

**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ (ΤΕΙ) ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ : ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ  
ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ**

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΕΛΑΙΟΥΡΓΕΙΩΝ  
ΣΕ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΟΥΣ ΜΥΚΗΤΕΣ ΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

της Σπουδάστριας  
**ΓΕΩΡΓΙΑΣ Χ. ΑΡΓΕΙΤΗ**

**Καλαμάτα, Νοέμβριος 2000**

**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ (ΤΕΙ) ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ : ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ  
ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ**

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΕΛΑΙΟΥΡΓΕΙΩΝ  
ΣΕ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΟΥΣ ΜΥΚΗΤΕΣ ΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

της Σπουδάστριας  
**ΓΕΩΡΓΙΑΣ Χ. ΑΡΓΕΙΤΗ**

Επιβλέπων Καθηγητής:  
**ΝΙΚΟΠΟΥΛΟΥ ΔΕΣΠΟΙΝΑ**

**Καλαμάτα, Νοέμβριος 2000**

## *Αντι προλόγου*

Ευχαριστώ την επιβλέπουσα Δρ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη για την καθοδήγηση και τη συμπαράστασή της στη διεξαγωγή αυτής της μελέτης και τον Δρ. Οιχαλιώτη Κωσταντίνο για την πολύτιμη βοήθειά του στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Επίσης τον προϊστάμενο του Ινστιτούτου Ελαίας και Οπωροκηπευτικών Καλαμάτας Δρ. Ζερβάκη Γεώργιο για τις συμβουλές του και τη διάθεση των εργαστηριακών χώρων.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τις συναδέλφους Τουρνά Μαρία και Αγγέλου Ιωάννα για την βοήθειά τους στους εργαστηριακούς χώρους.

Τέλος, ευχαριστώ την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κ. Νικοπούλου Δέσποινα για τη βοήθειά της και τις εύστοχες παρατηρήσεις της.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>1</b>
----------------------	----------

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ**

<b>1.1 ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ.....</b>	<b>2</b>
--	----------

1.1.1 Λειτουργία των οργανικών υλικών.....	3
--	---

<b>1.2 ΤΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΩΝ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΩΝ.....</b>	<b>4</b> ✓
--	------------

1.2.1 Τα προβλήματα από τα απόβλητα των ελαιοτριβείων τριών φάσεων.....	5
---	---

1.2.2 Μέθοδοι διαχείρισεως των υγρών αποβλήτων της βιομηχανίας ελαιολάδου.....	6
---	---

1.2.3 Χρήσεις των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων.....	8
--	---

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ**

<b>2.1 ΣΗΨΗ ΛΑΙΜΟΥ ΚΑΙ ΡΙΖΩΝ.....</b>	<b>11</b>
---------------------------------------	-----------

2.1.1 Ταξινόμηση.....	11
-----------------------	----

2.1.2 Συμπτώματα.....	12
-----------------------	----

2.1.3 Συνθήκες που ευνοούν τις ασθένειες .....	12
--	----

2.1.4 Έλεγχος.....	13
--------------------	----

<b>2.2. ΦΥΤΟΦΘΟΡΑ.....</b>	<b>15</b>
----------------------------	-----------

2.2.1 Ταξινόμηση.....	16
-----------------------	----

2.2.2 Συμπτώματα.....	16
-----------------------	----

2.2.3 Συνθήκες που ευνοούν τις ασθένειες.....	17
---	----

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ ( ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ)**

### **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **3.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΔΕΙΚΤΗ ΦΥΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ**

Υ.Α.Ε.....18

#### **3.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΔΕΙΚΤΗ ΒΛΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ**

ΓΛΑΣΤΡΑΚΙΑ ΜΕ ΠΕΡΛΙΤΗ.....19

#### **3.3 ΕΞΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΑΠΟ ΤΑ Υ.Α.Ε.....20**

3.3.1 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών ενώσεων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.....21

#### **3.4 ΣΠΟΡΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΥΤΩΝ ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΙ ΑΓΓΟΥΡΙΟΥ.....21**

3.4.1 Μολύνσεις των φυτών τομάτας .....23

3.4.2 Μολύνσεις των φυτών αγγουριού.....23

#### **3.5 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ.....23**

3.5.1 Καλλιέργειες στελεχών .....23

#### **3.6 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΟΝΙΔΙΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΓΡΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ**

ΤΟΥ FORL.....24

3.7.1 In Vitro επίδραση στην ανάπτυξη μυκηλίου.....25

3.7.2 In Vitro επίδραση στην παραγωγή και βλάστηση κονιδίων.....25

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ**

### **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

#### **4.1 ΜΟΛΥΝΣΗ ΦΥΤΩΝ ΤΟΜΑΤΑΣ .....26**

##### **ΠΕΙΡΑΜΑ Α'**

4.1.1 Μόλυνση φυτών τομάτας κατά τη σπορά (t0).....26

4.1.2 Μόλυνση φυτών τομάτας 10 ημέρες μετά τη σπορά (t10).....28

4.1.3 Μόλυνση φυτών τομάτας 20 ημέρες μετά τη σπορά (t20).....30

## **ΠΕΙΡΑΜΑ Β'**

4.1.4 Μόλυνση φυτών τομάτας κατά τη σπορά (t0).....	31
4.1.5 Μόλυνση φυτών τομάτας 10 ημέρες μετά τη σπορά (t10).....	32
4.1.6 Μόλυνση φυτών τομάτας 20 ημέρες μετά τη σπορά (t20).....	33
4.2 ΜΟΛΥΝΣΗ ΦΥΤΩΝ ΑΓΓΟΥΡΙΟΥ.....	35.
4.3 ΡΥΘΜΟΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΑΚΤΙΝΑΣ ΤΟΥ FORL.....	37
4.4 ΒΛΑΣΤΗΣΗ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ FORL.....	39

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ**

<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>41</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>43</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>44</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>45</b>

## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα υγρά απόβλητα των ελαιουργείων (Υ.Α.Ε.) ή Olive Mill Water (OMW) παράγονται κυρίως από τα φυγοκεντρικά ελαιοτριβεία τριών φάσεων και είναι γνωστότερα ως λιόζουμα ή κατσίγαρος. Προέρχονται από το υδατικό κλάσμα του χυμού του ελαιοκάρπου και τα νερά που προστίθενται κατά τις φάσεις της πλύσης, μάλαξης και διαχωρισμού του ελαιολάδου.

Στην Ελλάδα υπολογίζεται ότι παράγονται 1,5 εκατομμύρια τόνοι υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων κάθε χρόνο ενώ σε όλη τη λεκάνη της Μεσογείου ξεπερνούν τα 10 εκατομμύρια σε χρονιές μεγάλης ελαιοπαραγωγής.

Τα Υ.Α.Ε. χαρακτηρίζονται από εξαιρετικά υψηλό οργανικό φορτίο και μεγάλες απαιτήσεις σε οξυγόνο για την αποδόμησή του, σημαντικό μέρος του οποίου είναι άμεσα βιοαποδομήσιμο. Επίσης χαρακτηρίζονται από ισχυρές μικροβιοστατικές ιδιότητες σε ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών, που αποδίδονται κυρίως στα φαινολικά συστατικά και τα μικρομοριακά λιπαρά οξέα καθώς και στη συνεργιστική δράση φαινολικών και μη-φαινολικών ουσιών.

Στην παρούσα μελέτη εξετάσθηκε η επισχετικότητα των Υ.Α.Ε. στην ανάπτυξη και παθογένεια του *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, το οποίο προκαλεί τη σήψη λαιμού και ρίζας (crown and root rot) φυτών τομάτας και ενός στελέχους του ωομύκητα *Phytophthora* sp. που απομονώθηκε από προσβεβλημένα φυτά αγγουριού. Ο συνδυασμός του διαθέσιμου άνθρακα που ευνοεί την ανάπτυξη μικροβιακών πληθυσμών στο έδαφος με τις μικροβιοστατικές ιδιότητες των Υ.Α.Ε. καθιστούν ενδιαφέρουσα τη μελέτη της πιθανής επισχετικής δράσης τους σε παθογόνα εδάφους.



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>0</sup>

## 1.1 ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Η καταπολέμηση των ασθενειών εδάφους γίνεται με φυτοφάρμακα , κυρίως με ισχυρά μυκητοκτόνα εδάφους (π.χ  $\text{CH}_3\text{Br}$  , Βαπάμ , Μπαζαμίντ). Ο τρόπος όμως αυτός παρουσιάζει προβλήματα περιβαλλοντικής ρύπανσης , τα οποία αναφέρονται παρακάτω:

- Τοξικότητα στον άνθρωπο και τα ζώα
- Υπολείμματα στα γεωργικά προϊόντα
- Εμφάνιση ανθεκτικότητας των φυτοπαρασίτων
- Επιπτώσεις στα ωφέλιμα έντομα
- Γενικότερη ρύπανση του περιβάλλοντος (Ηλιόπουλος , 1993)

Η εναλλακτική μέθοδος για τον περιορισμό της ζημιάς που προκαλείται από τα φυτοπαθογόνα εδάφους είναι η λεγόμενη βιολογική ή οικολογική αντιμετώπισή τους. Με τον όρο βιολογική αντιμετώπιση ασθενειών, εννοείται η ποσοτική μείωση του μολύσματος ή της φυτοπαθογόνου δραστηριότητας ενός παθογόνου αιτίου, που επιτυγχάνεται με την χρήση ή μεσολάβηση ενός ή περισσότερων οργανισμών, εκτός του ανθρώπου.

Η Ευρωπαϊκή Ένωση αφού έλαβε υπόψη της ότι η γεωργία είναι το κύριο μέσο για τη διατήρηση, βελτίωση και αξιοποίηση του περιβάλλοντος, καθώς και ότι χρησιμοποιεί και μετασχηματίζει περισσότερο από οποιαδήποτε άλλη οικονομική δραστηριότητα τους φυσικούς πόρους (έδαφος, ανακυκλώσιμες πηγές ενέργειας κ.α.), αποφάσισε να ενισχύει τεχνικές καλλιέργειας φιλικές προς το περιβάλλον. Έτσι η απόφαση ότι το περιβάλλον μπορεί να προστατευτεί με την υιοθέτηση τεχνικών εναρμονισμένων με τους φυσικούς πόρους, έγινε ένας από τους κεντρικούς στόχους του κανονισμού 2078/92 << σχετικά με τις μεθόδους γεωργικής παραγωγής που συμμορφώνονται με τις απαιτήσεις προστασίας του περιβάλλοντος και με τη διατήρηση του φυσικού χώρου>>.

Το συμβούλιο των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων θέσπισε κοινοτικό καθεστώς ενισχύσεων, που συγχρηματοδοτείται από το Ευρωπαϊκό Γεωργικό Ταμείο Προσανατολισμού και Εγγυήσεων ( Ε Γ Τ Π Ε ) , λαμβάνοντας μεταξύ άλλων υπόψη ότι:

⇒ Με βάση ένα καθεστώς κατάλληλων ενισχύσεων, οι γεωργοί μπορούν να ασκούν ένα πραγματικό λειτούργημα στην υπηρεσία του συνόλου της κοινωνίας, με την εισαγωγή ή



διατήρηση μεθόδων παραγωγής που συμμορφώνονται προς τις αυξημένες απαιτήσεις της προστασίας του περιβάλλοντος και των φυσικών πόρων.

⇒ Η θέσπιση καθεστώτος ενισχύσεων που θα ενθαρρύνει τη σημαντική μείωση της χρησιμοποίησης λιπασμάτων και φυτοφαρμάκων ή την εφαρμογή μεθόδων βιολογικής καλλιέργειας μπορεί να συμβάλλει στη μείωση της ρύπανσης που προκαλεί η γεωργία. Επίσης συμβάλλει στην προσαρμογή των διαφόρων παραγόντων παραγωγής στις ανάγκες των αγορών, ευνοώντας τις λιγότερο εντατικές μεθόδους παραγωγής.

Τόσο η Ευρωπαϊκή Ένωση όσο και τα κράτη -μέλη πρέπει να εντείνουν τις προσπάθειες τους για την κατάρτιση και την πληροφόρηση όσον αφορά την εισαγωγή γεωργικών και δασικών μεθόδων παραγωγής που να σέβονται το περιβάλλον (Ηλιόπουλος,1993).

Εναλλακτικά η προσθήκη οργανικών υλικών στο έδαφος μπορεί να λειτουργήσει ενισχύοντας την καταστολή ασθενειών αυτών κυρίως με δύο τρόπους:

A. Με την ενίσχυση μικροβιακών πληθυσμών που δρουν ανταγωνιστικά προς το παθογόνο

- Με την εισαγωγή οργανικών υλικών που ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό τέτοιων ανταγωνιστικών μικροοργανισμών στο έδαφος
- Με απευθείας εμβολιασμό με τέτοιους οργανισμούς

B. Με την πρόκληση επαγώμενης ανθεκτικότητας (SAR) στο φυτό

### **1.1.1 Λειτουργία των οργανικών υλικών**

Τα οργανικά υλικά, στην Κίνα και στην Ιαπωνία και σε άλλα μέρη της ανατολής έχουν χρησιμοποιηθεί στην γεωπονία με ενθαρρυντικά αποτελέσματα για χρόνια. Στη Δύση όμως η χρησιμοποίηση αυτών είναι ένα πρόσφατο φαινόμενο. Κατά την διάρκεια των 2 τελευταίων δεκαετιών πολλές αναφορές έχουν συζητηθεί για τα κατασταλτικά αποτελέσματα των οργανικών υλικών σε μια ποικιλία από τα παθογενή των φυτών που αναπτύσσονται στο έδαφος. Μόνο μερικές από τις ασθένειες των κηπευτικών και των υπαίθριων καλλιεργειών έχουν ελεγχθεί από τα οργανικά υλικά.

Η πρώτη αναφορά πάνω σε έλεγχο σε ασθένεια του μύκητα *Phytophthora* έγινε με εφαρμογή υποστρώματος από φλοιούς δέντρων σε αργιλώδες έδαφος που έχει μολυνθεί με *Phytophthora fragariae*. Το υπόστρωμα παρείχε ένα μεγάλο βαθμό ελέγχου της ασθένειας για τις φράουλες κατά τη διάρκεια του πρώτου και δεύτερου χρόνου μετά την επέμβαση. Το πέμπτο όμως χρόνο η ασθένεια ήταν τόσο σφοδρή στα εδάφη με φλοιούς δέντρων για οργανικό υπόστρωμα, όσο σε εδάφη που δεν είχαν υποστεί εφαρμογή του υποστρώματος.

## 1.2 ΤΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΩΝ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΩΝ

Στις χώρες της Μεσογείου είναι συγκεντρωμένο το 98% των ελαιόδεντρων της γης ,αν και στα επόμενα χρόνια , χώρες όπως η Αυστραλία που επιχειρεί μαζική ανάπτυξη της ελαιοκομίας , αναμένει να μειώσουν ελαφρά το ποσοστό αυτό. Η Ελλάδα , όπου παράγονται γύρω στους 350.000 τόνους ελαιολάδου ετησίως από περισσότερα από 130 εκατομμύρια δέντρα , είναι η τρίτη ελαιοπαραγωγός χώρα στον κόσμο, μετά την Ισπανία και την Ιταλία .Δυστυχώς , εξίσου σημαντικά είναι και τά περιβαλλοντικά προβλήματα που δημιουργούνται κατά τη διαδικασία έκθλιψης του ελαιοκάρπου , λόγω των τεραστίων ποσοτήτων αποβλήτων που δημιουργούνται . Πιο συγκεκριμένα και με δεδομένη την αυξομείωση που παρουσιάζει η ελαιοπαραγωγή από χρονιά σε χρονιά , υπολογίζεται ότι στην Ελλάδα παράγονται κατά μέσο όρο 1,5 εκατομμύρια τόνοι υγρών αποβλήτων και 400.000 τόνοι στερεών υπολειμμάτων - παραπροϊόντων ετησίως.

Τα υγρά απόβλητα των ελαιουργείων παράγονται κυρίως από τα φυγοκεντρικά ελαιοτριβεία τριών φάσεων και είναι γνωστότερα ως λιόζουμα ή κατσίγαρος . Προέρχονται από το υδατικό κλάσμα του χυμού του ελαιοκάρπου και τα νερά που προστίθενται κατά τις φάσεις της πλύσης, μάλαξης και διαχωρισμού του ελαιολάδου. Τα λιόζουμα έχουν χρώμα σκούρο καφέ έως μαύρο, χαρακτηριστική έντονη οσμή στην οποία συμβάλλουν σημαντικά τα πτητικά οξέα που περιέχουν, όξινο ΡΗ, υψηλή ρυθμιστική ικανότητα και επιφανειακή τάση, περιέχουν μεγάλες ποσότητες αιωρούμενων σωματιδίων και είναι πλούσιες σε οργανικές ουσίες. Οι τελευταίες μπορούν να διαχωριστούν σε ενώσεις άμεσα διασπώμενες (π.χ σάκχαρα, οργανικά οξέα, αμινοξέα), βιοαποδομήσιμα πολυμερή (π.χ πρωτεΐνες, ημικυτταρίνες) και δύσκολα διασπώμενα συστατικά όπως μεγαλομοριακές λιπαρές ουσίες φαινολικές ενώσεις .

Ειδικά όσον αφορά στα φαινολικά έχει διαπιστωθεί πως κύρια ευθύνονται για τις φυτοτοξικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες που εμφανίζουν τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων και σε συνδυασμό με τις ιδιαίτερα αυξημένες τιμές που έχουν μετρηθεί για την βιολογική απαίτηση σε οξυγόνο Biological Oxygen Demand (**BOD**) και τη χημική απαίτηση σε οξυγόνο Chemical Oxygen Demand (**COD**) παρουσιάζουν ισχυρή ρυπογόνο δράση.

Στην Ελλάδα το σύνολο σχεδόν των λιόζουμων οδηγείται χωρίς επεξεργασία σε χείμαρρους, στο έδαφος, στα ποτάμια και την θάλασσα. Τα τελευταία χρόνια έχει τεθεί σε λειτουργία σε ορισμένες περιοχές της χώρας μας , περιορισμένος αριθμός ελαιοτριβείων δύο φάσεων (ή “οικολογικών”). Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα, λειτουργούν χωρίς προηγούμενη

αραιώση της ελαιοζύμης και παράγουν δύο προϊόντα, το ελαιόλαδο και την ελαιοπυρήνα η οποία περιέχει και το σύνολο των λοιπών φυτικών υγρών του καρπού. Αντίθετα με ότι ευρέως πιστεύεται, δεν υπάρχει μείωση του ρυπαντικού φορτίου του αποβλήτου, το οποίο απλά παρουσιάζει αυξημένη συγκέντρωση ανά μονάδα όγκου (“συμπυκνώνεται”). Ο περαιτέρω χειρισμός της συγκεκριμένης ελλαιοπυρήνας γίνεται σε ειδικά πυρηνελαιουργεία (μονάδες *gerasso*) από τα οποία παραλαμβάνεται λάδι, πυρηνόξυλο και ημιστερεό απόβλητο (“πούλπα”). (Οιχαλιώτης Κώστας, Ζερβάκης Γιώργος, 1999)

### **1.2.1 Τα προβλήματα από τα απόβλητα των ελαιοτριβείων τριών φάσεων**

Ο κατσίγαρος για να διατεθεί στο περιβάλλον (σε υδάτινους ή χερσαίους αποδέκτες) πρέπει να αντιμετωπιστούν τρία βασικά προβλήματα:

1. Τα λιόζουμα έχουν ένα πολύ υψηλό οργανικό φορτίο που χρειάζεται οξυγόνο για να αποδομηθεί ( $COD = 60 - 150 \text{ g/l}^1$ ,  $BOD_5 = 20-50 \text{ g/l}^1$ ). Ειδικά το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο για την αποδόμηση του φορτίου αυτού ( $COD$ ) είναι μεγαλύτερο και από αυτό των αστικών αποβλήτων. Αυτό σημαίνει ότι εάν διοχετευτούν ανεπεξέργαστα λιόζουμα σε υδάτινους αποδέκτες (χείμαρρους, θάλασσα, λίμνες) δημιουργούνται εύκολα συνθήκες έλλειψης οξυγόνου οι οποίες είναι καταστροφικές για τους περισσότερους οργανισμούς. Τα θρεπτικά στοιχεία που συγχρόνως παρέχονται με τα λιόζουμα εντείνουν ακόμα περισσότερο το πρόβλημα αυτό λόγω της ταυτόχρονης ανάπτυξης φαινομένων ευτροφισμού.

2. Ο ελαιόκαρπος έχει υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις που (μεταξύ άλλων) τον προστατεύουν αποτελεσματικά από παθογόνους μικροοργανισμούς. Οι ουσίες αυτές είναι κατά κύριο λόγο υδατοδιαλυτές και έτσι μεταφέρονται στο λιόζουμο μετά την έκθλιψη του ελαιοκάρπου. Στα φαινολικά, αλλά και σε ορισμένα λιπαρά οξέα μικρού μοριακού βάρους, αποδίδονται οι φυτοτοξικές και οι αντιμικροβιακές ιδιότητες που εμφανίζουν τα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων.

3. Το τρίτο πρόβλημα δεν αφορά τη σύσταση, αλλά την ποσότητα και τον χρόνο παραγωγής των λιόζουμων: Ο όγκος είναι τεράστιος και παράγεται σε 3 ή 4 το πολύ μήνες. Επομένως το κόστος συγκέντρωσης αποθήκευσης και μεταφοράς τους είναι υψηλό. Η εύκολη αλλοίωσή τους δεν επιτρέπει μακροχρόνια αποθήκευση και η εφαρμογή τους σε χερσαίους αποδέκτες παρουσιάζει προβλήματα πρόσβασης και απορρόφησης στα χωράφια κατά τη διάρκεια του χειμώνα. (Οιχαλιώτης Κώστας, Ζερβάκης Γιώργος, 1999)

## 1.2.2 Μέθοδοι διαχείρισεως των υγρών αποβλήτων της βιομηχανίας ελαιολάδου

Η διαχείριση των υγρών αποβλήτων της βιομηχανίας ελαιολάδου, ήταν και εξακολουθεί να είναι ένα πρόβλημα σοβαρό, οξύ στη διάρκεια της ελαιοποιήσεως και δυσεπίλυτο. Έχουν διεξαχθεί πολλές επάνω σε αυτό όλες τις ελαιοπαραγωγικές χώρες, που όμως δεν έχουν δώσει πλήρη λύση στο πρόβλημα.

Τα αίτια είναι πολλά, όπως το μεγάλο οργανικό φορτίο τους, η παρουσία σ' αυτά τοξικών ουσιών για φυτά και ζώα που αποικοδομούνται δύσκολα ή καθόλου και η παρουσία χρωστικών .

Ο ευκολότερος και οικονομικότερος τρόπος διαχείρισης τους, που εφαρμόστηκε από τα πανάρχαια χρόνια και εξακολουθεί να εφαρμόζεται μέχρι σήμερα, ήταν η παροχέτευσή τους σε καλλιεργημένο ή και χέρσο έδαφος. Συνηθισμένη ήταν επίσης η τεχνική της παροχέτευσης τους σε ποτάμια και κυρίως σε χειμάρρους και σπανιότερα κατ' ευθείαν στη θάλασσα. Με τους τρόπους αυτούς διαχείρισης, η ρύπανση και η επιβάρυνση του περιβάλλοντος ήταν και εξακολουθεί να είναι μεγάλη. Παράλληλα, οι διαμαρτυρίες ήταν πάντοτε σοβαρές, τον τελευταίο όμως καιρό οι πιέσεις της Πολιτείας προς τους ελαιουργούς ήταν σε τέτοιο σημείο έντονες, ώστε να αναγκαστούν πολλές βιομηχανίες ελαιολάδου να προβούν σε ίδρυση καταστάσεων καθαρισμού των υγρών αποβλήτων χωρίς όμως ουσιαστικό αποτέλεσμα. Στην Ισπανία και στην Ιταλία, και πολύ περισσότερο στις άλλες ελαιοπαραγωγικές χώρες, το θέμα της διαχείρισης των υγρών αποβλήτων είναι σοβαρό και τα προβλήματα ρυπάνσεως οξύτατα. Έχουν ληφθεί στις χώρες αυτές νομοθετικά μέτρα, τα οποία όμως δεν απέδωσαν, γιατί δεν βρέθηκε ως τώρα μια πρακτική εφαρμόσιμη λύση.

Για να αντιμετωπιστούν τα προβλήματα αυτά, υπήρξε στο παρελθόν μια σειρά διαφορετικών ερευνητικών προσεγγίσεων. Ακολουθεί μια συνοπτική περιγραφή με έμφαση στο σχολιασμό των αποτελεσμάτων τους σε επίπεδο εφαρμογής:

### • Η διάθεση των υγρών αποβλήτων στο έδαφος και σε υδάτινους αποδέκτες

Σχετικά πρόσφατα επιστημονικά στοιχεία (Petruccioli 1998) συνηγορούν προς την κατεύθυνση χειρισμού των υγρών αποβλήτων με την παραδοσιακή μέθοδο της φερτάρδευσης, δηλαδή της εφαρμογής των υγρών αποβλήτων σε καλλιεργούμενα εδάφη, όπως έχουν ή μετά



από προεπεξεργασία τους Η ανάπτυξη τέτοιας μεθοδολογίας διάθεσης των υγρών αποβλήτων μπορεί να προσφέρει διέξοδο στα προβλήματα που αντιμετωπίζουν κυρίως στα μικρά και μεμονωμένα ελαιοτριβεία. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στην επίλυση πρακτικών ζητημάτων που σχετίζονται με την εφαρμογή αυτής της προσέγγισης, όπως η εξουδετέρωση των λιόζουμων στο ελαιοτριβείο, το κόστος μεταφοράς στους ελαιώνες, ο τρόπος παροχέτευσης στα δέντρα κ.τ.λ, ενώ θα πρέπει να έχει προηγηθεί μελέτη των εδαφολογικών χαρακτηριστικών στους χώρους διάθεσης, ώστε να χορηγηθεί η κατάλληλη ποσότητα αποβλήτων και να αποφευχθεί η διήθηση σε βαθύτερα στρώματα του υπεδάφους.

#### • Η επεξεργασία των υγρών αποβλήτων με φυσικοχημικές μεθόδους

Αρχικά δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στη χρήση φυσικοχημικών μεθόδων όπως διήθησης , φυγοκέντρωσης, θρόμβωσης και καθίζησης, επίπλευσης, εξαγωγής με διαλύτη, ηλεκτροδιάλυσης, υπερδιήθησης και αντίστροφης ώσμωσης . Οι μεθοδολογίες αυτές παρ'ότι δοκιμάζονται εντατικά σε εργαστηριακό αλλά και σε “ πιλοτικό ” επίπεδο τα τελευταία είκοσι χρόνια σε διάφορους συνδυασμούς δεν έχουν δώσει λύσεις ευρείας αποδοχής , διότι προσκρούουν κυρίως στο υψηλό κόστος εγκατάστασης και λειτουργίας , στους τεράστιους όγκους αποβλήτων και στη διακύμανσή της σύστασής τους. Εξάιρεση αποτελούν ίσως οι ανοιχτές δεξαμενές καθίζησης και εξάτμισης που έχουν εφαρμοστεί στην Κρήτη και την Κύπρο. Όμως, κι εδώ υπάρχουν δυσεπίλυτα προβλήματα που σχετίζονται με την εκπομπή έντονης δυσοσμίας και την αποτελεσματική και την ασφαλή διαχείριση της ιλύος που απομένει στον πυθμένα των δεξαμενών .

Απόπειρες βελτίωσης της συγκεκριμένης τεχνικής οδήγησε στην εξέλιξη νέων σύνθετων μεθοδολογιών που ενδεικτικά περιλαμβάνουν :

- I. Εντατικοποίηση της δραστηριότητας της φυσικής εξάτμισης με χρήση ειδικών ανεμιστήρων ή κάθετων διάτρητων επιφανειών ανταλλαγής .
- II. Θερμική συμπύκνωση με προηγούμενη προεπεξεργασία με καυστικό νάτριο και αντίστροφη ώσμωση .
- III. Χρήση κροκιδωτικών ουσιών και καθίζηση μέρους του αποβλήτου που περιέχει αυξημένες ποσότητες ρυπογόνων ουσιών, αφού έχει προηγηθεί εξουδετέρωση με οξείδιο του ασβεστίου και εφαρμογή τεχνικών υπερδιήθησης ή διήθησης υπό κενό μέσω μεμβράνης. Οι παραπάνω περιπτώσεις προσφέρουν μερική επίλυση στο πρόβλημα της διαχείρισης των υγρών αποβλήτων και κάνουν επιτακτική την ανάγκη συνδυασμού τους με βιολογικές μεθόδους επεξεργασίας .

- **Βιολογικές μέθοδοι επεξεργασίας**

Οι βιολογικές μέθοδοι αφορούν τη χρησιμοποίηση ζωντανών οργανισμών για την αποδόμηση οργανικών συστατικών του αποβλήτου. Οι οργανισμοί αυτοί είναι φυτά (καλαμές υάκινθος), συνήθως όμως χρησιμοποιούνται μικροοργανισμοί οι οποίοι εισάγονται στα λιόζουμα ως εμβόλιο και στη συνέχεια εξασφαλίζονται ευνοϊκές συνθήκες για την επικράτησή τους.

Η βιο-επεξεργασία των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων με επιλεγμένα στελέχη μικροοργανισμών έχει συνήθως στόχο:

⇒ την μείωση του ρυπαντικού φορτίου

⇒ την παραγωγή νέων προϊόντων προστιθέμενης αξίας .

Οι μεθοδολογίες που αναπτύχθηκαν ενδεικτικά , είναι οι παρακάτω:

- ο αερόβιος βιολογικός καθαρισμός του κατσίγαρου (Fiesta Row de Ursinos, 1977)
- η αναερόβια ζύμωση για παραγωγή βιοαερίου
- η χρήση βιοαντιδραστήρα με ακινητοποιημένη βιομάζας
- μέθοδοι συγκομποστοποίησης με πυρηνόξυλα .

Τα συστήματα βιολογικής επεξεργασίας χωρίζονται σε συστήματα αεροβικής ή αναεροβικής επεξεργασίας, ανάλογα με τον τύπο μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται .

4. Στην αεροβική επεξεργασία τα λιόζουμα εμβολιάζονται με επιλεγμένα στελέχη αεροβικών μικροοργανισμών δηλαδή οργανισμών που απαιτούν οξυγόνο για τον μεταβολισμό τους. Το αποτέλεσμα τεχνικών αυτών είναι η μικρή μείωση του συνολικού οργανικού φορτίου των λιόζουμων. (Οιχαλιώτης Κώστας, Ζερβάκης Γιώργος,1999)

### **1.2.3 Χρήσεις υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων**

- **Για άρδευση – λίπανση**

Η εφαρμογή των αποβλήτων για άρδευση χωρίς κίνδυνο για τις καλλιέργειες ή το περιβάλλον πρέπει να πληρεί τις παρακάτω προϋποθέσεις (Morisot):

Η εφαρμογή να γίνεται στο ενδιαμέσω των σειρών των δέντρων σε περίοδο μη βλαστικής δραστηριότητας.

⇒ Οι ποσότητες πρέπει να εφαρμόζονται κλιμακωτά , με μικρές δόσεις και δεν πρέπει να υπερβαίνουν τα 10 m<sup>3</sup>/ στρ.

⇒ Σε ετήσιες καλλιέργειες , η σπορά να γίνεται έναν μήνα μετά την τελευταία άρδευση

⇒ Η άρδευση με απόβλητα δεν πρέπει να επαναλαμβάνεται συχνότερα από δύο έτη. Η εφαρμογή των αποβλήτων για λίπανση είναι σημαντική για τους παρακάτω λόγους:

⇒ Έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε K , P και Mg

⇒ Έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε οργανική ύλη, η οποία συντελεί στην ανάπτυξη μικροοργανισμών εδάφους που βελτιώνουν τις φυσικοχημικές του ιδιότητες και αυξάνουν την ικανότητα του για συγκράτηση νερού και ανόργανων στοιχείων. Όμως αρνητικές επιπτώσεις είναι: η υψηλή αλατότητα (8-18 mmhos/cm), η υψηλή οξύτητα (PH=4-6) και η υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες.

- **Ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων για την επίτευξη μονοκυτταρικών πρωτεϊνών**

Η υψηλή περιεκτικότητα των αποβλήτων σε σάκχαρα (8%), επιτρέπει την παραγωγή μονοκυτταρικών πρωτεϊνών με τη βοήθεια της ζύμης *Candida utilis*. (*J.fiestas*). Τα σάκχαρα μετατρέπονται κατά 50% σε αδιάλυτες πρωτεΐνες οι οποίες είναι κατάλληλες για τη διατροφή των ζώων. Τέλος τα σάκχαρα μπορούν να ανταγωνιστούν το αλεύρι της σόγιας, λόγω των αμινοξέων και της βιταμίνης B που περιέχουν.

- **Καλλιέργεια εδώδιμων μανιταριών**

Η καλλιέργεια των εδώδιμων μανιταριών είναι μια διαδικασία ελεγχόμενης βιομετατροπής λιγνοκυτταρινούχων υλικών σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Οι μύκητες του γένους *Pleurotus* διαθέτοντας έναν ιδιαίτερο αποδοτικό ενζυμικό μηχανισμό αποδόμησης των φαινολικών ουσιών που περιέχονται στον κατσίγαρο, μειώνουν τη φυτοτοξική δράση και προκαλούν τον αποχρωματισμό τους, (Zervakis et al.,1995, Flouri et al., 1995). Η μυκηλιακή βιομάζα στα υγρά απόβλητα στοχεύει και στην παραγωγή μικροβιακής πρωτεΐνης ή και εδαφοβελτιωτικού.



- **Παραγωγή βιοτασενεργών ουσιών**

Ορισμένα στελέχη *Pseudomonas sp.* αναπτύσσονται και συσσωρεύουν ραμνολιπίδια (ενώσεις με τασιενεργές ιδιότητες), χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα τον κατσίγαρο.

- **Παραγωγή πρώτων υλών**

Ορισμένα συστατικά που εξάγονται από τον κατσίγαρο μπορούν να χρησιμοποιηθούν στον εμβολιασμό μειγμάτων ζωοτροφών για πουλερικά, γαλακτωματοποιητές και διάφορες ουσίες. (Μπαλατσούρας Γεώργιος, 1997)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>0</sup>

### 2.1 ΣΗΨΗ ΛΑΙΜΟΥ ΚΑΙ ΡΙΖΩΝ

Η φουζαρίωση του λαιμού και ριζών (αγγλ. Fusarium crown and root rot ή foot and root rot) της τομάτας προκαλείται από το *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (FORL). Αναγνωρίστηκε και περιγράφηκε για πρώτη φορά σε πλαστικά θερμοκήπια στις περιοχές Οπο και Kamiiso της Ιαπωνίας το 1969. Στη συνέχεια η νέα αυτή ασθένεια της τομάτας εμφανίστηκε μέσα σε λίγα χρόνια σε υπαίθριες καλλιέργειες στην Καλιφόρνια το 1971. (Jarvis, 1988). Τα επόμενα χρόνια η ασθένεια αυτή εμφανίστηκε στην Ιαπωνία, Καναδά, Ολλανδία, Γαλλία και Μ. Βρετανία. Η ασθένεια διαπιστώθηκε και στη χώρα μας σε θερμοκήπια της Κρήτης (Malathrakis, 1985).

#### 2.1.1 Ταξινόμηση

Το γένος *Fusarium* ανήκει στην οικογένεια Tuberculariaceae της τάξης Tuberculariales, χαρακτηριστικό της οποίας είναι ότι τα κονίδια παράγονται σε σποριοδοχεία. Ανήκει στην κλάση Hyrhomycetes των Δευτερομυκήτων.

Οι Δευτερομύκητες (ή Ατελείς μύκητες ή Αδηλομύκητες) αποτελούν ομάδα που περιλαμβάνει πολλά επιζήμια παθογόνα των καλλιεργειών. Ανήκουν στους ανώτερους μύκητες και σχηματίζουν μυκήλιο πολυκύτταρο. Περιλαμβάνουν είδη τα οποία αναπαράγονται μόνο αγενώς. Πολλά είδη τους είναι η ατελής (αγενής) μορφή Ασκομυκήτων και μερικά Βασιδιομυκήτων, χωρίς όμως να σχηματίζουν εγγενείς καρποφορίες (ασκούς και βασίδια). Όταν σχηματίζουν τέτοιες περνούν στην τέλεια μορφή και ανήκουν στις αντίστοιχες υποδιαίρεσεις (Ασκομύκητες ή Βασιδιομύκητες). Συνήθως οι μύκητες αυτοί ζουν παρασιτικά με την αγενή τους μορφή (ως Δευτερομύκητες) και σαπροφυτικά με την εγγενή (ως Ασκομύκητες και Βασιδιομύκητες). Η αγενής αναπαραγωγή των Δευτερομυκήτων γίνεται με όλους τους τρόπους (κονίδια, τεμάχια μυκηλίου, σκληρώτια, ριζόμορφα) (Ηλιόπουλος Αναστάσιος, 1996).

Το γένος *Fusarium* περιλαμβάνει πολλά φυτοπαθογόνα είδη, που προκαλούν διάφορες ασθένειες των φύλλων με ποικιλία συμπτωμάτων. Κυρίως προκαλούν αδρωμυκώσεις στα κηπευτικά (τομάτα, μελιτζάνα, πιπεριά, κολοκυνθοειδή κ.α.) και ξηρές σήψεις (πατάτα, κρεμμύδι κ.α.).

Κυριότερο είδος το *F. oxysporum*, το οποίο εμφανίζει διάφορες φυσιολογικές φυλές εξιδικευμένες κατά ξενιστή.

Άλλα ενδιαφέροντα είδη είναι τα *F. moniliforme*, *F. culmorum*, *F. gramineum*, κ.α. (Ηλιόπουλος Αναστάσιος, 1996)

### 2.1.2 Συμπτώματα

Στο θερμοκήπιο, η ασθένεια εκδηλώνεται με ένα απότομο μαρασμό των φυτών ακριβώς πριν οι πρώτοι καρποί ωριμάσουν, ιδιαίτερα τις ημέρες με ηλιοφάνεια. Τα προσβεβλημένα φυτά συνήθως επανέρχονται τη νύχτα ή τις νεφοσκεπείς ημέρες ή μετά την αφαίρεση του φορτίου τους με τη συγκομιδή των καρπών. Τελικά τα προσβεβλημένα φυτά ξηραίνονται.

Άλλα συμπτώματα σε αναπτυσσόμενα φυτά περιλαμβάνουν μια καφέ σήψη του φλοιώδους ιστού, η οποία γίνεται αντληπτή συνήθως με αφαίρεση των επιφανειακών στρωμάτων του στελέχους. Παρατηρείται επίσης ένας καφέ-κόκκινος μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου στην περιοχή του λαιμού που εκτείνεται σε απόσταση συνήθως 5-10 εκ., ποτέ περισσότερο από 25 εκ. πάνω από τη βάση του στελέχους. Οι ρίζες στην αρχή παρουσιάζουν κατά θέσεις και αργότερα ολοκληρωτική καστανή σήψη. Αρχικά εντοπίζεται μαρασμός των φύλλων της κορυφής, ακολουθεί μαρασμός των κατώτερων φύλλων και τελικά κιτρίνισμα που αρχίζει απ' την κορυφή του ελάσματος και τελικά ξηραίνονται. Οι καρποί των προσβεβλημένων φυτών είναι μαλακοί και στερούνται το φυσιολογικό λαμπερό χρώμα τους.

Στις υπαίθριες καλλιέργειες, η ασθένεια εκδηλώνεται με απότομο μαρασμό και ξήρανση των φυτών ή με ένα βραδύ μαρασμό με βαθμιαία ξήρανση των φύλλων. Τα φυτά που εμφανίζουν βραδύ μαρασμό επιβιώνουν μέχρι το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου και αναβλαστάνουν μετά τη συλλογή των περισσότερων καρπών (Jarvis, 1988).

### 2.1.3 Συνθήκες που ευνοούν τις ασθένειες

Ο μύκητας *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) μορφολογικώς είναι όμοιος με τον *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) που προκαλεί την ανδρομύκωση της τομάτας. Διαφέρει όμως από το FORL τόσο από παθολογικής όσο και από φυσιολογικής απόψεως. Δεν προκαλεί ανδρομύκωση. Το παθογόνο εισέρχεται στο φυτό από τις ρίζες διατροφής και εξαπλώνεται βραδέως στην κύρια ρίζα, την περιοχή του λαιμού και τις πλάγιες ρίζες, κυρίως με την βοήθεια μεσοκυττάρων μυκηλιακών υφών μέσω του φλοιώδους παρεγχύματος και δευτερευόντως μέσω του ξύλου. Προκαλεί ξηρή

καστανή σήψη. Η άριστη θερμοκρασία για την παθογένεση είναι 18 - 20<sup>0</sup>C. Το παθογόνο προσβάλλει και τις ανθεκτικές στο FOL ποικιλίες τομάτας. Η ασθένεια ευνοείται από τις χαμηλές θερμοκρασίες του εδάφους ( περίπου 18<sup>0</sup>C ), καθώς και σε εδάφη τα οποία έχουν υποστεί απολύμανση με ατμό ή με χημικά μέσα. Φαίνεται ότι ο μύκητας στα φυσικά εδάφη περιορίζεται σημαντικά από την ανταγωνιστική μικροχλωρίδα και γι' αυτό δεν προκαλεί συνήθως ασθένεια, ενώ αντιθέτως αποικίζει εύκολα και πλούσια τα αποστειρωμένα εδάφη. Το παθογόνο μεταδίδεται με τα υπολείμματα της καλλιέργειας, το έδαφος, τα μολυσμένα φυτάρια, τα ρούχα και τα παπούτσια των εργαζομένων στις καλλιέργειες, τα εργαλεία, καθώς και με τον σπόρο (Menzies and Jarvis, 1994). Παράγει μεγάλες ποσότητες μικροκονιδίων τα οποία σχηματίζονται στο έδαφος και τα ξηρά στελέχη των φυτών και μεταφέρονται σε αμόλυντες καλλιέργειες, ιδίως θερμοκηπιακές, με την βοήθεια του ανέμου. Επίσης παράγει μακροκονίδια και χλαμυδοσπόρια.

#### 2.1.4 Έλεγχος

Οι στρατηγικές για τον έλεγχο του FORL έχουν ανασκοπηθεί από τους Rowe and Farley (1981). Πολλές νεότερες προσπάθειες για τον έλεγχο της ασθένειας με διαδικασίες συμβατικής αποστείρωσης του εδάφους καθώς και με μυκητοκτόνα απέτυχαν λόγω της επαναπροσβολής των αποστειρωμένων εδάφους από μικροκονίδια τα οποία παρασύρθηκαν από τον αέρα και τις μεταγενέστερης έκρηξης του πληθυσμού στο έδαφος. Οι Rowe και Farley αναγνώρισαν τρεις προσεγγίσεις για τον έλεγχο: αφαίρεση των σπορίων του FORL μέσα στο θερμοκήπιο, με τη χρήση των μεθόδων αποστείρωσης του εδάφους για να εμποδίσουν την επαναποίκηση, αναπτύσσοντας ανθεκτικές ποικιλίες και ως μελλοντική ανάπτυξη, τον βιολογικό έλεγχο (Jarvis, 1988).

- **Χημικός έλεγχος**

Εξαιτίας της γρήγορης επαναποίκησης των αποστειρωμένων εδάφους από παρασυρόμενα από τον αέρα μικροκονίδια, η αποστείρωση με ατμό και η απολύμανση του εδάφους είχε γενικότερα μικρή επιτυχία. (Jarvis and Thorpe, 1980, Rowe and Coplin 1976, Rowe et.al., 1977).

Οι Jarvis και Thorpe (1976) δοκίμασαν μια ποικιλία μυκητοκτόνων ως μεταχειρίσεις σπόρων και διαβροχής εδάφους κατά και μετά τη μεταφύτευση και δεν ήταν επιτυχής εκτός αν γίνονταν φυτοτοξικές.(Jarvis 1988).

Στο παρόν το μόνο αποτελεσματικό μέτρο ελέγχου είναι η εφαρμογή της διαβροχής του cartafol στα σπορεία του θερμοκηπίου αμέσως μετά τη σπορά. Το cartafol επιλεκτικά εμποδίζει την ανάπτυξη του παθογενούς FORL στο έδαφος ( Marois, 1981).

- **Βιολογικός έλεγχος**

Ακολουθώντας την αποτυχία του χημικού ελέγχου και το τακτικό δυνάμωμα της ασθένειας σε αποστειρωμένα εδάφη, ο Jarvis (1977) πρότεινε ότι η ασθένεια θα μπορούσε να ελέγχει με βιολογικά μέσα, πιθανόν με παρόμοιο όμοιο τρόπο με τη χρήση κατασταλτικών εδαφών για τον έλεγχο των *formae speciales* του *Fusarium oxysporum*, ή με την αύξηση στα εδάφη με ουσίες που βοηθούν την επισχετικότητα (Cook, 1982).

Οι Jarvis και Thopre ( 1981) ερεύνησαν τη χρήση χλωρής λίπανσης για να αυξηθεί ο πληθυσμός των ανταγωνιστών του FORL μικροοργανισμών σε αποστειρωμένα εδάφη. Έτσι φυτά όπως leaf mustard (*Brassica Juncea Coss.*), σπανάκι (*spinacia oleracea L.*) μεγάλωσαν σε αποστειρωμένο και επαναπροσβεβλημένο με FORL έδαφος. Πραγματοποιήθηκε κοπή αυτών μέσα στο έδαφος πριν τη φύτευση φυτών τομάτας και παρατηρήθηκε μείωση της ασθένειας.(Jarvis, 1988).

Ορισμένα φθορίζοντα στελέχη *Pseudomonas sp.* μπορούν να επαυξήσουν το βιολογικό έλεγχο μη παθογενών στελεχών του *Fusarium oxysporum*. Δηλαδή το στέλεχος *Pseudomonas putida* WCS 358 επαύξησε το βιολογικό έλεγχο με το στέλεχος του μη παθογόνου *Fusarium oxysporum* Fo 47 (Duijff et.al. 1999).

Άλλη μια μέθοδος βιολογικής καταπολέμησης αποτελεί η αύξηση του ανταγωνισμού του FORL με την βοήθεια του ενδοφυτικού βακτηρίου στελέχους 63-28 του *Pseudomonas fluorescens* (Piga et.al. 1997).

Αρκετές αναφορές υποστηρίζουν ξεκάθαρα ότι οι μυκορριζικοί μύκητες Vesicular Arbuscular Mycorrhiza (VAM) επιτρέπουν καλύτερη απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών από τα φυτά και ο φώσφορος γενικά έχει βρεθεί σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στα ενδομυκορριζικά φυτά. Οι μελέτες της αλληλεπίδρασης μεταξύ μυκορριζικών μυκητών και παθογενών μυκητών ριζών έχουν δείξει ότι η επίδραση των μυκορριζικών μυκητών στην ανάπτυξη της παθογένειας και της ασθένειας μπορεί να συσχετίζεται στην αύξηση της θρέψης του φωσφόρου. (Caron et.al.1986).

Τέλος, ο βιολογικός έλεγχος του FORL πραγματοποιείται με τον μύκητα *Trichoderma harzianum* σε συνδυασμό με βρωμιούχο μεθύλιο ή ηλιοαπολύμανση.



- **Ανθεκτικές ποικιλίες**

Ο Jarvis (1988) ανακάλυψε ανθεκτικές ποικιλίες για υπαίθριες καλλιέργειες και θερμοκηπιακές .

- **Καλλιεργητικά μέτρα**

Συνιστάται να αποφεύγεται το πότισμα με πολύ κρύο νερό, η φύτευση να γίνεται σε θερμό έδαφος, να αποφεύγεται η ολική αποστείρωση του εδάφους, τα ασθενή φυτά να εκριζώνονται μαζί με ολόκληρο το ριζικό τους σύστημα και να απομακρύνονται από τον αγρό.

## **2.2 ΦΥΤΟΦΘΟΡΑ**

Στη χώρα μας οι ασθένειες που οφείλονται στο γένος *Phytophthora* είναι από τις πιο σοβαρές και δύσκολες στην αντιμετώπισή τους. Το όνομά του προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις "φυτό" και "φθορά". Αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1876 από τον Anton de Bary, γερμανό βοτανολόγο, ο οποίος περιέγραψε το παθογόνο που προξενούσε τον περονόσπορο της πατάτας στην Ιρλανδία και στο οποίο έδωσε το όνομα *Phytophthora infestans*. Η ασθένεια είχε εμφανιστεί στην Ευρώπη το 1840, πρώτα στη Γαλλία και στη συνέχεια και σε άλλες χώρες, όπου προκαλούσε ανυπολόγιστες καταστροφές στις καλλιέργειες της πατάτας, με αποτέλεσμα την απώλεια της παραγωγής και εν συνεχεία την ερήμωση από τους κατοίκους των περιοχών όπου η προσβολή εξελίχθηκε σε επιδημία. Εκτός από τις καταστροφές στην καλλιέργεια της πατάτας, αναφέρεται ότι μεγάλες ζημιές επίσης προκαλεί το είδος *P. colocasiae* στις τροπικές χώρες στις φυτείες του τάρου, είδος φυτού που τα προϊόντα του καταναλώνονται εκεί που παράγονται, χωρίς να εμφανίζονται στις διεθνείς αγορές. Η ασθένεια περιορίζεται στη Ν. Ασία και στις χώρες του Ειρηνικού. Ο *P. syringae* προξενεί μεγάλες ζημιές στην Αγγλία στα μήλα που αποθηκεύονται σε χαμηλές θερμοκρασίες. (Ελενα Κ, 1999)

### 2.2.1 Ταξινόμηση

Τα τελευταία χρόνια αμφισβητείται η κατάταξη του γένους *Phytophthora* και άλλων ωομυκήτων στο βασίλειο των μυκήτων. Οι μύκητες αυτοί κατατάσσονται σε ένα νέο βασίλειο, που έχει περιγραφεί πρόσφατα και είναι το βασίλειο των Chromista. Η ομάδα των ωομυκήτων χαρακτηρίζεται από την απουσία της χιτίνης στο κυτταρικό τοίχωμα (ενώ υπάρχει στο τοίχωμα των αληθινών μυκήτων), από ζωοσπόρια με ανόμοια μαστίγια, τα οποία σχηματίζονται σε σποριάγγεια, διπλοειδείς πυρήνες στα κύτταρα των υφών και εγγενή αναπαραγωγή με την ένωση ανθηριδίου και ωογονίου. Ακόμη όμως στη διεθνή βιβλιογραφία το γένος *Phytophthora* εξακολουθεί να περιλαμβάνεται στους μύκητες.

Το γένος *Phytophthora* ανήκει στην οικογένεια Pythiaceae, της τάξης των Peronosporales, από την κλάση των ωομυκήτων. Η διάκριση των ειδών μέσα στο γένος σε μερικές περιπτώσεις είναι εύκολη, ενώ γίνεται δύσκολη τις περισσότερες φορές, διότι αφ' ενός μεν υπάρχει μεγάλη ποικιλομορφία μέσα και μεταξύ των ειδών και αφ' ετέρου πολλά είδη παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες μεταξύ τους. Ακόμη είναι δυνατόν ο ίδιος ξενιστής να προσβάλλεται από περισσότερα του ενός είδη, τα οποία προξενούν τα ίδια συμπτώματα. (Ελενα Κ, 1999)

### 2.2.2 Συμπτώματα

Οι μύκητες του γένους *Phytophthora* προσβάλλουν τα φυτά σ' όλα τα στάδια αναπτύξεως τους και προκαλούν τήξη φυταρίων, έλκος του λαιμού, σηψηρριζίες, προσβολές φύλλων και σήψη καρπών.

Η προσβολή του λαιμού εκδηλώνεται στη βάση του στελέχους ως υδατώδης επιμήκης κηλίδα που σύντομα γίνεται πρασινοκαστανή ή καστανή και ο φλοιός γίνεται μαλακός και συνήθως βυθίζεται. Συχνά η μόλυνση αρχίζει από τις ρίζες. Όταν η προσβολή περιβάλλει το στέλεχος τα φυτά μαραίνονται απότομα και ξηραίνονται.

Στους καρπούς, ιδίως σ' αυτούς που ακουμπούν ή βρίσκονται πολύ κοντά στο έδαφος, η ασθένεια εκδηλώνεται με το σχηματισμό υδατώδους κηλίδας με ασαφή όρια η οποία αποκτά γκριζοκαστανό ή καστανό χρώμα και σύντομα μεγαλώνει καλύπτει μεγάλο μέρος του καρπού και παρουσιάζει συγκεντρικές ζώνες διαφόρων αποχρώσεων. Είναι χαρακτηριστικό ότι η επιδερμίδα παραμένει ανέπαφη και προσβεβλημένοι ιστοί διατηρούνται σφιχτοί για αρκετό διάστημα. Ενώ η προσβολή μπορεί να εξαπλωθεί μέχρι το



κέντρο του καρπού. Όταν υπάρχει πολύ υγρασία στο έδαφος και το περιβάλλον του φυτού πάνω στους προσβεβλημένους ιστούς αναπτύσσεται βαμβακάδες λευκό μυκήλιο. (Παναγόπουλος Γ.Χ., 1995)

### 2.2.3 Συνθήκες που ευνοούν τις ασθένειες

Η εξάπλωση των ασθενειών που οφείλονται στο γένος *Phytophthora*, όπως ισχύει και σε άλλα παθογόνα εξαρτάται από το δυναμικό του μολύσματος, τις συνθήκες του περιβάλλοντος και την ευπάθεια του ξενιστή. Οι κλιματικές συνθήκες έχουν καθοριστικό ρόλο για όλα τα είδη *Phytophthora* και την εξάπλωση της ασθένειας που προξενούν. Ο περιβαλλοντικός παράγοντας όμως που έχει το σπουδαιότερο ρόλο είναι η υγρασία. Τα περισσότερα είδη του γένους ζουν στο έδαφος, όπου οι αλλαγές των συνθηκών του περιβάλλοντος δεν είναι τόσο γρήγορες. Το ελεύθερο νερό εδώ, εκτός από το ότι ευνοεί την ασθένεια, διότι παράγονται τα μολύσματα του μύκητα (σποριάγγεια, ζωοσπόρια), τα μεταφέρει και σε μεγαλύτερες αποστάσεις και έτσι τη μεταδίδει. Εδώ ο ρόλος του επιπέδου της εδαφικής υγρασίας και της θερμοκρασίας και ο κατάλληλος συνδυασμός των δύο είναι καθοριστικός, με αποτέλεσμα επιδημίες από συγκεκριμένα είδη να περιορίζονται σε ορισμένα γεωγραφικά πλάτη. Στα περισσότερα μέρη του κόσμου πάντως οι κλιματικές συνθήκες είναι ευνοϊκές για τα περισσότερα είδη από αυτό το γένος. Σε γενικές γραμμές οι υπερβολικές λιπάνσεις ευνοούν την εξάπλωση των ασθενειών, υπάρχουν όμως μεγάλες διαφορές μεταξύ των ειδών και μεταξύ του συνδυασμού του είδους *Phytophthora* και του ξενιστή που έχει προσβληθεί.

Η επιβίωση των παθογόνων, όπως είναι γνωστό, εξαρτάται όχι μόνο από την δυνατότητά τους να παρασιτούν έναν ξενιστή, αλλά και από την ικανότητα τους να επιβιώνουν κατά την απουσία του. Όταν στο έδαφος δεν υπάρχει υψηλό ποσοστό υγρασίας, η διάρκεια επιβίωσης των μολυσμάτων είναι πολύ μικρότερη. Σε γενικές γραμμές η σαπροφυτική ικανότητα του γένους *Phytophthora* είναι μικρή. Συχνά παρατηρείται γρήγορη αποδιοργάνωση του μυκηλίου σε φυσικά εδάφη, η οποία οφείλεται σε αποίκηση του από βακτήρια. (Παναγόπουλος Γ.Χ., 1995)

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>0</sup>

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΔΕΙΚΤΗ ΦΥΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ Υ.Α.Ε.

Για τον προσδιορισμό του δείκτη φυτοτοξικότητας των Υ.Α.Ε. τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Κατσιγαρος (OMW)
- Σπόροι: κάρδαμου, τομάτας ποικιλίας (ACE 55), αγγουριού υβριδίου (HAMADA)
- Απιονισμένο νερό (d-H<sub>2</sub>O)
- Τριβλία Petri
- Διηθητικό χαρτί
- Σακούλες νάυλον
- Σιφώνι των 10 ml
- Ογκομετρικός κύλινδρος των 250 ml

#### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ :

Σε κάθε τριβλίο τοποθετήθηκαν τρία διηθητικά χαρτιά και με το σιφώνι των 10 ml προστέθηκαν 3ml νερού ή Υ.Α.Ε. σε ποσοστό 0,25,50 και 100%. Για την μέτρηση του δείκτη φυτοτοξικότητας για την τομάτα ποικιλίας (ACE 55) χρειάστηκαν 25 σπόροι, για το αγγούρι υβρίδιο (HAMADA) 10 σπόροι και 25 για τον κάρδαμο 25 σπόροι. Για την κάθε επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν 3 τριβλία Petri, δηλαδή συνολικά χρειάστηκαν 36 τριβλία. Τοποθετήθηκαν οι αντίστοιχοι σπόροι σε κάθε τριβλίο και σημειώθηκαν τα απαραίτητα στοιχεία (ημερομηνία, είδος σπόρου, το υγρό που αποτέλεσε το υπόστρωμα). Επόμενο βήμα ήταν το τύλιγμα των τριβλίων με βρεγμένο διηθητικό χαρτί και η τοποθέτησή τους σε νάυλον σακούλες. Επώαστηκαν για τρεις ημέρες στους 35<sup>0</sup>C και την τέταρτη ημέρα, έγινε η μέτρηση του μήκους του ριζιδίου (mm), καθώς και η μέτρηση των σπόρων που βλάστησαν.

Πολλαπλασιαζόμενος ο μέσος όρος βλαστικότητας επί % και διαιρούμενος με τον μέσο όρο βλαστικότητας του μάρτυρα, δίνει τον άγνωστο X1. Ενώ ο μέσος όρος του μήκους του ριζιδίου (mm) επί % και στη συνέχεια διαιρούμενος με τον αντίστοιχο μέσο όρο του μάρτυρα

σε (mm) μας δίνει τον άγνωστο Ψ1. Πολλαπλασιάζοντας το Χ1 με το Ψ1 προκύπτει ο δείκτης βλαστικότητας.

### **3.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΔΕΙΚΤΗ ΒΛΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΓΛΑΣΤΡΑΚΙΑ ΜΕ ΠΕΡΛΙΤΗ**

Για τον προσδιορισμό του δείκτη βλαστικότητας σε γλαστράκια με περλίτη τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- περλίτης
- γλαστράκια
- σπόροι τομάτας ποικιλίας (ACE 5.5) και αγγουριού υβρίδιο (HAMADA)
- Υ.Α.Ε
- χλωρίνη 20%

#### **ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ :**

Οι σπόροι απολυμάνθηκαν σε διάλυμα χλωρίνης 20% για δέκα λεπτά. Στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με άφθονο απιονισμένο νερό ( $d-H_2O$ ) και στεγνώθηκαν. Τοποθετήθηκαν σε γλαστράκια τα οποία περιείχαν υπόστρωμα περλίτη. Αφού έγινε η σπορά ποτίστηκαν με Υ.Α.Ε σε ποσοστά 0,10,25,50 και 75% Υ.Α.Ε. και τοποθετήθηκαν σε φυσικό περιβάλλον με θερμοκρασία  $26^{\circ}C$ . Τα φυτά κάθε μέρα ζυγίζονταν και ποτίζονταν με ανάλογη ποσότητα νερού, έτσι ώστε να πληρείται το 80% της υδατοικανότητας.

### **3.3 ΕΞΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΑΠΟ ΤΑ Υ.Α.Ε.**

Για την εξαγωγή των φαινολικών από τα Υ.Α.Ε. τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Υ.Α.Ε.
- θειϊκό οξύ ( $H_2SO_4$ )
- Ακετόνη ( $CH_3)_2 CO$
- Ethylacetate (EtAc)
- Ποτήρι ζέσεως
- Ογκομετρικός κύλινδρος

- Σωλήνες φυγοκέντρωσης
- Μαγνήτης
- Φυγόκεντρος
- Μαγνητικός αναδευτήρας

### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

Φυγοκεντρήθηκαν τα Υ.Α.Ε. αφού τοποθετήθηκαν στη φυγόκεντρο μέσα σε σωλήνες φυγοκέντρωσης για 5 λεπτά στις 10.000 στροφές/λεπτό. Στη συνέχεια το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε ποτήρι ζέσεως και τοποθετήθηκε πάνω στο μαγνητικό αναδευτήρα. Ρυθμίστηκε το ΡΗ των Υ.Α.Ε. μεταξύ των τιμών 1 και 2 αφού έγινε προσθήκη κατάλληλης ποσότητας  $H_2SO_4$ . Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η διαδικασία για την εξαγωγή των φαινολικών. Έγινε ανάμιξη των Υ.Α.Ε. με EtAc και ακετόνη σε αναλογία 3:2:1. Ακολούθησε φυγοκέντρωση των παραπάνω, για 10 λεπτά στις 10.500 στροφές ανά λεπτό. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και τοποθετήθηκε σε ποτήρι ζέσεως στον απαγωγό για 5-10 ημέρες περίπου, μέχρι να εξατμιστεί. Τέλος μετά το πέρας του παραπάνω χρονικού διαστήματος, το ίζημα διαλύθηκε σε 10ml d- $H_2O$ .

### **3.3.1 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών ενώσεων με τη μέθοδο Folin - Ciocalteu**

Για τον προσδιορισμό των φαινολικών τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Κωνική φιάλη των 25 ml
- Σιφώνι των 10ml
- Πιπέττα των 1000λ
- Απιονισμένο νερό (d- $H_2O$ )
- Διάλυμα Βολφραμικού Νατρίου και Φωσφορομολυβδενικού Οξέως
- Ανθρακικό Νάτριο ( $NaCO_3$ )
- Φασματοφωτόμετρο ατομικής απορρόφησης

### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ :

Σε κωνική φιάλη των 25 ml προσθέθηκαν 20ml (d- $H_2O$ ) και στη συνέχεια 250μl (250λ) με τη πιπέττα των 1000λ από το δείγμα των φαινολικών το οποίο είχε υποστεί αραιώση. Στη

συνέχεια έγινε προσθήκη 1250ml (1250λ) διάλυμα Βολφραμικού Νατρίου και φωσφορομολυβδενικού οξέως και 3,75 ml διαλύματος Ανθρακικού Νατρίου. Για την παρασκευή του τελευταίου διαλύθηκαν 200gr Ανθρακικού Νατρίου σε 1l (d-H<sub>2</sub>O). Τέλος, προστέθηκε (d-H<sub>2</sub>O) μέχρι να συμπληρωθούν 25ml. Το χρονικό διάστημα μεταξύ της προσθήκης των δύο διαλυμάτων και του (d-H<sub>2</sub>O) δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερο από 8 λεπτά. Το διάλυμα παρέμεινε για 2 ώρες στην κωνική φιάλη. Ύστερα μετρήθηκαν τα ολικά φαινολικά στο φασματοφωτόμετρο ατομικής απορρόφησης (absorbance) σε μήκος κύματος 760nm.

Η ποσότητα των ολικών φαινολικών, εκφράστηκε σε μg/ml αρχικού δ/τος ως μονάδες συρριγγικού οξέως, σύμφωνα με πρότυπη καμπύλη ( $\psi=0.0369*\chi+0.0084135$ )(Waterman, 1994).

### **3.4 ΣΠΟΡΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΥΤΩΝ ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΙ ΑΓΓΟΥΡΙΟΥ**

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την σπορά και την ανάπτυξη των φυτών τομάτας και αγγουριού ήταν τα εξής:

- Γλαστράκια
- Σπόροι τομάτας ποικιλίας Ace 55 και αγγουριού υβρίδιο HAMADA
- Περλίτης
- Χλωρίνη 20%
- Υ.Α.Ε.
- Αποιονισμένο νερό (d-H<sub>2</sub>O)

#### **ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:**

Οι σπόροι απολυμάνθηκαν σε διάλυμα χλωρίνης 20% για 10 λεπτά. Στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με άφθονο αποιονισμένο νερό (d-H<sub>2</sub>O) και στεγνώθηκαν. Τοποθετήθηκαν σε γλαστράκια τα οποία περιείχαν υπόστρωμα περλίτη αποστειρωμένο για 60 λεπτά στους 121°C. Αφού έγινε η σπορά ποτίστηκαν με Υ.Α.Ε σε ποσοστά 0,25 και 50% σε νερό και τοποθετήθηκαν σε φυσικό περιβάλλον με θερμοκρασία 26°C. Τα φυτά κάθε μέρα ζυγίζονταν και προσθέτονταν η ανάλογη ποσότητα (d-H<sub>2</sub>O) που είχαν χάσει, έτσι ώστε να πληρείται το 80% της υδατοϊκανότητας. Οι τρεις επεμβάσεις εφαρμόστηκαν σε 4 επαναλήψεις για τα δύο

φυτά τομάτας και αγγουριού κάνοντας 48 πειραματικές μονάδες για λήψη παρατηρήσεων με σπορά 8 σπόρων τομάτας στην κάθε γλάστρα και 4 σπόρων αγγουριού στην κάθε γλάστρα. Μια με δύο φορές την εβδομάδα ποτίζονταν με το παρακάτω θρεπτικό διάλυμα φυτών αφού γινόταν προσθήκη ιχνοστοιχείων σε αναλογία 0,1ml/l.

#### **ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΦΥΤΩΝ**

0.072% (W/V)	$K_2HPO_4$
0.024% (W/V)	$KH_2PO_4$
0.025% (W/V)	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$
0.025% (W/V)	$CaSO_4$
0.003%(W/V)	$FeCl_3$

#### **ΔΙΑΛΥΜΑ ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΩΝ**

200mg/lt	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$
200mg/lt	$MnSO_4 \cdot H_2O$
15mg/lt	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$
200mg/lt	$COCl_2 \cdot 6H_2O$
200mg/lt	$H_3BO_3$
200mg/lt	$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$
200mg/lt	$ZnSO_4 \cdot 4H_2O$

#### **3.4.1. Μολύνσεις των φυτών τομάτας**

Οι μολύνσεις έγιναν σε φυτά 0,10 και 20 ημερών σε δύο επίπεδα μόλυνσης. Στο χαμηλό επίπεδο οι μολύνσεις έγιναν με 1ml διαλύματος κονιδίων του μύκητα FORL σε d-H<sub>2</sub>O συγκέντρωσης 10<sup>3</sup> και στο υψηλό σε συγκέντρωση 10<sup>6</sup>. Τα δύο επίπεδα μόλυνσης εφαρμόστηκαν στις τρεις επεμβάσεις 0, 25 και 50% Υ.Α.Ε σε τέσσερις επαναλήψεις γλαστρώνσε τρεις χρόνους κάνοντας 72 πειραματικές μονάδες για την λήψη παρατηρήσεων με σπορά 8 σπόρων στην κάθε γλάστρα. Στη συνέχεια τα φυτά μεταφέρθηκαν σε θάλαμο με φωτοπερίοδο 16 ωρών στους 20<sup>0</sup> C, συνθήκες κατάλληλες για την προσβολή του FORL.



### 3.4.2 Μολύνσεις των φυτών αγγουριού

Οι μολύνσεις έγιναν σε φυτά 6 και 7 ημερών σε ένα επίπεδο μόλυνσης. Οι μολύνσεις έγιναν με 250 πολλαπλασιαστικές μονάδες ανά φυτό (colony forming units) του μύκητα. Στη συνέχεια τα φυτά μεταφέρθηκαν σε φυσικό περιβάλλον με θερμοκρασία 25°C. Οι 24 γλάστρες με 5 σπόρους αγγουριού η κάθε μια ή πειραματικές μονάδες μετρήθηκαν ως προς την επιβίωση των φυτών.

### 3.5 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα παρακάτω: PDA, PDB, V8.

PDA	Ανά λίτρο 39gr Potato Dextrose Agar
PDB	gr Potato Dextrose Broth ή 400gr πατατα και 20gr sucrose. Για την παρασκευή τριβλίων προσθέτουμε 1.8% άγαρ.
V8	Ανά λίτρο 200ml V8 χυμό, 3gr CaCO <sub>3</sub> (PH = 7-7.5). Για την παρασκευή τριβλίων προσθέτουμε 1.7% άγαρ.

#### 3.5.1 Καλλιέργειες στελεχών

Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: *Fusarium oxysporum f. sp. radialis-lycopersici* (FORL) και *Phytophthora sp.* Οι στερεές καλλιέργειες επώαστηκαν στους 22°C διατηρούνταν στο ψυγείο και οι υγρές επώαστηκαν στον αναδευτήρα στις 150 στροφές / λεπτό στους 25°C.



### 3.6 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΟΝΙΔΙΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΓΡΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΟΥ FORL

Για την απομόνωση των σπορίων και τη μέτρηση της συγκέντρωσης του FORL, τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Κωνική φιάλη των 250ml
- Χωνί
- Σωλήνες αποστείρωσης
- Τουλουπάνι
- Eppendorf
- Φυγόκεντρος
- Ζυγαριά
- Αναδευτήρας
- Αιματοκυτόμετρο
- Πιπέττες των 2,100 και 1000 λ
- Απιονισμένο νερό (d-H<sub>2</sub>O)
- Υγρή καλλιέργεια του FORL

#### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ :

Τοποθετήθηκε το χωνί μέσα στο οποίο είχε ενσωματωθεί τουλουπάνι πάνω στην κωνική φιάλη των 250ml. Όλα τα παραπάνω είχαν υποστεί αποστείρωση για 20 λεπτά στους 121°C. Στην συνέχεια προστέθηκε στην κωνική φιάλη των 250 ml η υγρή καλλιέργεια του FORL η οποία είχε παραμείνει στον αναδευτήρα χρονικό διάστημα 3-4 ημερών στις 150 στροφές/λεπτό. Το χωνί με το τουλουπάνι συγκράτησε το μυκήλιο του μύκητα και το υγρό διαπέρασε αυτό με αποτέλεσμα να καταλήξει στην κωνική φιάλη. Στη συνέχεια το υγρό προστέθηκε μέσα σε σωλήνες αποστείρωσης και αφού ισοζυγίστηκαν τοποθετήθηκαν στη φυγόκεντρο για 5 λεπτά στις 4000 στροφές/λεπτό. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα που δημιουργήθηκε αποτελούσε τα κονίδια του μύκητα.

Για να μετρηθεί η συγκέντρωση των κονιδίων του μύκητα, επαναδιαλύθηκαν τα κονίδια σε d- H<sub>2</sub>O. Τέλος, έγινε αραιώση σε eppendorf, μετρήθηκε στο αιματοκυτόμετρο ο αριθμός

των κονιδίων και βρέθηκε ο μέσος όρος αυτών. Ο τύπος που χρησιμοποιήθηκε για να βρεθεί η συγκέντρωση των κονιδίων είναι ο εξής:  $C = M.O. * 25 * 10^4 * \text{ΑΡΑΙΩΣΗ}$ .

### **3.7.1. In Vitro επίδραση στην ανάπτυξη μυκηλίου**

Παρασκευάστηκε θρεπτικό υλικό PDA εμπλουτισμένο με Υ.Α.Ε. σε ποσοστό 0,25,50 και 100%. Τα ολικά φαινολικά που απομονώθηκαν από τα Υ.Α.Ε. με τον τρόπο που έχει ήδη περιγραφεί προστέθηκαν στο PDA έτσι ώστε να αντιστοιχούν σε ποσοστό 25 και 50% Υ.Α.Ε. Αφού τα παραπάνω προστέθηκαν σε τριβλία Petri έγινε ο εμβολιασμός με τον μύκητα και τοποθετήθηκαν στον επωαστικό θάλαμο στους 22<sup>0</sup>C. Κάθε ημέρα γίνονταν μέτρηση της ακτίνας ανάπτυξης του μυκηλίου σε (mm) για μια εβδομάδα περίπου.

### **3.7.2. In Vitro επίδραση στην παραγωγή και βλάστηση κονιδίων**

Παρασκευάστηκε μέσα σε κωνικές φιάλες των 100ml θρεπτικό υλικό PDB εμπλουτισμένο με Υ.Α.Ε. και φαινολικά σε ποσοστά που αναφέρθηκαν παραπάνω. Στη συνέχεια έγινε εμβολιασμός με 10<sup>3</sup> κονίδια του μύκητα και οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν στον αναδευτήρα στις 150 στροφές / λεπτό για 5 ημέρες. Στη συνέχεια για τη μέτρηση του αριθμού των κονιδίων που περιείχε η κάθε κωνική, ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφηκε στην παράγραφο 2.6.

Έγινε αραίωση του μυκηλίου και στρώσιμο σε τριβλία με θρεπτικό υλικό PDA. Στη συνέχεια έγινε απομόνωση μοναδιαίων κονιδίων και μεταφορά με τη βοήθεια του στερεοσκοπίου και της λαβίδας σε θρεπτικό υλικό PDA εμπλουτισμένο με Υ.Α.Ε. σε ποσοστό 0,25 και 50%. Επώαστηκαν στους 22<sup>0</sup>C και κάθε ημέρα γίνονταν μέτρηση της ακτίνας ανάπτυξης του μυκηλίου (mm) των κονιδίων, για μια εβδομάδα περίπου.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>0</sup> ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ Υ.Α.Ε. ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ *in planta*

#### 4.1 ΜΟΛΥΝΣΗ ΦΥΤΩΝ ΤΟΜΑΤΑΣ

Οι μολύνσεις φυτών τομάτας ποικιλίας ACE 55 διεξάχθηκαν σε δύο διαφορετικά πειράματα. Ο χρόνος διάρκειας του 1<sup>ου</sup> πειραματικού, ήταν από 26/5/2000, μέχρι 5/7/2000 (Πείραμα Α) και του 2<sup>ου</sup> από 17/8/2000, μέχρι 21/9/2000 (Πείραμα Β). Στο Πείραμα Α οι μολύνσεις έγιναν σε δύο επίπεδα μόλυνσης: α) χαμηλό ( $10^3$  κονίδια / ml) και β) υψηλό ( $10^6$  κονίδια / ml). Επειδή στο χαμηλό επίπεδο μόλυνσης πολύ λίγα φυτά παρουσίασαν συμπτώματα της ασθένειας και τα συμπτώματα αυτά είχαν ανομοιογένεια ως προς την εμφάνισή τους, στο δεύτερο πείραμα έγινε μόλυνση μόνο με  $10^6$  κονίδια / ml.

Τα φυτά ποτίστηκαν με Υ.Α.Ε. σε ποσοστά 0 (νερό), 25 και 50%. Οι χρόνοι που πραγματοποιήθηκαν οι μολύνσεις ήταν τρεις:

- α) κατά τη σπορά (**t0**),
- β) 10 ημέρες μετά τη σπορά (**t10**) και,
- γ) 20 ημέρες μετά τη σπορά (**t20**).

Καθημερινά καταγράφηκε ο αριθμός των φυτών που επιβίωσαν μετά τη μόλυνση με F.O.R.L. στις τρεις διαφορετικές επεμβάσεις ποτίσματος (νερό, 25 και 50% Υ.Α.Ε.). Τα φυτά μάρτυρες δέχθηκαν τις ίδιες επεμβάσεις ποτίσματος με νερό, 25% και 50% Υ.Α.Ε. χωρίς μόλυνση με κονίδια του παθογόνου.

### ΠΕΙΡΑΜΑ Α

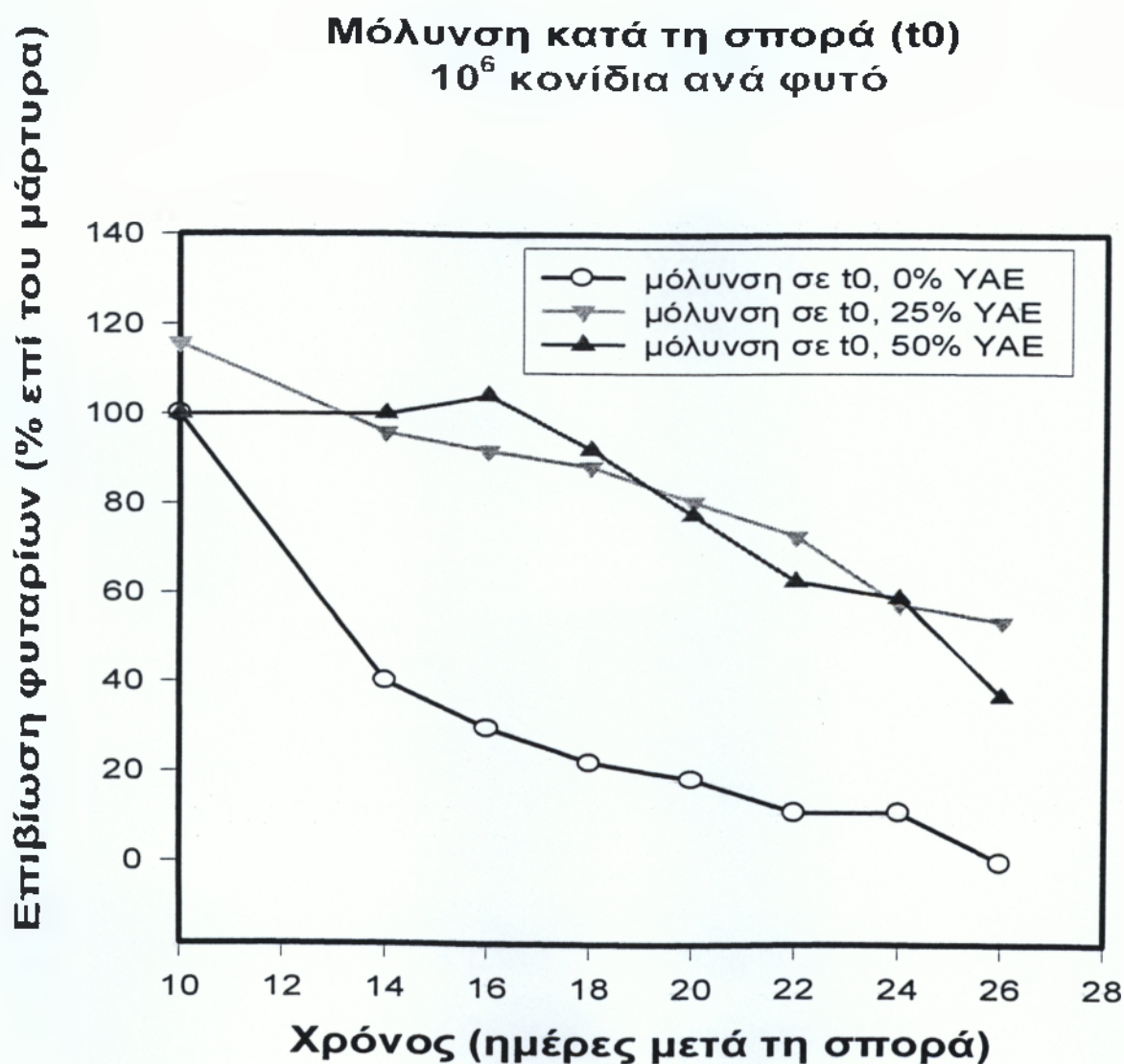
#### 4.1.1 Μόλυνση φυτών τομάτας κατά τη σπορά (t0)

Οι μολύνσεις έγιναν μαζί με τη σπορά των φυτών τομάτας σε δύο επίπεδα σε συγκεντρώσεις  $10^3$  κονίδια / ml και  $10^6$  κονίδια / ml. Ποτίστηκαν με Υ.Α.Ε. σε ποσοστά 0, 25 και 50% και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε θάλαμο στους  $18^{\circ}$  C με φωτοπερίοδο 16 ωρών.

Συγκεντρωτικά κατά τη διάρκεια του πειράματος η επί τοις εκατό (%) επιβίωση σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες, ήταν:

	H2O	25% Y.A.E.	50% Y.A.E
26/5/2000	0	0	0
1/6/2000	400	0	0
4/6/2000	126,66	163,63	66,66
5/6/2000	115	137,5	92,85
6/6/2000	100	115,78	100
9/6/2000	40	95,83	100
11/6/2000	29,62	92	104,34
13/6/2000	22,22	88,46	92,3
15/6/2000	18,51	80,76	77,77
17/6/2000	11,11	73,07	62,96
19/6/2000	11,11	57,69	59,25
21/6/2000	0	53,84	37,03

και διαγραμματικά:



Στο υψηλό επίπεδο μόλυνσης δύο εβδομάδες μετά τη σπορά, η επιβίωση των φυτών που είχαν ποτιστεί μόνο με νερό είχε μειωθεί στο 40%, σε αντίθεση με τα φυτά που είχαν δεχθεί 25 και 50% Υ.Α.Ε. αντίστοιχα, τα οποία επιβίωσαν όλα.

Τρεις εβδομάδες μετά τη σπορά η επιβίωση των φυτών που είχαν ποτιστεί με νερό μειώθηκε στο 20%, ενώ στις επεμβάσεις με Υ.Α.Ε. σε ποσοστά 25 και 50%, μειώθηκε μόνο στο 80% περίπου.

Στο τέλος του πειράματος, διατηρήθηκε η κατά 60% υψηλότερη επιβίωση στα φυτά που είχαν δεχθεί Υ.Α.Ε.

Σε αντίθεση, στο χαμηλό επίπεδο μόλυνσης, η επιβίωση των φυταρίων ήταν αυξημένη σε όλα τα ποσοστά. Για το λόγο αυτό οι μετρήσεις σε ότι αφορούσαν την επίδραση των Υ.Α.Ε. σε αυτό το επίπεδο μόλυνσης εγκαταλείφθηκαν.

#### 4.1.2 Μόλυνση φυτών τομάτας 10 ημέρες μετά τη σπορά (t10)

Οι μολύνσεις έγιναν 10 ημέρες μετά τη σπορά των φυτών τομάτας, όπως ακριβώς έχει περιγραφεί.

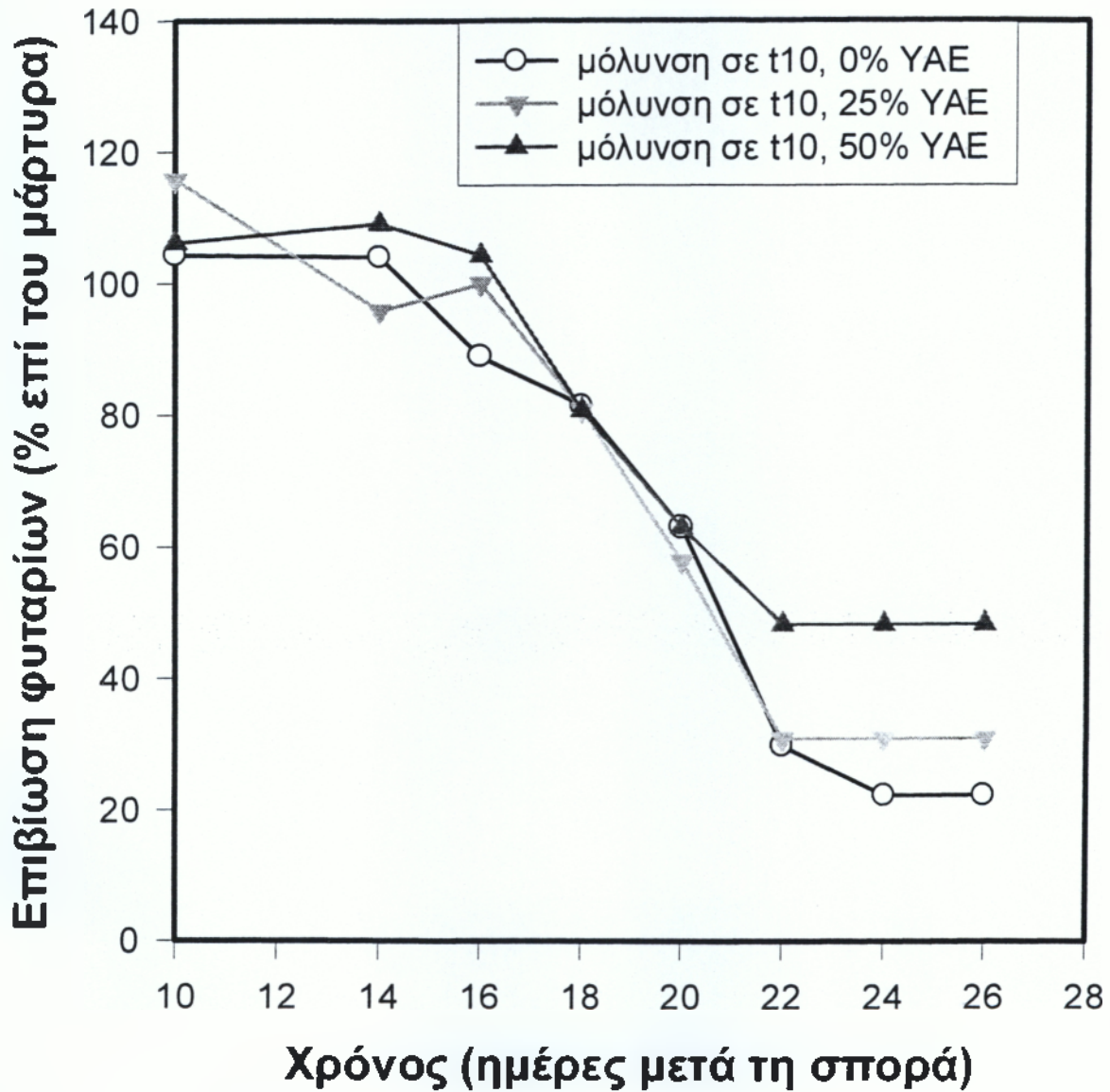
Κατά τη διάρκεια του πειράματος η επί τοις εκατό (%) επιβίωση σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες, ήταν:

	H2O	25%Υ.Α.Ε.	50%Υ.Α.Ε
26/5/2000	0	0	0
1/6/2000	0	0	0
4/6/2000	113,33	172,73	166,67
5/6/2000	110	125	107,14
6/6/2000	104,35	115,79	106,25
9/6/2000	104	95,83	109,09
11/6/2000	88,89	100	104,35
13/6/2000	81,48	80,77	80,77
15/6/2000	62,96	57,69	62,96
17/6/2000	29,63	30,77	48,15
19/6/2000	22,22	30,77	48,15
21/6/2000	22,22	30,77	48,15
23/6/2000	22,22	30,77	48,15
25/6/2000	22,22	30,77	48,15
27/6/2000	22,22	30,77	48,15
29/6/2000	22,22	30,77	48,15
1/7/2000	22,22	30,77	48,15
3/7/2000	22,22	30,77	48,15
5/7/2000	22,22	30,77	48,15



Και διαγραμματικά:

### Μόλυνση 10 ημέρες μετά τη σπορά (t10) 10<sup>6</sup> κονίδια ανά φυτό



Όταν η μόλυνση πραγματοποιήθηκε σε φυτά ηλικίας 10 ημερών, η επίδραση των Υ.Α.Ε. ήταν λιγότερο εμφανής σε σύγκριση με τα αποτελέσματα επισχετικότητας των Υ.Α.Ε. σε t0 (ταυτόχρονη μόλυνση και επέμβαση Υ.Α.Ε.). Η επιβίωση των μολυσμένων φυτών σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες ήταν παρόμοια και για τις τρεις επεμβάσεις ποτίσματος για το χρονικό διάστημα των πρώτων τριών εβδομάδων μετά τη μόλυνση. Τελικώς, όμως, και σε

αυτήν την περίπτωση παρατηρήθηκε και πάλι επισχετικότητα των Υ.Α.Ε. στην μόλυνση με F.O.R.L. καθώς μετά την τρίτη εβδομάδα μετά τη μόλυνση, τα φυτά που είχαν δεχθεί 50% Υ.Α.Ε. παρουσίασαν διπλάσιο ποσοστό επιβίωσης από τα φυτά που είχαν δεχθεί μόνο νερό.

#### 4.1.3 Μόλυνση φυτών τομάτας 20 ημέρες μετά τη σπορά (t20)

Οι μολύνσεις έγιναν 20 ημέρες μετά τη σπορά των φυτών τομάτας, με τρόπο που έχει ήδη περιγραφεί και στα δύο επίπεδα μόλυνσης. Αυτές οι μολύνσεις δεν έδωσαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στα ποσοστά 25 και 50% Υ.Α.Ε. Προφανώς τα φυτά ντομάτας σε ηλικία 20 ημερών υπό τις συνθήκες που πραγματοποιήθηκε το πείραμα εμφάνισαν ανθεκτικότητα στη μόλυνση με το παθογόνο και δεν παρουσιάστηκαν καθόλου συμπτώματα της ασθένειας. Συγκεκριμένα η επί τοις εκατό (%) επιβίωση των φυτών στις τρεις επεμβάσεις σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες, ήταν:

	H2O	25%Υ.Α.Ε.	50%Υ.Α.Ε.
26/5/2000	0	0	0
1/6/2000	0	0	0
4/6/2000	86,67	118,18	144,44
5/6/2000	85	137,5	157,14
6/6/2000	86,96	115,79	137,5
9/6/2000	88	104,17	113,64
11/6/2000	88,89	104	113,04
13/6/2000	88,89	103,85	103,85
15/6/2000	88,89	103,85	100
17/6/2000	88,89	103,85	100
19/6/2000	88,89	92,31	88,89
21/6/2000	88,89	92,31	88,89
23/6/2000	88,89	92,31	88,89
25/6/2000	88,89	92,31	88,89
27/6/2000	88,89	92,31	88,89
29/6/2000	88,89	92,31	88,89
1/7/2000	88,89	92,31	88,89
3/7/2000	88,89	92,31	88,89
5/7/2000	66,67	84,62	81,48

Συνολικά το πείραμα Α έδειξε ότι η επέμβαση μεΥ.Α.Ε. μπορεί να εμφανίσει σημαντική επισχετικότητα στη μόλυνση ή/και την ανάπτυξη του FORL (οι δύο τρόποι επίδρασης τωνΥ.Α.Ε είναι δύσκολο να διαχωριστούν στις συνθήκες αυτών των πειραμάτων).Όμως η επισχετικότητα αυτή εμφανίζεται σημαντικότερη τις πρώτες ημέρες μετά την εφαρμογή Υ.Α.Ε. Σε καθυστερημένες εφαρμογές του μολύσματος, η επισχετικότητα των Υ.Α.Ε.εξασθενεί, αλλά συγχρόνως αυξάνεται και η φυσική ικανότητα επιβίωσης των φυτών

(προσβάλλονται σε οψιμότερο στάδιο ανάπτυξης) καθιστώντας δυσδιάκριτες τις επιδράσεις των Υ.Α.Ε.

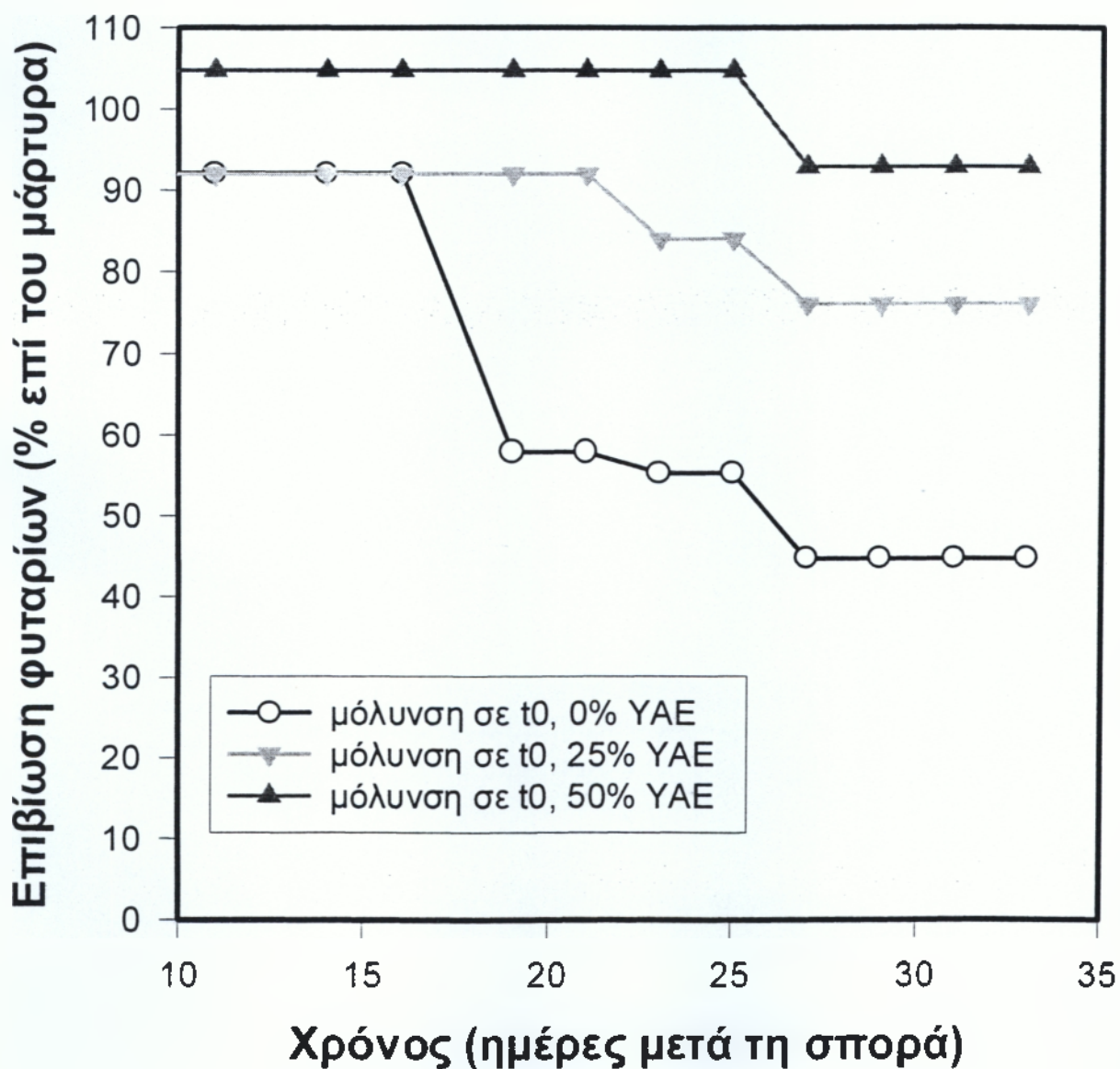
## ΠΕΙΡΑΜΑ Β

### 4.1.4 Μόλυνση φυτών τομάτας κατά τη σπορά (t0)

Η μόλυνση των φυτών στο Πείραμα Β παρουσίασε καθυστέρηση και ήταν ασθενέστερη σε σχέση με τη μόλυνση των φυτών στο Πείραμα Α.

Διαγραμματικά

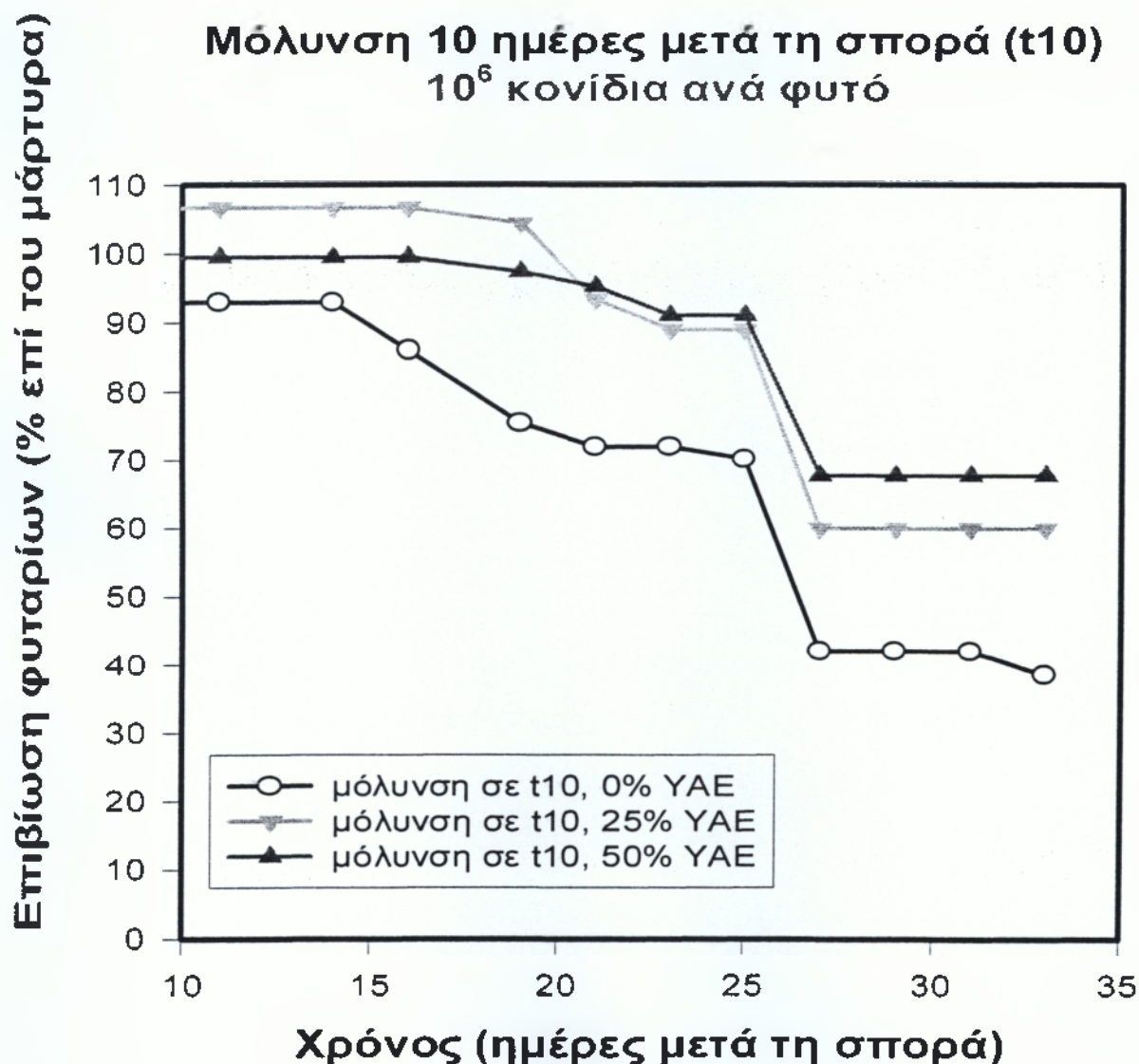
### Μόλυνση κατά τη σπορά (t0) 10<sup>6</sup> κονίδια ανά φυτό



Δύο εβδομάδες μετά τη μόλυνση όλα τα φυτά και στις τρεις επεμβάσεις ποτίσματος επιβίωσαν. Η θετική επίδραση των Υ.Α.Ε. στην προστασία των φυτών από το παθογόνο F.O.R.L. έγινε εμφανής τρεις εβδομάδες μετά τη μόλυνση οπότε παρατηρήθηκε σταθερή επιβίωση των φυτών που δέχθηκαν Υ.Α.Ε. (25 και 50%) ενώ το 30% των φυτών που ποτίστηκαν μόνο με νερό είχαν πεθάνει. Τελικώς, τα φυτά που ποτίστηκαν με 25% και 50% Υ.Α.Ε. είχαν μείωση της επιβιώσής τους μόνο κατά 15% και 10% αντιστοίχως ενώ ακόμη και μετά από 35 ημέρες μετά τη μόλυνση διατηρήθηκε μια διαφορά τουλάχιστον 30% και 50% υψηλότερης επιβίωσης των φυτών στην επέμβαση με Υ.Α.Ε από αυτή με νερό.

#### 4.1.5 Μόλυνση φυτών τομάτας 10 ημέρες μετά τη σπορά (t10)

Διαγραμματικά :

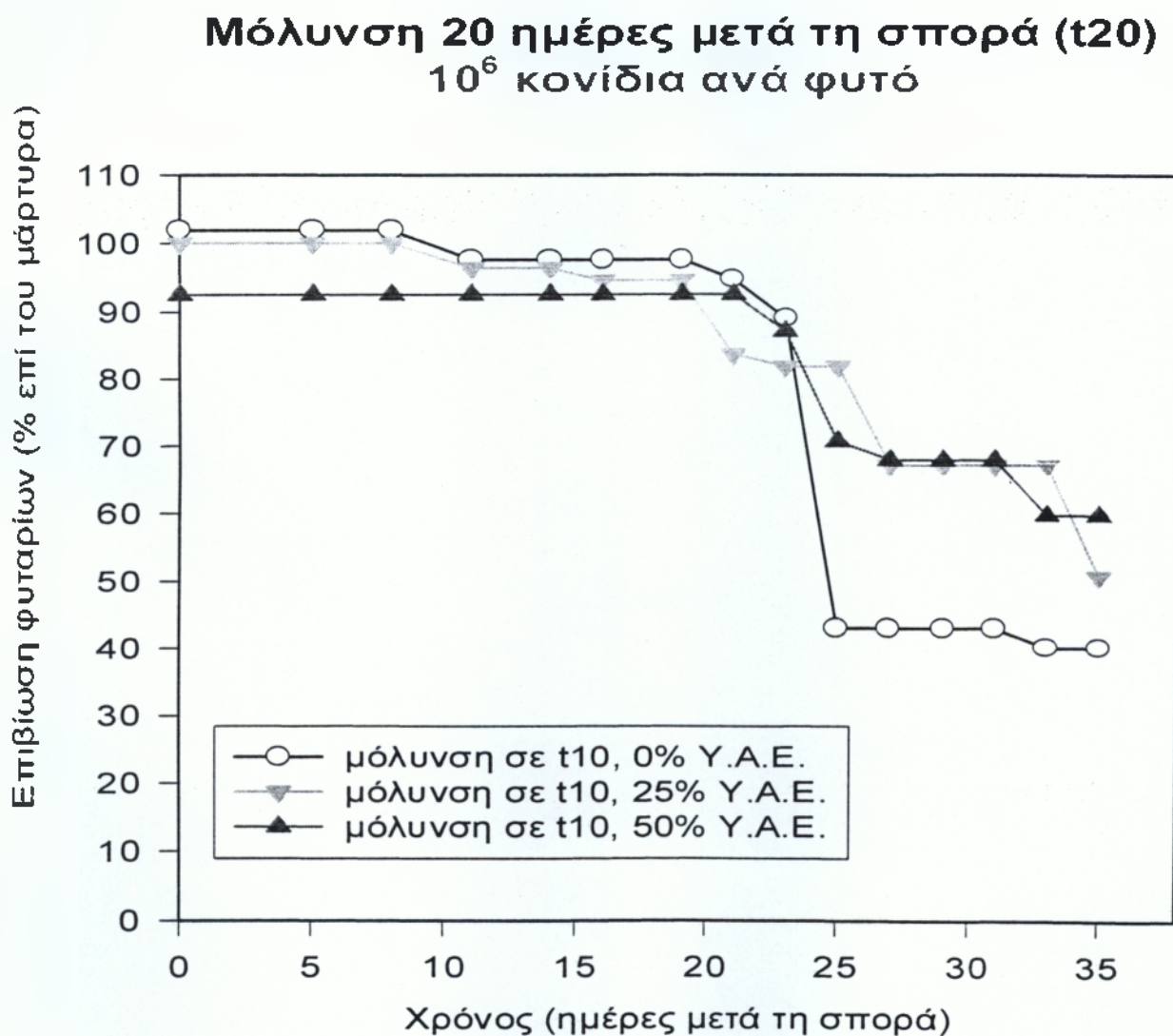




Σε φυτά 10 ημερών η παρουσία των Υ.Α.Ε. έχει θετική επίδραση στην προστασία των φυτών από το παθογόνο FORL και αυτό είναι πολύ εμφανές κατά τη πρώτη εβδομάδα. Τα φυτά που ποτίστηκαν με Υ.Α.Ε. (25 και 50%) επιβίωσαν σχεδόν όλα αντίθετα το 20% περίπου των φυτών που ποτίστηκαν με νερό είχαν ήδη πεθάνει. Η διαφορά αυτή διατηρήθηκε η ίδια σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Για παράδειγμα δυο εβδομάδες μετά τη μόλυνση τα φυτά που ποτίστηκαν με νερό επιβίωσαν σε ποσοστό 70% ενώ τα φυτά που ποτίστηκαν με Υ.Α.Ε. σε ποσοστό 90%. Στο τέλος του πειράματος διατηρήθηκε η κατά 20% υψηλότερη επιβίωση στα φυτά που είχαν δεχθεί 25% Υ.Α.Ε ενώ στα φυτά που είχαν ποτιστεί με 50% Υ.Α.Ε. το ποσοστό επιβίωσης ήταν 30% υψηλότερη.

#### 4.1.6 Μόλυνση φυτών τομάτας 20 ημέρες μετά τη σπορά (t20)

Διαγραμματικά





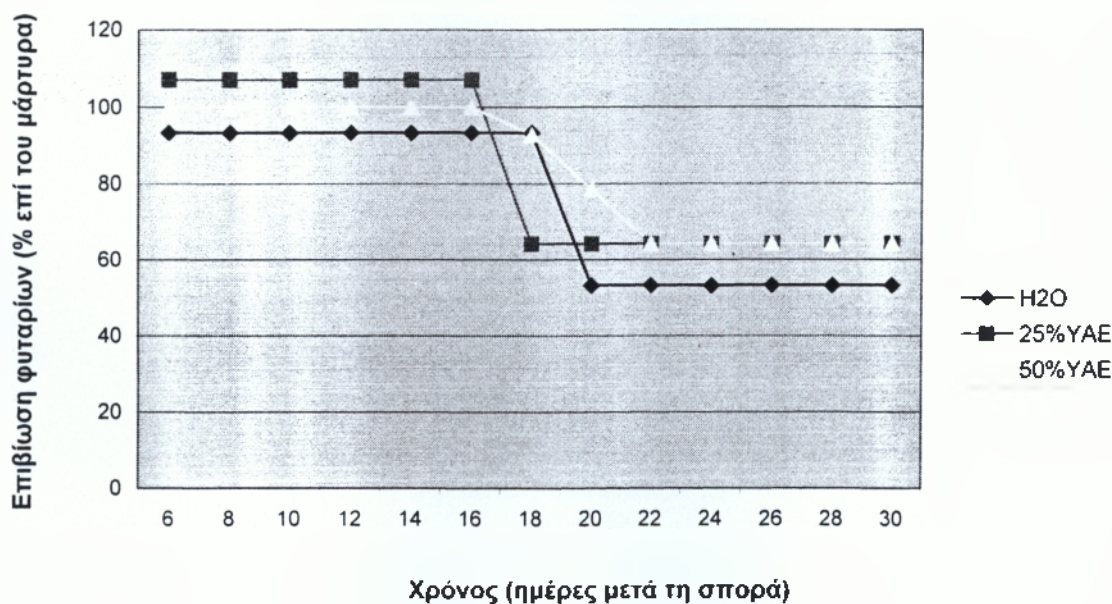
Όταν η μόλυνση πραγματοποιήθηκε σε φυτά ηλικίας 20 ημερών, η επίδραση των Υ.Α.Ε ήταν λιγότερο εμφανής σε σύγκριση με τα αποτελέσματα επισχετικότητας των Υ.Α.Ε σε t0 (μόλυνση κατά τη σπορά ) και σε t10 (μόλυνση 10 ημέρες μετά τη σπορά ). Δύο εβδομάδες μετά τη μόλυνση η επιβίωση των φυτών που είχαν ποτιστεί με νερό μειώθηκε στο 40%, ενώ στις επεμβάσεις με Υ.Α.Ε. σε ποσοστά 25 και 50% μειώθηκε μόνο στο 70%. Στο τέλος του πειράματος το ποσοστό επιβίωσης στα φυτά που είχαν δεχθεί Υ.Α.Ε. (25 και 50%) ήταν 20%.

Συνολικά στο πείραμα Β επιβεβαιώθηκαν οι τάσεις που παρατηρήθηκαν και στο πείραμα Α (μεγαλύτερη επισχετικότητα όταν η εφαρμογή του μολύσματος γινόταν χωρίς μεγάλη χρονική καθυστέρηση από την εφαρμογή των ΥΑΕ). Η καθυστερημένη εμφάνιση των αποτελεσμάτων της μόλυνσης με FORL και η γενικά βελτιωμένη τελική επιβίωση των φυτών σε όλες τις επεμβάσεις πιθανά να οφείλονται σε ανωμαλίες που προέκυψαν στη συχνότητα των ποτισμάτων κατά τη διάρκεια του πειράματος Β και οδήγησαν σε καθυστερημένη ανάπτυξη του μολύσματος.

## 4.2 ΜΟΛΥΝΣΗ ΦΥΤΩΝ ΑΓΓΟΥΡΙΟΥ

Έγινε σπορά αγγουριού υβρίδιο (HAANDA) στις 14/7/00 και το πείραμα ολοκληρώθηκε στις 11/8/00. Μετά τη σπορά ποτίστηκαν με Υ.Α.Ε. σε ποσοστά 0, 25 και 50%. Για κάθε επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν 8 γλαστράκια από τα οποία τα μισά μολύνθηκαν την 6<sup>η</sup> ημέρα μετά τη σπορά και τα υπόλοιπα μια μέρα αργότερα. Για την πραγματοποίηση της μόλυνσης έγιναν προσπάθειες απομόνωσης ζωοσπορίων από υγρή καλλιέργεια θρεπτικού υλικού V8, τα αποτελέσματα των οποίων ήταν ανεπιτυχή. Τελικά η πραγματοποίηση της μόλυνσης έγινε με συλλογή του μυκηλίου από υγρή καλλιέργεια θρεπτικού υλικού PDB του μύκητα *Phytophthora* τριών ημερών. Στη συνέχεια αφού ομογενοποιήθηκε το μυκήλιο στον εμβολιοφόρο συνθλίπτη, έγιναν διαδοχικές αραιώσεις και υπολογίστηκε η συγκέντρωση των πολλαπλασιαστικών μονάδων. Κάθε φυτό μολύνθηκε με 250 πολλαπλασιαστικές μονάδες.

ΜΟΛΥΝΣΗ 7 ΗΜΕΡΕΣ ΜΕΤΑ ΤΗ ΣΠΟΡΑ



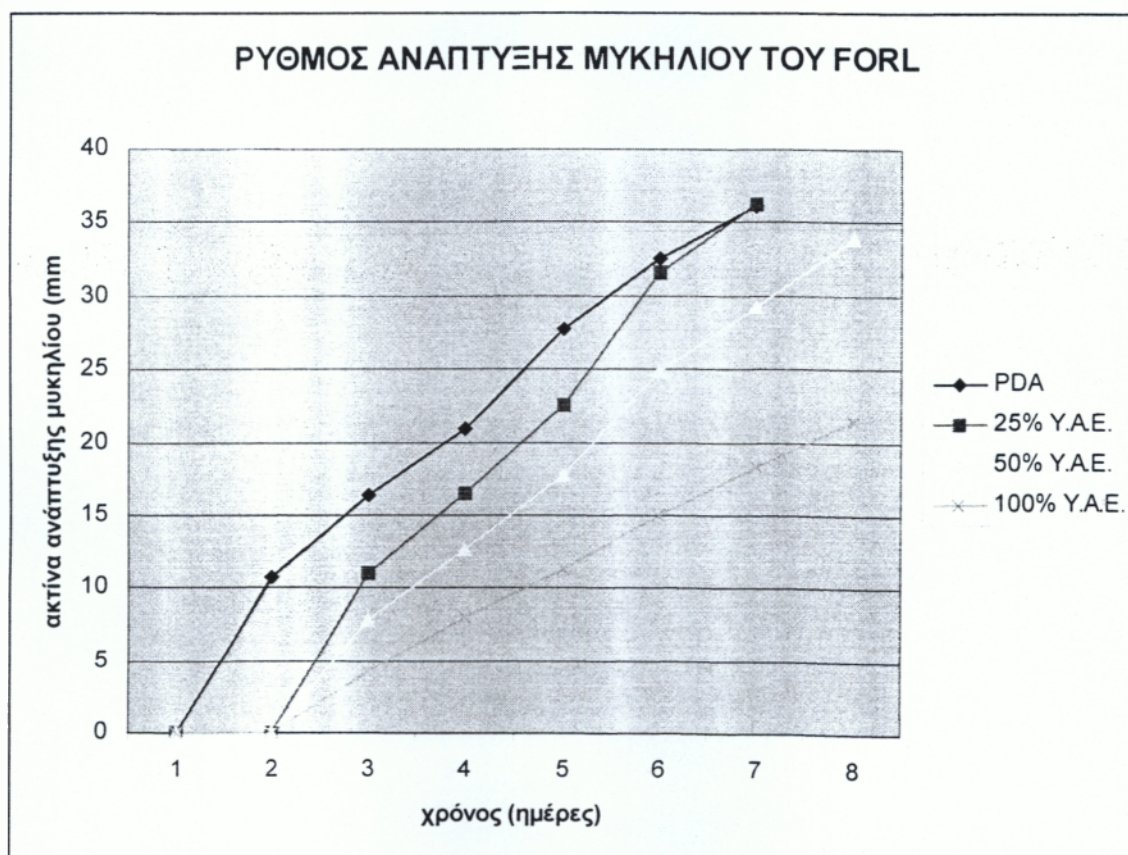
Δέκα ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών παρατηρήθηκε μία απότομη μείωση του ρυθμού επιβίωσης των φυτών που είχαν δεχτεί 25% Υ.Α.Ε σε αντίθεση με τα φυτά που είχαν δεχθεί 50% Υ.Α.Ε. των οποίων η μείωση του ρυθμού επιβίωσης ήταν αργή. Ακόμα τα φυτά

που είχαν ποτιστεί με Υ.Α.Ε. σε ποσοστό 25% παρουσίασαν συμπτώματα νέκρωσης νωρίτερα από φυτά τα οποία είχαν δεχθεί Υ.Α.Ε. σε ποσοστό 50%. Μετά τη 16η ημέρα παρατηρήθηκε πλήρης αναστολή της δράσης του παθογόνου μύκητα σε αντίθεση με τη δράση του σε φυτά τα οποία είχαν δεχθεί μόνο νερό, πράγμα που συνεχίστηκε μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα. Τελικά φυτά που είχαν υποστεί Υ.Α.Ε. παρουσίασαν ανθεκτικότητα κατά 10% σε σχέση με τα φυτά τα οποία είχαν ποτιστεί μόνο με νερό.

# ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ Υ.Α.Ε. ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ *in vitro*

## 4.3 ΡΥΘΜΟΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΑΚΤΙΝΑΣ ΤΟΥ FORL

Για τις *in vitro* μετρήσεις σε στερεές καλλιέργειες το μύκητα χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό PDA και PDA εμπλουτισμένο με Υ.Α.Ε. σε ποσοστά 25, 50 και 100%. Για κάθε επέμβαση δημιουργήθηκαν τρία τριβλία στα οποία γίνονταν καθημερινά μετρήσεις της ακτίνας του μυκηλίου. Η παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μυκηλίου του μύκητα FORL ήταν μεγαλύτερη στο ποσοστό 100% Υ.Α.Ε. και μικρότερη στο PDA, 25 και 50% Υ.Α.Ε. Οι ίδιες επεμβάσεις έγιναν και στο μύκητα *Phytophthora*. Όμως η παρεμπόδιση της ακτίνας του μυκηλίου του *Phytophthora* ήταν μεγαλύτερη και σε μικρότερο χρονικό διάστημα από την ανάπτυξη του FORL.

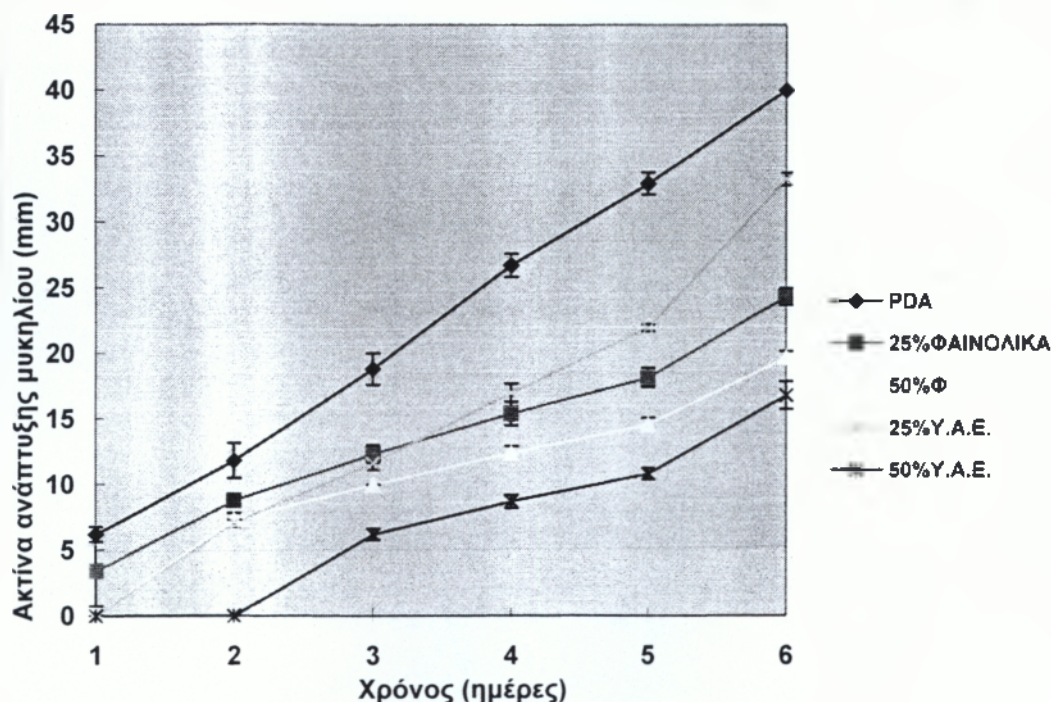


Το πείραμα για τις *in vitro* μετρήσεις σε στερεές καλλιέργειες του μύκητα FORL επαναλήφθηκε σε θρεπτικό υλικό PDA, PDA εμπλουτισμένο με Υ.Α.Ε. σε ποσοστά 25 και



50% και PDA εμπλουτισμένο με ολικά φαινολικά που αντιστοιχούν σε ποσοστό Υ.Α.Ε. 25 και 50%. Για τον υπολογισμό των ολικών φαινολικών που αντιστοιχούν στα παραπάνω ποσοστά Υ.Α.Ε. λαμβάνεται υπόψη ότι σε 1ml Υ.Α.Ε. αντιστοιχούν 200μg ολικών φαινολικών (σε ισοδύναμο συριγγικού οξέως)

#### ΡΥΘΜΟΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΥΚΗΛΙΟΥ ΤΟΥ FORL



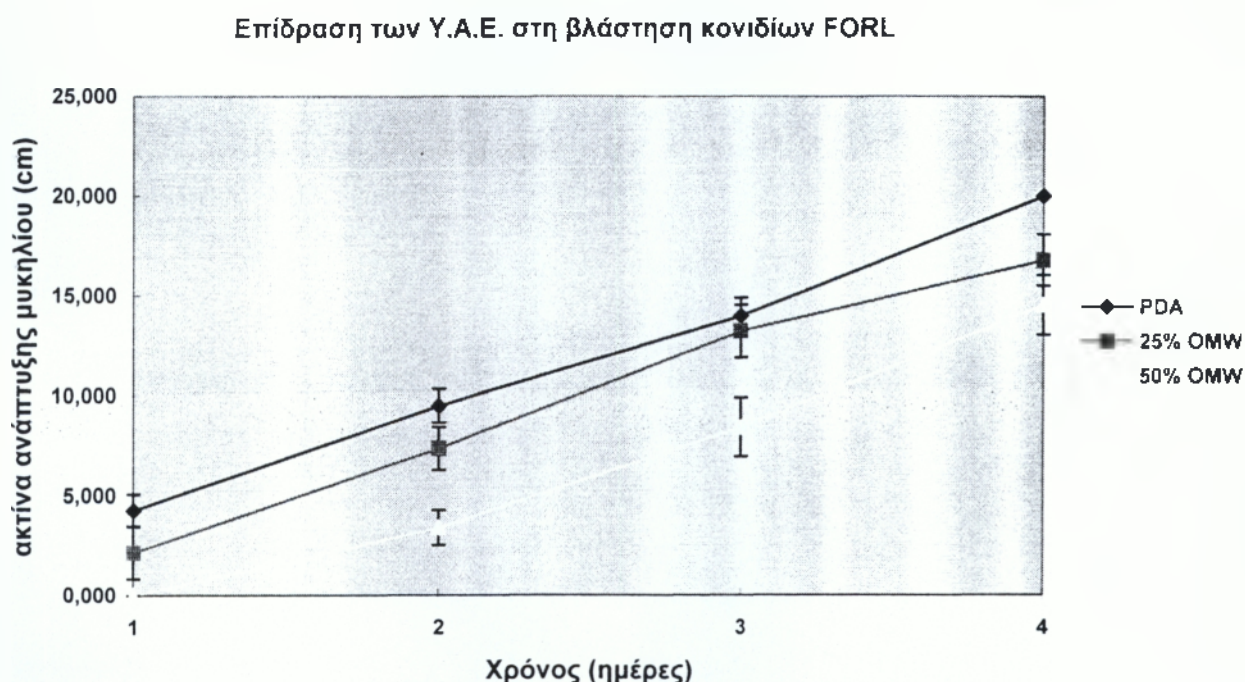
Παρατηρήθηκε μεγαλύτερη παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μύκητα FORL σε ποσοστό 50% Υ.Α.Ε. σε αντίθεση με τα αντίστοιχα ολικά φαινολικά που απομονώθηκαν από τα Υ.Α.Ε, αλλά μικρότερη για τα 25% Υ.Α.Ε. σε σύγκριση με τα αντίστοιχα συνολικά φαινολικά. Έτσι η παρεμπόδιση του FORL από τα ολικά φαινολικά που απομονώθηκαν από τα Υ.Α.Ε. κομάνθηκε τελικά σε ενδιάμεσα επίπεδα της παρεμπόδισης που παρουσίασαν τα 25% και 50% Υ.Α.Ε. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν την άμεση σχέση μικροβιακής παρεμπόδισης που επιδεικνύουν τα Υ.Α.Ε με το φαινολικό φορτίο.



## 4.4 ΒΛΑΣΤΗΣΗ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ FORL

### α) Βλάστηση κονιδίων

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης των Υ.Α.Ε. στη βλάστηση των κονιδίων του FORL χρησιμοποιήθηκαν 4 τριβλία για κάθε ποσοστό (0,25,50% Υ.Α.Ε.).Κάθε ημέρα πραγματοποιούνταν μετρήσεις της ακτίνας ανάπτυξης των τεσσάρων κονιδίων που περιείχε το κάθε τριβλίο.Έγιναν συνολικά 4 μετρήσεις και παρατηρήθηκε καταστολή στην ανάπτυξη του μυκηλίου στο ποσοστό 50% Υ.Α.Ε., ενώ στο ποσοστό 25% Υ.Α.Ε. η καταστολή ήταν μικρότερη.



### β) Παραγωγή κονιδίων

Για τον προσδιορισμό της παραγωγής των κονιδίων χρησιμοποιήθηκαν 10 κανικές φιάλες (2 επαναλήψεις για κάθε επέμβαση) που περιείχαν PDB .PDB εμπλουτισμένο με Υ.Α.Ε. σε ποσοστά 25 και 50% και PDB εμπλουτισμένο με 25 και 50% ολικών φαινολικών.Όταν έγινε το συγκεκριμένο πείραμα υπήρχαν ολικά φαινολικά στη διάθεση μας. Σε ποσοστό 25% Υ.Α.Ε. παρατηρήθηκε μείωση του αριθμού των κονιδίων κατά μία

τάξη μεγέθους και σε ποσοστό 50% Υ.Α.Ε. μείωση κατά δύο τάξεις μεγέθους. Στο ποσοστό ολικών φαινολικών που αντιστοιχούν σε 25 και 50% Υ.Α.Ε. η μείωση του αριθμού των κονιδίων ήταν κατά 3 τάξεις μεγέθους. Το βάρος του μυκηλίου μειώθηκε επίσης ανάλογα με το ποσοστό Υ.Α.Ε και φαινολικών, επιβεβαιώνοντας και σε αυτό το επίπεδο τη συσχέτιση της μυκοστατικής δράσης των Υ.Α.Ε με το φαινολικό τους φορτίο

	<b>ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΟΝΙΔΙΩΝ ML<sup>-1</sup></b>	<b>ΒΑΡΟΣ ΜΥΚΗΛΙΟΥ (g)</b>
<b>PDB</b>	$8 \times 10^8$	10,24
<b>25% Υ.Α.Ε.</b>	$7,5 \times 10^7$	7,4
<b>50% Υ.Α.Ε.</b>	$8 \times 10^6$	Δεν υπάρχει μέτρηση
<b>25% ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ</b>	$7,75 \times 10^7$	9,12
<b>50% ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ</b>	$7 \times 10^5$	5,52

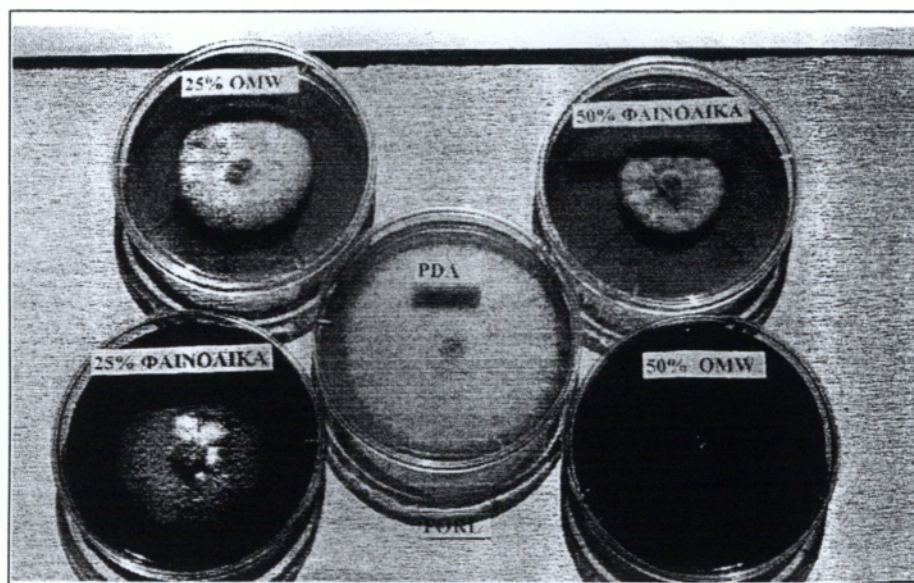
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup>

### ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### • Δοκιμές in vitro

Διαπιστώθηκε η επισχετική δράση των Υ.Α.Ε. στην ανάπτυξη του μυκηλίου, στην παραγωγή και βλάστηση κονιδίων ( in vitro μετρήσεις σε στερεές και υγρές καλλιέργειες του FORL σε θρεπτικά υλικά PDA και PDB εμπλουτισμένα με Υ.Α.Ε. σε ποσοστό 0,25,50,100% και σε ποσοστά φαινολικών που αντιστοιχούν στο 25 και 50% των Υ.Α.Ε.). Έτσι καταδείχτηκε μια άμεση σχέση των φαινολικών των Υ.Α.Ε. με την επισχετική δράση που αυτά παρουσιάζουν στην ανάπτυξη και/ή την μολυσματική δράση του FORL.

Η παρουσία των Υ.Α.Ε στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης του FORL παρεμπόδισε και την παραγωγή κονιδίων. Σε ποσοστό 25% Υ.Α.Ε. παρατηρήθηκε μείωση του αριθμού κονιδίων κατά μια τάξη μεγέθους και σε ποσοστό 50% Υ.Α.Ε. μείωση κατά δυο τάξεις μεγέθους. Σε ποσοστό φαινολικών που αντιστοιχούν σε 25 και 50% Υ.Α.Ε. η μείωση του αριθμού των κονιδίων ήταν κατά 3 τάξεις μεγέθους.



Σε ένα μικρό μέρος της εργασίας εξετάστηκε η επίδραση των Υ.Α.Ε. στην ανάπτυξη του μυκηλίου του μύκητα *Phytophthora* sp. Ο μύκητας ήταν ακόμα πιο ευαίσθητος στην παρουσία Υ.Α.Ε. και η παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μύκητα ήταν πλήρης ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις Υ.Α.Ε.



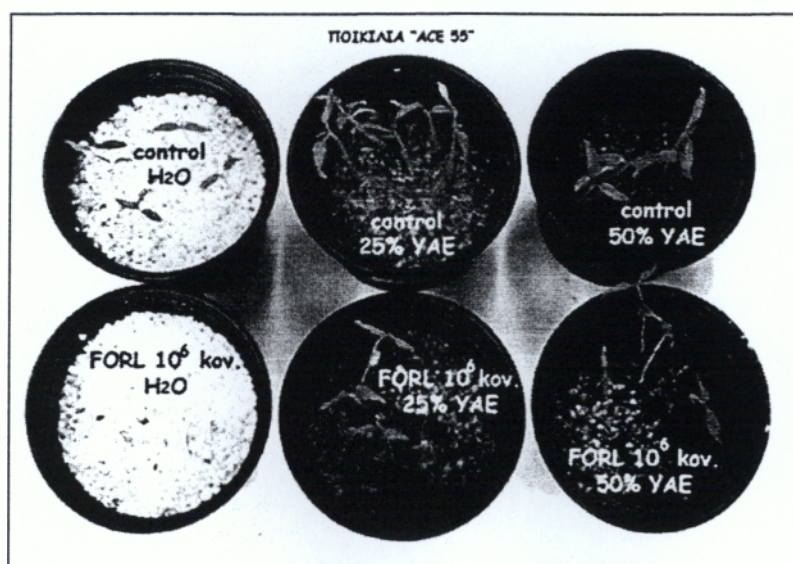
- **Δοκιμές σε γλάστρες**

Αρχικά διαπιστώθηκε ότι η εφαρμογή των Υ.Α.Ε σε ποσοστό μέχρι 50% δεν επηρέασε τη βλάστηση και ανάπτυξη φυτών τομάτας σε ουδέτερο υπόστρωμα (περλίτης). Στη συνέχεια έγιναν πειραματικά σε γλάστρες με περλίτη όπου ελέγχθηκε η επισχετικότητα των Υ.Α.Ε στην προσβολή φυτών τομάτας από FORL σε δύο επίπεδα μόλυνσης (χαμηλό και υψηλό). Η μόλυνση έγινε είτε συγχρόνως με τη σπορά και την εφαρμογή Υ.Α.Ε. (μόλυνση σε t0) είτε 10 ημέρες αργότερα (μόλυνση σε t10), είτε 20 ημέρες αργότερα (μόλυνση σε t20).

Στο πρώτο πείραμα η επιβίωση των φυτών του ποτίστηκαν με Υ.Α.Ε. μειώθηκε στο 20% τρεις εβδομάδες μετά τη σπορά, ανεξάρτητα από το χρόνο εφαρμογής του FORL. Με τη μόλυνση σε t0 η επιβίωση στο μάρτυρα είχε είδη μειωθεί στο 40% δύο εβδομάδες μετά τη σπορά ενώ τα φυτά που είχαν δεχθεί Υ.Α.Ε (25 και 50%) επιβίωναν όλα. Αυτή η κατά 60% υψηλότερη επιβίωση διατηρήθηκε μέχρι το τέλος του πειράματος (26<sup>η</sup> ημέρα ) στα φυτά που είχαν δεχθεί Υ.Α.Ε. Με τη μόλυνση σε t10 παρατηρήθηκε διαφοροποίηση μεταξύ των επεμβάσεων μόνο μετά την 3<sup>η</sup> εβδομάδα, όπου τα φυτά που είχαν δεχθεί 50% Υ.Α.Ε παρουσίασαν διπλάσιο ποσοστό επιβίωσης. Ιδιαίτερα καθυστερημένες μολύνσεις (20 ημέρες μετά τη σπορά ) δεν έδωσαν διαφοροποιήσεις αφού τα φυτά είχαν μεγαλώσει αρκετά ώστε να παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στο FORL και υψηλή επιβίωση σε όλες τις μεταχειρίσεις.

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στο δεύτερο πείραμα αφού ακόμα και αυτά που ποτίστηκαν με νερό παρουσίαζαν σημαντικό ποσοστό επιβίωσης (~ 40% ) ένα μήνα μετά την έναρξη του πειράματος.

Συμπερασματικά η εφαρμογή των Υ.Α.Ε. είχε επισχετική επίδραση στην ανάπτυξη του FORL in vitro και σε υψηλό επίπεδο εφαρμογής διπλασίασε τουλάχιστον τα ποσοστά επιβίωσης τομάτας σε συνθήκες μόλυνσης με FORL κατά τη σπορά.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### Επίδραση υγρών αποβλήτων ελαιουργείων σε φυτοπαθογόνους μύκητες του εδάφους

Τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων (λιόζουμα ή κασίγαρος) εμφανίζουν βιοτοξική δράση σε μικροοργανισμούς, η οποία έχει αποδοθεί κυρίως σε φαινολικά συστατικά, μακρομοριακά λιπαρά οξέα και πτητικά οξέα. Η εφαρμογή τους στα γεωργικά εδάφη θα πρέπει να ενθαρρύνεται για την επίλυση του προβλήματος διαχείρισής τους αλλά και για την παροχή οργανικής ουσίας και λιπαντικών στοιχείων στα φυτά. Η επίδρασή τους όμως (άμεση ή έμμεση) στους μύκητες του εδάφους έχει ελάχιστα διερευνηθεί. Μελετήθηκε η επίδραση λιόζουμων σε δύο μύκητες, που προέρχονται από διαφορετικές κατηγορίες παθογόνων μυκήτων εδάφους όσον αφορά την φυσιολογία, οικολογία και τους τρόπους αντιμετώπισής τους: έναν ωομύκητα του γένους *Phytophthora* και ένα στέλεχος του *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicislycopersici*. Σε πειράματα καθαρής καλλιέργειας σε τριβλία η παρεμπόδιση ανάπτυξης του *Phytophthora* ήταν άμεση και πλήρης ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις λιόζουμων ενώ η παρεμπόδιση του *Fusarium* ήταν μερική εκτός από πολύ υψηλές συγκεντρώσεις λιόζουμων. Τα ολικά φαινολικά που απομονώθηκαν από τα απόβλητα εμφάνισαν συσχέτιση με την παρεμποδιστική δράση. Η εξουδετέρωση της οξύτητας πριν την εφαρμογή των λιόζουμων δεν έδειξε να επηρεάζει την αποτελεσματικότητά τους. Η επίδραση των λιόζουμων στη φυτοπαθογόνο δράση των μυκήτων μελετήθηκε επίσης σε πειράματα με φυτά αγγουριού και τομάτας σε γλάστρες χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ανάπτυξης των φυτών.



## SUMMARY

### **Effect of olive oil mill waste on soil – borne phytopathogenic fungi**

Olive mill waste water (OMW) are characterized by antimicrobial activity, which has been attributed to their content of phenolic compounds, long – chain fatty acids and volatile acids. Agricultural soils are preferable receptors for OMW, which improves their fertility and structure. Very little information exist though on their direct and/or indirect effect on soil – borne fungi. In the present work, the effect of OMW on two taxonomically different soil – borne phytopathogenic fungi was studied: an oomycetes isolate of the genus *Phytophthora* and an isolate of *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis – lycopersici*. The two isolates differ not only in their physiology and ecology but also in the means employed to control plant infection. The oomycetes isolate appeared to be considerably more sensitive to the presence of even low concentrations of OMW than the *Fusarium* isolate. The PH was not found to be a significant parameter for the observed growth inhibition. On the contrary total phenolics purified from OMW seem to play a role in OMW toxicity. The effect of OMW on the pathogenicity of the fungi was also studied in pot experiments of tomato and cucumber plants using autoclaved inert growth substrate (perlite)

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Caron M. Fortin J. A. and Richard C. 1986.** *Effect of phosphorus concentration and Glomus intraradices on Fusarium crown and root rot of tomatoes*, *Phytopathology* 76: p942 – 946.
- **Cook, R. J. 1982.** Use of pathogen-suppressive soils for disease control. Pages 51-65 in R.W. Schneider (ed), *Suppressive soils and plant disease*. Am. Phytopathol. Soc., St.Paul, MN.
- **Datnoff L. E. Nemeč S. and Pernezny K. 1995.** Biological Control of Fusarium Crown and Root Rot of Tomato in Florida Using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices*, *Biological Control* 5, p427 – 431.
- **Duijf J. Ben, Daniel Pouhair, Chantal Olivain, Claude Alabouvette and Philippe Lemanceau 1998.** Implication of systemic induced resistance in the suppression of fusarium wilt of tomato by *Pseudomonas fluoresces* WCS417r and by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *European Journal of Plant Pathology* 104,p 903 – 910.
- **Duijf J. Ben, Ghislaine Recorbet, Peter A. H. Bakker, Jouce E. Loper and Philippe Lemanceau 1999.** Microbial Antagonism at the Root Level Is Involved in the Suppression of Fusarium Wilt by the Combination of Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and *Pseudomonas putida* WCS358, *Phytopathology* 89,p. 1073 – 1079.
- **Fiestas Ros de Ursinos J.A. 1977.** *Depuacion de las aguas residuales en las industrias y aceite de oliva*, *Gracas Aceites*, 28, p : 113.
- **Jarvis W. R. 1988.** Fusarium crown and root of tomatoes, *Phytoprotection* 69: p.49 – 64.
- **Jarvis, W. R. 1997.** Biological control of Fusarium. *Can. Agric.*22: 28-30.
- **Jarvis, W. R. and H. J. Thorpe. 1981.** Control of Fusarium foot and root of tomato by soil amendment with lettuce residues. *Can. J. Plant Pathol.* 3: 159-162.
- **Jarvis, W. R., and H. J. Thorpe.1976.** Seed dusting and soil drenching to control Fusarium foot and root rot of greenhouse tomatoes.I. *Pesticide Research Report* 1976.p:373-380
- **Jarvis, W. R.,and H. J. Thorpe.1980.** The role of straw in the epidemiology of Fuzarium foot and root rot of greenhouse tomatoes. *Research Report Canadian horticultural Council* 1980 , p 74.

- **Malathrakis, N.E, 1985.** Tomato crown and root rot cause by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* in Greece. *Plant Pathology*, **34**: 438-439.
- **Marois J. J., Mitchell D. J. and Sonoda R. M. 1981,** Biological Control of *Fusarium* Crown Rot of Tomato Under Field Conditions, *Phytopathology* **71**: p1257 – 1260.
- **Menzies G. J. and Jarvis R. W. 1994,** The infestation of tomato seed by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis – lycopersici*, *Plant Pathology* **43**,p. 378 – 386.
- **Morisot A. 1979.** Utilisation des margines par espondage. *L' Olivier*, **19**, p: 8-13.
- **Piga M. P., R. R. Belanger, T. C. Paulitz and N. Benhamoy 1997,** Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis – lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63 – 28, *Plant Pathology* **50**,p. 301 – 320.
- **Rowe, R. C., and D.L. Coplin. 1976.** Dispersal of *Fusarium oxysporum* in tomato greenhouses.*Proc.Am. Phytopathol.Soc.* **2**:88 (Abstract).
- **Rowe, R. C.,A and J. D. Farley.1981.** Strategies for controlling *Fusarium* crown and root rot in greenhouse tomatoes.*Plant Dis.* **65**:107-112.
- **Rowe,R. C., and J.D. Farley. 1977.** New greenhouse tomato disease can be controlled.*Ohio Rep.***62**:41-43.
- **Sivan Alex and Chet Ilan 1993,** Integrated control of *Fusarium* crown and root rot of tomato with *Trichoderma harzianum* in combination with methyl bromide or soil solarization,*Crop Protection* Volume **12** Number **5**,p. 380 – 385.
- **Waterman P. G. and Mole S. 1994,** Analysis of phenolic plant metabolites. *Methods in Ecology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- **Γραβάνης Θ. Φ. 1998.** Φυτικά εκχυλίσματα και βιολογικοί παράγοντες για την αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων εδάφους. Πρακτικά Δημερίδας Βιολογικά Γεωργία. Καλαμάτα, σελ. 61 – 74.
- **Έλενα Κ. 1999.** Μύκητες του γένους *phytophthora* στην Ελλάδα. Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, Τεχνικό δελτίο αρ. 13, Κηφισιά, σελ. 11 – 23.
- **Ζερβάκης Ι. Γ. 1999.** Τα απόβλητα και παραπροϊόντα των ελαιοτριβείων, Ελαιοπαραγωγή, Οκτώβριος 1999, Εύριπος Εκδοτική, σελ. 98 – 103.
- **Ηλιόπουλος Γ. Α. 1993.** Στοιχεία Βιολογικής Γεωργίας, Βιοκαλλιέργειες, Καλαμάτα. σελ. 15.

- **Ηλιόπουλος Γ. Α. 1996.** *Φυτοπροστασία Ι, Στοιχεία Φυτοπαθολογίας*, Καλαμάτα, σελ. 50 – 53.
- **Μπαλατσούρας Δ. Γ. 1997.** *Το Ελαιόλαδο σύγχρονη ελαιοκομία*, Αθήνα, σελ. 603 – 613.
- **Οιχαλιώτης Δ. Κ. & Ζερβάκης Ι. Γ. 1999.** *Τα απόβλητα και παραπροϊόντα των ελαιοτριβείων δύο και τριών φάσεων*. Ινστιτούτο Ελαίας & Οπ/κων Καλαμάτας Ελιά και Ελαιόλαδο, Τεύχος 14, Δεκέμβριος 1999 – Ιανουάριος 2000, σελ. 52 – 59.
- **Παναγόπουλος Γ. Χ. 1995.** *Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών*, Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα – Πειραιάς, σελ. 52 – 55, 95 – 97.