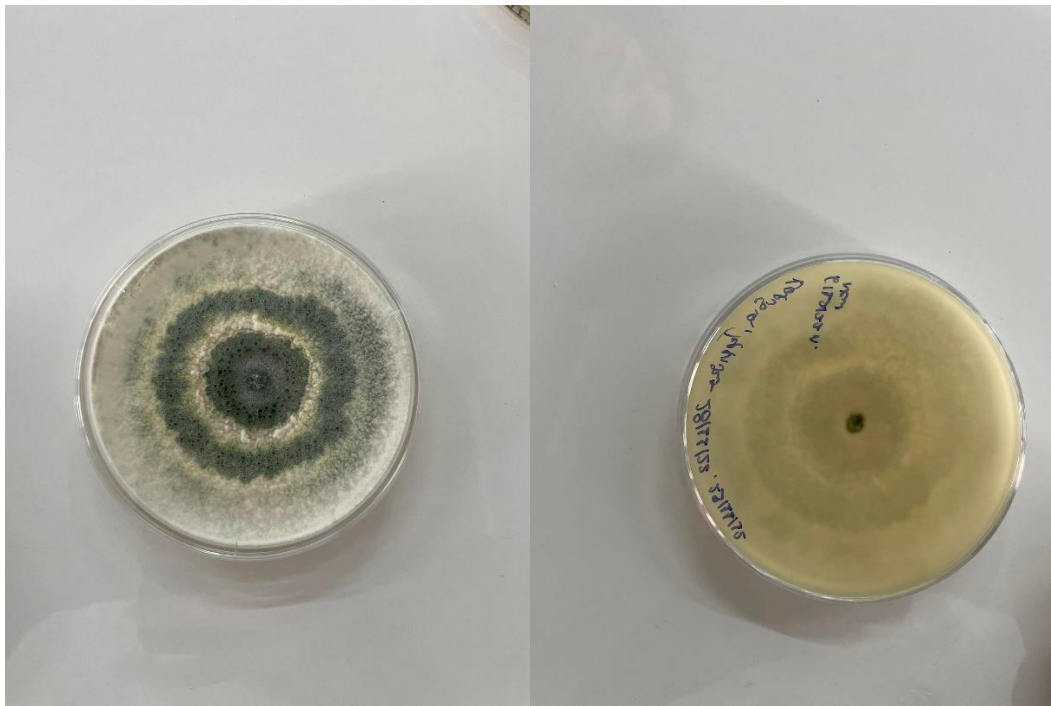
Ένας από τους πρωταρχικούς ρόλους του *Trichoderma* είναι η ικανότητά του να δημιουργεί μια αμοιβαία επωφελή σχέση με τα φυτά. Ο μύκητας επεκτείνεται και ευδοκιμεί στη ριζόσφαιρα της καλλιέργειας, προάγοντας την ανάπτυξή του και αποκτώντας περισσότερο χώρο για τη δική του ανάπτυξη. Επιπλέον, χρησιμεύει ως παράγοντας βιολογικού ελέγχου δημιουργώντας ένζυμα που στοχεύουν και εμποδίζουν την ανάπτυξη φυτικών παθογόνων μυκήτων. Η ενσωμάτωση του μύκητα στο υπόστρωμα ή η προφύτευση σε γεωργικές εκτάσεις αποφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα. Όσον αφορά την ανταγωνιστική παρασιτική του συμπεριφορά, ο μύκητας παράγει αντιμυκητιακές ουσίες και υδρολυτικά ένζυμα. (Romero-Arenas et al., 2009)

1.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Σε μεγαλύτερη κλίμακα, οι αποικίες μπορούν εύκολα να αναγνωριστούν με βάση την λευκοπράσινη ή κιτρινοπράσινη εμφάνισή τους. Επιπλέον, ομόκεντροι δακτύλιοι μπορούν να παρατηρηθούν σε περιοχές όπου υπάρχουν κονίδια. Διακρίνονται από τις αποικίες με κίτρινη, πορτοκαλί ή κιτρινοπράσινη απόχρωση. (Εικόνα 3) Σε μικροσκοπικό επίπεδο, τα κονιδιοφόρα μπορεί να παρατηρηθούν ως ζευγαρωμένα κλαδιά με πυραμιδικό σχήμα, που καταλήγουν σε ένα ή μερικά φιαλίδια. Τα κονίδια έχουν σχήμα αχλαδιού, με μια διευρυμένη κεντρική περιοχή και ένα λεπτό επάνω τμήμα. Αυτά τα φιαλίδια μπορούν να είναι διατεταγμένα σε στροβιλισμούς ή μεμονωμένα και μπορούν να συγκεντρωθούν πυκνά σε έναν ευρύ κύριο άξονα. Τα ίδια τα κονίδια ποικίλλουν στο χρώμα, κυμαίνονται από βαθύ πράσινο έως σχεδόν γκρι και έχουν μήκος και πλάτος μικρότερο από 5 μm. Τα κονίδια, τα οποία είναι μονοκύτταρα, μπορεί να έχουν επιμήκη ή κάπως σφαιρικό σχήμα και μπορεί να έχουν λεία ή ελαφρά οδοντωτή επιφάνεια. (Samuels, 1996). (Εικόνα 2)



Εικόνα 2: Κονιδιοφόρα , φιαλίδια και κονίδια των στελεχών *Trichoderma*.



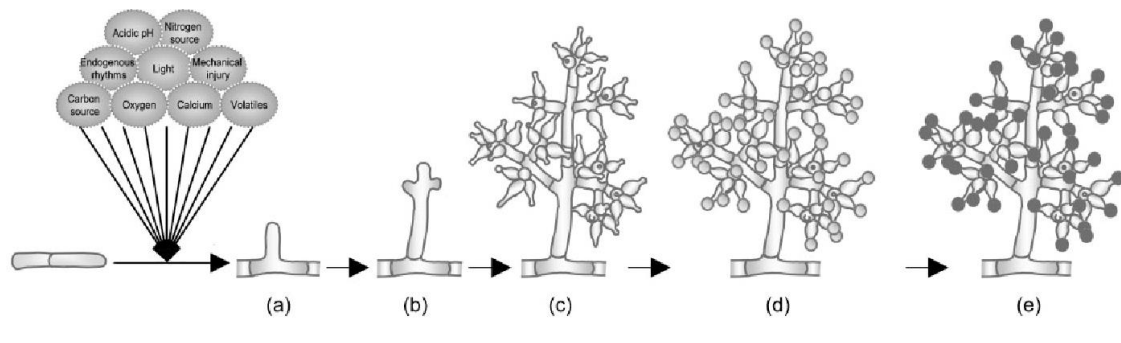
Εικόνα 3: Απομονωμένο στέλεχος του Τριχοδέρματος.

1.4 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΟΥ TRICHODERMA

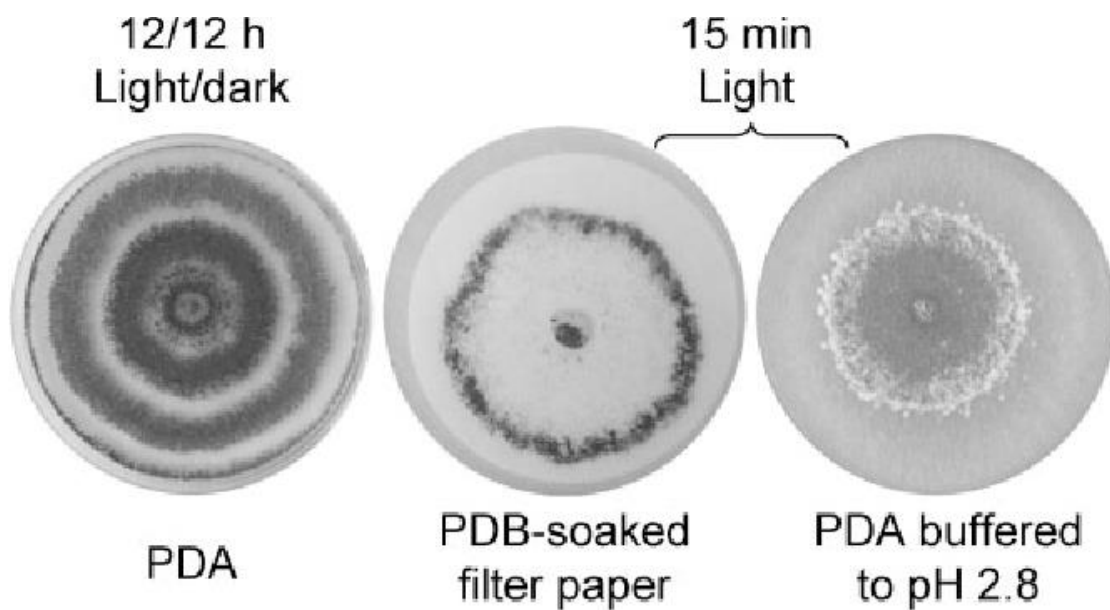
Τα είδη Trichoderma παρουσιάζουν τυπική ανάπτυξη μυκητιακών υφών, με διάμετρο 5-10 μm και ελάχιστες διατροφικές απαιτήσεις, ωστόσο ο πολλαπλασιασμός του διευκολύνεται από την παρουσία οργανικού υλικού και υγρασίας. Το ιδανικό εύρος θερμοκρασίας για την ανάπτυξή του κυμαίνεται μεταξύ 25 και 30 βαθμών Κελσίου. Σε εργαστηριακές συνθήκες, τα περισσότερα στελέχη παράγουν ασεξουαλικά σπόρια όπως τα κονίδια και τα χλαμυδοσπόρια, ενώ σχηματίζουν ασκοσπόρια στην περιθηκία στο φυσικό τους περιβάλλον. Αυτά τα σπόρια εξυπηρετούν το σκοπό της διασποράς ή του λήθαργου και χρησιμοποιούνται επίσης για εμβολιασμούς. Παρά το γεγονός ότι τα χλαμυδοσπόρια έχουν εντοπιστεί εδώ και πολύ καιρό, οι γνώσεις μας σχετικά με τους γενετικούς μηχανισμούς που διέπουν την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή τους παραμένουν περιορισμένες. Παρόλα αυτά, τα χλαμυδοσπόρια παράγονται άφθονα σε βυθισμένα περιβάλλοντα και χρησιμεύουν ως το κύριο μέσο διάδοσης σε ορισμένα εμπορικά προϊόντα που βασίζονται στο Trichoderma. (Romero-Arenas et al.(2009)

Αναπαραγωγή

Τα περισσότερα στελέχη *Trichoderma* έχουν ταξινομηθεί ως ατελείς μύκητες καθώς δεν έχουν σεξουαλικό στάδιο αλλά παράγουν μόνο ασεξουαλικά σπόρια. Ωστόσο, σε ορισμένες στελέχη το σεξουαλικό στάδιο είναι γνωστό, π.χ. σε ασκομύκητες του γένους *Hypocrea*, αλλά όχι σε στελέχη που χρησιμοποιούνται για βιολογικό έλεγχο ασθενειών. Οι μοριακές προσεγγίσεις χρησιμοποιούνται τώρα για ταξινόμηση, γεγονός που είχε ως αποτέλεσμα οι ταξινομικές τάξεις να αυξηθούν από το εννέα σε τουλάχιστον τριάντα τρεις σήμερα. Τα περισσότερα στελέχη είναι ιδιαίτερα προσαρμοσμένα σε έναν ασεξουαλικό κύκλο ζωής. Σε αυτή την περίπτωση, η πλαστικότητα των χρωμοσωμάτων είναι ο κανόνας, αφού διαφορετικά στελέχη έχουν διαφορετικούς αριθμούς και μεγέθη χρωμοσωμάτων. Υπάρχουν μεγάλες διαφορές στον φαινότυπο και τον γονότυπο των άγριων στελεχών. Ενώ τα άγρια στελέχη είναι πολύ ευπροσάρμοστα και μπορεί να είναι ετεροκαρυωτικά, π.χ. *H. Δεδομένου* ότι πυρήνες διαφορετικών γονοτύπων περιέχονται σε έναν μόνο οργανισμό και επομένως είναι εξαιρετικά μεταβλητοί, τα στελέχη που χρησιμοποιούνται για βιοέλεγχο στην εμπορική γεωργία είναι ή θα έπρεπε να είναι ομοκαρυωτικά, π.χ. οι πυρήνες είναι όλοι γενετικά όμοιοι ή πανομοιότυποι. Σε συνδυασμό με τον αυστηρό έλεγχο της ποικιλίας μέσω της γενετικής μετατόπισης, αυτό επιτρέπει σε αυτά τα εμπορικά στελέχη να είναι γενετικά διακριτά και μεταβλητά. Αυτό είναι ένα εξαιρετικά σημαντικό στοιχείο ποιοτικού ελέγχου για κάθε εταιρεία που επιθυμεί να εμπορευματοποιήσει αυτούς τους οργανισμούς. (Harman, 2000). Φυσικά ερεθίσματα, όπως η έκθεση στο φως και ο μηχανικός τραυματισμός στο μυκήλιο, πυροδοτούν την κονιδίωση. Ωστόσο, η ίδια η κονιδιογένεση είναι μια ολιστική απόκριση που καθορίζεται από τη μεταβολική κατάσταση του κυττάρου, όπως επηρεάζεται από το περιβάλλον και τους ενδογενείς βιολογικούς ρυθμούς. Βασικές αναπαραγωγική περιβαλλοντικές παράμετροι είναι η κατάσταση άνθρακα και αζώτου και η αναλογία C:N, το pH του περιβάλλοντος και το επίπεδο των ιόντων ασβεστίου. (Steyaert et al. , 2010)



Εικόνα 4: Κονιδιογένεση στο *Trichoderma* μετά από την επίδραση διαφόρων ερεθισμάτων. (α) Εμφάνιση κατακόρυφων υφών, (β) διακλάδωση υφών, (γ) ανάπτυξη υφών, (δ) εμφάνιση υαλικών κωνιδίων, (ε) ωρίμανση της χρωματισμός των κωνιδίων. (Steyaert et al. 2010)



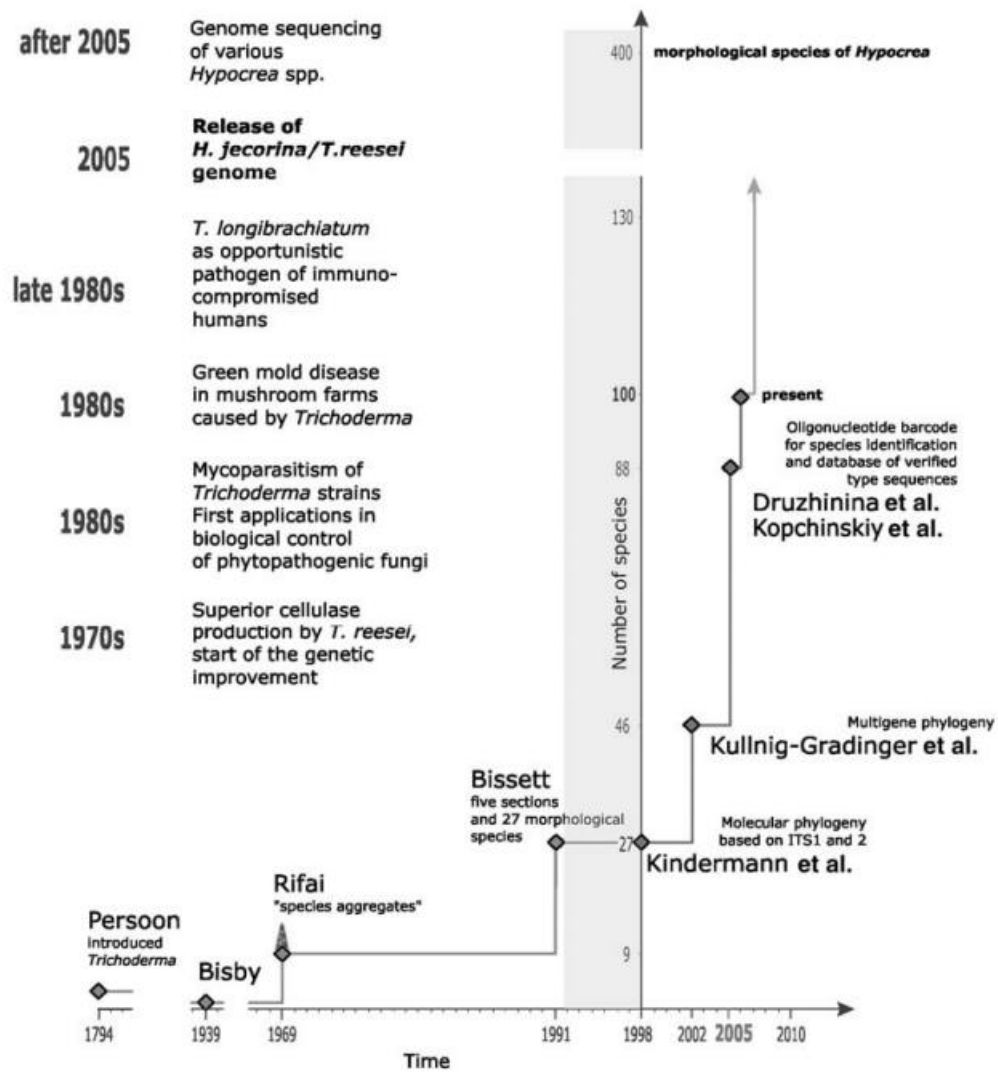
Εικόνα 5: Μορφολογικά πρότυπα φωτοκωνιδιοποίησης του *T. atroviride*. PDB, ζυμός δεξτρόζης πατάτας. (Steyaert et al. 2010)

1.5 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Η γενική ονομασία *Trichoderma* εισήχθη πριν από περισσότερα από 200 χρόνια από τον Persoon (1794) με βάση το υλικό που συλλέγεται στη Γερμανία. Συμπεριέλαβε τέσσερα είδη στο γένος, αλλά μόνο ένα, το *Trichoderma viride*, αποδείχθηκε στην πραγματικότητα ότι είναι *Trichoderma* με βάση τις επόμενες έρευνες. Εβδομήντα χρόνια αργότερα οι Tulasne και Tulasne (1860) προσδιόρισαν ότι το *T. viride* είναι το ασεξουαλικό στάδιο της *Hypocrea rufa*. Το γεγονός ότι αυτή η σχέση εξακολουθεί να ισχύει σήμερα καθιστά την ανακάλυψή τους ένα ορόσημο στην ταξινόμηση των κονιδιακών μυκήτων. Συνεχίζοντας στις αρχές του 20ου αιώνα, περιγράφηκαν επιπλέον είδη *Trichoderma*, αλλά επειδή τα περισσότερα από αυτά τα απομονωμένα στελέχη δεν έχουν διατηρηθεί, η ταυτότητά τους είναι αμφίβολη. Πολλές από αυτές τις απομονώσεις που διατηρήθηκαν αποδείχθηκε ότι είτε ήταν πανομοιότυπες με ένα περιγραφόμενο είδος είτε δεν ανήκουν στο *Trichoderma*. Για παράδειγμα, ο Abbott (1927) αναγνώρισε τέσσερις καλά καθορισμένες ομάδες μεταξύ των ενσωματωμένων απομονώσεων *Trichoderma* από το έδαφος, αλλά διέκρινε μόνο τρία είδη με δύο από αυτά θεωρούνται πλέον συνώνυμα του *T. viride*. Ο Bisby (1939) μείωσε όλα τα είδη *Trichoderma* στο μεμονωμένο είδος *T. viride*, ένα σύστημα που ακολουθήθηκε μέχρι το 1969. Ωστόσο, η υψηλή φαινοτυπική ποικιλομορφία του συστήματος ενός είδους ώθησε τους John Webster και Mein Rifai να αναθεωρήσουν την ταξινόμηση του *Trichoderma* και *Hypocrea* εξετάζοντας τους κύκλους ζωής των ειδών *Hypocrea* (Rifai and Webster 1966a,b; Rifai 1969). Ακολούθησαν την προσέγγιση ότι η προσθήκη χαρακτήρων από ένα τελεόμορφο θα βοηθούσε στον ορισμό του *Trichoderma*. Σε μια μεταγενέστερη περιεκτική μονογραφία, ο Rifai (1969) αναγνώρισε εννέα συνολικά είδη, μερικά από τα οποία απομονώθηκαν από δείγματα *Hypocrea*. Επόμενο βήμα έγινε από τον Bissett (1984, 1991a–c, 1992). Έβλεπε ορισμένα από τα συνολικά είδη του Rifai ως τμήματα και μέσα σε αυτά τα τμήματα, ο Bissett αναγνώρισε βιολογικά είδη. Πράγματι, πολλά από τα νέα είδη του Bissett βασίστηκαν σε καλλιέργειες που ελήφθησαν ως *T. hamatum*. Αντικατέστησε τα 9 συνολικά είδη αναγνωρίζοντας επίσημα τέσσερα τμήματα που περιλαμβάνουν 27 είδη. (Druzhinina et al. 2006)

Ο αριθμός των ειδών που περιλαμβάνονται στο γένος *Trichoderma* είναι εδώ και καιρό αντικείμενο αβεβαιότητας. Αρχικά προτάθηκε από τον Persoon το 1794 με τέσσερα είδη, παραμένει μόνο το *T. uiride*. Το Saccardo's *Sylloge fungorum* περιελάμβανε μόνο 27 είδη *Trichoderma* και πριν από το 1980 είχαν περιγραφεί λιγότερα από πενήντα είδη. Το μοναδικό εργαλείο αναγνώρισης για το *Trichoderma* πριν από το 1939 παρεχόταν από τους Gilman & Abbott (1927), οι οποίοι κατηγοριοποίησαν το *Pachybasium* ως ένα είδος και διαφοροποίησαν τέσσερα είδη *Trichoderma* με βάση τα χαρακτηριστικά της αποικίας, το σχήμα των κονιδίων και τη μελάγχρωση. Ο Bisby (1939) υποστήριξε ότι η μεταβλητότητα των χαρακτηριστικών της αποικίας και το σχήμα και η διακόσμηση των κονιδίων καθιστούσαν δύσκολο τον

καθορισμό των ορίων των ειδών, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι υπήρχε μόνο ένα είδος, το *T. uiride*. Αναγνώρισε ότι ενώ ένας μικρός αριθμός απομονώσεων εμφάνιζε διακριτές αποικίες ή μορφολογικά χαρακτηριστικά, αυτές οι φαινομενικές διαφορές έγιναν λιγότερο σαφείς όταν εξετάστηκε ένας μεγαλύτερος αριθμός καλλιεργειών. Κατά την περίοδο από το 1939 έως το 1969, πιστευόταν ευρέως ότι το *Trichoderma* αποτελούνταν μόνο από ένα είδος. Είναι σημαντικό να εξεταστεί προσεκτικά η βιβλιογραφία για τη βιολογία του *Trichoderma* από αυτή τη στιγμή. Επί του παρόντος, υπάρχουν περίπου εβδομήντα πέντε αναγνωρισμένα είδη *Trichoderma*. Οι Doi & Doi (1986) παρείχαν έναν κατάλογο ειδών που περιγράφηκαν πριν από το 1986. Ο αριθμός των ειδών που υπάρχουν στην πραγματικότητα εξαρτάται από τον τρόπο με τον οποίο ορίζεται ένα είδος. Αν λάβουμε υπόψη το παράδειγμα του *T. reesei*, θα μπορούσαν να υπάρχουν πολλά διαφορετικά κλωνικά είδη που είναι γενετικά παρόμοια με άλλα μορφοειδή. Εάν υποθέσουμε ότι η πλειοψηφία των ειδών *Hypocrea* είναι έγκυρα είδη *Trichoderma* και ότι μόνο τα μισά από τα περιγραφόμενα είδη *Hypocrea* είναι έγκυρα, τότε πρέπει να υπάρχουν τουλάχιστον 100 βιολογικά είδη *Trichoderma*. Ωστόσο, αυτή η εκτίμηση δεν λαμβάνει υπόψη τα πολλά μη περιγραφόμενα είδη *Hypocrea*. Οι γνώσεις μας για την ταξινόμηση του *Hypocrea* δεν είναι πολύ πιο προηγμένες από τις γνώσεις μας για το ίδιο το *Trichoderma*. Η μονογραφία του Doi (1972) για το γένος στην Ιαπωνία παρέχει μια ιδέα για την ποικιλομορφία των άγνωστων ειδών στο *Hypocrea*. Από τα πενήντα δύο αποδεκτά taxa, τα 31 ταξινομήθηκαν ως νέα. Τα περισσότερα από αυτά εμφάνισαν χαρακτηριστικά παρόμοια με το *Trichoderma*. Ενώ πολλά από αυτά θα μπορούσαν να αποδοθούν σε υπάρχοντα είδη, είναι σαφές ότι υπάρχει μεγαλύτερη μορφολογική διακύμανση από ό,τι αναφέρεται στα συσσωματώματα Rifai. Έτσι, ενώ οι Domsch et al. (1980) σωστά παρατήρησε ότι οι εννέα συναθροίσεις ειδών του Rifai θα μπορούσαν να συσχετιστούν με περισσότερα από ένα τηλεόμορφα είδη, μεγάλο μέρος της φαινοτυπικής ποικιλομορφίας στο *Trichoderma* παραμένει άγνωστο. (Druzhinina et al. 2006)



Εικόνα 6: Η εξέλιξη της ταξινόμησης του Τριχοδέρματος spp. πριν και αφού εισαχθούν οι μέθοδοι μοριακής φυλογένεσης. Η γκριζα γραμμή υποδηλώνει την αναμενόμενη άυξηση αριθμού των αναγνωρίσιμων ειδών στο κοντινό μέλλον. (Druzhinina et al. 2006)

1.6 ΧΡΗΣΗ, ΟΦΕΛΗ ΤΡΙΧΟΔΕΡΜΑΤΟΣ

Τα είδη *Trichoderma* είναι μύκητες που μπορούν να βρεθούν σε αφθονία στα οικοσυστήματα του εδάφους και των ριζών. Ένα από τα αξιοσημείωτα χαρακτηριστικά τους είναι η ικανότητά τους να δημιουργούν μια σειρά από ενώσεις που διεγείρουν τους αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών, είτε σε συγκεκριμένες περιοχές είτε σε ολόκληρο το φυτικό σύστημα. Λόγω αυτών των χαρακτηριστικών, τα στελέχη *Trichoderma* έχουν χρησιμοποιηθεί από καιρό ως βιολογικοί παράγοντες για τον έλεγχο των φυτικών ασθενειών. Επιπλέον, έχουν αποδείξει την αποτελεσματικότητά τους στην ενίσχυση της ανάπτυξης και ανάπτυξης των ριζών, ενισχύοντας την παραγωγικότητα της καλλιέργειας, ενισχύοντας την αντίσταση στις περιβαλλοντικές πιέσεις και διευκολύνοντας την απορρόφηση και τη χρήση των θρεπτικών συστατικών. Η χρήση των στελεχών *Trichoderma* ως προαγωγή ανάπτυξης των φυτών είναι ευεργετική λόγω της ικανότητάς τους να διαλυτοποιούν φωσφορικά άλατα και μικροθρεπτικά συστατικά. Όταν αυτά τα στελέχη εφαρμόζονται σε φυτά όπως τα χόρτα, ενισχύουν αποτελεσματικά την ανάπτυξη βαθιών ριζών, βελτιώνοντας έτσι την ανθεκτικότητα του φυτού στις συνθήκες ξηρασίας.

Βιοχημικοί διεγέρτες της νόσου ανθεκτικότητα: Τα στελέχη *Trichoderma* έχουν αναγνωριστεί ως αποτελεσματικοί παράγοντες για την τόνωση της αντοχής στα φυτά. Επί του παρόντος, οι ερευνητές έχουν ανακαλύψει τρεις διακριτές κατηγορίες ενώσεων που παράγονται από το *Trichoderma* που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην πρόκληση αντοχής. Αυτές οι ενώσεις είναι υπεύθυνες για την ενεργοποίηση της παραγωγής αιθυλενίου, την πρόκληση αντιδράσεων υπερευαισθησίας και την ενεργοποίηση άλλων αποκρίσεων που σχετίζονται με την άμυνα σε διάφορα είδη φυτών.

Διαγονιδιακά φυτά: Η ενσωμάτωση του γονιδίου ενδοχτινιάσης από το *Trichoderma* σε διάφορα είδη φυτών, έχει οδηγήσει σε ενισχυμένη αντίσταση κατά του πολλαπλασιασμού των μυκήτων.

Βιοαποκατάσταση: Τα στελέχη *Trichoderma* είναι εξαιρετικά σημαντικά στη διαδικασία της βιοαποκατάστασης για το έδαφος που έχει μολυνθεί με φυτοφάρμακα και ζιζανιοκτόνα. Αυτά τα στελέχη διαθέτουν τη μοναδική ικανότητα να διασπών και να εξαλείφουν διάφορους τύπους εντομοκτόνων, συμπεριλαμβανομένων των οργανοχλωρικών, οργανοφωσφορικών και ανθρακικών αλάτων.

1.7 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ

Μυκητίαση: Το *Trichoderma* μπορεί να αναπτύσσεται παρά την παρουσία τοξικών ουσιών στο έδαφος που οφείλονται είτε σε παραγόμενους μεταβολήτες από τα φυτά, είτε σε τοξικές ενώσεις που βρίσκονται σε ζιζανιοκτόνα, μυκητοκτόνα και εντομοκτόνα. Επίσης το *Trichoderma* έχει την δυνατότητα ανάκαμψης ακόμα και μετά την επαφή του με μεγάλες ποσότητες αυτών των ουσιών. (Gajera 2013)

Ανταγωνισμός για θρεπτικά συστατικά: Οι μικροοργανισμοί, όπως οι μύκητες, είναι πιο πιθανό να πεθάνουν από έλλειψη θρεπτικών συστατικών. Ως αποτέλεσμα, ο ανταγωνισμός για θρεπτικά συστατικά μπορεί να οδηγεί στη βιολογική ρύθμιση των μυκητιακών φυτοπαθογόνων. Ο σίδηρος είναι ένα σημαντικό θρεπτικό συστατικό για τους μύκητες. Όταν οι μύκητες αντιμετωπίζουν έλλειψη σιδήρου, απελευθερώνουν σιδεροφορές, οι οποίες είναι ενώσεις που μπορούν να δεσμεύσουν τον σίδηρο και να τον κάνουν πιο διαθέσιμο για τον μύκητα. Ο σίδηρος στη συνέχεια λαμβάνεται από τον μύκητα μέσω ειδικών μηχανισμών πρόσληψης. Συγκεκριμένα, ορισμένα στελέχη του μύκητα *Trichoderma* παράγουν σιδεροφορές πιο δυνατές με αποτέλεσμα να συνδέονται με τον σίδηρο και να μην υπάρχει αρκετό διαθέσιμο για άλλους μύκητες, αναστέλλοντας έτσι την ανάπτυξη τους. Το *Trichoderma* είναι ένας πολύ ευπροσάρμοστος μύκητας που μπορεί να προσαρμοστεί σε διαφορετικές συνθήκες. Αυτό οφείλεται στην εκτεταμένη γενετική του παραλλαγή. Το *Trichoderma* είναι επίσης σε θέση να χρησιμοποιεί και να απολαμβάνει θρεπτικά συστατικά πιο αποτελεσματικά από άλλους οργανισμούς. Αυτό του δίνει ένα πλεονέκτημα έναντι άλλων μυκήτων. Το *Trichoderma* παρουσιάζει ανώτερη ικανότητα σε σύγκριση με άλλους οργανισμούς στη χρήση και την απόκτηση θρεπτικών στοιχείων του εδάφους. Αναφορά Το *Trichoderma* είναι σε θέση να μεταβολίζει μια ποικιλία θρεπτικών συστατικών, συμπεριλαμβανομένων των σακχάρων, της κυτταρίνης, της γλυκάνης και της χιτίνης. Αυτή η ικανότητα του επιτρέπει να χρησιμοποιεί θρεπτικά συστατικά που είναι λιγότερο διαθέσιμα για άλλους οργανισμούς. (Gajera 2013)

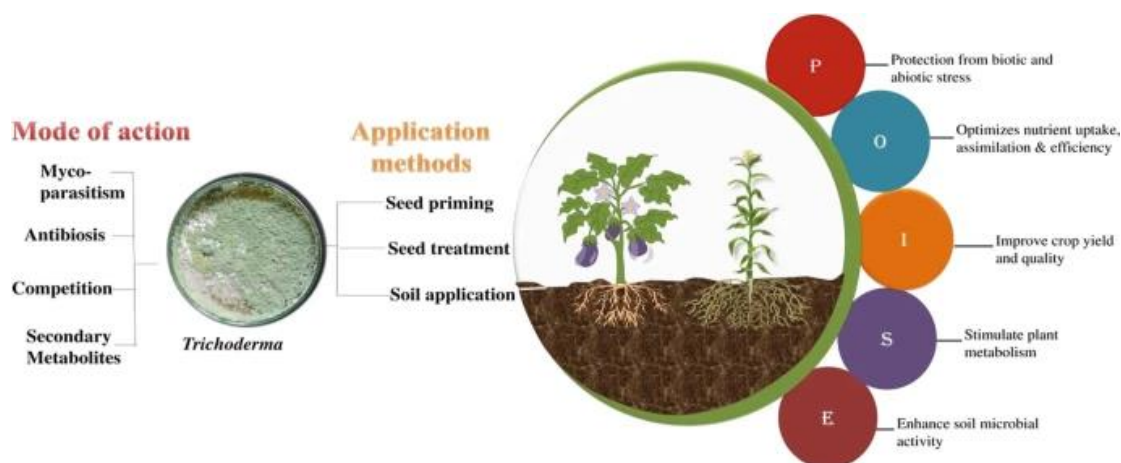
ΑΝΤΙΒΙΩΣΗ

Τα αντιβιοτικά είναι χημικές ουσίες που παράγονται από έναν οργανισμό και αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλου οργανισμού. Στελέχη του γένους *Trichoderma* παράγουν μια ποικιλία αντιβιοτικών, συμπεριλαμβανομένων της γλιοβιρίνης, των αλαμεθικίνων, της τριχολίνης, των πεπταϊβόλων και των αντιβιοτικών πυρόνης. Αυτά τα αντιβιοτικά μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη άλλων μυκήτων με διάφορους τρόπους, όπως η παρεμπόδιση της σύνθεσης πρωτεΐνης, της αναπνοής ή της κυτταρικής διαίρεσης. Τα υδρολυτικά ένζυμα είναι ένζυμα που διασπούν μεγάλα μόρια, όπως η κυτταρίνη, η χιτίνη και οι γλυκάνες. Τα στελέχη *Trichoderma* παράγουν μια ποικιλία υδρολυτικών ενζύμων, συμπεριλαμβανομένων της χιτινάσης, της κυτταρινάσης και της γλυκανάσης. Αυτά τα ένζυμα μπορούν να αποδομήσουν το κυτταρικό τοίχωμα του μύκητα, καθιστώντας τον πιο ευάλωτο σε βλάβη από αντιβιοτικά. Ο συνδυασμός της παραγωγής αντιβιοτικών και υδρολυτικών ενζύμων

καθιστούν το *Trichoderma* sp. πιο αποτελεσματικό έναντι άλλων μυκήτων. (Gajera 2013)

ΜΥΚΟΠΑΡΑΣΙΤΙΣΜΟΣ

Η άμεση μόλυνση ενός μύκητα από έναν άλλο είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει πολλά στάδια, όπως η αναγνώριση, η επίθεση, η διείσδυση και τελικά η θανάτωση του ξενιστή. Το *Trichoderma* sp. μπορεί να ανιχνεύσει την παρουσία άλλων μυκήτων και να αναπτυχθεί ενεργά προς αυτούς. Η ικανότητα αίσθησης της παρουσίας άλλων μυκήτων αποδίδεται εν μέρει στη διαδοχική έκφραση πρωτεϊνών όπως οι χιτινάσες, οι γλυκανάσες και οι πρωτεάσες. Το *Trichoderma* sp. χρησιμοποιεί την παραγωγή εξωχιτινασών για να ανιχνεύσει και να επιτεθεί σε άλλους μύκητες. Οι εξωχιτινάσες είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την αναγνώριση μυκήτων, καθώς εκκρίνονται από πολλούς διαφορετικούς τύπους μυκήτων. Όταν το *Trichoderma* sp. ανιχνεύει εξωχιτινάσες από έναν άλλο μύκητα, ξεκινά την παραγωγή των δικών του εξωχιτινασών. Αυτές βοηθούν στην αποικοδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος του μύκητα στόχου, καθιστώντας τον πιο ευάλωτο σε περαιτέρω βλάβη. (Gajera 2013)



Εικόνα 7: Μηχανισμοί δράσεις του Τριχοδέρματος. (Woo et al. 2022)

2. ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

2.1 ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Με τη διαθεσιμότητα των αναλυτικών στοιχείων DNA για συστηματική μυκητίαση, οι ερευνητές του *Trichoderma* ενσωμάτωσαν γρήγορα τον πρώτο πολυμορφισμό μήκους θραύσματος περιορισμού (RFLP) και το τυχαίο ενισχυμένο πολυμορφικό DNA (RAPD) και αργότερα την ανάλυση αλληλουχίας στην αναπτυσσόμενη

ταξινόμηση του *Trichoderma* και του *Hypocrea* (για ανασκόπηση, βλ. Lieckfeldt et al. 1998). Οι εργασίες που διεξήχθησαν έως το 2000, οι οποίες περιλάμβαναν την αναγνώριση του *T. reesei* ως ανάμορφου του *H. jecorina*, και μια αναθεώρηση της ενότητας *Longibrachiatum* (Kuhls et al. 1996, 1997), χρησιμοποίησαν κυρίως την εσωτερική μεταγραφή περιοχές διαχωρισμού (ITS) των ριβοσωμικών γονιδίων που κωδικοποιούν RNA, ITS1 και ITS2. Οι Kindermann et al. (1998) επιχείρησε μια πρώτη φυλογένεση ολόκληρου του γένους με βάση τις αλληλουχίες ITS1. Ωστόσο, μετά την εργασία για το σύμπλεγμα ειδών *Gibberella fujikuroi* (O'Donnell et al. 1998, 2000), οι ερευνητές ένιωσαν την ανάγκη να βάλουν τις φυλογενεσίες τους στο έδαφος της ανάλυσης πολλών μη συνδεδεμένων γονιδίων (Taylor et al. 2000). Kullnig-Gradinger et al. (2002) πρωτοστάτησε με μια φυλογένεση όλων των περιγραφόμενων ειδών *Trichoderma*, με βάση την ανάλυση αλληλουχίας των ITS1 και -2, το πέμπτο εσώνιο του παράγοντα επιμήκυνσης μετάφρασης 1-άλφα (*tef1*), ένα μερικό εξόνιο της ενδοχιτινάσης 42 (*ech42*) και το μικρό υπομονάδα του μιτοχondριακού γονιδίου που κωδικοποιεί rRNA. Η εργασία τους αύξησε τον αριθμό των ειδών που διακρίνονται με μοριακές μεθόδους σε 47. Τα επόμενα χρόνια, η εργασία των Chaverri και Samuels (Chaverri et al. 2003 a,b; Chaverri and Samuels 2004) για το *Hypocrea* spp με πράσινα σπόρια διπλασίασαν τον αριθμό των ειδών *Trichoderma*. Δεδομένου ότι η πλειονότητα των ειδών αναγνωρίστηκε στη «μοριακή εποχή» της ταξινόμησης των μυκήτων, το γένος *Trichoderma* τεκμηριώνεται εξαιρετικά καλά από δεδομένα γονιδιακής αλληλουχίας, καθώς σχεδόν κάθε είδος τεκμηριώνεται με διαγνωστικές αλληλουχίες από τουλάχιστον ένα έως δύο γονίδια.

2.2 ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

Οι συμβατικές τεχνικές δεν επαρκούν για τη μικροβιακή ταξινόμηση καθώς παρέχουν περιορισμένες μόνο πληροφορίες σχετικά με χαρακτηριστικά όπως το σχήμα, το χρώμα, το μέγεθος και την κινητικότητα. Η μοριακή ταυτοποίηση είναι μια πολύ ακριβής μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση οργανισμών με μεγάλη ακρίβεια και σε διάφορες εφαρμογές, όπως η ιατρική, η γεωργία και η περιβαλλοντική επιστήμη. Σε γενικές γραμμές, η διαδικασία της μοριακής ταυτοποίησης περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

Εξαγωγή DNA: Το DNA απομονώνεται από το δείγμα.

Αλληλούχιση DNA: Η αλληλουχία του DNA προσδιορίζεται.

Σύγκριση αλληλουχίας: Η αλληλουχία του δείγματος συγκρίνεται με την αλληλουχία ενός γνωστού οργανισμού.

Ταυτοποίηση οργανισμού: Ο οργανισμός του δείγματος ταυτοποιείται με βάση τη σύγκριση της αλληλουχίας του.

2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (*PCR*) είναι μια εξαιρετικά προηγμένη και ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για την επαναληπτική ενίσχυση των νουκλεϊκών οξέων. Αυτή η διαδικασία απαιτεί την παρουσία ενός ζεύγους συνθετικών ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων που συνδέονται με τους δύο κλώνους της αλληλουχίας στόχου σε κοντινή απόσταση. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει τρία στάδια: (α) ξετύλιγμα DNA, κατά το οποίο διαχωρίζεται η διπλή έλικα του DNA στόχου, (β), προσκόλληση των εκκινήτων στις συμπληρωματικές αλληλουχίες τους στο μόριο στόχο η οποία συμβαίνει σε χαμηλότερη θερμοκρασία και (γ) αντίδραση επιμήκυνσης, όπου η DNA πολυμεράση επεκτείνει τις αλληλουχίες των εκκινήτων σε μια κατεύθυνση 5' προς 3' χρησιμοποιώντας το DNA στόχο ως εκμαγείο. Στο τέλος κάθε κύκλου, η ποσότητα των προϊόντων *PCR* θεωρητικά διπλασιάζεται. Η όλη διαδικασία εκτελείται σε έναν προγραμματισμένο θερμικό κυκλοποιητή και ολοκληρώνεται μετά από 30 έως 50 κύκλους, οδηγώντας σε μια εκθετική αύξηση του συνολικού αριθμού αντιγράφων της αλληλουχίας στόχου. (Κυριαζής, κ.α., 2014)

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση.

Η *PCR* αντίστροφης μεταγραφάσης (*rtPCR*) δημιουργήθηκε ως μέσο μεγέθυνσης αλληλουχιών RNA, επιτρέποντας μια πιο ενδελεχή εξέταση και ανάλυση. Η διαδικασία ξεκινά με τη μετατροπή των RNA-στόχων σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) μέσω της χρήσης ενός μοναδικού ενζύμου γνωστού ως ανάστροφη μεταγραφάση. Στη συνέχεια, το ενισχυμένο cDNA υποβάλλεται στην μέθοδο *PCR*, ενισχύοντας περαιτέρω την παρουσία του για μελέτη. (Κυριαζής, κ.α., 2014)

Επάλληλη *PCR*.

Η Nested *PCR* είναι μια τεχνική που έχει σχεδιαστεί ειδικά για να βελτιώνει την ακρίβεια ανίχνευσης μικρών ποσοτήτων στόχου σε δείγμα που περιέχει παρόμοιες ακολουθίες. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση δύο σετ εκκινητών. Στην πρώτη φάση ενίσχυσης, χρησιμοποιείται ένα σετ εκκινητών και τα προκύπτοντα προϊόντα ενίσχυσης υποβάλλονται στη συνέχεια σε δεύτερη φάση ενίσχυσης χρησιμοποιώντας ένα διαφορετικό σύνολο εκκινητών που στοχεύουν μια εσωτερική αλληλουχία του πρώτου κύκλου προϊόντος. Αυτή η διαδικασία διπλής ενίσχυσης αυξάνει σημαντικά την ειδικότητα της *PCR* και επιτρέπει τη διαφοροποίηση μεταξύ αλληλουχιών που είναι παρόμοιες αλλά όχι ταυτόσημες. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι κατά τη μεταφορά των προϊόντων ενίσχυσης από την πρώτη φάση στην δεύτερη φάση αντίδρασης, υπάρχει πιθανότητα διασταυρούμενων αντιδράσεων. Για την αντιμετώπιση αυτού του ζητήματος, ο φυσικός διαχωρισμός των δύο μειγμάτων ενίσχυσης μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας ένα στρώμα κεριού ή λαδιού. Εναλλακτικά, οι εκκινητές μπορούν να σχεδιαστούν ειδικά για να λειτουργούν σε διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδισμού ώστε να αποτρέπονται οι διασταυρούμενες αντιδράσεις. (Κυριαζής, κ.α., 2014)

Multiplex PCR.

Η Multiplex *PCR* είναι μια τεχνική που επιτρέπει την ενίσχυση πολλαπλών αλληλουχιών στόχων ταυτόχρονα μέσα στον ίδιο σωλήνα αντίδρασης. Αυτό επιτυγχάνεται με την εισαγωγή δύο ή περισσότερων ζευγών εκκινητών, το καθένα ειδικό για διαφορετικό στόχο, στο μίγμα της αντίδρασης. Το πλεονέκτημα της multiplex *PCR* είναι ότι επιτρέπει την ανίχνευση και την ενίσχυση περισσότερων της μιας μοναδικής αλληλουχίας στόχου σε ένα μόνο δείγμα. Για να διασφαλιστεί η επιτυχία της multiplex *PCR*, είναι σημαντικό να σχεδιαστούν προσεκτικά οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται. Ο λόγος είναι ότι εάν οι εκκινητές έχουν σημαντικά διαφορετικές θερμοκρασίες τήξης, ενδέχεται να μην λειτουργούν βέλτιστα στην ίδια αντίδραση, οδηγώντας σε ασυνεπή ενίσχυση. Συνοπτικά, η multiplex *PCR* είναι ένα ισχυρό εργαλείο στη μοριακή βιολογία που επιτρέπει την ταυτόχρονη ενίσχυση πολλαπλών αλληλουχιών στόχων. Αυτή η τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διαγνωστικούς σκοπούς και ποσοτική ανάλυση του DNA ή RNA στόχου. (Κυριαζής, κ.α., 2014)

Αλυσιδωτή αντίδραση λιγάσης.

Η αλυσιδωτή αντίδραση λιγάσης (LCR) είναι μια εξαιρετικά ευαίσθητη και ειδική μέθοδος που χρησιμοποιεί ένα θερμόφιλο ένζυμο (λιγάση DNA) και δύο ζεύγη εκκινητών (ολιγονουκλεοτίδια) διατεταγμένα με διαδοχικό και συμπληρωματικό τρόπο. Σε αντίθεση με τις μεθόδους που βασίζονται στην πολυμεράση, η LCR περιλαμβάνει τη σύνδεση διαδοχικών εκκινητών κάθε ζεύγους μέσω δράσης λιγάσης, σχηματίζοντας ένα πρόσθετο ολιγονουκλεοτίδιο. Η ειδικότητα του LCR ενισχύεται από την ευαισθησία της λιγάσης σε αναντιστοιχίες βάσεων, ιδιαίτερα στο 3' άκρο των εκκινητών, καθιστώντας την κατάλληλη για ανίχνευση σε πραγματικό χρόνο μεταλλάξεων σημείου υποκατάστασης (SNPs). (Κυριαζής, κ.α., 2014)

Μικροσυστοιχίες

Η χρήση μικροσυστοιχιών DNA στην μικροβιολογία παρουσιάζει τρεις κύριες εφαρμογές. Αυτά περιλαμβάνουν τον εντοπισμό και την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών, την ανάλυση των ιδιοτήτων τους όπως η αντοχή στα αντιβιοτικά και την πιθανή ανακάλυψη νέων μικροοργανισμών. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα των μικροσυστοιχιών DNA εξαρτάται από την ποσότητα των νουκλεϊκών οξέων που υπάρχουν στα δείγματα που εξετάζονται. Τυπικά, η ενίσχυση *PCR* χρησιμοποιώντας συγκεκριμένα ζεύγη εκκινητών είναι απαραίτητη για την ενίσχυση της ευαισθησίας των μικροσυστοιχιών, αν και αυτή η διαδικασία ενίσχυσης προσθέτει πολυπλοκότητα στη διαδικασία. Οι ανιχνευτές μπορεί να είναι μακριά μόρια DNA, που λαμβάνονται από μια βιβλιοθήκη cDNA ή γίνονται μέσω *PCR*, ή βραχεία συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια που έχουν τυπικά μήκος 20-80 βάσεων. Οι μικροί ανιχνευτές μπορούν να συντεθούν χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους, όπως φωτολιθογραφία (όπως φαίνεται στο Affymetrix GeneChip® Arrays), τεχνολογία inkjet (όπως η τεχνολογία Agilent Sure Print) ή χημική σύνθεση χρησιμοποιώντας μικροηλεκτρόδια (όπως το CustomArray™ της CombiMatrix Corporation). Οι μικροσυστοιχίες εναιωρήματος, οι οποίες περιλαμβάνουν την προσάρτηση ανιχνευτών DNA σε μικροσφαιρίδια που μπορούν να αναγνωριστούν μεμονωμένα (όπως το Luminex), αποτελούν εναλλακτική λύση στις επίπεδες μικροσυστοιχίες DNA. Αυτή η τρισδιάστατη κινητική αντίδραση επιτρέπει ταχύτερο υβριδισμό, οδηγώντας σε μείωση του κόστους και τη δυνατότητα εξέτασης περισσότερων δειγμάτων. Οι φθορίζουσες βαφές χρησιμοποιούνται συχνά για την επισήμανση των νουκλεϊκών στόχων στα δείγματα και μετά τον υβριδισμό στη μικροσυστοιχία, τυχόν μη

δεσμευμένοι στόχοι απομακρύνονται μέσω πλύσεων. Στη συνέχεια χρησιμοποιείται μικροσκόπιο φθορισμού για την ανίχνευση των υβριδοποιημένων στόχων. Είναι απίθανο το γενετικό υλικό από ένα τόσο ευρύ φάσμα παραγόντων που προέρχεται από δείγματα ιστών να έχει απομονωθεί και να έχει ενισχυθεί ώστε να αναπαρασταθεί σε μία μόνο μικροσυστοιχία. Επομένως, μια συνδρομική προσέγγιση στο σχεδιασμό διαγνωστικών μικροσυστοιχιών παθογόνων, η οποία λαμβάνει υπόψη τις διαθέσιμες πληροφορίες για τον προσδιορισμό της καλύτερης μεθόδου για την προετοιμασία του νουκλεϊκού οξέος στόχου από το δείγμα, είναι πιο ρεαλιστική. (Fabrice Teletchea, 2009)

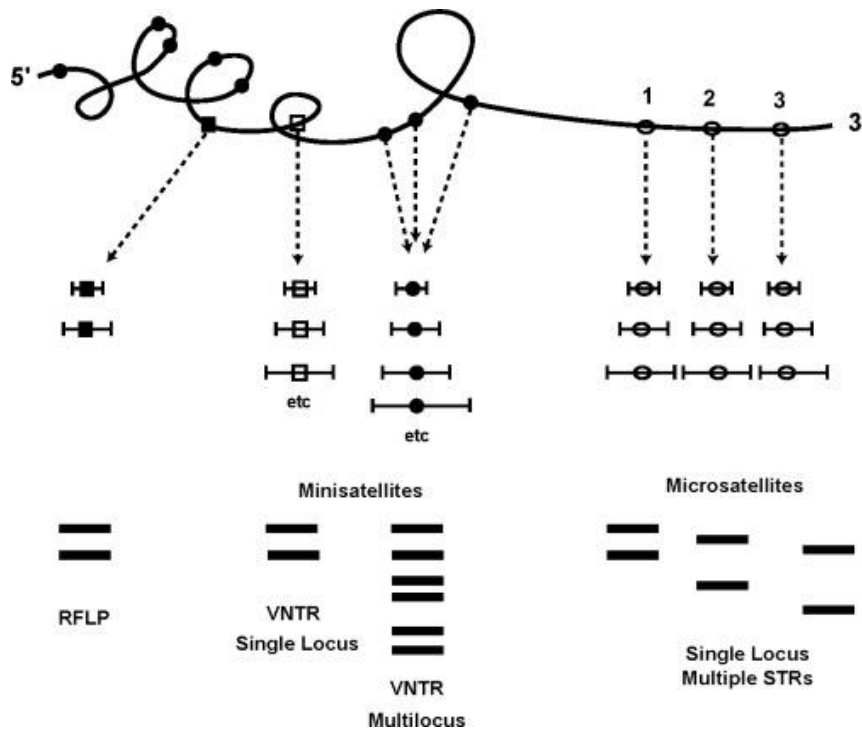
Το PCR-RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) είναι μια τεχνική μοριακής βιολογίας που χρησιμοποιείται για την ενίσχυση τυχαίων τμημάτων γονιδιωματικού DNA χρησιμοποιώντας έναν μόνο σύντομο εκκινητή αυθαίρετης αλληλουχίας. Η τεχνική αυτή είναι σχετικά απλή και γρήγορη, και δεν απαιτεί προηγούμενη γνώση της αλληλουχίας του DNA του δείγματος. Τα πλεονεκτήματα της τεχνικής PCR-RAPD είναι ότι δεν απαιτεί προηγούμενη γνώση της αλληλουχίας του DNA του δείγματος. Στοχεύει πολλές αλληλουχίες στο DNA του δείγματος, παράγοντας πρότυπα DNA που επιτρέπουν τη σύγκριση πολλών τύπων ταυτόχρονα. Είναι απλή και γρήγορη. Υπάρχουν όμως και κάποια μειονεκτήματα όπως ότι μπορεί να μην είναι πρακτικό να προσδιοριστεί το είδος προέλευσης σε προϊόντα που περιέχουν μείγματα ειδών. Δεν είναι επαρκής για την ανάλυση μερικώς υποβαθμισμένου υλικού. (Fabrice Teletchea, 2009)

Η διαδικασία των RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) περιλαμβάνει την απομόνωση και πέψη του DNA , το διαχωρισμό των τμημάτων του DNA με ηλεκτροφόρηση αγαρόζης, τα οποία συνήθως έχουν μέγεθος 2-10 kd , την υβριδοποίηση τους για ορισμένο γενετικό τόπο και τέλος την ανίχνευση τυχόν πολυμορφισμού με αυτοραδιογραφία ή μη ραφιενεργή σήμανση. Οι δείκτες αυτοί υπάρχουν άφθονοι στα περισσότερα γονιδιώματα, όπου είναι τυχαία διασκορπιζόμενοι, οι ζώνες που παράγουν μπορεί να αποδοθούν σε γενετικούς τόπους και αλληλόμορφους, υπάρχει συγκυριαρχία αλληλόμορφων, ενώ τα αποτελέσματα που προκύπτουν είναι επαναλήψιμα. Γενικά πρόκειται για χρονοβόρα και τεχνικά δύσκολη διαδικασία, με υψηλό κόστος εφαρμογής και πρόσθετο κόστος σε περίπτωση που δεν υπάρχουν κατάλληλοι σημαντές. Απαιτεί μεγάλη συγκέντρωση DNA (5-10 kd), μεγάλου μοριακού βάρους, ενώ δεν επιδέχεται αυτοματισμό.

Δακτυλικό αποτύπωμα DNA

Στον τομέα της γενετικής, το δακτυλικό αποτύπωμα DNA, αναφέρεται σε μια μέθοδο που χρησιμοποιείται για την απομόνωση και τον εντοπισμό γενετικών στοιχείων που παρουσιάζουν μεταβλητότητα στην αλληλουχία των ζευγών βάσεων DNA. Αυτή η τεχνική αναπτύχθηκε το 1984 από τον Βρετανό γενετιστή Alec Jeffreys, ο οποίος παρατήρησε ότι ορισμένες αλληλουχίες DNA γνωστές ως Minisatellites, οι οποίες δεν έχουν κανένα ρόλο στις λειτουργίες των γονιδίων, επαναλαμβάνονται μέσα στα γονίδια. Ο Jeffreys συνειδητοποίησε ότι κάθε άτομο διαθέτει ένα ξεχωριστό μοτίβο μίνι δορυφόρων, με μόνη εξαίρεση τα άτομα που προέρχονται από έναν μόνο ζυγότη, όπως τα πανομοιότυπα δίδυμα. Η διαδικασία δημιουργίας δακτυλικού αποτυπώματος DNA ξεκινά με τη λήψη δείγματος κυττάρων που περιέχουν DNA. Στη συνέχεια το DNA απομονώνεται και καθαρίζεται. Στην αρχική μέθοδο του Jeffreys, η οποία χρησιμοποίησε την τεχνολογία πολυμορφισμού μήκους περιοριστικού τμήματος (RFLP), το DNA κόβεται σε συγκεκριμένες θέσεις χρησιμοποιώντας περιοριστικά ένζυμα. Αυτά τα ένζυμα δημιουργούν θραύσματα διαφόρων μεγεθών, τα οποία διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε ένα πήκτωμα. Τα κοντύτερα θραύσματα κινούνται πιο γρήγορα προς τον θετικό πόλο. Τα διαχωρισμένα δίκλινα θραύσματα DNA στη συνέχεια μεταφέρονται σε ένα φύλλο νάιλον μέσω μιας τεχνικής στύπωσης. Τα θραύσματα εκτίθενται σε ανιχνευτές DNA, τα οποία είναι συνθετικά κομμάτια DNA που είναι ραδιενεργά και συνδέονται με τους μίνι δορυφόρους. Τα θραύσματα εκτίθενται σε φιλμ ακτινών X, με αποτέλεσμα να παράγονται σκοτεινά σημάδια όπου είναι προσαρτημένος ένας ραδιενεργός ιχνηθέτης. Στη συνέχεια αναλύεται το μοτίβο των σημείων που προκύπτει. Η ανάλυση που αναπτύχθηκε από τον Jeffreys έχει αντικατασταθεί από πιο σύγχρονες προσεγγίσεις που χρησιμοποιούν την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (*PCR*) και μικροδορυφόρους (ή *STR*).

Οι μικροδορυφόροι έχουν μικρότερες επαναλαμβανόμενες μονάδες σε σύγκριση με τους μίνι δορυφόρους και η *PCR* ενισχύει το επιθυμητό θραύσμα DNA, δημιουργώντας πολλά αντίγραφα. Αυτή η αυτοματοποιημένη διαδικασία είναι αποτελεσματική με περιορισμένα δείγματα DNA και ακόμη και αποικοδομημένο DNA. Μόλις παραχθεί επαρκής ποσότητα DNA, η αλληλουχία των ζευγών νουκλεοτιδίων σε ένα τμήμα DNA μπορεί να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους βιομοριακής αλληλούχισης.



Εικόνα 8: Μικροδορυφόρος και Μινιδορυφόρος (Trent, R. J., 2005)

2.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΡΙΧΟΔΕΡΜΑΤΟΣ

Απαραίτητη είναι επίσης η μοριακή ταυτοποίηση του μύκητα *Trichoderma*. Διότι λόγω αυτής μπορεί να γίνει η επιλογή του κατάλληλου στελέχους για τη βιολογική καταπολέμηση των ασθενειών των φυτών. Επίσης επιτυγχάνεται η παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας των προϊόντων βιολογικού ελέγχου. Για να πραγματοποιηθεί η μοριακή ταυτοποίηση χρειάζεται αρχικά να γίνει η συλλογή του δείγματος του *Trichoderma*. Η συλλογή του γίνεται συνήθως από το έδαφος, τις καλλιέργειες και από σάπια ξυλεία. Επόμενο βήμα είναι η απομόνωση του και η καλλιέργεια του. Έπειτα η εξαγωγή του DNA, δηλαδή το DNA απομονώνεται από το δείγμα. Ακολουθεί η αλληλούχιση DNA του τριχοδέρματος και στη συνέχεια η σύγκριση αλληλουχίας του. Τέλος η ταυτοποίηση οργανισμού, ο οργανισμός του δείγματος ταυτοποιείται με βάση τη σύγκριση της αλληλουχίας του. Έχουν μελετηθεί 18 papers. Με βάση αυτά θα γίνει σύγκριση των μεθόδων που έχουν εκτελεστεί από τους μελετητές ως προς τις τεχνικές που ακολουθούν, τις υπάρχουσες ομοιότητες και διαφορές.

2.3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΡΙΧΟΔΕΜΑΤΟΣ

Η απομόνωση και καλλιέργεια του τριχοδέρματος σύμφωνα με τα papers είναι δυνατή με διάφορες μεθόδους και μέσα. Τα μέσα που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη του και το καθαρισμό του είναι το άγαρ δεξτρόζης πατάτας PDA, άγαρ εκχυλίσματος βύνης MEA, άγαρ καλαμποκάλευρου (Difco) + 2% (β/ο) δεξτρόζη (CMD) και σε στερεό μέσο YEG. Συγκεκριμένα τα papers που χρησιμοποίησαν ως μέσο το άγαρ δεξτρόζης πατάτας PDA (M.R. HERMOSA 2000, , WEIZHEN QI AND LEI ZHAO 2012, PERVAIZ A. ABBASI 1993, Xuping Shentu(2014), M. Belén Rubio(2014), Ainhoa Martínez-Medina,(2014), LIDIA BLASZCZYK 2011 , S. Muthumeenakshi(1994)) εμφανίζουν σημαντικές ομοιότητες και μικρές διαφορές μεταξύ τους. Όλες οι μέθοδοι των papers ξεκινούν με τη συλλογή και καθαρισμό του μυκηλίου από το αρχικό δείγμα σε άγαρ δεξτρόζης πατάτας PDA εκτός από το (LIDIA BLASZCZYK 2011) και (Krishna Kumar(2011)) Στο πρώτο τα κομμάτια του αποσυντιθέμενου ξύλου επιστρώθηκαν σε θρεπτικό άγαρ αλμυρού νερού (SNA, Nirenberg 1976) και επώαστηκαν στους 20°C για 6 ημέρες και έπειτα οι αποικίες καθαρίστηκαν σε 2 γύρους υποκαλλιέργειας σε άγαρ δεξτρόζης πατάτας PDA. Στο paper Krishna Kumar(2011) τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο και αποθηκεύτηκαν στους 4°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Πενταπλάσιες σειριακές αραιώσεις για κάθε δείγμα εδάφους παρασκευάστηκαν σε αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό και 0,5 ml αραιωμένου δείγματος χύθηκε στην επιφάνεια του ειδικού μέσου Trichoderma (TSM). Σε γενικές γραμμές οι μέθοδοι είναι παρόμοιοι με μικρές διαφορές στις συνθήκες κυρίως στην θερμοκρασία, στην διάρκεια καλλιέργειας του μυκηλίου. Πιο συγκεκριμένα το μυκήλιο διατηρήθηκε στους 25 με 28 βαθμούς κελσίου (M.R. HERMOSA 2000, , WEIZHEN QI AND LEI ZHAO 2012, PERVAIZ A. ABBASI 1993, Ainhoa Martínez-Medina,(2014), , S. Muthumeenakshi(1994)) ενώ στα υπόλοιπα στους 4 βαθμούς κελσίου (Xuping Shentu(2014), M. Belén Rubio(2014), LIDIA BLASZCZYK (2011)). Η διάρκεια καλλιέργειας του μυκηλίου σε ορισμένα papers διαρκεί 4 ημέρες (Pervaiz A. Abbasi, 1993; Xuping Shentu, 2014; Ainhoa Martínez-Medina, 2014) ενώ σε άλλα paper η καλλιέργεια του μυκηλίου διαρκεί 3 ημέρες (S. Muthumeenakshi, 1994; M. Belén Rubio, 2014). Τα μυκήλια για την εκχύλιση του DNA σε όλα τα papers αναπτύσσονται σε υγρές καλλιέργειες (120 rpm-200 rpm) στους 25°C σε ζωμό δεξτρόζης πατάτας (PDB) από 2 έως και 5 μερες. Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν τη θερμοκρασία καλλιέργειας και εκχύλισης DNA από μύκητες του γένους Trichoderma. Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν το είδος ή το στέλεχος του μύκητα. Μερικά είδη ή στελέχη Trichoderma είναι πιο ευαίσθητα σε υψηλές θερμοκρασίες από άλλα. Ένας άλλος παράγοντας είναι η επιθυμητή ποιότητα του DNA. Η υψηλότερη θερμοκρασία μπορεί να οδηγήσει σε φθορές στο DNA. Επίσης η μέθοδος εκχύλισης DNA. Ορισμένες μέθοδοι εκχύλισης DNA είναι πιο

αποτελεσματικές σε ορισμένες θερμοκρασίες. Για παράδειγμα, το κείμενο του Pervaiz A. Abbasi (1993) περιγράφει απομονώσεις από το έδαφος, ενώ το κείμενο του Krishna Kumar (2011) περιγράφει απομονώσεις από το νερό. Είναι πιθανό ότι ορισμένα είδη ή στελέχη *Trichoderma* είναι πιο ανθεκτικά σε υψηλές θερμοκρασίες από άλλα. Η επιθυμητή ποιότητα του DNA. Τα κείμενα περιγράφουν διαφορετικές εφαρμογές για το DNA που εκχυλίζεται. Για παράδειγμα, το κείμενο του S. Muthumeenakshi (1994) περιγράφει την εφαρμογή της αλληλούχησης DNA. Η υψηλότερη θερμοκρασία μπορεί να οδηγήσει σε φθορές στο DNA, οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν την αλληλούχηση. Η μέθοδος εκχύλισης DNA. Τα κείμενα περιγράφουν διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης DNA. Για παράδειγμα, το κείμενο του Xuping Shentu (2014) περιγράφει τη χρήση μιας μεθόδου που είναι πιο αποτελεσματική σε υψηλότερες θερμοκρασίες.

Τα επόμενα papers ALAN CASTLE 1998, IRINA S. DRUZHININA 2005, MUHAMMAD ANEES 2010, IRINA S. DRUZHININA 2008, χρησιμοποίησαν ως μέσο το άγαρ εκχυλίσματος βύνης MEA. Και στα τρία papers οι μύκητες αναπτύχθηκαν στους 25 βαθμούς κελσίου. Συγκεκριμένα ο ALAN CASTLE 1998 έλαβε δείγματα από υλικά κομπόστ ή περιβλήματος που ήταν εμφανώς αποικισμένα από το *Trichoderma*. Αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως εμβόλια σε πλάκες άγαρ εκχυλίσματος βύνης (MEA) (30 g εκχυλίσματος βύνης Difco και 15 g άγαρ ανά λίτρο) που περιείχαν 0,78 g θειικής στρεπτομυκίνης (Fisher) ανά λίτρο. Οι πλάκες επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Οι συγγραφείς IRINA S. DRUZHININA 2005, MUHAMMAD ANEES 2010, IRINA S. DRUZHININA 2008 ανέπτυξαν στο μυκήλιο σε άγαρ εκχυλίσματος βύνης (MEA) στους 25 βαθμούς κελσίου για 2-4 ημέρες. Ο Inbal Gal-Hemed(2011) διαφέρει διότι πρώτα το τριχόδερμα αναπτύχθηκε σε άγαρ δεξτρόζης πατάτας PDA και έπειτα για την εκχύλιση του DNA τα μυκήλια συλλέχθηκαν μετά από 2 έως 4 ημέρες ανάπτυξης σε 3% άγαρ εκχυλίσματος βύνης (MEA, Merck, Γερμανία) στους 25°C. Επιπλέον διαφορές διακρίνουμε στα δείγματα που έγιναν οι απομονώσεις. Ο Alan Castle (1998) τα δείγματα που χρησιμοποίησε για την απομόνωση ήταν υλικά κομπόστ ή περιβλήματος που ήταν εμφανώς αποικισμένα από το *Trichoderma*. Η Irina S. Druzhinina (2005) τα δείγματα για την απομόνωση ήταν ξύλα σε αποσύνθεση και έδαφος. Ο Inbal Gal-Hemed (2011) τα στελέχη *Hypocrea/Trichoderma* απομονώθηκαν από το μεσογειακό σπόγγο είδος *Psammocinia* και το καθιερωμένο στέλεχος βιοελέγχου T203.

Κοινό στοιχείο των Irina S. Druzhinina (2005), SARAH L. DODD 2017, PRISCILA CHAVERTI 2003, είναι ότι χρησιμοποίησαν ως μέσο το άγαρ καλαμποκάλευρου (Difco) + 2% (β/ο) δεξτρόζη (CMD) σε θερμοκρασία δωματίου (25 βαθμούς κελσίου). Έγινε απομόνωση ασκοσπορίων με χρήση μικροχειριστή ή βελόνας πλατίνας και από τους τρεις ερευνητές. Εδικότερα στην Irina S. Druzhinina (2005) οι καλλιέργειες ελήφθησαν με άμεση απομόνωση από το υπόστρωμα ή από στρώματα τηλεόμορφων *Hypocrea*. Στον Priscilla Chavert (2003) οι καλλιέργειες ελήφθησαν από φρέσκες συλλογές δειγμάτων *Hypocrea*.

Τελευταίο μέσο είναι το YEG που αποτελείται από γλυκόζη, εκχύλισμα μαγιάς, φωσφορικό κάλιο και άγαρ. Η γλυκόζη παρέχει ενέργεια για την ανάπτυξη των μυκήτων, το εκχύλισμα μαγιάς παρέχει θρεπτικά συστατικά και το φωσφορικό κάλιο βοηθά στη σταθεροποίηση του μέσου. Το άγαρ χρησιμοποιείται για να δώσει στο μέσο ημιστερεή μορφή. Το YEG παρέχει τα θρεπτικά συστατικά που χρειάζονται οι μύκητες του γένους *Trichoderma* για να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν. Οι συγγραφείς KRISTIAN FOG NIESEN 2005, L HATVANI 2006 το χρησιμοποίησαν με ιχνοστοιχεία (0,001% $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ και 0,0005% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$) και 5 g γλυκόζη ανά λίτρο, 1 g εκχύλισμα μαγιάς ανά λίτρο, 5 g KH_2PO_4 ανά λίτρο και 20 g άγαρ ανά λίτρο σε απεσταγμένο νερό συμπληρωμένο με 0,1 g στρεπτομυκίνης ανά λίτρο και 0,1 g γλωραμφενικόλης ανά λίτρο, αντίστοιχα.

2.3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Τα παρακάτω papers για την απομόνωση του γονιδιωματικού DNA χρησιμοποίησαν το kit QIAGEN DNeasy Plant Maxi σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. (Irina S. Druzhinina (2005), (2008), (2012), Kristian Fog Nieslen (2005), Ainhoa Martinez Melida (2014), Inbal Gal Hmed (2011)), Sarah L. Dodd(2017), Priscila Chaverri (2003). Το kit χρησιμοποιεί μια σειρά βημάτων για να διαχωρίσει το DNA από άλλα μόρια, όπως πρωτεΐνες, RNA και πολυσακχαρίτες. Είναι εύκολο στη χρήση διότι περιλαμβάνει όλα τα υλικά και τις οδηγίες που απαιτούνται για την απομόνωση DNA. Παρέχει DNA υψηλής ποιότητας αφού χρησιμοποιεί μια σειρά βημάτων για να διαχωρίσει το DNA από άλλα μόρια, εξασφαλίζοντας έτσι την υψηλή ποιότητα του απομονωμένου DNA. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μια ποικιλία δειγμάτων για την απομόνωση DNA όπως στελέχη, ρίζες, και σπόρους. Βέβαια είναι σχετικά ακριβό από άλλα kit απομόνωσης DNA που είναι διαθέσιμα στην αγορά. Δεν είναι κατάλληλο για όλους τους τύπους δειγμάτων: Το kit μπορεί να μην είναι κατάλληλο για την απομόνωση DNA από δείγματα που είναι πολύ μικρά ή που έχουν υποστεί επεξεργασία.

Στα επόμενα papers (Krisha Kumar (2011), S. Muthumeenakshi(1994), M. Belén Rubio(2014)) το συνολικό μυκητιακό DNA εκχυλίστηκε με τη μέθοδο φαινόλης-χλωροφορμίου που περιγράφηκε από τους Reader και Broda. Η μέθοδος απομόνωσης DNA του *Trichoderma* Reader και Broda είναι μια μέθοδος που

βασίζεται σε χημική θραύση και χρωματογραφία. Είναι μια βελτιωμένη έκδοση της παραδοσιακής μεθόδου απομόνωσης DNA του Trichoderma. Χρησιμοποιεί μια σειρά χημικών ουσιών για να διασπάσει το δείγμα Trichoderma και να απελευθερώσει το DNA. Στη συνέχεια, το DNA διαχωρίζεται από άλλα μόρια με χρήση χρωματογραφίας. Παρέχει DNA υψηλής ποιότητας εφόσον χρησιμοποιεί μια σειρά βημάτων για να διαχωρίσει το DNA από άλλα μόρια. Είναι αποτελεσματική για μια ποικιλία δειγμάτων Trichoderma και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση, συμπεριλαμβανομένων των φρέσκων, αποξηραμένων, μολυσμένων και επεξεργασμένων δειγμάτων. Είναι σχετικά εύκολη στη χρήση και μπορεί να πραγματοποιηθεί από ερευνητές με διαφορετικά επίπεδα εμπειρίας. Είναι σχετικά ακριβή γιατί απαιτεί τη χρήση ορισμένων ακριβών χημικών ουσιών. Δεν είναι κατάλληλη για όλα τα δείγματα Trichoderma. Μπορεί να μην είναι κατάλληλη για την απομόνωση DNA από δείγματα που είναι πολύ μικρά ή που έχουν υποστεί πολύ σοβαρή επεξεργασία.

Σύμφωνα με το paper (ALAN Castle (1998)) η απομόνωση DNA έγινε με την μεθοδο φαινόλης-χλωροφορμίου που περιγράφηκε από τους Reader και Broda. Αυτές οι δυο μέθοδοι που περιγράφηκαν στον ALAN Castle (1998) και Reader και Broda έχουν κάποιες διαφορές. Η μέθοδος του ALAN Castle (1998) χρησιμοποιεί ένα διάλυμα αποπρωτεϊνοποίησης που περιέχει SDS, προνάση και EDTA. Το SDS διασπά τις πρωτεΐνες, η προνάση διασπά το RNA και το EDTA ρυθμίζει το pH του διαλύματος. Το διάλυμα αποπρωτεϊνοποίησης στους Reader και Broda περιέχει μόνο SDS και EDTA. Επίσης χρησιμοποιεί μια βραχεία επώαση στους 37°C για να διασπάσει τις κυτταρικές μεμβράνες και να απελευθερώσει το DNA ενώ το δεύτερο πρωτόκολλο απαιτεί επώαση στους 37°C για 8 ώρες. Η μέθοδος του Reader και Broda χρησιμοποιεί ένα στάδιο καθαρισμού με 7,5 M οξικό αμμώνιο για να αφαιρέσει τα νουκλεϊκά οξέα που δεν είναι DNA. Στον ALAN Castle (1998) απαιτεί μόνο ένα στάδιο καθίζησης με αιθανόλη για να αφαιρέσει τα νουκλεϊκά οξέα που δεν είναι DNA. Επιπλέον, η δεύτερη περιγράφει ένα βήμα ελέγχου της ποιότητας του DNA που δεν περιλαμβάνεται στην πρώτη. Αυτό το βήμα περιλαμβάνει ηλεκτροφόρηση πηκτη για να επιβεβαιωθεί ότι το DNA έχει απομονωθεί με επιτυχία και ότι είναι υψηλής ποιότητας.

Το πρωτόκολλο απομόνωσης mtDNA που περιγράφεται στην M. R. HERMOSA είναι ένα τυπικό πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται για την απομόνωση καθαρού mtDNA από μύκητες. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα. Αλέθισμα του μυκηλίου σε υγρό άζωτο για να διασπαστεί το κυτταρικό τοίχωμα και να απελευθερωθούν τα μιτοχόνδρια. Κυτταρική λύση σε διάλυμα σακχαρόζης, EDTA και τρικίνης για να απομακρυνθούν τα μιτοχόνδρια από άλλα κυτταρικά συστατικά. Φυγοκέντρηση για να διαχωριστούν τα μιτοχόνδρια από τα υπόλοιπα κυτταρικά συστατικά. Λύση των μιτοχονδρίων με πρωτεΐνάση K και δωδεκυλοθειικό νάτριο και Nonidet P-40 για τη διάσπαση των πρωτεϊνών που συνδέονται με το mtDNA.

Φυγοκέντρηση για να απομακρυνθούν τα μη λυμένα υλικά. Καθαρισμός του mtDNA με φυγοκέντρηση βαθμίδωσης χλωριούχου καισίου-δισβενζιμιδίου για τον διαχωρισμό του mtDNA από άλλα μόρια DNA. Απομάκρυνση της βαφής με βουτανόλη χρησιμοποιείται για την ενίσχυση της ορατότητας του mtDNA. Συμπύκνωση του mtDNA με καθίζηση με αιθανόλη για τη συμπύκνωση του mtDNA σε μορφή που είναι εύκολη στη χειρισμό και στην ανάλυση. Η χρήση χαμηλής θερμοκρασίας για την απολύμανση του μυκηλίου και την αποφυγή τροποποίησης του DNA.

Το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο κείμενο Lidia Błaszczuk (2011) είναι μια μέθοδος για την εκχύλιση συνολικού DNA από σιτηρά και μύκητες. Η μέθοδος που χρησιμοποιεί είναι CTAB, η οποία είναι μια αποτελεσματική μέθοδος για την εκχύλιση DNA από φυτικά και βακτηριακά υλικά. Η διαδικασία εκχύλισης περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα: Αλέθισμα του υλικού σε λεπτή σκόνη. Αυτό βοηθά στη διάσπαση των κυττάρων και στην απελευθέρωση του DNA. Η χρήση χαμηλής θερμοκρασίας για την επώαση του αλεσμένου υλικού βοηθά στη διατήρηση της ακεραιότητας του DNA. Επώαση του αλεσμένου υλικού σε διάλυμα CTAB. Το διάλυμα CTAB περιέχει σαπωνοποιητικά και αλκαλικά άλατα που βοηθούν στη διάσπαση των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων. Εξαγωγή του DNA με χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης. Η χλωροφορμίου/ισοαμυλική αλκοόλη είναι ένα μη πολικό μίγμα που μπορεί να διαχωρίσει το DNA από άλλα μόρια, όπως πρωτεΐνες και νουκλεοτίδια. Καθίζηση του DNA με αιθανόλη. Το DNA είναι ένα πολικό μόριο και θα κατακαθίσει σε αιθανόλη. Διαλύση του DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα. Το ρυθμιστικό διάλυμα βοηθά στη σταθεροποίηση του DNA. Οι δύο φυγοκέντρες για την απομάκρυνση του χλωροφορμίου βοηθά στη μείωση της περιεκτικότητας σε χλώριο του DNA, η οποία μπορεί να επηρεάσει την ανάλυση της αλληλουχίας. Το ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει EDTA βοηθά στην πρόληψη της κατάρρευσης του DNA.

Το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο κείμενο των Weizhen Qi and Lei Zhao(2012) είναι μια μέθοδος για την εκχύλιση γονιδιωματικού DNA από το στέλεχος Q1 του βακτηρίου Escherichia coli. Η μέθοδος χρησιμοποιεί τη μέθοδο phenol-chloroform-isoamyl alcohol (PCI), η οποία είναι μια αποτελεσματική μέθοδος για την εκχύλιση DNA από βακτήρια. Η μέθοδος είναι σχετικά απλή και μπορεί να πραγματοποιηθεί με σχετικά χαμηλό κόστος. Διαλύετε το λυοφιλοποιημένο υλικό σε διάλυμα EDTA-Tris-SDS-προνάση. Το διάλυμα αυτό βοηθά στη διάσπαση των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων. Εκχύλιση των πρωτεϊνών με χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης. Η χλωροφορμίου/ισοαμυλική αλκοόλη είναι ένα μη πολικό μίγμα που μπορεί να διαχωρίσει τις πρωτεΐνες από το DNA. Καθίζηση του DNA με οξικό αμμώνιο και αιθανόλη. Το DNA είναι ένα πολικό μόριο και θα κατακαθίσει σε

αιθανόλη. Πλύσιμο του DNA με αιθανόλη για να απομακρυνθεί η αιθανόλη και η χλωροφορμίου. Διαλύση του DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα. Το ρυθμιστικό διάλυμα βοηθά στη σταθεροποίηση του DNA. Η χαμηλή θερμοκρασία για την αποπρωτεϊνοποίηση βοηθά στη διατήρηση της ακεραιότητας του DNA. Οι 2 φυγοκέντρσεις για την απομάκρυνση της χλωροφορμίου βοηθά στη μείωση της περιεκτικότητας σε χλώριο του DNA, η οποία μπορεί να επηρεάσει την ανάλυση της αλληλουχίας. Το ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει EDTA βοηθά στην πρόληψη της κατάρρευσης του DNA.

Τα προαναφερόμενα papers αν και με διαφορετικά πρωτόκολλα έχουν κάποια κοινά σημεία. Συγκεκριμένα όλες οι μέθοδοι περιλαμβάνουν τα ακόλουθα βασικά βήματα. Γίνεται αλέθισμα του δείγματος για να διασπαστούν τα κύτταρα και να απελευθερωθεί το DNA. Διαλύση του DNA σε ένα διάλυμα που βοηθά στη διάσπαση των πρωτεϊνών και των άλλων μορίων που συνδέονται με το DNA. Καθίζηση του DNA από άλλα μόρια με χρήση χρωματογραφίας ή εκχύλισης με χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης. Διαλύση του DNA σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα που βοηθά στη σταθεροποίηση του DNA. Επιπροσθέτως όλες οι μέθοδοι χρησιμοποιούν χαμηλή θερμοκρασία για να διατηρήσουν την ακεραιότητα του DNA. Συνολικά, τα παραπάνω πρωτόκολλα είναι παρόμοια ως προς την προσέγγισή τους στην απομόνωση DNA. Όλες οι μέθοδοι χρησιμοποιούν μια σειρά βημάτων για να διαχωρίσουν το DNA από άλλα μόρια, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, του RNA και των πολυσακχαριτών. Οι μέθοδοι αυτές είναι αποτελεσματικές για την απομόνωση DNA από μια ποικιλία δειγμάτων, συμπεριλαμβανομένων των φυτών, των βακτηρίων και των μυκήτων.

2.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ TRICHODERMA

2.4.1 ΑΝΕΠΤΥΞΗ ΤΥΧΑΙΑ ΕΝΙΣΧΥΜΕΝΑ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΚΑ DNA (RAPD)

Δυο συγγραφείς μελέτησαν το Trichoderma με την μέθοδο RAPD (S. Muthumeenakshi et al.(1994), Alan Castle) et al. (1998)) . Συγκεκριμένα οι μελέτες βασίζονται στην πράσινη επιδημία μούχλας όπως ονομάστηκε στις Βρετανικές Νήσους κατά την περίοδο 1985-86 και πιο πρόσφατα στα τέλη του 1990 και το

1991 στις καλλιέργειες μανιταριών. Αρχικά οι S. Muthumeenakshi et al. (1994) ανέπτυξαν τυχαία ενισχυμένα πολυμορφικά DNA (RAPD) ως μοριακούς δείκτες για την ταυτοποίηση απομονώσεων *T. harzianum* από φάρμες με μανιτάρια στις Βρετανικές Νήσους. Με βάση αυτήν την έρευνα ο Alan Castle et al. (1998) θέλησαν να αναπτύξουν διαδικασίες μοριακής ταυτοποίησης κατάλληλες για βορειοαμερικανικά στελέχη *T. harzianum* και να προσδιορίσουν τη γενετική παραλλαγή σε απομονώσεις *Trichoderma* από τη Βρετανική Κολομβία, την Αλμπέρτα, το Οντάριο και την Πενσυλβάνια.

Για ανάλυση RAPD των S. Muthumeenakshi et al. (1994), χρησιμοποίησαν τέσσερις εκκινητές RAPD για να εξετάσουν τη γενετική ποικιλομορφία των απομονώσεων του μύκητα *Trichoderma harzianum*. Οι εκκινητές αυτοί είναι A3: AGTCAGCCAC, B6: TGCTCTGCCC, B7: GGTGACGCAG, B10: CTGCTGGGAC. Για κάθε απομόνωση, πραγματοποίησαν τέσσερις αντιδράσεις *PCR*, χρησιμοποιώντας έναν διαφορετικό εκκινητή κάθε φορά. Τα προϊόντα *PCR* αραιώθηκαν και στη συνέχεια χωρίστηκαν σε πηκτές αгарόζης που χρωματίστηκαν με βρωμιούχο αιθίδιο. Τα θραύσματα DNA εμφανίστηκαν ως λωρίδες στη πηκτη με κάθε λωρίδα να αντιπροσωπεύει ένα διαφορετικό RAPD. Για να αναλυθεί η γενετική ποικιλομορφία, μετρήσανε το μέγεθος και τον αριθμό των RAPD που εμφανίστηκαν για κάθε απομόνωση. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης RAPD χρησιμοποιήθηκαν για να δημιουργηθεί ένα δένδρο γενεαλογίας που δείχνει τις σχέσεις μεταξύ των απομονώσεων. Επιπλέον οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι οι απομονώσεις του *T. harzianum* που προκαλούν ασθένεια πράσινης μούχλας είναι γενετικά διακριτές από τα άλλα απομονωμένα στελέχη. Αυτές οι απομονώσεις σχηματίζουν ξεχωριστή ομάδα στο δένδρο γενεαλογίας. Η ανάλυση ITS 1 του rDNA είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του είδους και του υποείδους του *T. harzianum*. Στην ανάλυση αυτή, χρησιμοποιείται η περιοχή ITS 1 του rDNA, η οποία είναι μια περιοχή του DNA που είναι κοινή σε όλα τα είδη του *T. harzianum*. Εδώ χρησιμοποίησαν δύο βιοτινυλιωμένους εκκινητές για να ενισχύσουν την περιοχή ITS 1 του rDNA. Οι βιοτινυλιωμένοι εκκινητές έχουν προσαρτημένο ένα μόριο βιοτινίνης η οποία μπορεί να ανιχνευθεί με τη χρήση ενός ειδικού αντισώματος. Για κάθε απομόνωση, οι ερευνητές πραγματοποίησαν δύο αντιδράσεις *PCR*, χρησιμοποιώντας έναν από τους βιοτινυλιωμένους εκκινητές με έναν κατάλληλο μη βιοτινυλιωμένο εκκινητή. Τα προϊόντα *PCR* χωρίστηκαν σε πηκτές άγαρόζης που χρωματίστηκαν με βρωμιούχο αιθίδιο. Τα θραύσματα DNA που έφεραν βιοτινίνη ανιχνεύθηκαν με τη χρήση ειδικού αντισώματος. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης ITS 1 του rDNA επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα της ανάλυσης RAPD. Οι απομονώσεις του *T. harzianum* που προκαλούν ασθένεια πράσινης μούχλας ομαδοποιήθηκαν σε ξεχωριστή ομάδα από τα άλλα απομονωμένα στελέχη.

Οι χαρακτήρες RAPD των Alan Castle et al. (1998) αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας δύο εκκινητές που είναι επιλεγμένοι τυχαία. Τα δείγματα DNA θερμάνονται στους 94°C για 5 λεπτά και στη συνέχεια υποβάλλονται σε 40 κύκλους ανόπτησης στους

34°C για 1 λεπτό, επέκτασης στους 72°C για 2 λεπτά και μετουσίωσης στους 94°C για 1 λεπτό. Μια τελική ανόπτηση και επέκταση πραγματοποιείται στους 72°C για 10 λεπτά. Το ITS DNA ενισχύεται χρησιμοποιώντας τους εκκινητές ITS1 και ITS4. Οι συνθήκες PCR είναι παρόμοιες με αυτές που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση RAPD, εκτός από το ότι η θερμοκρασία ανόπτησης είναι 52°C και χρησιμοποιούνται 30 κύκλοι. Κόβονται με επτά περιοριστικά ένζυμα τα ενισχυμένα DNA. Τα δείγματα DNA διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτώματα αγαρόζης. Τα θραύσματα DNA χρωματίζονται με βρωμιούχο αιθίδιο και παρατηρούνται με φωτισμό UV.

Τα δύο papers περιγράφουν την ίδια μέθοδο για την ανάλυση της πολυμορφίας του γονιδιωματικού DNA χρησιμοποιώντας την τεχνική RAPD. Αναφέρουν ότι η μέθοδος βασίζεται στην ενίσχυση τυχαίων θέσεων στο γονιδιωματικό DNA με μια σύντομη νουκλεοτιδική αλληλουχία, γνωστή ως εκκινητής. Επιπλέον ακολουθούν ίδια βήματα στα πρωτόκολλα τους. Δηλαδή αραίωση γονιδιωματικού, ενίσχυση RAPD, αποχωρισμός θραυσμάτων DNA, ανίχνευση θραυσμάτων DNA. Τα θραύσματα DNA μπορούν να ανιχνευθούν με διάφορους τρόπους, όπως χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο ή με χρήση ειδικών ανιχνευτών. Οι διαφορές τους είναι στον αριθμό των εκκινητών. Οι Alan Castle et al. (1998) περιγράφουν τη χρήση δύο εκκινητών, ενώ οι S. Muthumeenakshi et al. (1994) τη χρήση τεσσάρων εκκινητών. Η θερμοκρασία ανόπτησης στους Alan Castle et al. (1998) είναι στους 34°C, ενώ το δεύτερο στους 94°C. Η χαμηλότερη θερμοκρασία ανόπτησης μπορεί να βοηθήσει στη μείωση της επίδρασης του υποστρώματος. Τέλος διαφορές στον τύπο πηκτη. Το δεύτερο paper αναφέρει τη χρήση πηκτη αγαρόζης 0,8%, ενώ το πρώτο paper αναφέρει τη χρήση πηκτη αγαρόζης 1,4%. Με βάση τα παραπάνω η ανάλυση RAPD είναι μια γρήγορη και εύκολη μέθοδος για την ανίχνευση πολυμορφισμών αλληλουχίας σε DNA. Είναι γρήγορο και εύκολο να ακολουθηθεί. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση και την ταξινόμηση οργανισμών.

2.4.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΗΚΟΥΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΟΥ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ RFLP

Στην έρευνα των Alan Castle et al. (1998) εφαρμόζεται επίσης ανάλυση πολυμορφισμού μήκους περιοριστικού θραύσματος RFLP. Η κοπή με περιοριστικά ένζυμα προκαλεί το σπάσιμο του DNA σε θραύσματα διαφορετικού μήκους. Τα θραύσματα DNA διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτώματα αγαρόζης, όπου ταξιδεύουν με βάση το μήκος τους. Αυτά που έχουν διαφορετικά μήκη μπορούν να ανιχνευθούν με χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. Ο υβριδισμός με επισημασμένο DNA είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μορίων DNA που έχουν

συμπληρωματική αλληλουχία. Στην περίπτωση αυτή, το επισημασμένο DNA είναι ένα ανώνυμο θραύσμα πυρηνικού DNA EcoRI που έχει επισημανθεί με βιοτίνη. Η βιοτίνη είναι ένα μικρό μόριο που μπορεί να συνδεθεί με ένα αντιδραστήριο ανιχνευτή που περιέχει χημειοφωταύγεια. Η πλύση της μεμβράνης αφαιρεί το μη επισημασμένο DNA. Αυτό αφήνει μόνο το επισημασμένο DNA να δεσμευτεί στη μεμβράνη. Η έκθεση της μεμβράνης σε αντιδραστήριο ανιχνευτή προκαλεί την προσκόλληση του αντιδραστηρίου ανιχνευτή στο επισημασμένο DNA. Το αντιδραστήριο ανιχνευτή περιέχει χημειοφωταύγεια, η οποία εκπέμπει φως όταν εκτίθεται σε UV. Η έκθεση της μεμβράνης σε UV κάνει τις περιοχές που δεσμεύουν το επισημασμένο DNA να λάμπουν με αποτέλεσμα να επιτρέπει την ανίχνευση των πολυμορφισμών μήκους περιοριστικού.

Η μέθοδος αυτή (RFLP) αναφέρεται και στον Elke Lieckfeldt(1999). Συνδυάζεται η ανάλυση πολυμορφισμού μήκους περιοριστικού θραύσματος (RFLP) με την ανάλυση δακτυλικών αποτυπωμάτων *PCR* για τη μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας των απομονώσεων του μύκητα *Trichoderma viride*. Η ανάλυση RFLP του γονιδίου ενδοχιτινάσης 42-kDa χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των διαφορών στις αλληλουχίες του γονιδίου μεταξύ των απομονώσεων. Η ανάλυση αυτή βασίζεται στην πέψη του προϊόντος *PCR* με ένα περιοριστικό ένζυμο, το οποίο κόβει το DNA σε συγκεκριμένα σημεία. Τα θραύσματα του DNA που προκύπτουν διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτές αγαρόζης και ανιχνεύονται με χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. Στην περίπτωση του *T. viride*, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν τους εκκινητές 5'-CACTTCACCATGTTGGGCTTCCTC και 5'GATCTCTAGTTGAGACCGCTTCGG για την ενίσχυση του γονιδίου ενδοχιτινάσης. Το περιοριστικό ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το HaeIII, το οποίο κόβει το DNA σε ένα σημείο εντός του γονιδίου. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης RFLP έδειξαν ότι οι απομονώσεις του *T. viride* παρουσιάζουν σημαντική γενετική ποικιλομορφία. Τα διαφορετικά στελέχη διακρίνονταν από τον αριθμό και το μέγεθος των θραυσμάτων που παρήχθησαν από την πέψη. Η ανάλυση δακτυλικών αποτυπωμάτων *PCR* χρησιμοποιείται για τη δημιουργία ενός "δακτυλικού αποτύπωμα" για κάθε απομόνωση. Το δακτυλικό αποτύπωμα δημιουργείται με την ενίσχυση μικρών τμημάτων του DNA με διαφορετικούς εκκινητές. Τα προϊόντα *PCR* διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτές αγαρόζης και ανιχνεύονται με χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης δακτυλικών αποτυπωμάτων έδειξαν ότι οι απομονώσεις του *T. viride* παρουσιάζουν επίσης σημαντική γενετική ποικιλομορφία. Τα διαφορετικά στελέχη διακρίνονταν από το πρότυπο των λωρίδων που παρήχθησαν από την ηλεκτροφόρηση. Συμπερασματικά η μέθοδος που περιγράφεται από τον Elke Lieckfeldt (1999) είναι μια αποτελεσματική μέθοδος για τη μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας των απομονώσεων του μύκητα *Trichoderma viride*. Είναι μια σχετικά απλή μέθοδος που μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ένα συνηθισμένο εργαστήριο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των διαφορών στις αλληλουχίες του DNA μεταξύ των απομονώσεων. Από την άλλη πλευρά μπορεί να είναι δύσκολο να ερμηνευθούν τα αποτελέσματα της ανάλυσης,

ειδικά αν τα στελέχη είναι σχετικά παρόμοια. Η μέθοδος μπορεί να είναι ακριβή, ειδικά εάν χρησιμοποιηθούν πολλοί διαφορετικοί εκκινητές για την ανάλυση δακτυλικών αποτυπωμάτων *PCR*.

Αξίζει να σημειωθεί ότι και τα δύο πρωτόκολλα βασίζονται στην τεχνική RFLP (restriction fragment length polymorphism) για την ανάλυση της πολυμορφίας του γονιδιωματικού DNA. Χρησιμοποιούν ένα περιοριστικό ένζυμο για να κόψουν το γονιδιωματικό DNA σε θραύσματα διαφορετικού μήκους και πηκτώματα αγαρόζης για να διαχωρίσουν τα θραύσματα DNA με βάση το μέγεθος τους. Διαφέρουν όμως στο ότι οι πρώτοι ερευνητές χρησιμοποιούν *PCR* για να ενισχύσει το γονιδιωματικό DNA πριν από την πέψη, ενώ το δεύτερο δεν χρησιμοποιούν. Η χρήση *PCR* έχει ως πλεονέκτημα ότι εξασφαλίζει ότι το γονίδιο θα ενισχυθεί πλήρως και ότι τα θραύσματα DNA που προκύπτουν από την πέψη θα είναι αξιόπιστα. Ωστόσο, η *PCR* μπορεί να καθυστερήσει τη διαδικασία και να αυξήσει την πολυπλοκότητα του πρωτόκολλου. Επίσης, Το περιοριστικό ένζυμο EcoRI που χρησιμοποιείται στο πρώτο πρωτόκολλο είναι πιο ευαίσθητο από το περιοριστικό ένζυμο HaeIII που χρησιμοποιείται στο δεύτερο πρωτόκολλο. Αυτό σημαίνει ότι το πρώτο πρωτόκολλο μπορεί να ανιχνεύσει μικρότερες διαφορές στο μήκος των θραυσμάτων DNA. Η χρήση πηκτωμάτων αγαρόζης 2,0% στο δεύτερο πρωτόκολλο παρέχει έναν καλύτερο διαχωρισμό των θραυσμάτων DNA διαφορετικού μεγέθους από τη χρήση πηκτωμάτων αγαρόζης 0,8% στο πρώτο πρωτόκολλο. Το πρώτο πρωτόκολλο χρησιμοποιεί χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο για την ανίχνευση των θραυσμάτων DNA, ενώ το δεύτερο πρωτόκολλο χρησιμοποιεί μια μεμβράνη GeneScreen Plus για την ανίχνευση των θραυσμάτων DNA. Η χρήση μιας μεμβράνης GeneScreen Plus στο δεύτερο πρωτόκολλο διευκολύνει την ανίχνευση των θραυσμάτων DNA. Ωστόσο, η χρήση χρώσης με βρωμιούχο αιθίδιο στο πρώτο πρωτόκολλο είναι πιο απλή και λιγότερο ακριβή.

2.4.3 ΕΝΙΣΧΥΣΗ *PCR* ΤΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ITS1 ΚΑΙ ITS2

Η παρούσα μελέτη M. R. Hermosa et al. (2000) χρησιμοποίησαν τον καθορισμό αλληλουχίας ITS και τους πολυμορφισμούς που προέρχονται από υβριδισμό ολικού γονιδιωματικού DNA με ανιχνευτή μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) για τη μελέτη 16 στελεχών βιοελέγχου που είχαν προηγουμένως αναγνωριστεί ως *T. harzianum* και ένα στέλεχος βιοελέγχου *T. viride*. Η ενίσχυση *PCR* που περιγράφεται στο κείμενο χρησιμοποιεί τους εκκινητές ITS1 και ITS4 για την ενίσχυση ενός θραύσματος rDNA που περιλαμβάνει τις ITS1 και ITS2 περιοχές και το γονίδιο 5.8S rDNA. Οι εκκινητές αυτοί είναι ειδικά σχεδιασμένες αλυσίδες DNA που συνδέονται με το DNA σε συγκεκριμένα σημεία, προκαλώντας την αντίδραση *PCR* να δημιουργήσει αντίγραφα μόνο εκείνων των τμημάτων του DNA που βρίσκονται μεταξύ των σημείων σύνδεσης

των εκκινητών. Οι συνθήκες *PCR* που περιγράφονται στο κείμενο είναι οι εξής Αρχική μετουσίωση 5 λεπτών στους 95°C 35 κύκλοι των 1,5 λεπτών στους 94°C, 2 λεπτών στους 55°C και 3 λεπτών στους 72°C Τελική επέκταση 5 λεπτών στους 72°C. Η αρχική μετουσίωση είναι απαραίτητη για να αποδομηθεί το DNA στο αρχικό στάδιο της αντίδρασης *PCR*. Η θερμοκρασία μετουσίωσης των 95°C είναι η θερμοκρασία που χρησιμοποιείται συνήθως για την αποικοδόμηση του DNA. Κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου, η Taq DNA πολυμεράση αντιγράφει το DNA που βρίσκεται μεταξύ των σημείων σύνδεσης των εκκινητών. Τα δείγματα *PCR* αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης για να επιβεβαιωθεί η επιτυχής ενίσχυση. Το τζελ αγαρόζης είναι ένα μέσο που χρησιμοποιείται για τη διέλευση ηλεκτρικού ρεύματος μέσω του DNA. Τα μεγαλύτερα θραύσματα DNA κινούνται πιο αργά από τα μικρότερα θραύσματα DNA. Ο δείκτης μοριακού μεγέθους είναι ένα θραύσμα DNA που έχει γνωστό μέγεθος και χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί το μέγεθος των προϊόντων *PCR*.

Στους Weizhen Qi and Lei Zhao(2012) Το πρωτόκολλο που περιγράφεται είναι μια μέθοδος για την ενίσχυση ενός θραύσματος rDNA από γονιδιωματικό DNA. Το θραύσμα rDNA περιλαμβάνει τις περιοχές ITS1, 5.8S rRNA και ITS2. Γίνεται προετοιμασία εκκινητών οι οποίοι εκκινητές ITS1 και ITS4 συντέθηκαν από την Boehringer Mannheim. Οι εκκινητές αυτοί είναι ολιγονουκλεοτίδια που σχεδιάστηκαν για να υβριδοποιηθούν στις περιοχές ITS1 και ITS4 του γονιδίου rDNA. Ακολουθεί ενίσχυση *PCR* με το γονιδιωματικό DNA ενισχύεται με *PCR* χρησιμοποιώντας τους εκκινητές ITS1 primer και ITS4. Η *PCR* πραγματοποιείται σε συνθήκες που ευνοούν την δραστικότητα της πολυμεράσης Taq, όπως θερμοκρασία 94°C και pH 8,3. Η ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αγαρόζης όπου τα προϊόντα *PCR* διαχωρίζονται σε πηκτώματα αγαρόζης 1,5%. Τα θραύσματα DNA ταξιδεύουν με βάση το μέγεθος τους, με μεγαλύτερα θραύσματα να ταξιδεύουν λιγότερο μακριά από την αρχή του πηκτώματος. Έπειτα τα θραύσματα DNA χρωματίζονται με βρωμιούχο αιθίδιο για να είναι ορατά στο φως του υπεριώδους.

Το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Ainhoa Martínez-Medina et al.(2014) είναι μια μέθοδος για την ενίσχυση και τον προσδιορισμό της αλληλουχίας της περιοχής ITS του rDNA από μύκητες. Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα. Το δείγμα θρυμματίζεται σε μικρά κομμάτια χρησιμοποιώντας ένα μύλο ιστών ή ένα γουδί και γουδοχέρι. Στη συνέχεια, υποβάλλεται σε επεξεργασία με ένα μίγμα που περιέχει πρωτεάσες και νουκλεάσες για να διασπάσει τις πρωτεΐνες και το DNA, αντίστοιχα. Η περιοχή ITS ενισχύεται χρησιμοποιώντας μια αντίδραση *PCR* με το γενικό ζεύγος εκκινητών ITS1 και ITS4. Η αντίδραση *PCR* πραγματοποιείται σε συνθήκες που ευνοούν την ενίσχυση της περιοχής ITS. Το προϊόν *PCR* καθαρίζεται χρησιμοποιώντας ένα κιτ εκχύλισης τζελ. Αυτό αφαιρεί τα μη ειδικά προϊόντα *PCR*

και βελτιώνει την ποιότητα του προϊόντος. Τέλος η αλληλουχία του προϊόντος *PCR* προσδιορίζεται με τη χρήση ενός συστήματος αυτόματης ανάλυσης αλληλουχίας.

Η τεχνική των Kristian Fog Nielsen et al. (2005) βασίζεται στην ενίσχυση δύο περιοχών του γονιδιώματος του μύκητα με *PCR*, στη συνέχεια στην αλληλούχιση των προϊόντων *PCR* και στη δημιουργία φυλογενετικών δέντρων με βάση τις αλληλουχίες. Οι περιοχές που ενισχύονται είναι οι περιοχές ITS1 και ITS2, οι οποίες βρίσκονται μεταξύ των γονιδίων rDNA 18S και 5.8S. Οι περιοχές αυτές είναι σχετικά μικρές (περίπου 1.500 ζεύγη βάσεων) και παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ των διαφορετικών ειδών και στελεχών μύκητων. Οι περιοχές αυτές ενισχύονται με *PCR* χρησιμοποιώντας τους εκκινητές ITS5 και ITS4. Τα προϊόντα *PCR* αλληλουχίζονται χρησιμοποιώντας έναν αλληλουχιστή DNA. Η αλληλούχιση παρέχει μια ακριβή εικόνα της ακολουθίας των βάσεων των προϊόντων *PCR*. Η τεχνική αυτή είναι σχετικά απλή και μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ένα συνηθισμένο εργαστήριο. Είναι αποτελεσματική για τον προσδιορισμό των διαφορών στις αλληλουχίες του DNA μεταξύ των διαφορετικών απομονώσεων. Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ των απομονώσεων. Η τεχνική αυτή μπορεί να είναι ακριβή, ειδικά εάν χρησιμοποιηθούν πολλοί διαφορετικοί εκκινητές για την αλληλούχιση των προϊόντων *PCR*. Η τεχνική αυτή μπορεί να είναι δύσκολο να ερμηνευτεί, ειδικά αν οι διαφορές στις αλληλουχίες είναι μικρές.

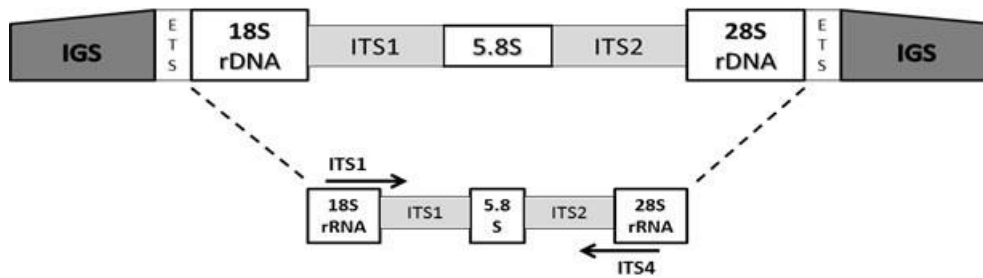
Στο πρωτόκολλο των Krishna Kumar et al. (2011) Η περιοχή ITS ενισχύεται με *PCR* χρησιμοποιώντας τους εκκινητές ITS1 και ITS4. Οι εκκινητές αυτοί συνδέονται με το DNA σε συγκεκριμένα σημεία, προκαλώντας την αντίδραση *PCR* να δημιουργήσει αντίγραφα μόνο εκείνων των τμημάτων του DNA που βρίσκονται μεταξύ των σημείων σύνδεσης των εκκινητών. Οι συνθήκες *PCR* που περιγράφονται στο κείμενο είναι οι εξής: Αρχική μετουσίωση 1 λεπτού στους 95°C. 35 κύκλοι του 1 λεπτού στους 95°C, 30 δευτερολέπτων στους 55°C και 1,5 λεπτού στους 72°C. Τελική επέκταση 10 λεπτών στους 72°C. Το προϊόν *PCR* καθαρίζεται και στη συνέχεια αλληλουχίζεται χρησιμοποιώντας έναν αλληλουχιστή DNA. Η αλληλούχιση παρέχει μια ακριβή εικόνα της ακολουθίας των βάσεων του προϊόντος *PCR*. το προϊόν *PCR* διαχωρίζεται σε ένα πήκτωμα αγαρόζης για να επιβεβαιωθεί η επιτυχής ενίσχυση. Αυτό είναι σημαντικό, καθώς η παρουσία πολλαπλών προϊόντων *PCR* μπορεί να δυσκολέψει την αλληλούχιση και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Στο Muhammad Anees et al. (2010) περιγράφεται μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανάλυση της γενετικής ποικιλομορφίας των απομονώσεων του μύκητα *Trichoderma harzianum*. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ενίσχυση της περιοχής ITS του γονιδιώματος του μύκητα με *PCR* και στη συνέχεια στην αλληλούχιση των προϊόντων *PCR*. Στην περίπτωση του *Trichoderma harzianum*, η περιοχή ITS ενισχύεται με *PCR* χρησιμοποιώντας δύο εκκινητές, τον ITS1 και τον ITS4. Οι

εκκινητές αυτοί συνδέονται με το DNA σε συγκεκριμένα σημεία, προκαλώντας την αντίδραση PCR να δημιουργήσει αντίγραφα μόνο εκείνων των τμημάτων του DNA που βρίσκονται μεταξύ των σημείων σύνδεσης των εκκινητών. Τα προϊόντα PCR ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτώματα αγαρόζης για να επιβεβαιωθεί η επιτυχής ενίσχυση. Τα προϊόντα PCR που είναι κατάλληλα για αλληλούχιση κλωνοποιούνται σε ένα φορέα αλληλουχίας, όπως το pGEM@-T. Η αλληλούχιση των προϊόντων PCR παρέχει μια ακριβή εικόνα της αλληλουχίας των γονιδίων ITS. Η σύγκριση των αλληλουχιών μεταξύ των διαφορετικών απομονώσεων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των διαφορών μεταξύ των απομονώσεων και για την κατανόηση της γενετικής τους ποικιλομορφίας.

Το πρωτόκολλο Christian P Kubicek et al. (2003) είναι μια μέθοδος για την ενίσχυση και τον προσδιορισμό της αλληλουχίας ενός θραύσματος rDNA από γονιδιωματικό DNA. Το θραύσμα rDNA περιλαμβάνει τις περιοχές ITS1, ITS2 και 5.8S rRNA. Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα: Ενίσχυση PCR: Το γονιδιωματικό DNA ενισχύεται με PCR χρησιμοποιώντας τους συνδυασμούς εκκινητών SR6R και LR1 και tef1fw και tef1rev. Η PCR πραγματοποιείται σε συνθήκες που ευνοούν την δραστηριότητα της πολυμεράσης Taq, όπως θερμοκρασία 94°C και pH 8,3. Καθαρισμός προϊόντων PCR: Τα προϊόντα PCR καθαρίζονται με ένα εμπορικό κιτ. Ανάλυση αλληλουχίας: Η αλληλουχία των προϊόντων PCR προσδιορίζεται με τη χρήση ενός συστήματος αυτόματης ανάλυσης αλληλουχίας.

Σύμφωνα με τα παραπάνω και τα 6 πρωτόκολλα χρησιμοποιούν εκκινητές ITS1 και ITS4 για την ενίσχυση με PCR των περιοχών ITS1 και ITS2 του γονιδίου 5.8S rDNA. Η τελευταία μονο μέθοδος ενίσχυση με PCR των περιοχών ITS1 και ITS2 του γονιδίου 5.8S rDNA χρησιμοποιώντας όμως το συνδυασμό εκκινητών SR6R και LR1 και tef1fw και tef1rev. Επίσης τα προϊόντα PCR από όλα τα πρωτόκολλα μπορούν να ανιχνευθούν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτώματα αγαρόζης. Επίσης μπορούν να αλληλουχιστούν για να προσδιορίσουν την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων τους. Υπάρχουν όμως κάποιες μικρές διαφορές στις συνθήκες των PCR. Όπως για παράδειγμα ο χρόνος μετουσίωσης στο 1ο κείμενο είναι 5 λεπτά ενώ στο δεύτερο 1 λεπτό. Οι διαφορές στις συνθήκες PCR μπορούν να επηρεάσουν το μήκος και την ποιότητα των προϊόντων PCR. Ωστόσο η τεχνική αυτή είναι αποτελεσματική για την ενίσχυση της περιοχής ITS του γονιδιώματος του *Trichoderma harzianum* είναι σχετικά απλή και μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ένα συνηθισμένο εργαστήριο. Μπορεί να είναι ακριβή, ειδικά εάν χρησιμοποιηθούν πολλοί διαφορετικοί εκκινητές για την ανάλυση των προϊόντων PCR. Η τεχνική αυτή μπορεί να είναι δύσκολο να ερμηνευτεί, ειδικά αν οι διαφορές στις αλληλουχίες είναι μικρές.



Εικόνα 9: Περιοχές ITS και γονιδίου 5.8S rRNA με τους εκκινιτές ITS1 ITS2. (Yang, X 2017)

2.4.4 ΕΝΙΣΧΥΣΗ PCR ΤΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ITS1, ITS2 ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΟΥ TEF1

Η ταυτοποίηση των απομονώσεων των Lidia Błaszczyk et al. (2011) βασίστηκε στην ανάλυση των αλληλουχιών των εσωτερικών μεταγραμμένων διαχωριστικών περιοχών 1 και 2 (ITS1 και ITS2) του συμπλέγματος γονιδίων rRNA. Η περιοχή ITS είναι μια περιοχή του DNA που βρίσκεται μεταξύ των γονιδίων rRNA 18S και 5.8S. Αυτή η περιοχή είναι σχετικά μικρή (περίπου 1.500 ζεύγη βάσεων) και παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ των διαφορετικών ειδών και στελεχών μύκητων. Στις περιπτώσεις όπου τα ITS1 και ITS2 δεν παρείχαν σαφή ταυτοποίηση, αναλύθηκε η αλληλουχία ενός θραύσματος του γονιδίου του παράγοντα μετάφρασης-επιμήκυνσης 1-άλφα (*tef1*). Το γονίδιο *tef1* είναι ένα γονίδιο που κωδικοποιεί ένα ένζυμο που είναι απαραίτητο για τη την ενίσχυση των περιοχών ITS και *tef1* πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας PCR. Η PCR είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την αντιγραφή ενός συγκεκριμένου τμήματος του DNA χρησιμοποιώντας ένα ένζυμο που ονομάζεται Taq DNA πολυμεράση. Οι συνθήκες PCR που περιγράφονται στο κείμενο είναι οι εξής: Αρχική μετουσίωση 5 λεπτά στους 94°C 35 κύκλοι των 45 δευτερολέπτων στους 94°C, 45 δευτ. στους 58°C (για την περιοχή ITS), ή 63°C (για το θραύσμα *tef1*), 1 λεπτό στους 72°C, με τελική επέκταση 10 λεπτών στους 72°C. Τα προϊόντα PCR διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης για να επιβεβαιωθεί η επιτυχής ενίσχυση. Τα προϊόντα PCR καθαρίστηκαν και στη συνέχεια αλληλουχίστηκαν χρησιμοποιώντας έναν αλληλουχιστή DNA. Η αλληλούχιση

παρέχει μια ακριβή εικόνα της ακολουθίας των βάσεων ενός τμήματος του DNA. Οι αλληλουχίες επεξεργάστηκαν και συναρμολογήθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Chromas. Οι αλληλουχίες ευθυγραμμίστηκαν χρησιμοποιώντας τα προγράμματα CLUSTAL W και MUSCLE. Οι ευθυγραμμίσεις που προέκυψαν επιθεωρήθηκαν και βελτιώθηκαν χειροκίνητα.

Το κείμενο των L. Hatvani et al. (2006) περιγράφει δύο μεθόδους για την ταυτοποίηση του μύκητα *Trichoderma aggressivum*. Η πρώτη μέθοδος είναι μια διαγνωστική δοκιμή PCR που βασίζεται σε ένα ζευγάρι εκκινητών που αναγνωρίζουν ένα μοναδικό τμήμα DNA στο μύκητα. Η δεύτερη μέθοδος είναι η ενίσχυση και η αλληλούχιση των γονιδίων ITS και *tef1*. Η διαγνωστική δοκιμή PCR χρησιμοποιεί ένα ζευγάρι εκκινητών που ονομάζονται Th-F και ThR. Οι εκκινητές αυτοί αναγνωρίζουν ένα μοναδικό τμήμα DNA στο *Trichoderma aggressivum*. Η δοκιμή PCR διεξάγεται ως εξής: Το DNA από ένα δείγμα μύκητα αναμιγνύεται με τους εκκινητές και τα άλλα συστατικά της PCR. Η PCR εκτελείται σε θερμοκυκλοποιητή, ο οποίος θερμαίνει το DNA, προσθέτει τα ένζυμα της PCR και στη συνέχεια το ψύχει για να επιτρέψει την επιμήκυνση του DNA. Η PCR επαναλαμβάνεται πολλές φορές για να ενισχυθεί το προϊόν PCR. Το προϊόν PCR ανιχνεύεται σε τζελ αгарόζης. Εάν το δείγμα περιέχει *Trichoderma aggressivum*, θα εμφανιστεί ένα ζεύγος ραβδώσεων στο τζελ αгарόζης. Η ύπαρξη αυτών των ραβδώσεων υποδηλώνει ότι το δείγμα είναι θετικό για *Trichoderma aggressivum*. Η ενίσχυση και η αλληλούχιση των γονιδίων ITS και *tef1* είναι μια πιο ακριβής μέθοδος για την ταυτοποίηση του *Trichoderma aggressivum*. Το DNA από ένα δείγμα μύκητα ενισχύεται χρησιμοποιώντας ένα ζευγάρι εκκινητών για κάθε γονίδιο. Τα προϊόντα PCR αλληλουχίζονται χρησιμοποιώντας μια συσκευή αλληλούχισης DNA. Η αλληλουχία των προϊόντων PCR συγκρίνεται με τις αλληλουχίες που είναι διαθέσιμες στο NCBI GenBank. Εάν η αλληλουχία του προϊόντος PCR είναι ταυτόσημη ή παρόμοια με την αλληλουχία του *Trichoderma aggressivum*, τότε το δείγμα είναι θετικό για τον μύκητα. Οι δύο μέθοδοι που περιγράφονται στο κείμενο είναι αποτελεσματικές για την ταυτοποίηση του *Trichoderma aggressivum*. Η διαγνωστική δοκιμή PCR είναι μια πιο γρήγορη και απλή μέθοδος, ενώ η ενίσχυση και η αλληλούχιση των γονιδίων είναι μια πιο ακριβής μέθοδος.

Το paper του Xuping Shentu et al. (2014) βασίζεται στην απομόνωση των ενδοφυτικών απομονωμένων στελεχών από φυτά όπως το σκόρδο. Περιγράφεται μια τεχνική που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας των απομονώσεων του μύκητα *Trichoderma harzianum*. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ενίσχυση δύο περιοχών του γονιδιώματος του μύκητα με PCR, στη συνέχεια στην αλληλούχιση των προϊόντων PCR και στη δημιουργία φυλογενετικών δέντρων με βάση τις αλληλουχίες. Η πρώτη περιοχή που ενισχύεται είναι η περιοχή ITS, η οποία

βρίσκεται μεταξύ των γονιδίων rDNA 18S και 5.8S. Η περιοχή αυτή είναι σχετικά μικρή (περίπου 1.500 ζεύγη βάσεων) και παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ των διαφορετικών ειδών και στελεχών μύκητων. Η περιοχή αυτή ενισχύεται με PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές ITS1 και ITS4. Η δεύτερη περιοχή που ενισχύεται είναι η περιοχή *tef1*, η οποία είναι ένα γονίδιο που εμπλέκεται στη μορφογένεση των σπορίων του μύκητα. Η περιοχή αυτή ενισχύεται με PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές *tef1* fw και *tef1* rev. Τα προϊόντα PCR αλληλουχίζονται χρησιμοποιώντας έναν αλληλουχιστή DNA. Η αλληλούχιση παρέχει μια ακριβή εικόνα της ακολουθίας των βάσεων των προϊόντων PCR.

Συνοψίζοντας όλα τα τρία πρωτόκολλα βασίζονται στην ενίσχυση PCR μιας περιοχής του DNA του μύκητα *Trichoderma*. Τα προϊόντα PCR από όλα τα πρωτόκολλα μπορούν να ανιχνευθούν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτώματα αгарόζης. Τα προϊόντα PCR από όλα τα πρωτόκολλα μπορούν να αλληλουχιστούν για να προσδιορίσουν την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων τους. Και τα τρία πρωτόκολλα των Lidia Błaszczuk et al. (2011), των L. Hatvani et al. (2006), του Xuping Shentu (2014) ενισχύει επίσης μόνο τις περιοχές ITS και *tef1*. Οι διαφορές τους είναι στις συνθήκες PCR μεταξύ των πρωτοκόλλων. Οι συνθήκες PCR που περιγράφονται στο πρωτόκολλο των Lidia Błaszczuk et al. (2011) είναι ελαφρώς διαφορετικές από τις συνθήκες PCR που περιγράφονται στα άλλα δύο πρωτόκολλα. Επίσης ο τρόπος που προσδιορίζεται η αλληλουχία των προϊόντων PCR διαφέρει μεταξύ των πρωτοκόλλων. Το πρωτόκολλο των Lidia Błaszczuk et al. (2011) χρησιμοποιεί μια διαδικασία δύο βημάτων για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των προϊόντων PCR, ενώ τα άλλα δύο πρωτόκολλα χρησιμοποιούν μια μόνο διαδικασία.

2.4.5 ENΙΣΧΥΣΗ PCR ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ACT, CAL, *tef1*, *las1*, *chi18-5*

Στους Priscila Chaverri et al. (2003) Αναλύθηκε η αλληλουχία τεσσάρων γονιδιακών περιοχών: εσωτερικοί μεταγραμμένοι διαχωριστές (ITS 1, 5.8S και ITS 2) της επανάληψης του πυρηνικού ριβοσωμικού γονιδίου RNA, ένα τμήμα του γονιδίου του παράγοντα επιμήκυνσης μετάφρασης (EF-1α) που περιλαμβάνει ένα εσώνιο, ένα τμήμα της ακτίνης γονίδιο (ACT) που περιλαμβάνει ένα εσώνιο και ένα τμήμα του γονιδίου καλμοδουλίνης (CAL) που περιλαμβάνει δύο εσώνια. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση και τον προσδιορισμό της αλληλουχίας ITS ήταν ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') και ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990). Για τον EF-1α οι εκκινητές ήταν EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') και EF1-986R (5'-

TACTTGAAGGAACCCTTACC-3'), για CAL οι εκκινητές ήταν CAL-228F (5'-GAGTTCAAGGAGGGCCTTC) και CAL-737R (5'-CATCTTTCTGGCCATCATGG-3') και για το ACT οι εκκινητές ήταν ACT-512F (5'-ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC-3') και ACT-783R (5'-TACGAGTCCTTCTCTGGCCCAT-3' και Kohn99). Οι αλληλουχίες επεξεργάστηκαν και συναρμολογήθηκαν χρησιμοποιώντας Sequencher 4.1 (Gene Codes, Wisconsin). Το Clustal X 1.81 (Thompson et al., 1997) χρησιμοποιήθηκε για την ευθυγράμμιση των αλληλουχιών και στη συνέχεια η ευθυγράμμιση βελτιώθηκε με το χέρι. Οι αλληλουχίες και η στοίχιση κατατέθηκαν στο GenBank (Πίνακας 1) και στο TreeBase (αριθμός υποβολής SN 1008, <http://herbaria.harvard.edu/treebase/>), αντίστοιχα.

Το πρωτόκολλο M. Belén Rubio et al. (2014) είναι μια μέθοδος για την ενίσχυση και τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των γονιδίων *tef1*, *cal1* και *las1* με τα ζεύγη εκκινητών EF1-728F/EF1-LLErev, CAL-228F/CAL-737R και LAS1 fw/LAS1 rev αντίστοιχα. Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα: Προετοιμασία του δείγματος: Το δείγμα θρυμματίζεται σε μικρά κομμάτια χρησιμοποιώντας ένα μύλο ιστών ή ένα γουδί και γουδοχέρι. Στη συνέχεια, το δείγμα υποβάλλεται σε επεξεργασία με ένα μίγμα που περιέχει πρωτεάσες και νουκλεάσες για να διασπάσει τις πρωτεΐνες και το DNA, αντίστοιχα. Ενίσχυση των γονιδίων: Τα γονίδια ενισχύονται χρησιμοποιώντας μια αντίδραση PCR με δύο εκκινητές, έναν για κάθε γονίδιο. Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε συνθήκες που ευνοούν την ενίσχυση των γονιδίων. Καθαρισμός των προϊόντων PCR: Τα προϊόντα PCR καθαρίζονται από τζελ αγαρόζης χρησιμοποιώντας ένα εμπορικό kit. Αυτό αφαιρεί τα μη ειδικά προϊόντα PCR και βελτιώνει την ποιότητα των προϊόντων PCR. Ανάλυση αλληλουχίας: Η αλληλουχία των προϊόντων PCR προσδιορίζεται με τη χρήση ενός συστήματος αυτόματης ανάλυσης αλληλουχίας.

Inbal Gal-Hemed et al. (2011) Η ενίσχυση θραυσμάτων του μεγάλου τέταρτου γονιδίων *tef1* (παράγοντας επιμήκυνσης μετάφρασης 1-α) και *cal1* (καλμοδουλίνη), χρησιμοποιώντας ζεύγη εκκινητών EF1728F και TEF1LLErev (5'-AAC TTG CAG GCA ATG TGG-3') ως καθώς και CAL-228F (5'-GAGTTCAAGGAGGCCTTCTCCC-3') και CAL-737R (5'-

CATCTTTCTGGCCATCATGG-3') (cal1). Η ενίσχυση του chi18-5 (GH18 χιτινάση CHI18-5,) και του grb2 (που κωδικοποιεί την υπομονάδα II β της RNA πολυμεράσης) πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών ech42-1a και ech42-2a όπως περιγράφεται από τους Lieckfeldt et al. και fRPB2-5f και fRPB2-7cr, αντίστοιχα. Η ενίσχυση του DNA πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την τεχνική PCR. Για κάθε γονίδιο χρησιμοποιήθηκε ένα ζευγάρι εκκινητών που συνδέεται με συγκεκριμένα σημεία του DNA. Οι συνθήκες PCR που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: Αρχική μετουσίωση 95°C για 5 λεπτά. 35 κύκλοι των 1 λεπτού στους 95°C, 1 λεπτού στους 54°C και 1 λεπτού και 30 δευτερολέπτων στους 72°C. Τελική επέκταση 10 λεπτών στους 72°C Τα προϊόντα PCR καθαρίστηκαν και στη συνέχεια αλληλουχίστηκαν χρησιμοποιώντας μια εμπορική υπηρεσία αλληλούχισης. Οι αλληλουχίες που ελήφθησαν συγκρίθηκαν με βάση την ομοιότητα τους με άλλες δημοσιευμένες αλληλουχίες.

Irina S. Druzhinina et al. 2008 Η ενίσχυση του πυρηνικού συμπλέγματος γονιδίων rRNA, που περιέχει ITS1 και 2 και το γονίδιο 5.8S rRNA, και ενός θραύσματος του γονιδίου ενδοχιτινάσης chi18-5 (παλαιότερα ονομαζόταν ech42) έγινε όπως περιγράφηκε (Komoń-Zelazowska et al., 2007) . Το τέταρτο μεγάλο εσώνιο του tef1 (παράγοντας επιμήκυνσης μετάφρασης 1-α) ενισχύθηκε χρησιμοποιώντας εκκινητές EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') και TEF1-LLErev (5'-AACTTGCAGGCAATGTGG-3') (Jaklitsch 2006, et al.), και ένα θραύσμα cal1 (καλμοδουλίνη) χρησιμοποιώντας εκκινητές CAL-228F (5'-GAGTTCAAGGAGGCCTTCTCCC-3') και CAL-737R (5'-CATCTTTCTGGCCATCATGG-3') (Chaverri et al., 2003). Ενίσχυση PCR: Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση των τεσσάρων περιοχών περιγράφονται στο πρωτόκολλο. Η PCR πραγματοποιείται σε συνθήκες που ευνοούν την δραστηριότητα της πολυμεράσης Taq, όπως θερμοκρασία 94°C και pH 8,3. Καθαρισμός προϊόντων PCR: Τα προϊόντα PCR καθαρίζονται με ένα εμπορικό κιτ. Ανάλυση αλληλουχίας: Η αλληλουχία των προϊόντων PCR προσδιορίζεται με τη χρήση ενός συστήματος αυτόματης ανάλυσης αλληλουχίας. Καταχώρηση αλληλουχιών: Οι αλληλουχίες κατατίθενται στο GenBank.

Τα παραπάνω πρωτόκολλα είναι όμοια μεταξύ τους ως προς την ενίσχυση PCR. Όλα τα πρωτόκολλα περιλαμβάνουν τη χρήση της τεχνικής PCR για την ενίσχυση των γονιδίων. Το Σε όλα τα πρωτόκολλα προβλέπεται ο καθαρισμός των προϊόντων PCR, πιθανόν με χρήση εμπορικών κιτ, για την αφαίρεση μη επιθυμητών προϊόντων και τη

βελτίωση της ποιότητας των προϊόντων PCR. Σε όλα τα πρωτόκολλα προβλέπεται η ανάλυση της αλληλουχίας των προϊόντων PCR, συνήθως με τη χρήση συστημάτων αυτόματης ανάλυσης αλληλουχίας. Σε όλα τα πρωτόκολλα προβλέπεται η καταχώρηση των αλληλουχιών στο GenBank. Παρουσιάζουν όμως και σημαντικές διαφορές. Κάθε πρωτόκολλο έχει διαφορετικό στόχο στην ενίσχυση και ανάλυση γονιδίων ή γονιδιακών περιοχών. Για παράδειγμα, το πρώτο πρωτόκολλο αναλύει γονίδια που σχετίζονται με το ριβοσώμιο, το δεύτερο πρωτόκολλο αναλύει γονίδια *tef1*, *cal1* και *las1*, το τρίτο πρωτόκολλο αναλύει τον rDNA και το γονίδιο *chi18-5*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται διαφέρουν μεταξύ των πρωτοκόλλων. Κάθε πρωτόκολλο χρησιμοποιεί ένα μοναδικό σύνολο εκκινητών για την ενίσχυση της επιθυμητής περιοχής DNA. Οι συνθήκες PCR διαφέρουν μεταξύ των πρωτοκόλλων. Οι συνθήκες PCR που χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση μιας συγκεκριμένης περιοχής DNA μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με το μέγεθος της περιοχής, τον τύπο του DNA και άλλα κριτήρια. Η μέθοδος καθαρισμού των προϊόντων PCR διαφέρει μεταξύ των πρωτοκόλλων. Τα προϊόντα PCR μπορούν να καθαριστούν με διάφορες μεθόδους, όπως η εκχύλιση με φαινολ/χλωροφορμ ή η εκχύλιση με αιθυλική αλκοόλη/ακετόνη. Η μέθοδος ανάλυσης αλληλουχίας διαφέρει μεταξύ των πρωτοκόλλων. Η αλληλουχία των προϊόντων PCR μπορεί να προσδιοριστεί με διάφορες μεθόδους, όπως η αλληλούχιση Sanger ή η αλληλούχιση επόμενης γενιάς.

3.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας ο μύκητας *Trichoderma* απασχολεί αρκετά του ερευνητές λόγω των χαρακτηριστικών και των ιδιοτήτων του. Είναι αξιοσημείωτο να αναφερθεί ότι οι μηχανισμοί δράσεις του το καθιστούν μοναδικό έναντι άλλων μυκήτων. Η μοριακή ταυτοποίηση του γένους *Trichoderma* είναι εξίσου σημαντική διότι με αυτήν μπορεί να ταυτοποιηθεί το είδος και να προσδιοριστεί για μια συγκεκριμένη χρήση. Σύμφωνα με τα όσα αναφέρθηκαν η απομόνωση του δείγματος *Trichoderma* γίνεται κυρίως από το έδαφος, τα φυτά και την σάπεια ξυλεία. Η καλλιέργεια του μπορεί να πραγματοποιηθεί σε διάφορα μέσα ανάπτυξης όπως PDA, MEA, CMD και YEG. Διαφαίνεται επίσης ότι η ανάπτυξη του σύμφωνα με την βιβλιογραφία γίνεται σε θερμοκρασία από 25 με 30 βαθμούς κελσίου. Η απομόνωση του DNA αν και γίνεται με διαφορετικές μεθόδους υπάρχουν πολλές ομοιότητες ως προς τα βήματα που ακολουθούν. Όλες οι μέθοδοι επίσης είναι αποτελεσματικές για ποικίλοι δείγματα. Επιπροσθέτως από τις προ αναφερόμενες μεθόδους μοριακής ταυτοποίησης οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στην μοριακή ταυτοποίηση του *Trichoderma* είναι η μέθοδος της PCR, η μέθοδος του δακτυλικού αποτυπώματος, και οι δυο τεχνικές RPLF και RADP. Κυρίως επιλέγονται οι περιοχές ITS1 ITS2 και το γονίδιο 5.8S rRNA με τους εκκινητές ITS1 και ITS4. Επίσης όπου οι περιοχές αυτές δεν παρείχαν σαφή ταυτοποίηση χρησιμοποιήθηκε η και αναλύθηκε η αλληλουχία ενός θραύσματος του γονιδίου (*tef1*). Διότι το γονίδιο *tef1* κωδικοποιεί ένα ένζυμο που είναι απαραίτητο για τη την ενίσχυση των περιοχών ITS. Συνολικά η κάθε μέθοδος από τις παραπάνω έχει σχεδιαστεί για να ενισχύσει και να αναλύσει συγκεκριμένες γονιδιακές περιοχές με διαφορετικά στοιχεία και εκκινητές ανάλογα

με τον στόχο του ερευνητικού έργου. Συνοψίζοντας το Trichoderma είναι ένα ευρέως διαδεδομένο γένος μυκήτων που είναι γνωστό για την ικανότητά του να παράγει μια ποικιλία βιοδραστικών ενώσεων. Οι βιοδραστικές ενώσεις του Trichoderma έχουν μια σειρά από πιθανές εφαρμογές, όπως η πρόληψη και η θεραπεία μυκητιακών και βακτηριακών ασθενειών των φυτών, η βελτίωση της ανθεκτικότητας των φυτών στις ασθένειες και η βελτίωση της ανάπτυξης και της απόδοσης των φυτών. Η έρευνα για το Trichoderma είναι αναγκαίο να συνεχιστεί για να οδηγήσει σε νέες και καινοτόμες εφαρμογές αυτού του σημαντικού οργανισμού.

4.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Βασίλειος Οικονόμου, (2013) «Η επίδραση των μυκήτων του γένους *Τριχοδερματος* στη φυτική παραγωγή», Καλαμάτα
2. Κυριαζής, Ι. Δ., Καμπούρης, Μ. Ε., Πουλάς, Κ., & Πατρινός, Γ. Π. (2014). Μοριακές τεχνικές για την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό μικροοργανισμών. *Αρχαία ελληνικής ιατρικής*, 31(1), 23-40.
3. Abbasi, P. A., Miller, S. A., Meulia, T., Hoitink, H. A., & Kim, J. M. (1999). Precise detection and tracing of *Trichoderma hamatum* 382 in compost-amended potting mixes by using molecular markers. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), 5421-5426.
4. Anees, M., Tronsmo, A., Edel-Hermann, V., Hjeljord, L. G., Héraud, C., & Steinberg, C. (2010). Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. *Fungal biology*, 114(9), 691-701.
5. Błaszczyk, L., Popiel, D., Chelkowski, J., Koczyk, G., Samuels, G. J., Sobieralski, K., & Siwulski, M. (2011). Species diversity of *Trichoderma* in Poland. *Journal of applied genetics*, 52, 233-243.
6. Balubhai G., Harsukh G., Mansukh K., Rinkal D., Sunil P.,(2013)Molecular mechanism of *Trichoderma* as bio-control agents against phytopathogen system – a review, Gujarat, India.
7. Cai, F., & Druzhinina, I. S. (2021). In honor of John Bissett: Authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. *Fungal Diversity*, 107, 1-69.
8. Chaverri, P., Castlebury, L. A., Samuels, G. J., & Geiser, D. M. (2003). Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 27(2), 302-313.
9. Christian P. Kubicen, Gaty R. Harman, (1998), *Trichoderma and Gliocladium* Volume 1 , Basic Biology , taxonomy and genetics, NY, USA.
10. GARY J. SAMUELS (1996) *Trichoderma: a review of biology and systematics of the genus* , USA.
11. Castle, A., Speranzini, D., Rghei, N., Alm, G., Rinker, D., & Bissett, J. (1998). Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates on North American mushroom farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(1), 133-137.
12. Dodd, S. L., Lieckfeldt, E., & Samuels, G. J. (2003). *Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia*, 95(1), 27-40.
13. Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G., Komoń, M., Bissett, J., Szakacs, G., & Kubicek, C. P. (2005). An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology*, 42(10), 813-828.

14. Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G., & Kubicek, C. P. (2006). The first 100 Trichoderma species characterized by molecular data. *Mycoscience*, 47(2), 55-64.
15. Gajera, H., Domadiya, R., Patel, S., Kapopara, M., & Golakiya, B. (2013). Molecular mechanism of Trichoderma as bio-control agents against phytopathogen system—a review. *Curr. Res. Microbiol. Biotechnol*, 1(4), 133-142.
16. Gal-Hemed, I., Atanasova, L., Komon-Zelazowska, M., Druzhinina, I. S., Viterbo, A., & Yarden, O. (2011). Marine isolates of Trichoderma spp. as potential halotolerant agents of biological control for arid-zone agriculture. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(15), 5100-5109.
17. Hatvani, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., ... & Kredics, L. (2007). Green mold diseases of Agaricus and Pleurotus spp. are caused by related but phylogenetically different Trichoderma species. *Phytopathology*, 97(4), 532-537.
18. Hermosa, M. R., Grondona, I., Iturriaga, E. T., Diaz-Minguez, J. M., Castro, C., Monte, E., & Garcia-Acha, I. J. A. E. M. (2000). Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of Trichoderma spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 1890-1898.
19. Horňáková, O., Zavodna, M., Žáková, M., Kraic, J., & Debre, F. (2003). Diversity of common bean landraces collected in the western and eastern Carpatien. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 39(3), 73.
20. Komon-Zelazowska, M., Bissett, J., Zafari, D., Hatvani, L., Manczinger, L., Woo, S., ... & Druzhinina, I. S. (2007). Genetically closely related but phenotypically divergent Trichoderma species cause green mold disease in oyster mushroom farms worldwide. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(22), 7415-7426.
21. Kubicek, C. P., Bissett, J., Druzhinina, I., Kullnig-Gradinger, C., & Szakacs, G. (2003). Genetic and metabolic diversity of Trichoderma: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal genetics and biology*, 38(3), 310-319.
22. Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Börner, T., & Guého, E. (1999). Molecular reidentification of human pathogenic Trichoderma isolates as Trichoderma longibrachiatum and Trichoderma citrinoviride. *Medical mycology*, 37(1), 25-33.
23. Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G. J., Kovacs, W., Meyer, W., Petrini, O., ... & Kubicek, C. (1996). Molecular evidence that the asexual industrial fungus Trichoderma reesei is a clonal derivative of the ascomycete Hypocrea jecorina. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(15), 7755-7760.
24. Kumar, K., Amaresan, N., Bhagat, S., Madhuri, K., & Srivastava, R. C. (2012). Isolation and characterization of Trichoderma spp. for antagonistic activity against root rot and foliar pathogens. *Indian Journal of Microbiology*, 52, 137-144.

25. Lieckfeldt, E., Samuels, G. J., Nirenberg, H. I., & Petrini, O. (1999). A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species?. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6), 2418-2428.
26. Martínez-Medina, A., Del Mar Alguacil, M., Pascual, J. A., & Van Wees, S. C. (2014). Phytohormone profiles induced by *Trichoderma* isolates correspond with their biocontrol and plant growth-promoting activity on melon plants. *Journal of chemical ecology*, 40, 804-815.
27. Muthumeenakshi, S., Mills, P. R., Brown, A. E., & Seaby, D. A. (1994). Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in the British Isles. *Microbiology*, 140(4), 769-777.
28. Nielsen, K. F., Gräfenhan, T., Zafari, D., & Thrane, U. (2005). Trichothecene production by *Trichoderma brevicompactum*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(21), 8190-8196.
29. Ospina-Giraldo, M. D., Royse, D. J., Chen, X., & Romaine, C. P. (1999). Molecular phylogenetic analyses of biological control strains of *Trichoderma harzianum* and other biotypes of *Trichoderma* spp. associated with mushroom green mold. *Phytopathology*, 89(4), 308-313.
30. Rubio, M. B., Quijada, N. M., Pérez, E., Domínguez, S., Monte, E., & Hermosa, R. (2014). Identifying beneficial qualities of *Trichoderma parareesei* for plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(6), 1864-1873.
31. Samuels, G. J., Dodd, S. L., Lu, B. S., Petrini, O., Schroers, H. J., & Druzhinina, I. S. (2006). The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Studies in mycology*, 56(1), 67-133.
32. Siddiquee, S., Yusof, N. A., Salleh, A. B., Tan, S. G., & Abu Bakar, F. (2012). Development of electrochemical DNA biosensor for *Trichoderma harzianum* based on ionic liquid/ZnO nanoparticles/chitosan/gold electrode. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 16, 273-282.
33. Shentu, X., Zhan, X., Ma, Z., Yu, X., & Zhang, C. (2014). Antifungal activity of metabolites of the endophytic fungus *Trichoderma brevicompactum* from garlic. *Brazilian journal of microbiology*, 45, 248-254.
34. Steyaert, J. M., Weld, R. J., Mendoza-Mendoza, A., & Stewart, A. (2010). Reproduction without sex: conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma*. *Microbiology*, 156(10), 2887-2900.
35. Qi, W., & Zhao, L. (2013). Study of the siderophore-producing *Trichoderma asperellum* Q1 on cucumber growth promotion under salt stress. *Journal of basic microbiology*, 53(4), 355-364.
36. Fabrice Teletchea (2009) Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications,
37. Romero-Arenas, O., Huerta Lara, M., Damián Huato, M. A., Domínguez Hernández, F., & Arellano Victoria, D. A. (2009). The characteristics of *Trichoderma harzianum* as a limiting agent in edible mushrooms. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 143-151.

38. Woo, S. L., Hermosa, R., Lorito, M., & Monte, E. (2023). Trichoderma: A multipurpose, plant-beneficial microorganism for eco-sustainable agriculture. *Nature Reviews Microbiology*, 21(5), 312-326.
39. Yang, X., Hameed, U., Zhang, A. F., Zang, H. Y., Gu, C. Y., Chen, Y., & Xu, Y. L. (2017). Development of a nested-PCR assay for the rapid detection of *Pilidiella granati* in pomegranate fruit. *Scientific reports*, 7(1), 40954.
40. Yao, X., Guo, H., Zhang, K., Zhao, M., Ruan, J., & Chen, J. (2023). Trichoderma and its role in biological control of plant fungal and nematode disease. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1160551.