

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑΣ
ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΓΙΑ
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΥΚΗΤΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ
ARTHROBOTRYS ΑΠΟ ΤΟ ΕΔΑΦΟΣ**

Πτυχιακή μελέτη
της σπουδάστριας

ΛΥΡΑ ΤΡΙΣΕΥΓΕΝΗΣ

Υπεύθυνος καθηγητής: Βελισσαρίου Δημήτριος
Επιβλέπων ερευνητής: Δρ. Λάσκαρης Δημήτριος

Καλαμάτα 2006

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μυκητολογίας του Μπεννακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον Δρ. Λάσκαρη Δημήτριο, ερευνητή Β του εργαστηρίου μυκητολογίας του Μ.Φ.Ι. για την καθοδήγηση, την επίβλεψη και τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις του κατά τη διάρκεια των πειραμάτων καθώς και για την ανεκτίμητη βοήθεια που μου προσέφερε για τη συγγραφή και την καλύτερη παρουσία αυτής της μελέτης.

Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον καθηγητή του ΤΕΙ Καλαμάτας κ. Βελισσαρίου Δημήτριο, για την εισήγηση του θέματος της παρούσης μελέτης καθώς και για την κριτική ανάγνωση και διόρθωση της.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Μυκητολογίας και της Βιβλιοθήκης του Μ.Φ.Ι. για τη βοήθεια που μου προσέφεραν καθ' όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου μελέτης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	5
----------------	---

ΚΕΦ. Α: ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

➤ Οι αρχές και τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη των εκλεκτικών υλικών	9
▪ Αρχές	9
▪ Υλικά που βασίζονται στην επιλεκτική παρεμπόδιση	9
▪ Υλικά που βασίζονται στην εκλεκτική αύξηση	10
➤ Εκλεκτικά υλικά απομόνωσης διαφόρων μυκήτων	10
▪ Γένος <i>Fusarium</i>	13
▪ Γένος <i>Phytophthora</i>	13
▪ Γένος <i>Rhizium</i>	14
▪ Γένος <i>Rhizoctonia</i>	14
▪ Γένος <i>Thielaviopsis</i>	14
▪ Γένος <i>Verticillium</i>	15
▪ Γένος <i>Colletotrichum</i> και <i>Trichoderma</i>	15
➤ Κριτήρια, διαδικασίες και προφυλάξεις στην ανάπτυξη και στη χρήση των εκλεκτικών υλικών	16
▪ Επιλογή του βασικού υλικού και της κατάλληλης πηγής ενέργειας	16
▪ Επιλογή εκλεκτικών αντιμυκητικών παραγόντων	16
▪ Επιλογή εκλεκτικών αντιβακτηριακών παραγόντων	17
▪ Κατανόηση των ιδιοτήτων και των αλληλεπιδράσεων	17
➤ Η πρακτική των δοκιμών	18
➤ Συνοπτική αναφορά των εκλεκτικών υλικών απομόνωσης μυκήτων που αναπτύχθηκαν τα τελευταία 33 χρόνια	19
➤ Νηματωβόροι μύκητες	26
▪ Συνθήκες σχηματισμού παγιδευτικών οργάνων	27
▪ Γένος <i>Arthrobotrys</i>	27
• <i>Arthrobotrys dactyloides</i>	29
• <i>Arthrobotrys oligospora</i>	30
➤ Χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν στη παρασκευή των εκλεκτικών υλικών	31
▪ Αντιβιοτικά	31
• Πενικιλίνη (Penicillin)	31
• Στρεπτομυκίνη (Streptomycin)	31
• Χλωραμφαινικόλη (Chloramphenicol)	31
• Τετρακυκλίνη (Tetracycline)	32
▪ Μυκητοκτόνα	32
• Thiram	32
• Iprodione	32
• Thiophanate-methyl	33
• Metalaxyl	33
• Fenaminosulf	34
• PCNB	34
▪ Χρωστικές	34

• Πράσινο του μαλαχίτη (Malachite green)	34
• Rose bengal	34
▪ Άλλες χημικές ουσίες	34
• Oxgall	34
• Γαλλικό οξύ (Gallic acid)	35
• Tergitol	35
• Εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract)	35
• Πεπτόνη (Peptone)	35
• Σακχαρόζη (Saccharose)	35

ΚΕΦ. Β: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

➤ Υλικά και μέθοδοι	36
▪ Θρεπτικά υλικά	36
▪ Διάφοροι μέθοδοι	37
➤ Πειράματα	41
▪ Δοκιμή 1 ^η : "Επίδραση των αντιβιοτικών χλωραμφαινικόλη και στρεπτομυκίνη στη γραμμική αύξηση <i>in vitro</i> των μυκήτων <i>A. oligospora</i> και <i>A. dactyloides</i> "	42
▪ Δοκιμή 2 ^η : "Μέτρηση της γραμμικής αύξησης του μυκηλίου του <i>Arthrobotrys oligospora</i> και <i>A. dactyloides</i> όταν αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό, με και χωρίς μυκητοκτόνα"	44
▪ Δοκιμή 3 ^η : "Μέτρηση της γραμμικής αύξησης του μυκηλίου του <i>Arthrobotrys oligospora</i> και <i>A. dactyloides</i> όταν αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό, με και χωρίς μυκητοκτόνα"	45
▪ Δοκιμή 4 ^η : "Μέτρηση της γραμμικής αύξησης του μυκηλίου του <i>Arthrobotrys oligospora</i> και <i>A. dactyloides</i> όταν αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό με αντιβιοτικά και άλλες παρεμποδιστικές ουσίες"	47
▪ Δοκιμή 5 ^η : "Δοκιμή της επίδρασης των αντιβιοτικών χλωραμφαινικόλη, στρεπτομυκίνη και πενικιλίνη στη βλάστηση κονιδίων και ανάπτυξη μυκηλίου των μυκήτων <i>A. oligospora</i> και <i>A. dactyloides</i> "	48
▪ Δοκιμή 6 ^η : "Δοκιμή της επίδρασης των αντιβιοτικών χλωραμφαινικόλη, στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη και των μυκητοκτόνων thiophanate methyl και iprodione στη βλάστηση κονιδίων και ανάπτυξη μυκηλίου των μυκήτων <i>A. oligospora</i> και <i>A. dactyloides</i> "	49
▪ Δοκιμή 7 ^η : "Δοκιμή της επίδρασης των αντιβιοτικών στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη και χλωραμφαινικόλη στη βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη αποικιών των μυκήτων <i>A. oligospora</i> και <i>A. dactyloides</i> και στην παρεμπόδιση των εδαφικών βακτηρίων. Η δοκιμή έγινε σε τριβλία με στερεό θρεπτικό υλικό C.E.+M.A. με προσθήκη βόλων εδάφους"	51
▪ Δοκιμή 8 ^η : "Δοκιμή της επίδρασης των αντιβιοτικών στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη και χλωραμφαινικόλη στη βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη αποικιών των μυκήτων <i>A. oligospora</i> και <i>A. dactyloides</i> και στην παρεμπόδιση των εδαφικών βακτηρίων. Η δοκιμή αυτή διαφέρει από την 7 ^η στο βασικό μέσο καλλιέργειας που ήταν σκέτο άγαρ. Η δοκιμή αυτή έγινε σε τριβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Plain Agar (P.A.) με προσθήκη βόλων εδάφους"	54
▪ Δοκιμή 9 ^η : "Δοκιμή της επίδρασης των αντιβιοτικών στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη και χλωραμφαινικόλη στη βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη αποικιών των μυκήτων <i>A. oligospora</i> και <i>A. dactyloides</i> και στην παρεμπόδιση των εδαφικών βακτηρίων. Η δοκιμή έγινε σε τριβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα	

Compost Extract (C.E.) με προσθήκη βόλων εδάφους"	55
▪ Δοκιμή 10 ^η : "Δοκιμή της επίδρασης των θρεπτικών ουσιών peptone και yeast extract μαζί στη βλάστηση σπορίων και κονιδίων και στην ανάπτυξη αποικιών των μυκήτων <i>A. oligospora</i> και <i>A. dactyloides</i> . Η δοκιμή έγινε σε τριβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα C.E.+M.A. με προσθήκη βόλων εδάφους"	56
▪ Δοκιμή 11 ^η : "Δοκιμή της επίδρασης των αντιβιοτικών χλωραμφαινικόλη, στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη και των μυκητοκτόνων thiophanate methyl και iprodione μαζί στη βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη αποικιών των μυκήτων <i>A. oligospora</i> και <i>A. dactyloides</i> . Η δοκιμή έγινε σε τριβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα C.E.+M.A. και προσθήκη αιωρήματος εδάφους"	57
▪ Δοκιμή 12 ^η : "Δοκιμή της επίδρασης των αντιβιοτικών χλωραμφαινικόλη, στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη και των μυκητοκτόνων metalaxyl, oxgall και rose bengal στη βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη αποικιών των μυκήτων <i>A. oligospora</i> και <i>A. dactyloides</i> . Η δοκιμή έγινε σε τριβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα C.E.+M.A. με προσθήκη αιωρήματος εδάφους"	59
▪ Δοκιμή 13 ^η : "Δοκιμή της επίδρασης των αντιβιοτικών χλωραμφαινικόλη, στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη και των μυκητοκτόνων thiophanate methyl, iprodione, metalaxyl, oxgall, rose bengal στη βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη αποικιών των μυκήτων <i>A. oligospora</i> και <i>A. dactyloides</i> . Η δοκιμή έγινε σε τριβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα C.E.+M.A. με προσθήκη αιωρήματος εδάφους"	61
▪ Δοκιμή 14 ^η : "Δοκιμή της επίδρασης των αντιβιοτικών χλωραμφαινικόλη, στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη, των μυκητοκτόνων thiophanate methyl, iprodione, metalaxyl, malachite green και της χημικής ουσίας tergitol στη βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη αποικιών των μυκήτων <i>A. oligospora</i> και <i>A. dactyloides</i> . Η δοκιμή έγινε σε τριβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα C.E.+M.A. με προσθήκη αιωρήματος εδάφους και βόλων εδάφους"	62
▪ Δοκιμή 15 ^η : "Δοκιμή της επίδρασης των αντιβιοτικών χλωραμφαινικόλη, στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη, των μυκητοκτόνων thiophanate methyl, iprodione, metalaxyl και των χημικών ουσιών tergitol και saccharose στη βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη αποικιών των μυκήτων <i>A. oligospora</i> και <i>A. dactyloides</i> . Η δοκιμή έγινε σε τριβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα C.E.+M.A. με προσθήκη αιωρήματος εδάφους και βόλων εδάφους"	63
➤ Συζήτηση-Συμπεράσματα	66
➤ Βιβλιογραφία	69

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μελέτη είχε αφορμή να διευκολύνει περαιτέρω την έρευνα που εδώ και μερικά χρόνια ξεκίνησε στο εργαστήριο μυκητολογίας του Μ.Φ.Ι. με σκοπό τη μελέτη και την αξιοποίηση στην πράξη των μυκήτων του γένους *Arthrobotrys* που όπως γνωρίζουμε παγιδεύουν και θανατώνουν νηματώδεις. Η εύρεση μιας μεθόδου που να επιτρέπει την παρακολούθηση του πληθυσμού των μυκήτων αυτών στο έδαφος και τη ριζόσφαιρα των φυτών ήταν απαραίτητη για να προχωρήσει η έρευνα. Αντίστοιχη έρευνα της βιολογίας μυκήτων εδάφους προέρχεται μόνο από μελέτες φυτοπαθογόνων μυκήτων και στηρίχτηκε κατά ένα μεγάλο μέρος στα υλικά απομόνωσης και καλλιέργειας για το συγκεκριμένο κάθε φορά μύκητα, των λεγόμενων εκλεκτικών υλικών.

Για μύκητες του γένους *Arthrobotrys* δεν έχει ακόμα ανακαλυφθεί εκλεκτικό υλικό, αν και είναι σχεδόν βέβαιο ότι η ερευνητική κοινότητα έχει προσπαθήσει πολύ γι' αυτό μιας και αυτοί οι μύκητες τραβούν το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών. Για την απομόνωση τους από το έδαφος, η οποία είναι δύσκολη, χρησιμοποιούνται συνήθως πρωτόγονες μέθοδοι, με πολλών ημερών επώαση εδάφους και οργανικών φυτικών υπολειμμάτων σε κοινά μη εκλεκτικά υλικά καλλιέργειας, που δεν είναι πλούσια σε πηγές ενέργειας και άνθρακα ενώ ταυτόχρονα παρίστανται νηματώδεις, προκειμένου να διευκολυνθούν και να επικρατήσουν αυτοί οι μύκητες ανάμεσα σε πολλούς άλλους μύκητες προκαλώντας σχηματισμό κονιδιοφόρων ή άλλων μορφολογικών χαρακτηριστικών που τους καθιστά "αναγνωρίσιμους". Η απομόνωση τους από τους λιγιστούς συνήθως κονιδιοφόρους είναι αρκετά δύσκολη, μιας και η συλλογή κονιδίων γίνεται με χρήση αποστειρωμένης βελόνας. Τόσο η ποιοτική ανίχνευση των μυκήτων αυτών όσο και η ποσοτική εκτίμηση του πληθυσμού τους στο έδαφος καθίσταται δύσκολη όταν ακολουθούμε την παραπάνω μέθοδο. Όσον αφορά την ποσοτική εκτίμηση, οι διαδοχικές αραιώσεις (μέθοδος most probable number) και ο μεγάλος αριθμός επαναλήψεων είναι η λύση για να έχουμε τελικά μια χονδροειδή ποσοτική εκτίμηση. Η αναζήτηση εκλεκτικού υλικού για μύκητες του γένους *Arthrobotrys* που έγινε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας μελέτης, μας ανάγκασε να αναζητήσουμε πληροφορίες για τα εκλεκτικά υλικά που χρησιμοποιούνται μέχρι και σήμερα. Αυτά τα υλικά αναπτύχθηκαν, βελτιώθηκαν και χρησιμοποιούνται πολύ συχνά σήμερα στις έρευνες και εργασίες. Η πρώτη και ίσως τελευταία review ήταν αυτή του P. H. Tsao το 1970 και όσα αναφέρονται σ' αυτήν κατά ένα μεγάλο μέρος ισχύουν. Επίσης οι αρχές και τα μέσα που χρησιμοποιούνταν πριν 35 χρόνια χρησιμοποιούνται ακόμα και σήμερα. Παρά την εξέλιξη και ανάπτυξη που είχαν τα εκλεκτικά υλικά τα τελευταία χρόνια, απουσιάζει μια σύγχρονη επιθεώρηση (review) για το αντικείμενο. Η βιβλιογραφική έρευνα βασίστηκε στην εξειδικευμένη ηλεκτρονική βάση πληροφοριών WinSPIRS, Plant Protection Database της Silver Platter που περιλαμβάνει περιλήψεις και τίτλους δημοσιεύσεων από το 1972 έως και σήμερα, ενώ αξιοσημείωτο είναι ότι ο όρος "εκλεκτικό υλικό" αναφέρεται σε περιλήψεις περισσότερων από 1000 εργασίες. Υπάρχουν ωστόσο πολλές επιστημονικές ανακοινώσεις που γίνονται αναφορές σε εκλεκτικά υλικά στο κείμενο και όχι στην περίληψη. Η αναζήτηση αυτή οδήγησε σε πολλά ενδιαφέροντα συμπεράσματα ενώ αντλήθηκαν απαραίτητες πληροφορίες για την κατάσταση του πειραματικού μέρους αυτής της μελέτης καθώς επίσης και για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Οι πηγές των πληροφοριών που είναι σχετικές με τα εκλεκτικά

υλικά αναφέρονται στο εισαγωγικό μέρος ενώ όπου δεν έχουμε αναφορές οι πληροφορίες προέρχονται από τη δημοσίευση του P. H. Tsao (1970).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Οι μύκητες σπάνια συναντώνται στη φύση μόνοι τους. Συχνά τους συναντάμε ως μέλη πολυπληθών και πολύπλοκων ομάδων που εκτός από τους ίδιους περιλαμβάνουν και βακτήρια, πρωτόζωα, φύκη κ.α.

Το κοινό γόνιμο έδαφος ή αλλιώς "ζων έδαφος" αποτελεί μία πολύπλοκη ομάδα οργανισμών. Αξίζει να σημειωθεί ότι στο ζων έδαφος υπάρχει ζωή και εκτελούνται πολλές βιολογικές λειτουργίες. Είναι κοινά παραδεκτό ότι η βάση της γεωργίας εξαρτάται από το έδαφος, γι' αυτό το λόγο η βιολογική, ορυκτολογική, φυσική και χημική μελέτη του εδάφους καθίσταται εξαιρετικά σημαντική. Στο έδαφος συντελείται μεγάλο μέρος του κύκλου σημαντικών στοιχείων όπως N, C, P, S κ.α. Η γονιμότητα του εδάφους εξαρτάται άμεσα από τους μικροοργανισμούς που παίρνουν μέρος σ' αυτές τις διεργασίες.

Μία σωστή έρευνα των βιολογικών ιδιοτήτων του εδάφους απαιτεί τη μελέτη της μικροχλωρίδας (και μικροπανίδας) που αμοιούνται τους ζώνιες οργανισμούς. Η πολυπλοκότητα των πληθυσμών είναι ένας από τους ανασταλτικούς παράγοντες ως προς την παρακολούθηση των δραστηριοτήτων συγκεκριμένων ειδών στο έδαφος. Οι συνήθεις μέθοδοι παρατήρησης όπως η μικροσκοπία δεν εξυπηρετούν τη μελέτη του εδάφους μιας και αυτό είναι αδιαφανές. Εξάλλου, οι περισσότεροι μικροοργανισμοί έχουν όμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά που δεν επιτρέπουν τον προσδιορισμό τους με μικροσκοπία.

Ένας τρόπος για τη μελέτη-εξακρίβωση ενός είδους είναι να τον απομονώσουμε σε καλλιέργεια ώστε να αναπαράγει τα χαρακτηριστικά που τον ορίζουν. Μεγάλη σημασία έχει το από πού θα πρέπει να απομονωθεί (ή να ανιχνευτεί) ένας μύκητας. Η απομόνωση ενός παθογόνου μύκητα από τον προσβεβλημένο ιστό του ξενιστή είναι πολύ ευκολότερη απ' ότι η απομόνωση του από το έδαφος. Έτσι, τα υλικά που χρησιμοποιούνται στην πρώτη περίπτωση είναι πολύ απλά καθώς ο προς ανίχνευση μύκητας βρίσκεται σε πλεονεκτική θέση, υπάρχει νέο, ζωνό μυκήλιο με αποθησαυριστικές ουσίες, δεν υφίσταται λήθαργος και η λοιπή μικροχλωρίδα αποτελεί "μειοψηφία". Η απομόνωση όμως ενός μύκητα από πολύπλοκα οικολογικά συστήματα όπως το έδαφος είναι δύσκολη υπόθεση.

Τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκαν μέθοδοι με τις οποίες εξερευνούμε καλύτερα μεμονωμένα είδη οργανισμών που ζουν σε πολύπλοκα βιολογικά συστήματα όπως το έδαφος. Ενδεικτικά αναφέρουμε τη μέθοδο του "εμπλουτισμού" που με την επέμβαση στις συνθήκες (φυσικοχημικές, τροφικές κ.α.) επιτυγχάνουμε τον σταδιακό αποκλεισμό των μη επιθυμητών οργανισμών και την εμφάνιση του οργανισμού που εξετάζουμε. Ο εμπλουτισμός μπορεί να γίνει με μηχανικά ή χημικά μέσα όπως π.χ. η παροχή συγκεκριμένης ουσίας στον πληθυσμό πρέπει να ευνοεί την "αφύπνιση" ή τον πολλαπλασιασμό του υπό εξέταση οργανισμού ή να καταστέλλει τους ανεπιθύμητους.

Γνωστές είναι και οι "δολωματικές" μέθοδοι. Σ' αυτήν την κατηγορία προσθέτουμε θρεπτικά υποστρώματα, ζωντανό ιστό ή οργανισμό που από πριν γνωρίζουμε ότι ο υπό εξέταση οργανισμός θα προσβάλλει επιλεκτικά και θα αποικίσει. Δυστυχώς όμως και οι δύο παραπάνω μέθοδοι είναι κοπιαστικές και δίνουν μόνο ποιοτικά αποτελέσματα και ασαφείς ποσοτικές εκτιμήσεις.

Η ανάγκη λοιπόν για ποσοτική εκτίμηση οδήγησε στην ανακάλυψη των εκλεκτικών υλικών απομόνωσης και καλλιέργειας (selective media). Ανακαλύφθηκαν κυρίως από ερευνητές μυκήτων μιας και οι μύκητες είναι η κύρια αιτία πρόκλησης ασθενειών των φυτών και πολλοί από αυτούς βρίσκουν καταφύγιο στο έδαφος.

Η απόκτηση γνώσεων για την εκλεκτικότητα των χημικών ουσιών αλλά και για τη φυσιολογία των παθογόνων έχει οδηγήσει τα τελευταία 45 χρόνια στην ανάπτυξη μεγάλου αριθμού αποτελεσματικών και χρήσιμων εκλεκτικών υλικών άγαρ τα οποία σχεδιάστηκαν για να επιτευχθεί η απομόνωση συγκεκριμένου παθογόνου ή παθογόνων συγγενικής ομάδας. Πολλοί μύκητες που ήταν δύσκολο ή αδύνατο να εντοπιστούν ή να ανακτηθούν, μπορούν τώρα εύκολα να απομονωθούν και ο πληθυσμός τους ποσοτικοποιείται από περίπλοκα φυσικά περιβάλλοντα όπως το έδαφος και τα επιφανειακά νερά. Η ανάπτυξη και η γνώση της χρήσης αυτών των υλικών μας έχει βοηθήσει να κατανοήσουμε πολλούς παθογόνους εδαφικούς μύκητες όσον αφορά τον πληθυσμό τους, τη σαπροφυτική συμπεριφορά τους και την επιβίωση τους (Peter H. Tsao, 1970).

Τα εκλεκτικά υλικά είναι θρεπτικά υλικά που επιτρέπουν την εκλεκτική ανάπτυξη ορισμένων μικροοργανισμών. Διάφοροι όροι που χρησιμοποιούνται στη διεθνή βιβλιογραφία είναι συνώνυμοι με τα εκλεκτικά υλικά: υλικό διαφοροποίησης (differential medium), εκλεκτικό υλικό, υλικό εμπλουτισμού. Σύγχυση προκύπτει όταν οι ίδιες ορολογίες χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν διαφορετικής κατηγορίας υλικά. Σε μερικές περιπτώσεις, τα εκλεκτικά υλικά έχουν ονομασθεί έτσι βασισμένα στις προσωπικές εκτιμήσεις του ερευνητή και μερικές φορές έρχονται σε αντίθεση μ' άλλους επιστήμονες. Κάποια βασίζονται μόνο στην εκλεκτική παρεμπόδιση και κάποια άλλα βασίζονται μόνο στην εκλεκτική αύξηση. Άλλοι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι τα εκλεκτικά υλικά είναι αποκλειστικά στερεά και ότι τα υλικά εμπλουτισμού είναι υγρά.

Ακριβής ορισμός των εκλεκτικών υλικών δεν μπορεί να υπάρξει καθώς κάθε υλικό έχει το δικό του βαθμό εκλεκτικότητας. Τα περισσότερα εκλεκτικά υλικά επιτρέπουν την ανάπτυξη και άλλων μικροοργανισμών και οι ερευνητές δείχνουν κάποια ανοχή. Συχνά, τα υλικά μέτριας εκλεκτικότητας αναφέρονται και ως "ημιεκλεκτικά" (semiselective).

Οι θρεπτικές απαιτήσεις των μυκήτων είναι παρόμοιες μ' αυτές των βακτηρίων και των πρωτόζωων. Για τον αποκλεισμό των βακτηρίων χρησιμοποιούνται τα γνωστά αντιβακτηριακά αντιβιοτικά, ουσίες που παρεμποδίζουν τα βακτήρια και όχι τους μύκητες. Για τον αποκλεισμό των πρωτόζωων που αναπτύσσονται σε υγρά περιβάλλοντα χρησιμοποιούμε στερεό υλικό (άγαρ). Για τον αποκλεισμό των φυκών η επώαση γίνεται στο σκοτάδι.

Η ανάπτυξη ενός επιτυχημένου εκλεκτικού υλικού δεν μπορεί να λύσει όλα τα προβλήματα μελέτης των μυκήτων στο έδαφος.

Για να απαντήσουμε στο ερώτημα πόσες πολλαπλασιαστικές μονάδες ενός μύκητα υπάρχουν ανά gr εδάφους, πρέπει να καταμετρήσουμε τις αποικίες που αναπτύχθηκαν στο εκλεκτικό υλικό. Δεν μπορούμε όμως να γνωρίζουμε αν αυτές οι μονάδες ήταν ενεργές ή σε λήθαργο και κατά πόσο ήταν ικανές ώστε να επιβιώσουν και να εξαπλωθούν στις πολύ δυσμενείς συνθήκες που επικρατούν στο έδαφος.

Με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων και επώασης σε τριβλία με εκλεκτικό υλικό, ευνοούμενοι είναι οι μύκητες που παράγουν πολλά και μικρά σπόρια. Στην περίπτωση αυτή μπορεί να γίνει υπερεκτίμηση της παρουσίας και δραστηριότητας του συγκεκριμένου μύκητα ή υποεκτίμηση ενός άλλου που παράγει κυρίως υφές και λίγα σπόρια. Τέλος ευνοούμενοι μύκητες είναι αυτοί που αναπτύσσονται γρήγορα σε βάρος αυτών που αναπτύσσονται αργά.

Τα εκλεκτικά υλικά αποτελούν κύριο εργαλείο για τη μελέτη των μυκήτων στο έδαφος. Αξίζει να σημειωθεί ότι για μύκητες που βρέθηκαν κατάλληλα εκλεκτικά θρεπτικά υλικά, σήμερα η βιολογία τους μας είναι γνωστή σε σημαντικό βαθμό, ενώ

για άλλους που δεν υπάρχουν τέτοια υλικά οι γνώσεις μας περιορίζονται σε λίγες πληροφορίες.

Οι αρχές και τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη των εκλεκτικών υλικών

Αρχές: Η ανάπτυξη των υλικών άγαρ για την επιλεκτική απομόνωση συγκεκριμένων μυκήτων ή μικροοργανισμών στηρίζεται στον εκλεκτικό αποκλεισμό μη επιθυμητών μικροοργανισμών με αποτέλεσμα να εγκαθίσταται ο επιθυμητός μύκητας στο υλικό απομόνωσης. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για να πετύχουμε το παραπάνω.

Η πιο αποτελεσματική και χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι η επιλεκτική αναστολή δηλ. η χρήση αντιμικροβιακών χημικών ουσιών που δημιουργούν παρεμπόδιση στην ανάπτυξη μη επιθυμητών μυκήτων και βακτηρίων στο υλικό χωρίς να επιδρούν αρνητικά στον απομονούμενο προεπιλεγμένο μύκητα.

Μία άλλη μέθοδος είναι η επιλεκτική αύξηση, κατά την οποία υπάρχει στο υλικό κάποια πηγή ενέργειας ή κάποιες θρεπτικές ουσίες που αφομοιώνονται από μικρό αριθμό μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένου και του υπό μελέτη μύκητα και έτσι επιτυγχάνεται μείωση ή ακόμα και αποκλεισμός των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών στο υλικό.

Κάποιες φορές οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται σαν επιλεκτικοί αναστολείς διεγείρουν τους απομονωμένους οργανισμούς. Η έμμεση χρήση χημικών για επιλεκτικό αποκλεισμό είναι η χρήση μη τοξικών ή μη μεταβολιζόμενων ουσιών που προκαλούν στο εκλεκτικό υλικό ένα περιβάλλον ευνοϊκότερο για τους οργανισμούς που θέλουμε να απομονώσουμε (υψηλή οξύτητα, αλκαλικότητα, αλατότητα, ωσμωτική πίεση). Εκτός των άλλων τα χημικά λειτουργούν ως χρωστικές ή χρωστικοί δείκτες και χρησιμοποιούνται ως συμπληρωματικά εργαλεία για την επιλεκτική διαφοροποίηση μέσω του σχηματισμού ή της συγκέντρωσης του χρώματος.

Υλικά που βασίζονται στην επιλεκτική παρεμπόδιση: Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος και αποτελεσματικός επιλεκτικός παράγοντας είναι τα αντιβιοτικά. Τα πιο συνηθισμένα αντιβακτηριακά αντιβιοτικά είναι αυτά που κυρίως αναστέλλουν τους ακτινομύκητες και τα θετικά κατά Gram βακτήρια αλλά με περιορισμένη δράση κατά των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων [π.χ. πενικιλίνη (penicillin), βανκομυκίνη (vancomycin)], αυτά που αναστέλλουν κυρίως τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια [π.χ. πολυμυξίνη (polymyxin), στρεπτομυκίνη (streptomycin)] και αυτά μ' ένα ευρύ φάσμα [π.χ. βαστρακίνη (bacitracin), χλωραμφαινικόλη (chloramphenicol), χλωροτετρακλίνη (chlorotetracycline), γενταμυκίνη (gentamycin), καναμυκίνη (kanamycin), νεομυκίνη (neomycin), νοβοβιοσίνη (novobiocin), οξυτετρακυκλίνη (oxytetracycline), τετρακυκλίνη (tetracycline)]. Τα αντιμυκητικά αντιβιοτικά έχουν ένα ευρύ αντιμυκητικό φάσμα, αλλά μερικά από αυτά επιτρέπουν την ανάπτυξη μόνο μερικών μυκήτων και έτσι είναι πολύ αποτελεσματικοί παράγοντες επιλογής. Τα πιο συνηθισμένα είναι τα πολυενικά αντιβιοτικά [π.χ. ενδομυκίνη (endomycin), νυστατίνη (nystatin), πιμαρικήνη (pimaricin) και κυκλοεξιμίδη (cycloheximide)]. Στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση μυκήτων είναι μη παρεμποδιστικά για τα βακτήρια και για τους

ακτινομυκήτες. Μερικά από αυτά τα αντιβιοτικά έχουν χρησιμοποιηθεί σε εκλεκτικά υλικά για την απομόνωση και άλλων μικροοργανισμών εκτός των μυκήτων.

Τα παρεμποδιστικά χημικά που χρησιμοποιούνταν στα υλικά ευρέως πριν την ανακάλυψη των αντιβιοτικών ήταν τα: χολή βοδιού (oxgall), προπιονικό κάλιο (sodium propionate) και οι χρωστικές: ρόδινο της Βεγγάλης (rose Bengal), κρυσταλλικό ιώδες (crystal violet) ή ιώδες γεντιανής (gentian violet), πράσινο του μαλαχίτη (malachite green) κ.α. Μερικές από αυτές τις ουσίες χρησιμοποιούνται και σήμερα μαζί με αντιβιοτικά νέας γενιάς. Επιπλέον, άλλοι αντιμικροβιακοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται στην απομόνωση μυκήτων ή βακτηρίων είναι τα: ταυροχολικά (taurocholates), δεσοξυχολικά (desoxycholates) άλατα, άλατα της ο-φαινυλφαινόλης (o-phenylphenol), γαλλικό οξύ (gallic acid), ταννικό οξύ (tannic acid), φαινόλες, αζίδια (azides), υποθειώδη (metabisulfites), αιθανόλη (ethanol) και μερικά εμπορικά μυκητοκτόνα όπως το botran, captan, διφαινύλιο (diphenyl), PCNB. Διάφορα άλλα συνθετικά χημικά όπως το nitrofuram, σορβικό οξύ (sorbic acid), 8-υδροξυκινολίνη (8-hydroxyquinoline), thallium salts, tellurites, selenite, υπερμαγγανικά (permanganates), διχρωμικά (dichromates) και τερπένια (terpenes) έχουν χρησιμοποιηθεί σε υλικά απομόνωσης μυκήτων, βακτηρίων και μυκοπλασμάτων. Μερικά από τα χημικά όπως rose bengal, oxgall, phosfon και μερικά μη ιονικά επιφανειοδραστικά (απορρυπαντικά) εκτός από την παρεμπόδιση της ανεπιθύμητης μικροχλωρίδας στο τριβλίο απομόνωσης, χρησιμεύουν ως επιβραδυντές της γραμμικής αύξησης των αποικιών για να περιορίσουν την εξάπλωση των αποικιών των επιθυμητών μυκήτων και έτσι να απαριθμούνται εύκολα οι αποικίες.

Υλικά που βασίζονται στην εκλεκτική αύξηση: Ο εμπλουτισμός-εφοδιασμός ενός υλικού με μία συγκεκριμένη πηγή ενέργειας δεν χρησιμοποιείται συχνά στα εκλεκτικά υλικά απομόνωσης παθογόνων μυκήτων. Η κυτταρίνη (cellulose), κρεατινίνη (creatinine), γαλακτόζη (galactose) και ινουλίνη (inulin) έχουν χρησιμοποιηθεί ως μοναδικές ή συμπληρωματικές πηγές άνθρακα ή ως συνδυασμοί πηγών άνθρακα και αζώτου. Αυτά και άλλα υλικά όπως κελλοβιόζη (cellobiose), χιτίνη (chitin), γλυκερίνη (glycerol), μαννιτόλη (mannitol), πηκτίνη (pectate), πετρέλαιο (petroleum), άμυλο (starch) και ξυλόζη (xylose) έχουν ομοίως χρησιμοποιηθεί σε εκλεκτικά υλικά για απομόνωση μυκήτων, ακτινομυκήτων και βακτηρίων. Το άγαρ όμως που χρησιμοποιείται επίσης για την παρασκευή των υλικών δεν είναι ένα απόλυτα καθαρό και ουδέτερο υπόστρωμα, αλλά με τις επιπλέον ουσίες που περιέχει μπορεί να προμηθεύσει τους διάφορους οργανισμούς με τα απαιτούμενα θρεπτικά συστατικά και να αφαιρεθεί έτσι η αποκλειστικότητα της προστιθέμενης "μοναδικής" πηγής ενέργειας.

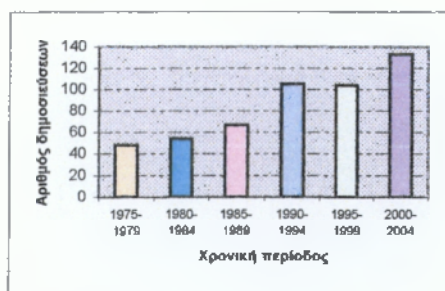
Εκλεκτικά υλικά απομόνωσης διαφόρων παθογόνων μυκήτων

Στην παρούσα μελέτη έγινε βιβλιογραφική έρευνα σε σχέση με την ανάπτυξη και χρησιμοποίηση των εκλεκτικών υλικών απομόνωσης μυκήτων με σκοπό να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια οι γνωστές μεθοδολογίες για την ανάπτυξη εκλεκτικού υλικού για μύκητες του γένους *Arthrobotrys*. Για την περίοδο ως το 1970, η επικρατούσα κατάσταση σ' αυτόν το τομέα περιγραφόταν από τον P. H. Tsao (1970). Τα στοιχεία που γνωρίζουμε για τα επόμενα χρόνια ως σήμερα

συγκεντρώθηκαν από τη βιβλιογραφία και όπου καθίσταται δυνατό παρουσιάζονται στατιστικά για να φανούν οι επικρατούσες τάσεις και η πρόοδος.

Πριν το 1960 λίγα ήταν τα διαθέσιμα εκλεκτικά υλικά για την απομόνωση συγκεκριμένων παθογόνων μυκήτων φυτών από μολυσμένο ιστό ή έδαφος. Τα προηγούμενα χρόνια οι μέθοδοι χαρακτηρίζονταν "πρωτόγονοι" και γίνονταν σε συνήθη μη εκλεκτικά υλικά όπως [π.χ. Πατάτα-Δεξτρόζη-Άγαρ (PDA), Czapek's agar] ή υλικά που περιείχαν ένα αντιβακτηριακό αντιβιοτικό και άλλους μη εκλεκτικούς παρεμποδιστές κατάλληλους για την απομόνωση μυκήτων. Για κάποια γένη φυτοπαθογόνων μυκήτων όπως *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Thielaviopsis* που ήταν αδύνατον να απομονωθούν από το έδαφος χρησιμοποιούνταν "δολωματικές" τεχνικές δηλαδή ευπαθή φυτά ή φυτικοί ιστοί που αποικίζονταν αποκλειστικά από συγκεκριμένο μύκητα και εν συνεχεία απομονώνονταν από τους αποικισμένους φυτικούς ιστούς. Την δεκαετία 1960-1970 εντάθηκαν οι έρευνες και αναπτύχθηκαν πολλά εκλεκτικά υλικά για παθογόνα φυτών κυρίως των γενών *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Verticillium*, *Thielaviopsis*, *Rhizoctonia* κ.α. Με σκοπό να φανούν οι τάσεις στην ανάπτυξη και χρησιμοποίηση των εκλεκτικών υλικών απομόνωσης μυκήτων, τα επόμενα χρόνια χρησιμοποιήθηκε η εξειδικευμένη επιστημονική ηλεκτρονική βάση πληροφοριών Plant Protection Database, CAB international που περιείχε στοιχεία από το 1972-2004 και στην οποία καταγράφηκαν όλες οι επιστημονικές ανακοινώσεις στις οποίες αναφέρονται εκλεκτικά υλικά απομόνωσης μυκήτων στον τίτλο ή την περίληψη. Φυσικά μία τέτοια έρευνα περιλαμβάνει μικρό μέρος των εργασιών στις εργασίες από τις οποίες χρησιμοποιήθηκαν εκλεκτικά υλικά. Καταφέρνουμε ωστόσο να ανακαλύπτουμε αρκετά ενδιαφέροντα πράγματα για τις εξελίξεις σ' αυτόν τον τομέα. Στον πίνακα 1 φαίνονται οι βιβλιογραφικές αναφορές εκλεκτικών υλικών για συγκεκριμένα γένη μυκήτων για την περίοδο 1972-2004. Αξιοσημείωτο είναι ότι τα γένη μυκήτων που αναφέρει ο P. H. Tsao (1972) επικεντρώνουν ακόμη και σήμερα το ενδιαφέρον των ερευνητών. Δεν πρέπει να ξεχνάμε ωστόσο ότι αρκετές δημοσιεύσεις αφορούν μύκητες που χρησιμοποιούνται ως παράγοντες βιολογικής καταπολέμησης (*Trichoderma* spp., *Beauveria* spp., *Metarhizium* spp. κ.α.).

Ο ρυθμός με τον οποίο εμφανίζονται οι δημοσιεύσεις στις οποίες βραίνει αυξανόμενος με το χρόνο παρουσιάζει ενδιαφέρον (διάγραμμα 1), δηλαδή μολονότι η ανάπτυξη μοντέρνων μοριακών μεθόδων ανίχνευσης και πιστοποίησης των μυκήτων, η έρευνα και σήμερα βασίζεται στην ανάπτυξη και χρήση των εκλεκτικών υλικών. Τα τελευταία χρόνια συχνά συναντάμε δημοσιεύσεις οι οποίες συγκρίνουν μοριακές μεθόδους ανίχνευσης με κλασικές μεθόδους που στηρίζονται σε εκλεκτικά υλικά. Στις περισσότερες από αυτές γίνεται παραδοχή της ανωτερότητας των τελευταίων (Timmer *et al* 1993).



Διάγραμμα 1: Ρυθμός εμφάνισης βιβλιογραφικών αναφορών εκλεκτικών υλικών απομόνωσης μυκήτων από το 1975 έως το 2004 (ανά 5ετία).

Τα πιο επιτυχημένα εκλεκτικά υλικά αναπτύχθηκαν για ορισμένα γένη μυκήτων παθογόνων φυτών που αναφέρονται στη συνέχεια.

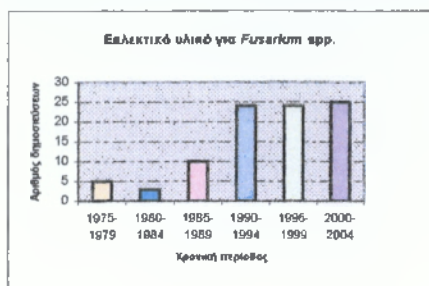
Πίνακας 1: Αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών εκλεκτικών υλικών για συγκεκριμένα γένη μυκήτων* την περίοδο 1972 έως 2004

Γένος μύκητα	Αριθμός αναφορών
<i>Fusarium</i>	97
<i>Phytophthora</i>	88
<i>Pythium</i>	37
<i>Verticillium, Pohonia</i>	31
<i>Trichoderma</i>	29
<i>Colletotrichum</i>	20
<i>Botrytis</i>	15
<i>Rhizoctonia</i>	15
<i>Metarhizium</i>	13
<i>Bipolaris, Drechslera, Cochliobolus, Helminthosporium</i>	11
<i>Alternaria</i>	10
<i>Beauveria</i>	10
<i>Aspergillus</i>	9
<i>Thielaviopsis</i>	8
<i>Phoma</i>	8
<i>Sclerotinia</i>	7
<i>Septoria, Stagonospora</i>	7
<i>Paecilomyces</i>	7
<i>Phialophora, Gaeumannomyces</i>	7
<i>Macrophomina</i>	6
<i>Heterobasidion</i>	6
<i>Akrocalymna, Aphanomyces, Armillaria, Aureobasidium, Calonectria, Candida, Centrospora, Cephalosporium, Ceratocystis, Chaetomium, Cladosporium, Coniochaeta, Crinipellis, Cryptoporus, Cryptosporiopsis, Curvularia, Cylindrocladium, Cytospora, Diaporthe, Epicoccum, Fomes, Ganoderma, Geotrichum, Gliocladium, Lassodiplodia, Lipomyces, Microdochium, Monilinia, Mucor, Mycoleptodiscus, Nattrassia, Neovossia, Penicillium, Phaeolus, Phanerochaete, Phellinus, Phomopsis, Pichia, Plectosphaerella, Pseudocercospora, Pyrenochaeta, Pyrenophytophthora, Rhizopus, Sclerotium, Serpula, Sorosporella, Sphaeropsis, Syngliocladium, Talaromyces, Tilletiopsis, Tyromyces, Verticicladiella</i>	Αναφέρονται λιγότερες από 5 φορές

*Οι αριθμοί αφορούν τις βιβλιογραφικές αναφορές που στον τίτλο ή στην περιλήψη τους αναφέρονται τέτοια υλικά (Πηγή: Plant Protection Database, CAB international).

Γένος *Fusarium*

Ο P. H. Tsao (1970) σημειώνει ότι λόγω της οικονομικής του σημασίας αλλά και της ανάγκης για ένα αποτελεσματικό μέσο ποσοτικής εκτίμησης των εδαφικών πληθυσμών το γένος *Fusarium* τράβηξε τη προσοχή των φυτοπαθολόγων.



Το υλικό Nash & Snyder (1962) είναι ένα από τα πιο επιτυχημένα και ευρέως χρησιμοποιούμενα εκλεκτικά υλικά που περιέχει στρεπτομυκίνη και το μυκητοκτόνο quinotozene (PCNB). Πολλές τροποποιήσεις αυτού του υλικού έχουν εμφανιστεί με διάφορες συγκεντρώσεις του PCNB και της στρεπτομυκίνης και άλλους συμπληρωματικούς αντιμυκητικούς και αντιβακτηριακούς

παράγοντες όπως αιθανόλη, potassium metabisulfite, αζίδιο του νατρίου (sodium azide), phytoactin, πράσινο του μαλαχίτη (malachite green), captan. Η γαλακτόζη και η ινουλίνη (inulin) έχουν χρησιμοποιηθεί σε υλικά ως πηγές άνθρακα που ευνοούν την ανάπτυξη του *Fusarium* spp.

Το υλικό του H. Komada (1972) που περιέχει ασπαραγίνη, γαλακτόζη, ανόργανα άλατα και τους αντιμικροβιακούς παράγοντες PCNB, oxgall, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}$ και στρεπτομυκίνη έφερε μεγάλη πρόοδο. Λόγω αυτού του υλικού δόθηκε μεγάλη ώθηση στην έρευνα του *Fusarium oxysporum* γιατί επιτρέπει η μελέτη των πληθυσμών του μύκητα στο έδαφος.

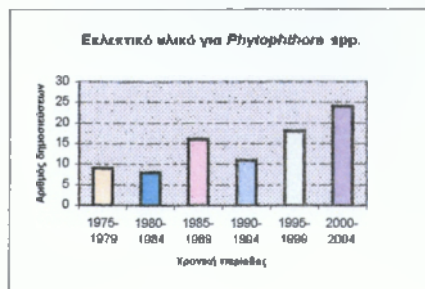
Στο διάγραμμα 2 μπορούμε να δούμε την τεράστια ώθηση που έδωσε η ανάπτυξη καλών εκλεκτικών υλικών στην έρευνα του *Fusarium* spp. Σ' αυτό το διάγραμμα διακρίνουμε ότι οι σχετικές δημοσιεύσεις υπερδιπλασιάζονται μετά το 1990.

Γένος *Phytophthora* και *Pythium*

Η ομάδα παθογόνων Pythiaceae που απομονώνονται δύσκολα αποτελείται από τα γένη *Phytophthora* και *Pythium*. Στις αρχές της έρευνας αναπτύχθηκαν εκλεκτικά υλικά που δεν ικανοποιούσαν τις ανάγκες της. Όταν λύθηκαν κάποια τέτοια προβλήματα επακολούθησε τροποποίηση ή ανάπτυξη πλήθους εκλεκτικών υλικών για την απομόνωση κάποιων ειδών ή ομάδων Pythiaceae από το έδαφος. Αυτή η πρόοδος στην ανάπτυξη και χρήση εκλεκτικών υλικών για απομόνωση μυκήτων Pythiaceae φαίνεται από τα διαγράμματα 3 & 4.

Γένος *Phytophthora*

Το 1969 αναπτύχθηκε από τους Eckert & Tsao ένα εκλεκτικό υλικό, το 3P, το οποίο επιτρέπει την εκλεκτική απομόνωση αρκετών *Phytophthora* spp. από ασθενείς ρίζες. Πρώτα χρησιμοποιήθηκαν τα αντιβακτηριακά αντιβιοτικά πενικιλίνη και πολυμυξίνη (polymyxin) και το αντιμυκητικό αντιβιοτικό πιμαρισίνη (pimaricin) που παρεμποδίζει όλους



σχεδόν τους μύκητες, όχι όμως και μέλη των Pythiaceae. Αργότερα τα δύο αυτά αντιβακτηριακά αντικαταστάθηκαν από τη βανκομυκίνη (vancomycin) στο PV υλικό. Ούτε όμως το 3P ούτε το PV υλικό ήταν ικανά για την απομόνωση του *Phytophthora* spp. από φυσικά εδάφη εξαιτίας του ότι η πιμαρισίνη (pimaricin) στα 100 ppm (μg/ml) εμποδίζει τη βλάστηση σπορίων πολλών *Phytophthora* spp. Έτσι οι Ocana & Tsao εφεύραν το P10VP υλικό με μείωση της συγκέντρωσης της πιμαρισίνης και συμπληρώνοντας το με PCNB. Αυτό το υλικό επέτρεπε την απομόνωση αρκετών *Phytophthora* spp. από φυσικά μολυσμένα εδάφη.

Γένος *Pythium*

Οι Eckert-Tsao, Flowers-Hendrix, Ocana-Tsao και Tsao-Menyonga ανέπτυξαν κατάλληλα εκλεκτικά υλικά για την εκλεκτική απομόνωση του *Pythium* spp. από μολυσμένους ιστούς ή μολυσμένα εδάφη. Το 1961 οι Singh & Mitchell ήταν



οι πρώτοι που ανέφεραν ένα υψηλής εκλεκτικότητας υλικό που περιείχε πιμαρισίνη για την απομόνωση του *Pythium* spp. από φυσικά εδάφη. Τα πολυενικά αντιβιοτικά ενδομυσίνη (endomycin), πιμαρισίνη (pimaricin) και νυστατίνη (nystatin) χρησιμοποιήθηκαν αργότερα σε παρόμοια υλικά που εφευρέθηκαν από τους Schitthenner, Hine & Luna, Kerr, αντίστοιχα. Πολλά από τα υλικά

απομόνωσης για *Pythium* spp. περιλαμβάνουν rose bengal και στρεπτομυκίνη τα οποία είναι γνωστό ότι είναι παρεμποδιστές σε κάποια είδη των Pythiaceae. Σε μερικά υλικά οι συγκεντρώσεις της πιμαρισίνης (pimaricin) είναι πολύ υψηλές με αποτέλεσμα τη χαμηλή ανάκτηση των πολλαπλασιαστικών μονάδων του *Pythium* από φυσικά εδάφη.

Γένος *Rhizoctonia*

Ο P.H. Tsao (1970), αναφέρει ότι κανένα εκλεκτικό υλικό δεν είναι διαθέσιμο για απομόνωση αυτής της σημαντικής ομάδας παθογόνων από το έδαφος. Την περίοδο που αναφέρονται αυτά χρησιμοποιούνταν δολωματικές τεχνικές και στη συνέχεια απομόνωση από το δόλωμα μέσω της χρησιμοποίησης υλικών (συνήθως water agar) που περιείχαν rose bengal και αντιβακτηριακά αντιβιοτικά. Το 1971 οι Ko & Hoga έκαναν τη μεγάλη ανακάλυψη. Το εκλεκτικό υλικό που εφεύραν δε βασίζεται τόσο στην επιλεκτική παρεμπόδιση αντιβιοτικών και τοξικών ουσιών, αλλά κυρίως στις ιδιαίτσουσες τροφικές ικανότητες του μύκητα (χρησιμοποίηση νιτρώδων ως πηγή αζώτου και γαλλικού οξέως ως πηγή άνθρακα).

Γένος *Thielaviopsis*

Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα υποστρώματα για την απομόνωση και απαρίθμηση του πληθυσμού του *T. basicola* στο έδαφος ήταν αρχικά η ρίζα καρότου και άλλα δολώματα. Κάποια ημιεκλεκτικά υλικά απομόνωσης, π.χ. VDYA και RB-

M2, είχαν χρησιμοποιηθεί για απομόνωση από το έδαφος με περιορισμένο βαθμό επιτυχίας μέχρι την αναφορά ενός εξαιρετικά αποτελεσματικού υλικού απομόνωσης από τον Ραρανίζας το 1964. Το υλικό αυτό περιλαμβάνει, μεταξύ άλλων συστατικών, PCNB, oxgall και nystatin, τα οποία σε συνδυασμό, κατορθώνουν έναν αξιοσημείωτο έλεγχο όλων σχεδόν των μυκήτων εκτός του *T. basicola* και ενός ασήμαντου αριθμού άλλων αποικιών μυκήτων. Ο έλεγχος των βακτηρίων είναι επίσης εξαιρετικός. Το υλικό αυτό είναι μάλλον το πιο εκλεκτικό από τα γνωστά εκλεκτικά υλικά απομόνωσης για κάθε συγκεκριμένο μύκητα ή ομάδα μυκήτων. Κανένα από τα αντιμικροβιακά συστατικά στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται στο υλικό δεν είναι παρεμποδιστής της βλάστησης είτε στα ενδοσπόρια ή χλαμυδοσπόρια του μύκητα. Αντικαθιστώντας το rose bengal με το oxgall σαν κατασταλτικό στο υλικό επιτρέπει πιο γρήγορη ανάπτυξη και πρόωμη σποροποίηση του *T. basicola*.

Γένος *Verticillium*

Το γένος αυτό συγκέντρωσε το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών από πολύ νωρίς. Οι Nadakavukaren & Horner δημιούργησαν για την απομόνωση του *V. dahliae* ένα από τα πιο επιτυχημένα εκλεκτικά υλικά που βασίζονται στην αιθανόλη. Ο Evans



χρησιμοποιούσε με μέτρια επιτυχία το PCNB σαν εκλεκτικό αντιμυκητικό παράγοντα για την απομόνωση του *Verticillium* spp. Ο Taylor βασίστηκε στην αρχή της εκλεκτικής αύξησης για τον μερικό αποκλεισμό ανεπιθύμητων μυκήτων χρησιμοποιώντας την κυτταρίνη (cellulose) και τη βιοτίνη ως μοναδικές θρεπτικές πηγές για τον *V. tricorpus* και εξασφαλίζοντας υψηλούς βαθμούς ανάκτησης από το φυσικό έδαφος.

Μετά το 1970 έγιναν πολλές προσπάθειες να αναπτυχθούν και να βελτιωθούν τα εκλεκτικά υλικά για *Verticillium* spp. Τα «μοντέρνα» υλικά περιέχουν εκχύλισμα εδάφους (soil extract), τεργικόλη, PCNB και κοινά αντιβακτηριακά αντιβιοτικά. Ωστόσο τα υλικά αυτά δεν είναι ικανοποιητικά καθώς δεν είναι απολύτως εκλεκτικά ως προς το *Verticillium* spp. Η απαρίθμηση των πολλαπλασιαστικών μονάδων βασίζεται στο σχηματισμό των χαρακτηριστικών σκληρωτίων του μύκητα που δεν είναι όμως πάντα ευδιάκριτα.

Η ανάγκη να ερευνηθεί η βιολογία των μυκήτων, παρά την έλλειψη ενός ικανοποιητικού εκλεκτικού υλικού, ανάγκασε πολλούς ερευνητές να χρησιμοποιήσουν τα υπάρχοντα υλικά και παραλλαγές τους, όπως μπορεί να διαπιστωθεί και από το διάγραμμα 5.

Γένη *Colletotrichum* και *Trichoderma*

Απ' αυτά τα δύο γένη μυκήτων, το πρώτο περιλαμβάνει πλήθος παθογόνων που προξενούν στα φυτά ασθένειες, γνωστές ως «ανθρακώσεις» και το δεύτερο περιλαμβάνει είδη που ανταγωνίζονται φυτοπαθογόνους μύκητες και χρησιμοποιούνται στη βιολογική αντιμετώπισή τους. Η ανάγκη για έρευνα της

οικολογίας τους οδήγησε στην ανάπτυξη μεθόδων εκλεκτικής απομόνωσής τους τα τελευταία χρόνια όπως φαίνεται στα αντίστοιχα διαγράμματα 6 & 7.



ΚΡΙΤΗΡΙΑ, ΔΙΑΔΙΑΚΑΣΙΕΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΕΚΛΕΚΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

Παρά το γεγονός ότι πολλά εκλεκτικά υλικά είναι χρήσιμα και αποτελεσματικά για την απομόνωση μυκήτων, ωστόσο κανένα δεν είναι τέλειο. Δυστυχώς, κάποια από τα υλικά έχουν προταθεί χωρίς να έχει προηγουμένως ελεγχθεί ούτε η θεωρητική τους βάση ούτε η αποτελεσματικότητά τους με εκτεταμένες δοκιμές, οπότε οι μετέπειτα αποτυχίες και η έλλειψη πρακτικότητας δεν ξάφνιασε. Στη συνέχεια αναφέρονται τα κριτήρια που κατά τον P. H. Tsao (1970) πρέπει να πληρούνται κατά τη διάρκεια ανάπτυξης ενός εκλεκτικού υλικού.

Επιλογή του βασικού υλικού και της κατάλληλης πηγής ενέργειας: Η επιλογή ενός βασικού υλικού πρέπει να γίνεται με βάση τις σύγχρονες γνώσεις της φυσιολογίας και των τροφικών απαιτήσεων του προς απομόνωση μύκητα. Αν και ένα καλό υλικό που περιέχει πεπτόνη ή κάποια εκχυλίσματα φυτών θα ικανοποιούσε πολλούς μη απαιτητικούς μύκητες, μύκητες με πολύπλοκες τροφικές ανάγκες π.χ. *Phytophthora infestans* κ.α., ικανοποιούνται από βασικά υλικά με πολύπλοκη σύνθεση. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στα συνθετικά υλικά, δηλαδή αυτά που αποτελούνται από καθαρά χημικά, ώστε να περιλαμβάνονται όλες οι αναγκαίες βιταμίνες και στερόλες. Η βλάστηση των σπορίων καθώς και η ανάπτυξη των υπό δοκιμή μυκήτων πρέπει να υποστηρίζονται από τα εκλεκτικά υλικά. Ωστόσο η βλάστηση των σπορίων πολλών μυκήτων όχι όμως και η ανάπτυξη του μυκηλίου είναι πιθανόν να παρεμποδίζεται από το όξινο pH που υπάρχει σε πολλά υλικά απομόνωσης. Ένα επιτυχημένο εκλεκτικό υλικό πρέπει να επιτρέπει στους μύκητες να σποροποιήσουν για να βοηθήσουν στη γρήγορη αναγνώριση χωρίς να χρειάζεται η μεταφορά τους σ' άλλο υλικό. Συχνά είναι πιο επιθυμητό ένα "φτωχό" υλικό που εμποδίζει τη γρήγορη και πυκνή βλαστική ανάπτυξη. Είναι επίσης αποτελεσματικό στη μείωση της ανάπτυξης της ανεπιθύμητης μικροχλωρίδας στο υλικό. Κατά την ανάπτυξη ενός συνθετικού βασικού υλικού οι πιο αφομοιώσιμες πηγές άνθρακα πρέπει να μπαίνουν στο υλικό ώστε να επιτευχθεί μία εκλεκτική αύξηση του υπό δοκιμή μύκητα.

Επιλογή εκλεκτικών αντιμυκητικών παραγόντων: Οι μύκητες, ακόμα και αυτοί που ανήκουν σε συγγενικές ομάδες διαφορετικών ειδών του ίδιου γένους

μυκήτων, συχνά διαφέρουν ως προς την ευαισθησία τους σε ποικίλους αντιμυκητικούς παράγοντες. Δοκιμές φάσματος της δράσης των διαφόρων ουσιών θα πρέπει να εκτελούνται, χρησιμοποιώντας αντιπροσωπευτικά είδη και απομονώσεις του προς εξέταση μύκητα. Οι πληροφορίες που έχουν δημοσιευθεί για τοξικότητες ουσιών περιλαμβάνουν στοιχεία ενός μόνο αντιπροσωπευτικού είδους για κάθε γένος. Για την ανάπτυξη ενός σωστού εκλεκτικού υλικού, οι δοκιμές πρέπει να περιλαμβάνουν πολλά στελέχη αντιπροσωπευτικά ενός πληθυσμού. Για παράδειγμα η ανακάλυψη του Holme για την κυκλοεξιμίδη (cycloheximide) έχει συμβάλει στη χρήση της εκλεκτικής απομόνωσης του *Ceratocystis* από τον Scheider, και τα στοιχεία του Vaartaja για το γαλλικό οξύ (gallic acid) και τη νυστατίνη (nystatin), έχουν παίξει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη υλικού για τον *Phytophthora* από τους Flower & Hendrix και υλικό για τον *Thielaviopsis* από τον Paraviza, αντίστοιχα.

Επιλογή εκλεκτικών αντιβακτηριακών παραγόντων: Οι αντιβακτηριακοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται στα εκλεκτικά υλικά απομόνωσης μυκήτων δεν πρέπει να παρεμποδίζουν τους επιθυμητούς μύκητες. Υπάρχουν πολλά εξαιρετικά αντιβακτηριακά αντιβιοτικά και αντιβακτηριακοί παράγοντες. Ένας συνδυασμός από περισσότερους από ένα παράγοντες στο υλικό, είναι συχνά σημαντικός για έναν αποτελεσματικό και επιτυχή έλεγχο των βακτηρίων. Ωστόσο οι ερευνητές των εκλεκτικών υλικών συχνά τείνουν στους στερεότυπους αντιβακτηριακούς παράγοντες. Προσοχή πρέπει να δοθεί στο ότι αν και πολλοί αντιβακτηριακοί παράγοντες δεν παρεμποδίζουν μύκητες, μερικοί είναι πολύ τοξικοί σε ορισμένους μύκητες, ειδικά σε υψηλές συγκεντρώσεις. Μερικά παραδείγματα είναι η παρεμπόδιση του *Phytophthora* ή του *Pythium* από τη χλωραμφαινικόλη (chloramphenicol), τη νοβοβιοσίνη (novobiocin), τη στρεπτομυκίνη (streptomycin), τη τετρακυκλίνη (tetracycline), του *Ceratocystis ulmi* από τη χλωτετρακυκλίνη (chlortetracycline) και την πολυμυξίνη (polymyxin), των ζυμομυκήτων από τη στρεπτομυκίνη (streptomycin) και διαφόρων μυκήτων από τη τετρακυκλίνη (tetracycline). Ορισμένα αντιβιοτικά παρεμποδίζουν τη βλάστηση των σπορίων από την ανάπτυξη των μυκηλίων συγκεκριμένων μυκήτων.

Κατανόηση των ιδιοτήτων και των αλληλεπιδράσεων των αντιμικροβιακών παραγόντων στο εκλεκτικό υλικό: Στην επιτυχία του υλικού σημαντικό ρόλο συχνά παίζουν η σταθερότητα, η διαλυτότητα και ο χημικός ανταγωνισμός ή συνεργισμός των παρεμποδιστών. Μερικά αντιβιοτικά είναι πολύ ασταθή σε υψηλές θερμοκρασίες ή σε ακραίες τιμές του pH. Η χλωτετρακυκλίνη (chlortetracycline) χάνει γρήγορα τη δραστηριότητα της σε διάφορα υλικά και τα πολυενικά αντιβιοτικά αδρανοποιούνται με το φως. Από την άλλη πλευρά, η έκθεση στο φως αυξάνει την τοξικότητα του rose bengal. Η υψηλή διαλυτότητα των αντιμικροβιακών παραγόντων στο νερό δεν είναι προϋπόθεση αλλά πλεονέκτημα, ειδικά όταν χρειάζονται οι υψηλές συγκεντρώσεις στο υλικό. Η χρήση υψηλών συγκεντρώσεων πέρα από το όριο της διαλυτότητας είναι ασήμαντη όταν η διαλυτότητα του νερού σε μερικούς παρεμποδιστές (π.χ. PCNB) είναι χαμηλή. Μερικές φορές ο αντιμικροβιακός παράγοντας πρέπει να διαλυθεί πρώτα σε έναν οργανικό διαλύτη πριν προστεθεί στο υλικό. Η τελική συγκέντρωση του διαλύτη στο υλικό δεν πρέπει να παρεμποδίζει τους μύκητες. Προσοχή πρέπει να δίνεται και στις περιπτώσεις αλληλεπίδρασης δύο ή περισσότερων παραγόντων. Ανταγωνισμός ή συνεργισμός με αποτέλεσμα τη μείωση ή αύξηση της τοξικότητας αντιστοίχως, μπορεί να υπάρξει όταν χρησιμοποιούνται συνδυασμοί των αντιμικροβιακών παραγόντων. Για παράδειγμα, το rose bengal αυξάνει την τοξικότητα της στρεπτομυκίνης (streptomycin) στον *Phytophthora* και

στον *Pythium* και το oxgall αυξάνει την τοξικότητα του PCNB και της πιμαρισίνης (pimaricin) στο *Pythium*.

Η ΠΡΑΚΤΙΚΗ ΤΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ

Οι δοκιμές πρέπει να γίνονται σε "πραγματικές" συνθήκες.

Σε δοκιμές των παρεμποδιστών θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τόσο το μυκήλιο όσο και τα σπόρια του υπό εξέταση μύκητα. Από τη στιγμή που πολλοί μύκητες επιζούν στη φύση με τη μορφή σπορίων και μυκηλίου, το εκλεκτικό υλικό πρέπει να επιτρέπει την ανάκτησή τους από τέτοιες μορφές. Η ανάκτηση των μυκήτων από το έδαφος ή από άλλους φυσικούς βιότοπους στα εκλεκτικά υλικά εξαρτάται από την ικανότητα τους να ξεκινούν την ανάπτυξη τους σ' αυτά τα υλικά, διακόπτοντας ίσως κάποιο λήθαργο και ανταγωνιζόμενοι άλλους οργανισμούς. Λόγω της διαφορετικής ευαισθησίας των σπορίων και των μυκηλίων σε διάφορες τοξικές ουσίες, όπως φαίνεται στις περιπτώσεις των *Monilinia fructicola*, *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp. και *Coccidioides* spp., οι υψηλές συγκεντρώσεις των αντιμικροβιακών παραγόντων που χρησιμοποιούνται στα εκλεκτικά υλικά μπορεί να παρεμποδίζουν τη βλάστηση των σπορίων. Πολλοί μύκητες εδάφους που δεν αναπτύσσουν μυκήλιο στο φυσικό έδαφος, παραμένουν ωστόσο σ' αυτό με τη μορφή ανθεκτικών σπορίων και προκειμένου να απομονωθούν πρέπει να αποφεύγονται υλικά με συγκεντρώσεις παρεμποδιστών που παρεμποδίζουν τη βλάστηση των σπορίων. Η χρήση των σπορίων ή άλλων μορφών πολλαπλασιασμού και διαχείμασης του προς εξέταση μύκητα, αποτελεί σημαντικό μέρος των δοκιμών. Για παράδειγμα, στο *Sclerotium* και στο *Verticillium* πρέπει να χρησιμοποιούνται τα σκληρότια και μικροσκληρότια αντιστοίχως.

Η αποτελεσματικότητα των εκλεκτικών ουσιών πρέπει να δοκιμάζεται και στην μικροχλωρίδα που θα παρεμποδιστεί, δηλαδή να γίνονται δοκιμές με φυσικά εδάφη με πλήρη τη μικροχλωρίδα τους. Πρέπει να χρησιμοποιούνται εδάφη διαφορετικής προέλευσης ώστε να καλυφθεί ένα μεγάλο φάσμα μικροβιακών πληθυσμών. Η δοκιμή μπορεί να γίνει προσθέτοντας μια γνωστή πυκνότητα των υπό δοκιμή μυκήτων σε φυσικό έδαφος και εκτιμώντας το βαθμό ανάκτησης του υλικού. Μια τελική επιβεβαίωση πρέπει να επιτευχθεί δοκιμάζοντας ένα φυσικά μολυσμένο έδαφος, ένα έδαφος της ριζόσφαιρας και μολυσμένους ιστούς.

Τέλος, όταν το εκλεκτικό υλικό χρησιμοποιείται για ποσοτικές εκτιμήσεις, θα πρέπει να γίνεται επιλογή της πλέον κατάλληλης τεχνικής απομόνωσης. Η πιο κατάλληλη μέθοδος είναι των διαδοχικών αραιώσεων, αν ο υπό εξέταση μύκητας είναι υπό μορφή σπορίων. Αν υπάρχει και με μορφή μυκηλίου τότε χρησιμοποιούνται και άλλες τεχνικές όπως είναι ο άμεσος εμβολιασμός με έδαφος. Ένα εκλεκτικό υλικό για να δώσει ένα μεγάλο βαθμό ευαισθησίας, μπορεί να συνδυαστεί και μ' άλλες τεχνικές εκλεκτικής απομόνωσης όπως είναι η χρήση δολώματος, η επώαση σε CO₂, το "υγρό κοσκίνισμα" κ.α. Ειδικά για τους μύκητες που αποτελούν πληθυσμούς στελεχών με διαφορετικές ευαισθησίες σε παρεμποδιστές καλό είναι να χρησιμοποιούνται περισσότερα από ένα εκλεκτικά υλικά (P. H. Tsao, 1970).

**ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ ΤΩΝ ΕΚΛΕΚΤΙΚΩΝ
ΥΛΙΚΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΜΥΚΗΤΩΝ ΠΟΥ
ΑΝΑΠΤΥΧΘΗΚΑΝ ΤΑ ΤΕΛΕΥΤΑΙΑ 33 ΧΡΟΝΙΑ**

Χρονο- λογία	Συγγραφέας	Είδος μύκητα	Βασικά συστατικά εκλεκτικού υλικού
1971	Djerbi, M.	<i>Fusarium</i> spp.	hydroxy-8-quinoline sorbate
1972	Veverka, K.	Ο μύκητας που προκαλεί μαύρα στελέχη στα ζαχαρότευτλα	benlate, dexon
1972	Jurgensen, M. F., Danielson, R. M.	<i>Lipomyces</i> spp.	imidazole, thymine ή NH ₄ Cl
1972	Chambers, S. C.	<i>Fusarium</i> spp.	PCNB
1972	Farley, J. D.	<i>Colletotrichum coccodes</i>	polygalacturonic acid, KH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄ , soil extract, difco agar, PCNB, benomyl, streptomycin sulphate, tetracycline HCl, chloramphenicol
1972	Day, J. R., Lewis, B. G., Martin, S.	<i>Centrospora acerina</i>	sucrose, streptomycin, agar
1973	Meyer, W. A., Sinclair, J. B., Khare, M. N.	<i>Macrophomina phaseoli</i> [<i>M. phaseolina</i>]	chloroned, ceresin wet, streptomycin sulfate, potassium penicillin ή mercuric chloride (αντί ceresin wet), rose bengal
1974	Bugbee, W. M.	<i>Phoma betae</i>	K ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ , soil extract, boric acid, streptomycin sulfate, chlorotetracycline, benomyl, sucrose, agar
1974	Agarwal, V. K., Singh, O. V.	<i>Fusarium moniliforme</i> [<i>Gibberella fujikuroi</i>]	malachite green, PCNB, yeast extract, dicrysticin
1974	Castillo G., E., Fernandez Northcote, E. N.	<i>Phytophthora</i> spp. και <i>Pythium</i> spp.	pimaricin, cefalotin, bromthymol blue, Na azide, cornmeal agar
1975	Baicu, T., Diaconu, V.	<i>Alternaria</i> spp.	benomyl ή thiophanate-methyl
1975	Castello, J. D., Shaw, C. G., Furniss, M. M.	<i>Cryptosporus volvatus</i>	difco malt agar, benomyl, streptomycin-sulfate, lactic acid
1975	Castello, J. D., Shaw, C. G., Furniss, M. M.	<i>Fomes pinicola</i>	difco malt agar, benomyl, streptomycin-sulfate, lactic acid
1975	Ausher R., Katan J., Ovadía S.	<i>Verticillium dahliae</i>	ethanol, PCNB, sucrose, Czapek's salts
1975	Komada H.	<i>Fusarium oxysporum</i>	K ₂ HPO ₄ , KCl, MgSO ₄ .7H ₂ O, Fe-Na-EDTA, L- asparagin, D-galactose
1975	Phillips D. J., Harvey J. M.	<i>Monilinia</i> spp.	PCNB, neomycin, streptomycin, agar
1975	Papavizas, G. C., Klag, N. G.	<i>Macrophomina phaseolina</i>	PDA, chlortetracycline, hydrochloride, streptomycin sulphate, ή συνδιασμοί των DASS, oxgall, rose bengal και των DASS, oxgall, PCNB
1975	McFadden, A.G. Sutton, J. C.	<i>Trichoderma</i> spp.	PDA, rose bengal, streptomycin sulphate, formalin
1975	Lumsden, R. D., Ayers, W. A., Dow, R. L.	<i>Pythium aphanidermatum</i>	pimaricin, vancomycin, gallic acid
1975	Stepanova, M. Yu.	<i>Verticillium dahliae</i>	soil extract, agar, K ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ , Na pectinate, streptomycin, biomyacin, levomyacin
1975	Krigsvold D. T., Griffin G. J.	<i>Cylindrocladium crotalariae</i>	sucrose, peptone, streptomycin, chlortetracycline, oxgall, PCNB, TBZ
1976	Puhalla J. E.	<i>Verticillium dahliae</i>	agar, glycerol
1976	Pont, W.	<i>Fusarium</i> spp.	dicloran
1976	Ricci, P., Toribio, J. A.,	<i>Pythium</i> spp.	PCNB, benomyl

Χρονο- λογία	Μεσσηαιεν, C. M. Συγγραφέας	Είδος μύκητα	Βασικά συστατικά εκλεκτικού υλικού
1976	Maduewesi J. N. C., Sneh B., Lockwood J. L.	<i>Thielaviopsis basicola</i>	V-8 juice, yeast extract, agar, PCNB, oxgall, nystatin, chloramphenicol, K penicillin G
1977	Stack R. W.	<i>Cochliobolus sativus</i>	Czapek-Dox agar, benomyl
1977	Masago, H., Yoshikawa, M., Fukada, M., Nakanishi, N.	<i>Phytophthora</i> spp.	PDA, benomyl, nystatin, PCNB, rifampicin, ampicillin
1977	Tsao, P. H., Guy, S. O.	<i>Phytophthora cinnamomi</i> και <i>P. [nicotianae var.]</i> <i>parasitica</i>	pimaricin, vancomycin, PCNB, hymexazol
1977	McCracken A. R., Logan C.	<i>Phoma exigua</i> var. <i>foveata</i>	thiophanate-methyl, PCNB, methoxyethylmercury chloride, propionic acid, chloramphenicol, streptomycin, aureomycin, malt extract agar
1977	Griffin G. J.	<i>Cylindrocladium</i> <i>crotalariae</i>	tyrosine
1978	Tsao P. H.	<i>Phytophthora</i> spp.	hymexazol
1978	Kulkarni, S., Siddaramaiah, A. L., Prasad, K. S. K.	<i>Drechslera sativum</i> [<i>Cochliobolus sativus</i>]	PDA, filipin, streptomycin, Terramycin [oxytetracycline], Bavistin [carbendazim]
1978	Mitchell D. J., Kannwischer M. E.	<i>Phytophthora parasitica</i> var. <i>nicotianae</i>	pimaricin, PCNB, ampicillin, rifampicin
1978	Humaidan, H. S., Williams, P. H.	<i>Aphanomyces raphani</i>	streptomycin sulphate, benomyl in radish agar
1978	Kritzman G., Netzer D.	<i>Botrytis</i> spp.	tannic acid, μυκητοκτόνα, αντιβιοτικά, Cu ²⁺ ions
1978	Barrett D. K.	<i>Phaeolus schweinitzii</i>	χαλκός, arsenic, CuSO ₄ , AS ₂ O ₅
1979	Hansen, E. M., Hamm, P. B., Julis, A. J., Roth, L. F.	<i>Phytophthora</i> spp.	cornmeal agar, pimaricin
1979	Kushi, K. K., Khare, M. N.	<i>Macrophomina phaseolina</i>	PDA, PCNB
1979	Matthews P.	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	PDA, benomyl
1980	McCall, K. A., Merrill, W.	<i>Verticicladiella procera</i>	acid malt agar, cycloheximide
1980	Kageyama, K., Ui, T.	<i>Pythium</i> spp.	agrimycin
1980	Bonnet, P., Ricci, P., Mercier, S.	<i>Phytophthora [Nicotianae</i> var.] <i>parasitica</i>	cholesterol, mineral salts
1980	Hicks, B. R., Cobb, F. W., Jr., Gersper, P. L.	<i>Ceratocystis wageneri</i>	cycloheximide
1980	Brown, G. E.	<i>Geotrichum candidum</i>	PDA, novobiocin, benomyl, dicloran
1981	Hall, R.	<i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	benomyl
1981	Elad, Y., Chet, I., Henis, Y.	<i>Trichoderma</i> spp.	chloramphenicol, PCNB, p- dimethylaminobenzene-diaz sodium sulfonate, rose bengal, glucose
1981	Papavizas, G. C., Bowers, J. H., Johnston, S. A.	<i>Phytophthora capsici</i>	Difco cornmeal agar, pimaricin, vancomycin, PCNB, penicillin G, benomyl, hymexazol
1981	Kobayashi, K., Tanaka, F., Kondo, N., Ui, T.	<i>Cephalosporium gregatum</i> [<i>Phialophora gregata</i>]	galactose, peptone, KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄ .7H ₂ O, sodium borate, PCNB, sodium cholate, streptomycin sulphate, tetracycline HCl, agar
1981	Miller, R. V., Sands, D. C., Strobel, G. A.	<i>Ceratocystis ulmi</i>	linoleic acid, cycloheximide, dicloran, triphenyltin hydroxide, chloramphenicol, streptomycin sulphate, PDA

Χρονο- λογία	Συγγραφέας	Είδος μύκητα	Βασικά συστατικά εκλεκτικού υλικού
1982	Dodman, R. L., Reinke, J. R.	<i>Cochliobolus sativus</i>	3 αντιβιοτικά, 3 μυκητοκτόνα, rose bengal
1982	Papavizas, G. C., Lumsden, R. D.	<i>Trichoderma</i> spp.	alkaryl polyether alcohol ή sodium propionate, benomyl
1982	Mohan, K. S., Pillai, G. B.	<i>Metarhizium anisopliae</i>	chitin
1982	Mihail, J. D., Alcorn, S. M.	<i>Macrophomina phaseolina</i>	chloroneb, streptomycin sulphate, PDA
1982	Almeida, O. C. de., Bolkan, H. A.	<i>Cylindrocladium</i> spp.	castorbean agar, glucose, yeast extract, KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄ ·7H ₂ O, oxgall, thiabendazole, PCNB, streptomycin sulphate, chloramphenicol, agar, Ricinus communis leaf extract
1982	Christen A. A.	<i>Verticillium albo-atrum</i>	l-sorbose, l-asparagine, K ₂ HPO ₄ , KCl, MgSO ₄ ·7H ₂ O, Fe-Na-EDTA, PCNB, oxgall, NaB ₄ O ₇ ·10 H ₂ O, streptomycin sulphate
1982	Shew, H. D., Benson, D. M.	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	pimaricin, chloramphenicol, hymexazol
1983	Newhouse, J. R., Hunter, B. B.	<i>Cylindrocladium</i> spp. και <i>Fusarium</i> spp.	glucose-lima bean rose bengal agar
1983	Wild, B. L.	<i>Penicillium digitatum</i>	guazatine, benomyl
1983	Shen Zhang., Holdenrieder, O.	<i>Heterobasidion annosum</i>	orthophenylphenol (OPP), streptomycin sulphate, water agar
1983	Reis, E. M.	<i>Cochliobolus sativus</i>	quarter-strength potato-sucrose agar, streptomycin, neomycin, benomyl, captan, dicloran
1983	Elad, Y., Chet, I.	<i>Trichoderma</i> spp. ή <i>Fusarium</i> spp.	TSM και benomyl, TSM και captan
1984	Pfender, W. F., Delwiche, P. A., Grau, C. R., Hagedorn, D. J.	<i>Aphanomyces</i> spp.	metalaxyl, benomyl, vancocin
1984	Solel, Z., Pinkas, Y.	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	P ₁₀ VPH και PARPH υλικό με iprodione
1984	Jeffries, C. J., Boyd, A. E. W., Paterson, L. J.	<i>Fusarium solani</i> var. <i>coeruleum</i> και <i>Fusarium sulphureum</i>	PCNB, 2-aminobutane
1984	Bruggen, A. H. C. Van., Arneson, P. A.	<i>Rhizoctonia solani</i>	PDA, Rizolex (tolclofos-methyl)
1984	Juhnke, M. E., Mathre, D. E., Sands, D. C.	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	PDA, streptomycin sulfate, dicloran, metalaxyl, Hoe 00703
1984	Renson, D. M.	<i>Trichoderma</i> spp.	Tergitol NP-10
1984	Shimizu, T., Ichitani, T.	<i>Pythium zingiberum</i>	άμυλο- πεπτόνη-ασπαραγίνη υλικό με benomyl, streptomycin, vancomycin
1985	Chikuo, Y., Sugimoto, T.	<i>Aphanomyces cochlioides</i>	corn meal agar, metalaxyl, thiophanate-methyl, chloramphenicol, iprodione
1985	Specht, L. P., Griffin, G. J.	<i>Thielaviopsis basicola</i>	etridiazol, nystatin, carrot extract
1985	Krishna, A., Singh, R. A.	<i>Neovossia indica</i>	glucose-yeast extract agar υλικό με nigrosine, haematoxylin, Indar [triazbutil] ή nigrosine, Du-ter [fentin hydroxide]
1985	Bottcher, I., Behr, L.	<i>Pythium</i> spp.	maize και αντιβιοτικά
1985	Samiran Gangopadhyay., Grover, R. K.	<i>Rhizoctonia solani</i>	mineral antibiotic (MA) υλικό με gallic acid και fosetyl-Al
1985	Hutchins, A. S., Fay, H., Knutson, D.	<i>Phellinus</i> [<i>Inonotus</i>] <i>weirii</i>	mycostatin, benomyl, claforan, HCl
1985	Conway, K. E.	<i>Pythium</i> spp.	PDA, etaconazole, sodium ampicillin
1985	Ben Yephet., Y., Bitton, S.	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	PDA, PCNB, streptomycin

Χρονο- λογία	Συγγραφέας	Είδος μύκητα	Βασικά συστατικά εκλεκτικού υλικού
1985	Cook, R. J., Zhang, B. X.	<i>Pythium</i> spp.	Pythium εκλεκτικό υλικό με metalaxyl
1986	Richard Molard., D.	<i>Fusarium</i> spp.	8-hydroxyquinoline sorbate, chloramphenicol, malt agar
1986		<i>Phytophthora drechsleri</i> f.sp. <i>cajani</i>	benomyl, hymexazol, mycostatin, PCNB, pimaricin, vancomycin, rifamycin, PDA
1986	George, S. W., Milholland, R. D.	<i>Phytophthora fragariae</i>	benomyl, pimaricin, hymexazol, rifamycin
1986	Deshpande, G. D.	<i>Curvularia lunata</i>	carbendazim, PCNB, streptomycin sulphate
1986	Andrews, S., Pitt, J. I.	<i>Fusarium</i> spp.	dicloran, chloramphenicol, bacteriological peptone
1986	Morris, E., Kavanagh, J. A.	<i>Phytophthora fragariae</i>	lima bean agar, hymexazol, benomy, pimaricin, rifamycin
1986	Awuah, R. T., Lorbeer, J. W.	<i>Fusarium oxosporum</i> f.sp. <i>apii</i>	L-sorbose, Bacto agar, DL-asparagine, cloramphenicol sulphate, PCNB, sodium p-(dimethylamino) benzenediazo sulphonate
1986	Smilanick, J. L., Eckert, J. W.	<i>Penicillium digitatum</i>	o-Phenylanizole (OPA), tetrachloroanisole (TCA), PDA
1986	Jeffers, S. N., Martin, S. B.	<i>Phytophthora</i> spp.	pimaricin, vancomycin, PCNB, ampicillin, rifambicin, hymexazol in cornmeal agar
1986	Jeffers, S. N., Martin, S. B.	<i>Pythium</i> spp.	pimaricin, vancomycin, PCNB, ampicillin, rifambicin, hymexazol in cornmeal agar
1986	Wyk, P. S. van., Scholtz, D. J., Los, O.	<i>Fusarium</i> spp.	rose bengal, glycerine, urea
1986	Frisvad, J. C.	<i>Penicillium viridicatum</i> και <i>P. verrucosum</i>	yeast extract sucrose agar, PCNB, rose bengal
1987	Windham, A. S., Lucas, L. T.	<i>Rhizoctonia zeae</i>	benomyl, metalaxyl, penicillin G, streptomycin sulphate, water agar
1987	Ohsawa, M., Katsuya, K., Otsuka, T.	<i>Phaeolus schweinitzii</i> και <i>Tyromyces balsameus</i>	benomyl, malt extract agar
1987	Swart, W. J., Wingfield, M. J., Knox Davies, P. S.	<i>Sphaeropsis sapinea</i>	Difco agar, Difco malt extract, rose bengal, benodanil, chlorothalonil, 2-phenylphenol
1987	Abildgren, M. P., Lund, F., Thrane, U., Elmholt, S.	<i>Fusarium</i> spp.	iprodione, dicloran
1987	Barker, I., Pitt, D.	<i>Colletotrichum acutatum</i> f.sp. <i>pineae</i>	PCNB
1987	Mathuresh Singh, Amerika Singh.	<i>Neovossia [Tilletia] indica</i>	streptomycin, terramycin, penicillin Du-Ter [fentin hydroxide], Dithane M-45[mancozeb], yeast extract-wheat grain dextrose agar
1988	Bisht, V. S., Nene, Y. L.	<i>Phytophthora drechsleri</i> f.sp. <i>cajani</i>	benlate, hymexazol, mycostatin, PCNB, pimaricin, vancomycin, rifamycin
1988	Herrera Isla, L., Camara, M.	<i>Pythium</i> spp.	chloramphenicol, penicillin, rose bengal, streptomycin, gallic acid, benomyl, nistatin ή PCNB
1988	White, J. G.	<i>Pythium intermedium</i> , <i>P. sylvaticum</i> ή <i>P. ultimum</i>	corn meal agar, pimaricin, rifamycin
1988	Koch, S. H., Knox Davies, P. S.	<i>Colletotrichum trifolii</i>	malt extract agar, tridemorph, rose bengal
1988	Irwin, J. A. G., Stirling, A. M.	<i>Acrocalymma medicaginis</i>	PDA, streptomycin, penicillin, polymixin, triadimefon
1989	Carey, J. K., Hull, A. V.	<i>Basidiomycetes</i>	benomyl, 2-phenylphenol
1989	Hadar, E., Katan, J., Katan, T.	<i>Fusarium oxysporum</i>	chlorate
1989	Itoh, S., Komoda, H.,	<i>Verticillium dahliae</i>	Czapek's agar, PCNB, ethanol, chloramphenicol,

Χρονο- λογία	Συγγραφέας	Είδος μύκητα	Βασικά συστατικά εκλεκτικού υλικού
	Monma, T., Amano, I.		polyoxin AL, blasticidin S, biotin
1990	Rey, P., Eymery, F., Peltier, G.	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	atrazine ή diuron
1990	Dietrich, D. M., Lamar, R. T.	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	benomyl, streptomycin sulfate, malt agar
1990	Bartschi, C., Berthier, J., Guiguettaz, C., Valla, G.	<i>Mucor</i> spp.	chloramphenicol, ketaconazole, malt yeast extract agar
1990	Sneh, B., Stack, J.	<i>Mycocleptodiscus terrestris</i>	KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄ ·7H ₂ O, dextrose, peptone, chloramphenicol, rose Bengal, oxgall, Terraclor, agar, sorbic acid, Subdue, Truban
1990	Tamietti, G., Valentino, D.	<i>Pyrenochaeta lycopersici</i>	PCNB, dicloran, copper sulfate, malt extract agar
1990	Migheli, Q., Minucci, C., Garibaldi, A.	<i>Rhizoctonia</i> spp.	ορυκτά, gallic acid, imazalil, prochloraz, streptomycin sulfate, oxytetracycline chlorhydrate
1990	Vincelli, P. C., Beaupre, C. M. S.	<i>Rhizoctonia solani</i>	Το υλικό Κο & Hora εμπλουτισμένο με prochloraz
1991	Sneh, B.	<i>Metarhizium anisopliae</i>	aqueous extract, chloramphenicol, benomyl, dodine, crystal violet, agar
1991	Darus, A., Seman, I. A.	<i>Ganoderma</i> spp.	chloramphenicol, metalaxyl, benomyl, tannic acid
1991	Mengistu, A., Tachibana, H., Grau, C. R.	<i>Phialophora gregata</i>	Difco bacto agar, CuSO ₄ , PCNB
1991	Elliott, M. L.	<i>Gaeumannomyces</i> spp., <i>Phialophora</i> spp. και <i>Magnaporthe poae</i>	Difco PDA, streptomycin, dichloran, metalaxyl, vinclozolin, CGA-173506, L-dopa
1991	Manandhar, J. B., Cunfer, B. M.	<i>Septoria nodorum</i>	PDA, agar, oxgall, peptone, chloroneb, copper hydroxide, dicloran, chloramphenicol, erythromycin, tetracycline hydrochloride, neomycin sulfate
1991	Wang, S. Q., Shang, H. S., Jing, J. X.	<i>Fusarium graminearum</i> [<i>Gibberella zeae</i>]	peptone, PCNB, tetracyclin
1991	Cloud, G. L., Roupe, J. C.	<i>Macrophomina phaseolina</i>	rifambicin, metalaxyl, nonoxynol, PDA
1991	Sumino, A., Kondo, N., Kodama, F.	<i>Pseudocercospora herpotrichoides</i>	streptomycin sulfate, copper sulfate, PDA
1991	Mathuresh Singh., Amerika Singh	<i>Neovossia indica</i>	wheat grain, dextrose, agar, yeast extract, streptomycin sulfate, terramycin [oxytetracycline], Du-Ter [fentin hydroxide]
1992	Brunner Keinath., S., Seemuller, E.	<i>Phytophthora fragariae</i> var. <i>rubi</i> και <i>P. citricola</i>	bean meal agar, benomyl, hymexazol, iprodione, pimaricin, rifampicin, penicillin, chloramphenicol
1992	Cunfer, B. M., Manandhar, J. B.	<i>Stagonospora nodorum</i>	Difco PDA, Bacto Peptone, oxgall, agar, chloroneb, copper hydroxide, dichloran, chloramphenicol, erythromycin, tetracycline, hydrochloride, neomycin sulfate, paraquat
1992	Harrison, R. D., Gardner, W. A.	<i>Beauveria bassiana</i>	dodine in oatmeal
1992	Park, Y. H., Stack, J. P., Kenerley, C. M.	<i>Gliocladium virens</i> και <i>Gliocladium roseum</i>	glucose, MgSO ₄ ·7H ₂ O, K ₂ HPO ₄ , KCl, NaNO ₃ , FeSO ₄ ·7H ₂ O, chloramphenicol, rose bengal, streptomycin sulfate, benomyl, sodium propionate, bacto agar
1992	Agostini, J. P., Timmer, L. W.	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> [<i>Glomerella cingulata</i>]	streptomycin, cooper hydroxide, σε PDA
1993	Liu, Z. Y., Milner, R. J., McRae, C. F.	<i>Metarhizium</i> spp.	dodine

Χρονο- λογία	Συγγραφέας	Είδος μύκητα	Βασικά συστατικά εκλεκτικού υλικού
	Lutton, G. G.		
1993	Cilliers, A. J., Swart, W. J., Wingfield, M. J.	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	malt extract agar, tannic acid, benodamil, tridemorph
1993	Sato, N., Kato, M.	<i>Phytophthora infestans</i>	nystatin, ampicillin, rye B agar
1993	Moreira, A. C., Ferraz, J. F. P.	<i>Phytophthora cactorum</i> και <i>P. cambivora</i>	penicillin G, streptomycin, neomycin, pimarcin, tetracycline, nystatin, benomyl, PCNB, hymexazol
1993	Rinker, D. L., Bussmann, S., Alm, G.	<i>Verticillium fungicola</i>	raffinose, αντιβιοτικό, μυκητοκτόνα, βαφές, mineral salts
1993	Askew, D. J., Laing, M. D.	<i>Trichoderma</i> spp.	αντικατάσταση του fenaminosulf με propamocarb ή metalaxyl
1994	Germeier, C., Hedke, K., Tiedemann, A. von.	<i>Sclerotium rolfsii</i> [<i>Corticium rolfsii</i>]	bromocresolgreen, CaCO ₃ , fenaminosulf, benomyl, rose bengal
1994	Urquhart, E. J., Menzies, J. G., Punja, Z. K.	<i>Tilletiopsis</i> spp.	corn meal agar, ampicillin, dicloran, rose bengal
1994	Steadman, J. R., Marcinkowska, J., Rutledge, S.	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Difco potato dextrose, PCNB, penicillin, streptomycin, bromophenol blue
1994	Togawa, M.	<i>Fusarium graminearum</i>	K ₂ HPO ₄ , KCl, MgSO ₄ ·7H ₂ O, Fe-EDTA, D-(+)-xylose, L-glutamic acid monoso-dium salt, oxgall, Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O, chloramphenicol, triazine, PCNB, agar
1994	Ali, Z., Singh, R. A.	<i>Sclerotium oryzae</i> [<i>Magnaporthe salvinii</i>]	mancozeb, rose bengal
1994	Takehara, T., Kuniyasu, K.	<i>Fusarium oxysporum</i>	potassium chlorate, nitrate
1994	Duffy, B. K., Weller, D. M.	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	tolclofos-methyl, PDA
1995	Chang TunTschu.	<i>Phellinus noxus</i>	malt extract, agar, benomyl, dicloran, ampicillin, gallic acid, tergitol NP-7
1995	Morris, R. A. C., Coley Smith, J. R., Whipps, J. M.	<i>Verticillium biguttatum</i>	PDA
1995	Manandhar, J. B., Hartman, G. L., Wang, T. C.	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	PDA, fenarimol, vinclozolin, chloramphenicol, erythromycin, iprodione, neomycin sulfate, tetraculine hydrochloride
1996	Shimazu, M., Sato, H.	<i>Beauveria bassiana</i>	copper chloride, ζάχαρη είτε crystal violet ή brilliant green
1997	Saaiman, W. C., Smith, Z.	<i>Natrasia mangiferae</i>	benodanil, tannic acid, rose bengal
1997	Iwai, M., Yamada, M., Nakazawa, Y., Hagiya, S.	<i>Botrytis cinerea</i>	benzimidazole, dicarboximide, diethofencarb
1997	Freeman, S., Katan, T.	<i>Colletotrichum acutatum</i>	iprodione, lactic acid
1997	Castella, G., Bragulat, M. R., Rubiales, M. V., Cabanes, F. J.	<i>Fusarium</i> spp.	malachite green
1997	Otieno, W.	<i>Armillaria mellea</i>	malt extract agar, rose bengal, streptomycin sulfate, benomyl, PCNB
1997	Fatemy, S.	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	sodium chloride, PCNB, rose bengal
1998	Gu YuHuan., Ko WenHsiung.	<i>Phytophthora parasitica</i>	metalaxyl, hloroneb
1998	Hanif, M., Haq, I.	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	MM ή PDA με KClO ₃ , KPS (PDA, KClO ₃)
1999	Tsai, J. N., Hsieh, W. H.	<i>Geotrichum candidum</i> και <i>Geotrichum ludwigii</i>	PDA, lactic acid, thiabendazole, iprodione, rose bengal

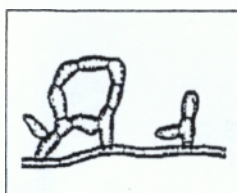
Χρονο- λογία	Συγγραφέας	Είδος μύκητα	Βασικά συστατικά εκλεκτικού υλικού
1999	Howell, C. R.	P και Q γένοι του <i>Trichoderma virens</i>	PDA, rifampicin, chlorothalonil, thiabendazole και PDA, rifampicin, gliotoxin, chlorothanolin
2000	Zhu Ping., Yang JinLing., Zhu HuiXin., Cheng KeDi.	<i>Gibberella fujikuroi</i>	hygromycin B
2000	Ekefan, E. J., Simons, S. A., Nwankiti, A. O., Peters, J. C.	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	penycuron, tolclofos-methyl, streptomycin sulphate, chloramphenicol, chlortetracycline, PDA
2000	Gu, Y. H., Ko, W. H.	<i>Phytophthora parasitica</i> ή <i>P. capsici</i>	streptomycin ή chloramphenicol
2002	Strandberg, J. O.	<i>Alternaria dauci</i> και <i>Alternaria radicina</i>	glucose, sodium polypectate, mineral salts συνδυασμένο με benomyl ή thiophanate-methyl
2002	Yang JiaRong., Shang HongSheng.	<i>Verticillium dahliae</i>	soil extract, KH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄ , sodium urate, sodium galacturonic acid (sodium pectate), sorbosc, Dox salt, Tergitol NP-10, agar, PCNB, chloramphenicol, streptomycin, penicillin
2003	Rumbos, C. I., Sikora, R. A., Kiewnick, S.	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	2,6-dichlor-4-nitroaniline
2003	Williams, J., Clarkson, J. M., Mills, P. R., Cooper, R. M.	<i>Trichoderma harzianum</i>	chloramphenicol, streptomycin, PCNB, propamocarb
2003	Gielen, S., Aerts, R., Seels, B.	<i>Botrytis cinerea</i>	fenarimol, maneb, PCNB
2003	Fernandez Pavia, S. P., Rodriguez Alvarado, G., Sanchez Yanez, J. M.	<i>Phytophthora capsici</i>	maize meal agar, ampicillin, pimaricin, rifampicin, PCNB
2003	Matsumoto, M.	<i>Rhizoctonia</i> spp.	metalaxyl, benomyl
2003	Yang, H. R., Ko, W. C., Ann, P. J., Tsai, J. R., Cheng, Y. H.	<i>Peronophythora litchii</i>	prochloraz E.C., iprodione F.P., kasugamycin, carbendazim W.P., ampicillin, V-8 juice agar
2004	Hong, S. G., Pryor, B. M.	<i>Alternaria</i> spp.	thiabendazole

ΝΗΜΑΤΩΒΟΡΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ

Οι νηματώβροιοι μύκητες είναι μύκητες που μπορούν να συλλάβουν, να σκοτώσουν και να χωνέψουν νηματώδεις. Ανάλογα με τον τρόπο προσβολής τους διακρίνονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες μυκήτων: τους μύκητες που σχηματίζουν παγίδες για να συλλάβουν τους νηματώδεις (αρπακτικοί μύκητες), τους ενδοπαρσιτικούς μύκητες που "επιτίθενται" στους ζωντανούς νηματώδεις χρησιμοποιώντας ειδικές κατασκευές και τους ωο- και κυστοπαρασιτικούς μύκητες που παρασιτούν με υφές, τα αυγά ή τις κύστες των νηματωδών.

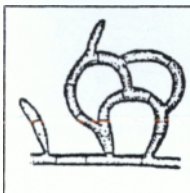
Οι νηματώβροιοι μύκητες εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία ως προς τους παγιδευτικούς μηχανισμούς και τις αντίστοιχες δομές που αναπτύσσουν. Ο τύπος παγίδας που σχηματίζεται σε κάθε είδος είναι χαρακτηριστικός του είδους και εξαρτάται και από το (βιοτικό & αβιοτικό) περιβάλλον. Οι νηματώβροιοι μύκητες που σχηματίζουν παγίδες, έχουν αναπτύξει πολύπλοκες μυκηλιακές κατασκευές (Nordbring-Hertz, B., et al, 2002) που συλλαμβάνουν τους νηματώδεις με προσκόλληση ή μηχανικά όπως:

❶ Κολλώδεις διακλαδώσεις (adhesive branches):



Είναι κοντές, πλευρικές μυκηλιακές διακλαδώσεις με μερικά μακριά κύτταρα, που μερικές φορές συνδέονται για να σχηματίσουν δισδιάστατα δίχτυα. Οι νηματώδεις παγιδεύονται στις διακλαδώσεις με προσκόλληση. Παράδειγμα τέτοιου μύκητα αποτελεί ο *Monacrosporium cionopagum*.

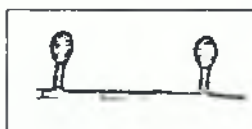
❷ Κολλώδη τρισδιάστατα δίχτυα (adhesive networks):



Τα δίχτυα προέρχονται από κοντές, πλευρικές μυκηλιακές διακλαδώσεις οι οποίες σγουραίνουν και αναστομώνονται μ' άλλες παρόμοιες διακλαδώσεις ή με τη γονική υφή και έτσι σχηματίζεται η θηλειά. Από αυτή τη θηλειά, άλλες θηλειές μπορούν να παραχθούν, σχηματίζοντας μια περίπλοκη τρισδιάστατη κατασκευή. Οι νηματώδεις πιάνονται στα δίχτυα με περιτύλιξη και προσκόλληση.

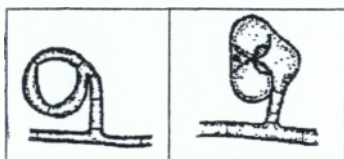
Παράδειγμα τέτοιου μύκητα αποτελεί ο *Arthrobotrys oligospora*, που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα μελέτη.

❸ Κολλώδεις κόμπιοι (adhesive knobs):



Μικρά σφαιρικά ή υποσφαιρικά κύτταρα σχηματίζονται πάνω σε 1 ή 2 κυτταρικές πλευρικές υφές. Μόνο το τελευταίο κύτταρο είναι κολλώδες. Παράδειγμα τέτοιου μύκητα αποτελεί ο *Monacrosporium gephyropagum*.

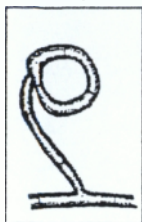
❹ Συσφικτικά δακτυλίδια ανοικτά και κλειστά (constricting rings):



Τα δακτυλίδια συνήθως ξεκικούν από δικύτταρες πλευρικές διακλαδώσεις που τελικά καταλήγουν να αποτελούνται από τρία κύτταρα που σχηματίζουν δακτύλιο και συνδέονται με το μητρικό μυκήλιο με κοινό μίσχο. Αν ο νηματώδης περάσει μέσα από το δακτυλίδι

και ερθει σ' επαφή μ' αυτό, τα τρία κύτταρα ξαφνικά μεγενθύνονται και παγιδεύουν το νηματώδη. Παράδειγμα τέτοιου μύκητα αποτελεί ο *Arthrobotrys dactyloides*, που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα μελέτη.

⑤ Μη συσφικτικά δακτυλίδια (non-constricting rings):



Παρόμοια στην κατασκευή με τα συσφικτικά δακτυλίδια, αυτά αποτελούνται από τρία κυρτά κύτταρα. Αν ο νηματώδης περάσει μέσα από το δακτυλίδι και επιχειρήσει να παραβιάσει τη δίοδο από τη μια πλευρά στην άλλη, σφηνώνεται σ' αυτό και είναι ανίκανος να διαφύγει. Τα δακτυλίδια είναι μη κολλώδη. Παράδειγμα τέτοιου μύκητα αποτελεί ο *Dactylaria candida* (Cooke R.C., 1964).

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΠΑΓΙΔΕΥΤΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΩΝ

Κάτω από ορισμένες συνθήκες, ο *Arthrobotrys suberba* μπορεί να μην αναπτύσσει ολοκληρωμένα δίχτυα αλλά να συλλαμβάνει τους νηματώδεις με απλές κολλώδεις διακλαδώσεις. Οι κολλώδεις διακλαδώσεις κανονικά σχηματίζονται αυθόρμητα στο *Monacrosporium gephyropagum*. Σποραδικά τέτοιες διακλαδώσεις μπορεί να συνδυαστούν για να σχηματίσουν απλά δακτυλίδια. Κολλώδεις κόμποι σχηματίζονται πάνω σε λεπτούς μίσχους του *M. haptotylum*. Αυτά τα είδη παράγουν επίσης μη συσφικτικά δακτυλίδια σε λεπτούς μίσχους.

Το αν θα σχηματιστούν όμως παγίδες και σε τι ποσότητα, εξαρτάται από το είδος ή τις περιβαλλοντικές συνθήκες του μύκητα, βιοτικές και αβιοτικές. Ο πιο σημαντικός βιοτικός παράγοντας σχηματισμού παγίδων είναι οι ζώντες νηματώδεις, οι οποίοι με τη παρουσία τους διεγείρουν το σχηματισμό κατασκευής παγίδων.

Μερικά είδη (π.χ. *A. suberba*) μπορεί να συλλάβουν νηματώδεις πάνω στα αρχικά κολλώδη δίχτυα ή ακόμα και στις κολλώδεις υφές, όπως στους *Stylorape* spp. και *Cystorape* spp. Επιπλέον, οι παγίδες μπορούν να σχηματιστούν κατευθείαν πάνω στη βλαστική υφή των κονιδίων, σχηματίζοντας τις λεγόμενες κονιδιακές παγίδες. Αυτό συμβαίνει σχεδόν σ' όλα τα είδη που σχηματίζουν παγίδες όταν τα κονίδια είναι σε θέση να βλαστήσουν σε φυσικές συνθήκες, όπως σε κοπριά αγελάδας ή στο έδαφος της ριζόσφαιρας. (Nordbring-Hertz B., et al, 2002).

Οι ενδοπαρασιτικοί, από την άλλη πλευρά, όπως οι *Drechmeria coniospora*, *Hirsutella rhossoliensis* και *Catenaria anguillulae* επιτίθενται στους νηματώδεις με τα σπόρια τους, που είτε προσκολλώνται στην επιφάνεια του νηματώδη ή καταπίνονται από αυτούς. Ανεξάρτητα από τη μέθοδο μόλυνσης, το αποτέλεσμα είναι πάντα το ίδιο: ο θάνατος του νηματώδη.

ΤΟ ΓΕΝΟΣ ARTHROBOTRYS

Η συστηματική κατάταξη του γένους *Arthrobotrys* είναι

Γένος: *Arthrobotrys*

Υποοικογένεια: Hyalodidymae

Οικογένεια: Moniliaceae

Τάξη: Moniliales (Hyphomycetes)

Κλάση: Deuteromycetes

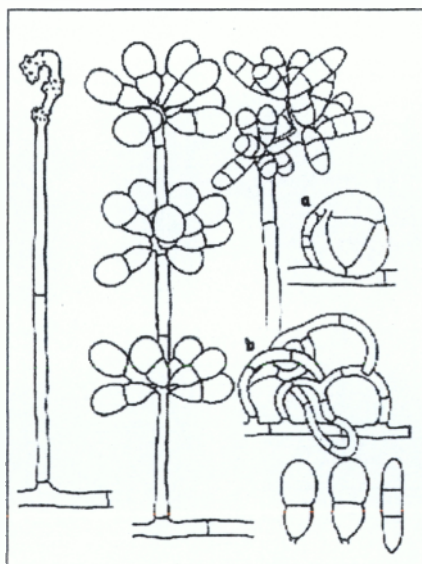
Υποδιαίρεση: Eumycota

Ένα έδαφος μπορεί να περιέχει 10-15 διαφορετικά είδη νηματώδων μυκήτων. Ο *Arthrobotrys* spp. φαίνεται να είναι ο πιο κοινός στα περισσότερα έδαφη, με τον *A. oligospora* να εμφανίζεται πιο συχνά σε εύκρατες περιοχές και τον *A. musiformis* σε τροπικές περιοχές, αν και τα δύο είδη είναι συνήθως πανταχού παρόντα. Είναι αναμφίβολα σημαντικοί στο να ελέγχουν ορισμένους νηματώδεις, συμπεριλαμβανομένων αυτών που προκαλούν καταστροφές στις καλλιέργειες. (Nordbring-Hertz B., et al, 2002).

Χαρακτηρίζονται από ψηλούς, σκούρους κονιδιοφόρους που φέρουν συστάδες από σπόρια στην άκρη. Τα σπόρια είναι υαλώδη, δυ- και τρικύτταρα και αφήνουν εμφανή σημάδια (σουλές) στους κονιδιοφόρους όταν "ελευθερώνονται".

Όλα τα είδη του *Arthrobotrys* είναι πιθανότατα αρπακτικοί των νηματώδων. Χρησιμοποιούν διάφορες κατασκευές για να συλλάβουν τους νηματώδεις,

συμπεριλαμβανομένων (α) των συσφικτικών δακτυλιδιών και (β) των κολλώδων δίχτων από θηλιές. Όταν ο νηματώδης, έχει ως σκοπό την αναζήτηση βακτηρίων και άλλων μικρών εδώδιμων κομματιών τροφής, εισέρχεται σ' ένα από τα συσφικτικά δακτυλίδια, τα κύτταρα του δακτυλιδιού ξαφνικά διογκώνονται και ο νηματώδης παγιδεύεται. Η συσφικτική δράση αυτών των δακτυλιδιών είναι τόσο ισχυρή όπου ο νηματώδης είναι σχεδόν κομμένος στη μέση. Όταν ο νηματώδης εισέρχεται στα κολλώδη δίχτυα με τις θηλιές κρατιέται από μία πολύ δυνατή "κόλλα" και είναι ανίκανος να διαφύγει. Και στις δύο περιπτώσεις, ο αιχμαλωτισμένος νηματώδης πρώτα αγωνίζεται σκληρά και μετά φαίνεται να ναρκώνεται. Ο μύκητας τότε αναπτύσσει υφές μέσα στο νηματώδη και τον χωνεύει. Όταν έχει αποκτήσει αρκετές θρεπτικές ουσίες από τη λεία του ο μύκητας αναπτύσσεται παράγοντας συστάδες από κονίδια στην άκρη των κονιδιοφόρων.



Εικόνα 1: Κονιδιοφόροι, παγίδες και σπόρια του γένους *Arthrobotrys* spp.

Οι μύκητες *Arthrobotrys* spp. γενικά έχουν μεγαλύτερη δυνατότητα σαπροφυτικής επιβίωσης από τους ενδοπαρασιτικούς. Πολλοί από τους *Arthrobotrys* spp. δεν σχηματίζουν αυθόρμητα παγίδες αλλά αυτό εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, ιδιαίτερα την παρουσία νηματώδων. Κατασκευές παγίδευσης από άλλους μύκητες, όπως διακλαδώσεις, κόμποι και συσφικτικά δακτυλίδια, μπορεί να σχηματίζονται αυθόρμητα, δείχνοντας έτσι τη μεγάλη ανάγκη αυτών των μυκήτων για τους νηματώδεις ως θρεπτική πηγή. (Nordbring-Hertz B., et al, 2002).

ARTHROBOTRYS DACTYLOIDES

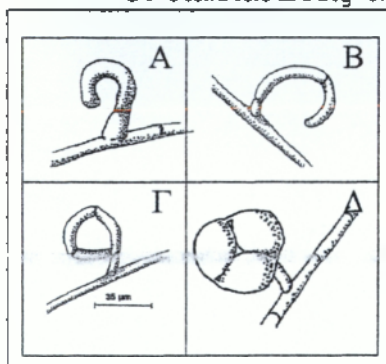
Ο νηματώβρορος μύκητας *Arthrobotrys dactyloides* αναπτύσσεται σε πολλά θρεπτικά υλικά. Η αποικία του έχει μορφή ακτινωτή και το μυκήλιο είναι υαλώδες και φέρει σέπτα. Το πλάτος των υφών είναι μεταξύ 2 και 5μ. Οι κονιδιοφόροι είναι και αυτοί υαλώδες, με σέπτα και κατακόρυφοι.

Το μήκος τους κυμαίνεται από 200-400μ, το πλάτος τους στη βάση είναι 4-6μ και καθώς προχωράει προς την άκρη λεπταίνει και η διάμετρος κυμαίνεται από 2,3-3,5μ. Στη κορυφή των κονιδιοφόρων βρίσκονται τα στηρίγματα που φέρουν συστάδες με 4-13 κονίδια. Τα κονίδια είναι υαλώδη, δικύτταρα και συνήθως επιμήκη ελλειψοειδή. Η μέση απόσταση όπου βρίσκεται το σέπτο είναι τα 20,5μ από τη βάση. Στη κορυφή είναι στρογγυλεμένα και στη βάση ελαφρώς πιο κυρτά. (Drechsler C., 1937).

Ο μύκητας *Arthrobotrys dactyloides* παράγει το πιο πολύπλοκο και αξιοσημείωτο είδος παγίδας που είναι το λεγόμενο "συσφικτικό δακτυλίδι". Τα συσφικτικά δακτυλίδια αποτελούνται από τρία κυρτά κύτταρα που ενώνονται σ' έναν κοντό δικύτταρο ποδίσκο. Παράγονται σε διαστήματα κατά μήκος μιας μυκηλιακής υφής και συνήθως μεγαλώνουν από τη δεξιά του γωνία. Όταν εισέρχεται ο νηματώδης, τα κύτταρα που περιλαμβάνουν το δακτυλίδι φουσκώνουν γρήγορα και εξαλείφουν το μεταξύ τους κενό.

Ο νηματώδης παγιδεύεται, ο μύκητας εισέρχεται σ' αυτόν από τα κύτταρα του δακτυλιδιού και εξαπλώνεται παντού, απορροφώντας το περιεχόμενο του.

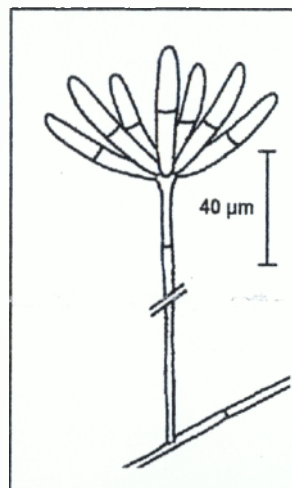
Οι διακλαδώσεις της υφής που πρόκειται να εξελιχθούν σε δακτύλιο είναι



Εικόνα 3: Μηχανισμός σχηματισμού του συσφικτικού δακτυλιδιού

ιδιαιτέρα εύρωστες και ευκόλως αναγνωρίσιμες. Καθώς επεκτείνονται αυτές οι ειδικές διακλαδώσεις εμφανίζονται σαν άγκιστρα που στη συνέχεια η άκρη τους συγκλίνει προς το μίσχο όπου αναστομώνονται και σχηματίζουν τον παγιδευτικό δακτύλιο (Εικόνα 3. Α-Γ). Μετά τις αναστομώσεις, τα τρία κύτταρα που περιλαμβάνουν το δακτυλίδι αυξάνονται σε μέγεθος. Έτσι το καθένα καταλήγει με πλάτος μεταξύ 5-8μ και μήκος μεταξύ 20-32μ. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι το φούσκωμα των κυττάρων των συσφικτικών δακτυλίων συμβαίνει από τη διαστολή του εσωτερικού τοιχώματος των κυττάρων, ενώ η εξωτερική περιφέρεια του δακτυλιδιού παραμένει αμετάβλητη (Estey R. H. & Thean S. S., 1976). Το κλείσιμο του δακτυλιδιού

μπορεί να γίνει θίγοντας μηχανικά το εσωτερικό του δακτυλιδιού με αύξηση της θερμοκρασίας. Το φούσκωμα είναι εξαιρετικά γρήγορο, χρειάζεται λιγότερο από 0,1 sec, και ο όγκος του κυττάρου είναι περισσότερος από το τριπλάσιο (Εικόνα 3. Δ). Κάτω από φυσικές συνθήκες, τα δακτυλίδια συσφίγγονται όταν οι νηματώδεις εισέρχονται στα ανοίγματα τους. (Higgins M. L. & Pramer D., 1967).



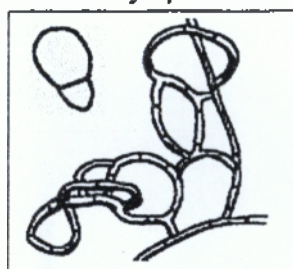
Εικόνα 2: Κονιδιοφόρος του *A. dactyloides*

ARTHROBOTRYYS OLIGOSPORA

Ο νηματώβoρος μύκητας *Arthrobotryys oligospora* αναπτύσσεται σε πολλά θρεπτικά υλικά. Η αποικία του έχει μορφή ακτινωτή, και το μυκήλιο είναι υαλώδες και φέρει σέπτα.

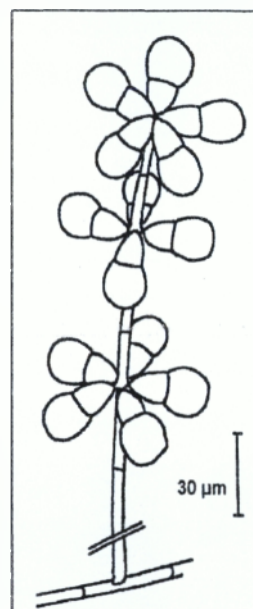
Το πλάτος των υφών κυμαίνεται από 2-6μ. Οι κονιδιοφόροι είναι και αυτοί υαλώδεις, κατακόρυφοι και φέρουν σέπτα. Το μήκος των κονιδιοφόρων είναι μεταξύ 350-450μ, η διάμετρος της βάσης είναι 7-10μ και πιο λεπτοί στη κορυφή 4-6,5μ. Οι κονιδιοφόροι στη κορυφή τους φέρουν πάνω στα στηρίγματα 20-30 συστάδες με 5-20 κονίδια. Τα κονίδια είναι υαλώδη, δικύτταρα, ωσειδή με μυτερή άκρη και συσφιγμένα στο σημείο του σέπτου. Το μήκος τους κυμαίνεται από 22-32μ και το πλάτος τους από 12-20μ. (Drechsler C., 1937).

Ο παγιδευτικός μηχανισμός του *Arthrobotryys oligospora* χαρακτηρίζεται από ένα πλήρως αναπτυγμένο κολλώδες τρισδιάστατο δίχτυ. Τα τρισδιάστατα αυτά δίχτυα περιβάλλονται από ένα στρώμα από πολυμερή ίνες ακόμα και πριν από την αλληλεπίδραση με τους νηματώδεις.



Εικόνα 5: Σπόριο και δίχτυα παγίδευσης του *A. oligospora*

Μετά την επαφή, αυτές οι ίνες πηγαίνουν κατευθείαν κάθετα στην επιφάνεια του ξενιστή, ίσως για να διευκολύνουν την αγκυροβόληση και περισσότερο την εισβολή του νηματώδη. Σε επόμενο στάδιο ένας σωλήνας διείσδυσης σχηματίζεται και διαπερνά την επιδερμίδα του νηματώδη. Αυτό το στάδιο περιλαμβάνει και τη δραστηριότητα των υδρολυτικών



Εικόνα 4: Κονιδιοφόρος του *A. oligospora*

ενζύμων καθιστώντας ευδιάλυτα τα μεγαλομόρια της επιδερμίδας του παγιδευμένου νηματώδη και τη δραστηριότητα μιας μηχανικής πίεσης που παράγεται από τις αναπτυσσόμενες διεισδυτικές υφές. Η επιδερμίδα του νηματώδη αποτελείται κυρίως από πρωτεΐνες και διάφορες πρωτεάσες έχουν απομονωθεί από τους νηματώβoρους μύκητες οι οποίες μπορούν να υδρολύνουν τις πρωτεΐνες της επιδερμίδας. Μετά τη διείσδυση, ο νηματώδης χωνεύεται από το μύκητα. Μόλις εισχωρήσει ο νηματώδης, ο αγωγός διείσδυσης του μύκητα διογκώνεται δίνοντας σχήμα λάμπας. (Nordbring-Hertz B., et al, 2002). Ο *A. oligospora* είναι ένας από τους νηματώβoρους μύκητες που είναι ικανός να σχηματίζει κονιδιακές παγίδες (conidial traps) πάνω σε επιφάνειες water agar που υπάρχει και γόνιμο έδαφος. Οι κονιδιακές παγίδες είναι κολλώδεις κατασκευές που σχηματίζονται όρθιες κατά τη βλάστηση των κονιδίων, χωρίς τη μεσολάβηση της φάσης της βλαστικής υφής. Τέτοια παραδείγματα υποδηλώνουν μια αυξημένη ικανότητα σ' αυτούς τους μύκητες να μειώνουν τον αριθμό των νηματώδων στο περιβάλλον. (Nordbring-Hertz B., et al, 1995).

ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΕΚΛΕΚΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Ως αντιβιοτικά ορίζονται οι χημικές ουσίες μικρού σχετικά μοριακού βάρους (<2000) που παράγονται από μύκητες, βακτήρια και άλλους οργανισμούς (αλλά και συνθετικά) και μπορούν να σκοτώνουν ή να παρεμποδίζουν την αύξηση άλλων μικροοργανισμών.

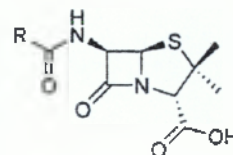
Η ανάγκη για φάρμακα που βοηθούν στη πρόληψη ή θεραπεία ασθενειών και ζώων, έδωσε τεράστια ώθηση στην έρευνα και ανακάλυψη πολλών αντιβακτηριακών αντιβιοτικών.

Τα αντιβιοτικά έχουν εκλεκτική τοξική δράση, δηλαδή είναι πολύ τοξικά σε ορισμένους μικροοργανισμούς -κυρίως σε βακτήρια- και σ' άλλους οργανισμούς είναι σχεδόν ή τελείως αβλαβή.

Στα εκλεκτικά υλικά απομόνωσης μυκήτων τα αντιβιοτικά χρησιμεύουν για την παρεμπόδιση των βακτηρίων.

Πενικιλίνη (Penicillin): $R-C_9H_{11}N_2O_4S$

Η πενικιλίνη είναι το πρώτο αντιβιοτικό που ανακαλύφτηκε από τον Alexander Fleming το 1929, αλλά σε καθαρή χημική μορφή μπόρεσε να παραχθεί μόλις το 1939. Παράγεται από μύκητες του γένους *Penicillium* εξού και το όνομα. Είναι τοξική μόνο στα θετικά κατά Gram βακτήρια, στα οποία παρεμποδίζει τη σύνθεση του πολυπεπτιδικού κυτταρικού τους τοιχώματος. Έχει σχετικά καλή διαλυτότητα στο νερό και χρησιμοποιείται ευρέως στα εκλεκτικά υλικά για τη παρεμπόδιση μιας μεγάλης ομάδας βακτηρίων.

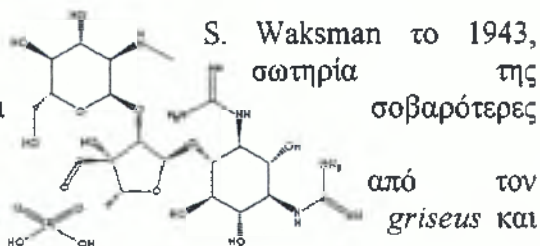


Στρεπτομυκίνη (Streptomycin): $(C_{21}H_{39}N_7O_{12})_2 (H_2SO_4)_3$

Η στρεπτομυκίνη ανακαλύφτηκε από τους προσφέροντας μαζί με την πενικιλίνη τη ανθρωπότητας από τις περισσότερες και μολυσματικές ασθένειες.

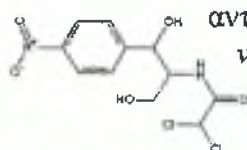
Ανήκει στα αμινογλυκοζίδια, παράγεται ακτινομύκητα (βακτήριο) *Streptomyces* είναι υδατοδιαλυτή.

Χρησιμοποιείται μαζί με την πενικιλίνη στα εκλεκτικά υλικά, παρεμποδίζοντας όλα σχεδόν τα βακτήρια που βρίσκονται στο έδαφος.



Χλωραμφαινικόλη (Chloramphenicol): $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$

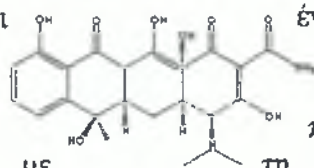
Η χλωραμφαινικόλη είναι ένα αντιβιοτικό που παράγεται από το βακτήριο *Streptomyces venezuelae*.



Είναι αποτελεσματικό εναντίον μεγάλου εύρους θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Σταματάει τη βακτηριακή ανάπτυξη με πρόσδεση επί του 50S τμήματος του βακτηριακού ριβοσώματος και την παρεμπόδιση έτσι της πρωτεϊνικής σύνθεσης.

Τετρακυκλίνη (Tetracycline): $C_{22}H_{24}N_2O_8$

Η τετρακυκλίνη είναι ένα αντιβιοτικό με ευρύ φάσμα αντιβακτηριακής δράσης. Ανήκει στην οικογένεια των τετρακυκλινών.



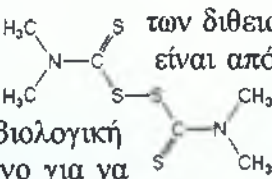
Η τετρακυκλίνη παρεμποδίζει τη βακτηριακή πρωτεϊνική σύνθεση με τη σύνδεση στο τμήμα 30S του βακτηριακού ριβοσώματος. Η τετρακυκλίνη παρεμποδίζει την ανάπτυξη παρά σκοτώνει τα βακτήρια.

Μυκητοκτόνα

Τα μυκητοκτόνα είναι χημικές ουσίες που σκοτώνουν ή παρεμποδίζουν την ανάπτυξη μυκήτων. Χρησιμοποιούνται σήμερα ευρέως στη γεωργική πράξη και ταξινομούνται σε ομάδες με βάση τη χημική τους δομή ή το τρόπο δράση τους.

Thiram: $C_6H_{12}N_2S_4$

Το thiram ανήκει στην ομάδα των διθειοκαρβαμιδικών μυκητοκτόνων. Ο μηχανισμός δράσης του δεν είναι απόλυτα γνωστός αλλά φαίνεται ότι δεσμεύει μέταλλα ή σχηματίζει σύμπλοκα με τα ένζυμα παρεμποδίζοντας τη βιολογική τους δράση. Το thiram χρησιμοποιείται ως μυκητοκτόνο για να εμποδίζει τη καταστροφή της καλλιέργειας και για να προστατεύει τη συγκομιδή από χειροτέρευση στην αποθήκευση ή στη μεταφορά.

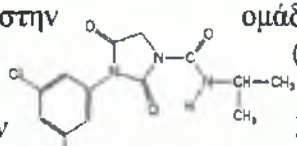


Στο έδαφος το thiram αποσυντίθεται με μικροβιακή δράση ή με υδρόλυση κάτω από όξινες συνθήκες. Το thiram επίσης προσροφάται στο έδαφος και δεν εξατμίζεται από υγρή ή ξηρή επιφάνεια εδάφους.

Έχει μικρή διαλυτότητα στο νερό (30 mg/L).

Iprodione: $C_{13}H_{13}Cl_2N_3O_3$

Το iprodione ανήκει στην ομάδα των αρωματικών υδρογονοαθράκων και δικαρβοξυμιδικών (AHDs). Το iprodione χρησιμοποιείται ως προστατευτικό μυκητοκτόνο και προκαλεί υπεροξειδωσή των λιπιδίων της μιτοχονδριακής και πυρηνικής μεμβράνης αλλά και του ενδοπλασματικού δικτύου των ευαίσθητων σ' αυτό μυκήτων. Επίσης, προκαλεί θραύσεις των χρωματοσωμάτων κατά τη μίτωση, γι' αυτό και εμφανίζει γενετική δραστηριότητα.



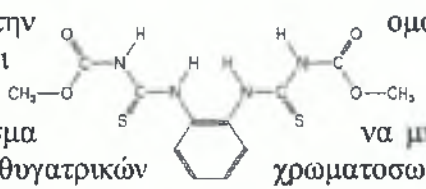
Έχει μικρή διαλυτότητα στο νερό (13 mg/L).

Χαρακτηριστικό της ομάδας αυτής είναι ότι η ανάπτυξη ανθεκτικότητας με μεταλλαγή ενός μύκητα σ' ένα μέλος της ομάδας, συνεπάγεται πάντα ανθεκτικότητα και σε όλα τα άλλα μέλη της ίδιας ομάδας μυκητοκτόνων.

Το iprodione χρησιμοποιείται για τον έλεγχο μιας μεγάλης ποικιλίας ασθενειών που προκαλούν μύκητες.

Thiophanate-methyl: C₁₂H₁₄N₄O₄S₂

Το thiophanate-methyl ανήκει στην βενζιμιδαζολικών. Είναι διασυστηματικό μυκητοκτόνο που παρεμποδίζει το σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου με αποτέλεσμα να μην γίνεται σωστά ο αποχωρισμός των θυγατρικών χρωματοσωμάτων.



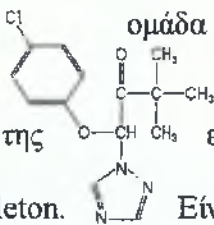
Το thiophanate-methyl χρησιμοποιείται για να ελέγχει τους μύκητες στις καλλιέργειες. Είναι συστηματικό μυκητοκτόνο που χρησιμοποιείται για έλεγχο μεγάλου φάσματος ασθενειών που οφείλονται σε μύκητες όπως *Botrytis*, *Cercospora*, *Cylindrocladium*, *Fusarium*, *Phamopsis* και *Rhizoctonia*.

Το thiophanate-methyl απορροφάται από τα κύτταρα των μυκήτων και παρεμβαίνει με τη λειτουργία των μικροσωλήνων, που χωρίζουν σε δύο μέρη το DNA του χρωμοσώματος. Τα κύτταρα δεν μπορούν να χωριστούν έτσι η ανάπτυξη εμποδίζεται. Το thiophanate-methyl αποδομείται γρήγορα στο έδαφος και έχει μικρή επίδραση στα βακτήρια του εδάφους.

Έχει μικρή διαλυτότητα στο νερό (22 mg/L).

Triadimefon: C₁₄H₁₆ClN₃O₁

Το triadimefon ανήκει στην εργοστερόλης που αποτελούν ομάδα διασυστηματικών μυκητοκτόνων. Το triadimefon παρεμποδίζει τη βιοσύνθεση της εργοστερόλης η οποία βρίσκεται στις μεμβράνες των μυκήτων.



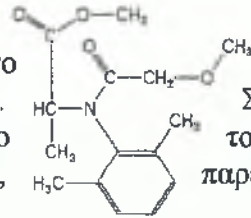
Είναι γνωστο και σαν Bayleton. Είναι διασυστηματικό μυκητοκτόνο στην οικογένεια των τριαζολών. Χρησιμοποιείται για να ελέγχει ασθένειες όπως τα ωΐδια κ.α.

Έχει ικανοποιητική διαλυτότητα στο νερό (260 mg/L).

Αν ελευθερωθεί στο έδαφος ή στο νερό, το triadimefon μπορεί να υποστεί αποδόμηση. Οι μύκητες του εδάφους έχουν δείξει ότι μεταβολίζουν το triadimefon σε triadimenol που είναι επίσης μυκητοκτόνο.

Metalaxyl: C₁₅H₂₁NO₄

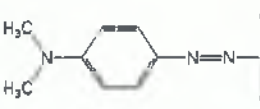
Το metalaxyl ανήκει στην ομάδα των φαινυλαμιδίων. Είναι διασυστηματικό μυκητοκτόνο εξειδικευμένο για την καταπολέμηση των Ωμομυκήτων. Σταματάει την ανάπτυξη των παθογόνων μετά την είσοδο του στο φυτό και αφού σχηματίσει τον πρώτο μυζητήρα, παρεμποδίζει τη βιοσύνθεση του RNA.



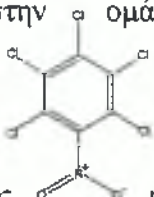
Απορροφάται από τις ρίζες, τους μίσχους και τα φύλλα των φυτών και χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση ασθενειών που οφείλονται σε φυκομύκητες.

Έχει καλή διαλυτότητα στο νερό (8400 mg/L).

Fenaminosulf: $C_8H_{10}N_3NaO_3S$

Το fenaminosulf είναι  μυκητοκτόνο που δεν μπορεί να καταταγεί σε καμία από τις γνωστές ομάδες μυκητοκτόνων. Είναι βενζοδιαζοσουλφονικό, γνωστό και σαν "Dexon" και παρεμποδίζει την αναπνοή αλλά επειδή είναι φωτοδιασπώμενο χρησιμοποιείται αποκλειστικά για εφαρμογές στο έδαφος. Φαίνεται να εμποδίζει τη μιτοχονδριακή λειτουργία και να αποδομείται στο έδαφος.

PCNB: C_6Cl_5NO

Το PCNB ανήκει στην ομάδα των οργανοχλωριόμενων μυκητοκτόνων. Είναι επίσης γνωστό και σαν quintozene  και σαν υδρογονάνθρακας και αδρανοποιεί τα αμινοξέα, τις πρωτεΐνες και τα ένζυμα αντιδρώντας με την αμινική και θειολική ομάδα. Χρησιμοποιείται ως μυκητοκτόνο εδάφους στον αγρό και στο θερμοκήπιο. Επίσης χρησιμοποιείται ως σπορό-επενδυτικό μυκητοκτόνο για να ελέγχει μολύνσεις των νεαρών φυτών από μύκητες.

Χρωστικές

Πράσινο του μαλαχίτη (Malachite green):

Είναι μια συνθετική χρωστική που αρχικά χρησιμοποιήθηκε στη βαφή υφασμάτων, καθώς έχει εκλεκτική τοξική δράση στους μύκητες και τα πρωτόζωα.

Rose bengal:

Είναι μια χρωστική που χρησιμοποιείται ως χρώμα στη βιομηχανία και ως βιολογική χρωστική στη βιολογία και την ιατρική. Στα εκλεκτικά υλικά χρησιμοποιείται ως βακτηριοστατικό και για τον περιορισμό αύξησης των αποικιών των μυκήτων.

Άλλες χημικές ουσίες

Oxgall:

Είναι γνωστό και ως oxbile. Το oxgall είναι μίγμα χολικών αλάτων, ακατέργαστο, όπως λαμβάνεται από τη χολή βοδιού για χρήση σε προετοιμασία μικροβιολογικών υλικών καλλιέργειας. Χρησιμοποιείται ως εκλεκτικός παράγοντας για την απομόνωση αρνητικών κατά Gram μικροοργανισμών, παρεμποδίζοντας τα θετικά κατά Gram βακτήρια.

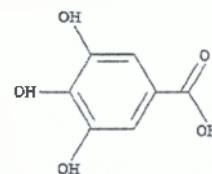
Γαλλικό οξύ (Gallic acid): $C_6H_2(OH)_3CO_2H$

Το γαλλικό οξύ είναι οργανικό οξύ και είναι γνωστό και ως 3,4,5-trihydroxybenzoic acid. Βρίσκεται ελεύθερο και σαν μέρος των ταννίνων.

Το γαλλικό οξύ βρίσκει κυρίως χρήση ως αντιβακτηριακό.

Παράγεται από φυτά ή από την υδρόλυση του ταννικού οξέος μεθειικό οξύ και χρησιμοποιείται στη βιομηχανία για τη σύνθεση ποικίλων ουσιών.

Το γαλλικό οξύ είναι τοξικό σε πολλούς μύκητες, ενώ άλλοι το χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα και ενέργειας.



Tergitol:

Alkyl sodium sulfate (ανιονικό) και Polyglycol ether (μη ιονικό) επιφανειοδραστικό (απορροπαντικό).

Η tergitol χρησιμοποιείται για να περιορίζει την αποικιακή ανάπτυξη χωρίς όμως να επηρεάζει την εναέρια μυκηλιακή ανάπτυξη ή μορφολογία.

Η tergitol επιτρέπει μερική εξάπλωση της αποικίας και περιορίζει μόνο την αύξηση της υψής.

Εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract):

Το εκχύλισμα ζύμης χρησιμοποιείται στα υλικά καλλιέργειας μυκήτων για να τους δώσει αυξητικούς παράγοντες, κυρίως βιταμίνες.

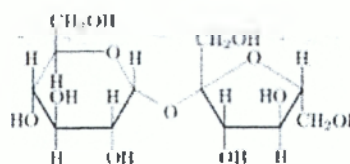
Πεπτόνη (Peptone):

Η πεπτόνη είναι υδρολυμένη πρωτεΐνη βοδινού κρέατος.

Είναι χρήσιμο υλικό καλλιέργειας μυκήτων γιατί είναι πλούσιο σε αμινοξέα.

Σακχαρόζη (Saccharose): $C_{12}H_{22}O_{11}$

Πρόκειται για την κοινή ζάχαρη (κάθε μόριο της σακχαρόζης αποτελείται από γλυκόζη και φρουκτόζη) και χρησιμοποιείται στα υλικά καλλιέργειας μυκήτων ως πηγή άνθρακα και ενέργειας.



Οι πληροφορίες για τις χημικές ουσίες προέρχονται από:

- i. (<http://www.wikipedia.the.free.encyclopedia.htm>)
- ii. (Δημόπουλος Βασίλης, 1998)
- iii. (<http://www.pesticide.information.profiles.htm>)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Για την εκτέλεση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω θρεπτικά υλικά ανάπτυξης:

1. Compost Extract (C.E.)

- ◊ Κομπόστα (Klasmann) 400gr
- ◊ Απιονισμένο νερό 1,5lt

● Παρασκευή πυκνού εκχυλίσματος κομπόστας (Stock solution)

Για την παρασκευή του εκχυλίσματος κομπόστας (compost extract) χρησιμοποιούνταν μια κωνική φιάλη των 3lt στην οποία είχε προστεθεί 400gr κομπόστα (οργανικό υπόστρωμα ανάπτυξης φυτών εισαγωγής, Klasmann) και 1.5lt απιονισμένο νερό. Αφού βραζόταν για 30min (από τη στιγμή που το διάλυμα έπαιρνε βράση), αφηνόταν να κρυώσει καλά και ακολουθούσε διήθηση. Αρχικά η διήθηση γινόταν με κόσκινα 123μ και 35μ με σκοπό την κατακράτηση των μεγάλων στερεών κομματιών και μετά με διηθητικό χαρτί. Η διαδικασία με το διηθητικό χαρτί επαναλαμβανόταν αρκετές φορές (περίπου 4), μέχρι το διηθημένο διάλυμα να αποκτήσει ανοιχτό και διαυγές χρώμα.

2. Maize Agar (M.A.)

- ◊ Καλαμπόκι 200gr
- ◊ Άγαρ (Biocar Diagnostics) 15gr
- ◊ Απιονισμένο νερό 4lt

● Παρασκευή maize agar

Για τη παρασκευή του maize agar χρησιμοποιούνταν μια κωνική των 5lt στην οποία είχε προστεθεί 200gr θρυμματισμένο καλαμπόκι και 4lt απιονισμένο νερό. Αφού βραζόταν για 2h, αφηνόταν να κρυώσει και ακολουθούσε διήθηση με τουλπάνι.

Επίσης ανάλογα με την πυκνότητα του υλικού που επιθυμούσαμε να χρησιμοποιήσουμε, προσθέταμε και την ανάλογη ποσότητα agar, ώστε να υπάρχει η αναλογία 15gr agar στο 1lt του θρεπτικού υλικού. Στο τέλος τοποθετώνταν σε μια κωνική φιάλη, θερμαινόταν με συνεχή ανακίνηση, για να διαλυθεί το άγαρ, μέχρι να πάρει βράση το διάλυμα.

3. Plain Agar (P.A.)

- ◊ Άγαρ (Biocar Diagnostics) 15gr
- ◊ Απιονισμένο νερό 4lt

● Παρασκευή plain agar

Για την παρασκευή του plain agar χρησιμοποιούνταν μια κωνική φιάλη των 2lt στην οποία είχε προστεθεί 15gr agar και 1lt απιονισμένο νερό. Μετά απλώς ανακινούνταν η κωνική φιάλη και γινόταν η αποστείρωση.

ΣΗΜ: Από τα παραπάνω υλικά χρησιμοποιήθηκαν και συνδυασμοί αυτών όπως C.E.+M.A. που ήταν και το βασικό θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε.

Όλα τα παραπάνω θρεπτικά υλικά αποστειρώνονταν σε υγρό κλίβανο αποστείρωσης για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία 120°C και υπό πίεση 1atm. Στη συνέχεια τοποθετούνταν κάτω από ασηπτικές συνθήκες σε πλαστικά τριβλία Petri διαμέτρου 9cm (περίπου 10ml υλικό/τριβλίο).

● **Παρασκευή αρχικών (πυκνών) διαλυμάτων μυκητοκτόνων και άλλων ουσιών**

Ουσίες, διαλύτες και συγκεντρώσεις των στοκ διαλυμάτων (stock solution) που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των εκλεκτικών υλικών του *Arthrobotrys* spp. παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2: Συγκεντρώσεις (μg/ml) πυκνών διαλυμάτων ουσιών στα πειράματα σε διάφορους διαλύτες

Ουσία	Διαλύτης		
	Νερό	Αιθ. Αλκοόλη 95%	Ακετόνη
penicillin	10 ⁴	10 ⁴	
chloramphenicol	10 ⁴		
streptomycin	10 ⁴		
thiophanate methyl	10 ⁴	10 ³	10 ⁴
iprodione	10 ⁴	10 ³	10 ⁴
PCNB		10 ³	10 ⁴
thiram		10 ³	10 ⁴
thiadimefon		10 ³	10 ⁴
metalaxyl		10 ³	10 ⁴
fenaminosulf		10 ³	10 ⁴
tetracycline		10 ⁴	
oxgall		10 ⁴	
malachite green		10 ³	

Οι ουσίες ζυγίζονταν ή λαμβάνονταν με τη βοήθεια πιπέτας ακριβείας και τοποθετούνταν σε αποστειρωμένα φιαλίδια McCartney με 10ml του αντίστοιχου διαλύτη.

ΔΙΑΦΕΡΟΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

● **Ανανέωση των καλλιεργειών των μυκήτων *Arthrobotrys* spp.**

Από τις καλλιέργειες που ήταν σε τριβλία γίνονταν μεταφορές σε πλαστικά τριβλία Petri με θρεπτικό υλικό compost extract και maize agar (περίπου 10ml/τριβλίο). Ως εμβόλιο χρησιμοποιόταν μυκηλιακοί δίσκοι διαμέτρου 7 mm, οι οποίοι τοποθετούνταν ανεστραμμένοι στο κέντρο των τριβλίων. Η ανανέωση πραγματοποιόταν υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο γραμμικής ροής (Laminar flow) και αφού τα τριβλία σφραγίζονταν με πλαστική μεμβράνη (Parafilm)

επωάζονταν σε θάλαμο θερμοκρασίας 27°C για 5 μέρες για τον *A. oligospora* και 11 μέρες για τον *A. dactyloides*.

● Τρόπος δοκιμών των χημικών ουσιών

Για να δοκιμαστεί η επίδραση των χημικών ουσιών στους μύκητες *Arthrobotrys oligospora* και *A. dactyloides*, οι ουσίες αυτές ενσωματώνονταν σε θρεπτικό υλικό με άγαρ.

Χρησιμοποιούνταν μπουκαλάκια που περιείχαν 60ml του θρεπτικού υλικού (C.E. + M.A.) και αφού αποστειρώνονταν, προσθέτονταν με τη βοήθεια πιπέτας ακριβείας ποσότητες της αντίστοιχης χημικής ουσίας ώστε αυτές να βρίσκονται σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Αφού ανακινούνταν, μοιραζόταν το περιεχόμενο των μπουκαλιών σε τριβλία (περίπου 10ml/τριβλίο) ώστε να υπάρχουν τρεις επαναλήψεις (τριβλία) για τον *A. oligospora* και τρεις επαναλήψεις (τριβλία) για τον *A. dactyloides*. Επίσης για κάθε σειρά δοκιμών χρησιμοποιούνταν και τριβλία χωρίς άλλες ουσίες παρά μόνο με το θρεπτικό υλικό (μάρτυρας).

● Εμβολιασμός των τριβλίων με τον μύκητα

Από την περιφέρεια της αναπτυσσόμενης αποικίας του κάθε είδους κόβονταν με τη βοήθεια αποστειρωμένου φελλοτρυπητή (cork borer) μυκηλιακοί δίσκοι διαμέτρου 7mm οι οποίοι τοποθετούνταν ανεστραμμένοι (δηλαδή το μυκήλιο ήταν σε επαφή με την επιφάνεια του θρεπτικού υλικού) στο κέντρο των τριβλίων με τις χημικές ουσίες και του μάρτυρα. Η όλη διαδικασία γινόταν υπό ασηπτικές συνθήκες όπως και κατά την ανανέωση της καλλιέργειας.

● Μέτρηση της γραμμικής αύξησης της αποικίας

Οι μετρήσεις της γραμμικής αύξησης (ακτίνας) της αποικίας γίνονταν με υποδεκάμετρο κάτω από το στερεοσκόπιο σε μικρή μεγέθυνση και άρχιζαν, και για τα δύο είδη *Arthrobotrys*, 24h μετά τον εμβολιασμό των τριβλίων. Συνολικά γίνονταν 5 μετρήσεις σε διάστημα 5 ημερών, εκτός από τον *A. oligospora* που γίνονταν 4 μετρήσεις σε διάστημα 4 ημερών επειδή η αύξηση της αποικίας ήταν ταχύτερη και κάλυπτε όλη περίπου την επιφάνεια των τριβλίων.

Η γραμμική αύξηση του μυκηλίου υπολογιζόταν με μέτρηση της διαμέτρου της αποικίας και αφαίρεση της σταθερής τιμής 0.7cm της διαμέτρου του μυκηλιακού δίσκου του αρχικού μολύσματος και διαίρεση με το 2.

$$x = z - y / 2$$

όπου x: η γραμμική αύξηση του μυκηλίου σε cm και ορισμένο χρόνο

z: η αύξηση της διαμέτρου του μυκηλίου σε cm σε ορισμένο χρόνο

y: σταθερή τιμή της διαμέτρου του αρχικού μολύσματος

Επίσης ο μέσος όρος και των τριών επαναλήψεων υπολογιζόταν με άθροισμα της γραμμικής αύξησης του μυκηλίου και των τριών επαναλήψεων, διά το σύνολο των επαναλήψεων δηλαδή:

$$a = (x_1 + x_2 + x_3) / 3$$

όπου a: ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων

$x_1 + x_2 + x_3$: η γραμμική αύξηση των τριών επαναλήψεων

Για τον υπολογισμό της ταχύτητας γραμμικής αύξησης ανά 24h, η τιμή διαιρούσαν διά του αριθμού ημερών ηλικίας της αποικίας.

● Εμβολιασμός τριβλίων με έδαφος

Προκειμένου να αναπτυχθεί ένα εκλεκτικό υλικό για τον *Arthrobotrys* spp. έπρεπε να βρεθεί μία μέθοδος τοποθέτησης του εδάφους σε τριβλία με θρεπτικό

υπόστρωμα και διάφορους παρεμποδιστές και να γίνεται κάθε φορά αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Επιλέχθηκαν δύο μέθοδοι: η πρώτη αφορούσε την προσθήκη του εδάφους (και της υπάρχουσας μικροχλωρίδας) στα τριβλία και η δεύτερη αφορούσε την τοποθέτηση βόλων εδάφους που τοποθετούνταν σε συγκεκριμένες θέσεις στο τριβλίο.

A) Εμβολιασμός τριβλίων με αιώρημα εδάφους

Ο εμβολιασμός των τριβλίων με αιώρημα εδάφους γινόταν ως εξής. Τοποθετήσαμε σε μία κωνική φιάλη των 250ml, 100ml απιονισμένο νερό και 0.1% agar. Αφού βραζόταν και αφηνόταν να κρυώσει, προσθέταμε 1gr εδάφους. Στη συνέχεια ανακινούσαμε πολύ καλά και ρίχναμε σε κάθε τριβλίο με τη βοήθεια πιπέτας ακριβείας, 300ml από το αιώρημα που είχε η κωνική φιάλη. Ακολουθούσε άπλωμα του αιωρήματος σ' όλη την επιφάνεια του θρεπτικού υλικού με τη βοήθεια αποστειρωμένης κεκαμένης γυάλινης ράβδου. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι η δημιουργία αιωρήματος εδάφους είναι δύσκολη καθώς πολλά από τα συστατικά του εδάφους έχουν μεγάλο όγκο και βάρος και καθιζάνουν πολύ γρήγορα. Για να ξεπεραστεί αυτή η δυσκολία χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό και 0.1% agar. Αυτή η ποσότητα του agar δίνει στο νερό μεγάλο ιξώδες και παρεμποδίζει τη γρήγορη καθίζηση των σωματιδίων χωρίς να σχηματίζει πήγμα.

B) Εμβολιασμός τριβλίων με σπόρια μυκήτων *Arthrobotrys* spp.

Κοβόταν μικρό τεμάχιο από μία καλλιέργεια του *A. oligospora*, που είχε σχηματίσει κονιδιοφόρους και σπόρια, και τοποθετούνταν σε φιαλίδιο McCartney (χωρητικότητας 20ml) με 10ml απιονισμένο-αποστειρωμένο νερό. Ύστερα ανακινιόταν πολύ καλά με σκοπό την απελευθέρωση των κονιδίων του μύκητα από το τεμάχιο. Μετά ρίχνονταν 300ml από το φιαλίδιο με το αιώρημα των σπορίων και με τη βοήθεια αποστειρωμένης κεκαμένης ράβδου απλωνόταν σ' όλη την επιφάνεια του θρεπτικού υλικού. Στη συνέχεια, ριχνόταν το αιώρημα των σπορίων που είχε περισσέψει στο McCartney στην κωνική φιάλη με το αιώρημα εδάφους. Αφού ανακινιόταν, ρίχνονταν 300ml και ακολουθούσε άπλωμα του αιωρήματος σ' όλη την επιφάνεια του θρεπτικού υλικού με τη βοήθεια αποστειρωμένης κεκαμένης ράβδου. Στο τέλος τα τριβλία σφραγίζονταν με πλαστική μεμβράνη (Parafilm) και επωάζονταν σε θάλαμο θερμοκρασίας 27°C.

Γ) Εμβολιασμός τριβλίων με βόλους εδάφους

Επίσης γινόταν εμβολιασμός των τριβλίων και με βόλους εδάφους. Στα τριβλία με διάφορα υλικά σε άγαρ, γινόταν εμβολιασμός με τέσσερα διαφορετικά είδη εδάφους. Το πρώτο είδος προερχόταν από "κοκκινόχωμα" από το κήπο του Μ.Φ.Ι. χωρίς βλάστηση, το δεύτερο από πευκόχωμα, το τρίτο από έδαφος που είχε φυλλοβόλα δέντρα και θάμνους και το τέταρτο από έδαφος που είχε ποώδη φυσική βλάστηση. Οι βόλοι ήταν ποσότητας 0.5gr και τοποθετούνταν περιφερειακά σε τρία σημεία του τριβλίου. Στη συνέχεια το τριβλίο κλεινόταν με Parafilm και επωάζονταν σε θερμοκρασία δωματίου σε χώρο του εργαστηρίου.

• Παρατήρηση τριβλίων μακροσκοπικά για ανάπτυξη αποικιών βακτηρίων, μυκήτων και άλλων οργανισμών.

Τα τριβλία, με το αιώρημα εδάφους και τους βόλους εδάφους, αρχικά παρατηρούνταν στο στερεοσκόπιο και στην περίπτωση που η παρατήρηση στο στερεοσκόπιο δε βοηθούσε στη διευκρίνιση της φύσης των αποικιών, το τριβλίο τοποθετούνταν ανοικτό στο μικροσκόπιο και αν αυτό ήταν απαραίτητο,

τοποθετούνταν και καλυπτρίδα πάνω στην επιφάνεια του υλικού με σκοπό την ανίχνευση κονιδιοφόρων διαφόρων ειδών μυκήτων.

• **Εμβολιασμός των τριβλίων με μυκήλιο και κονίδια**

Τα τριβλία εμβολιάζονταν σε δύο σημεία. Στο αριστερό μέρος στην άκρη του τριβλίου τοποθετούνταν μυκήλιο του μύκητα *A. oligospora* ή *A. dactyloides* και στο δεξί μέρος σε τέσσερα περιφερειακά σημεία του τριβλίου τοποθετούνταν κονίδια του μύκητα *A. oligospora* ή *A. dactyloides*. Το μυκήλιο κοβόταν με τη βοήθεια αποστειρωμένου φελλοτρυπητή και ήταν σε μορφή δίσκου διαμέτρου 7mm, ενώ τα κονίδια λαμβάνονταν από καλλιέργειες, του αντίστοιχου μύκητα, που είχαν σχηματίσει κονιδιοφόρους και σπόρια, με τη βοήθεια αποστειρωμένου πινέλου. Χρησιμοποιόταν διαφορετικό πινέλο για το κάθε είδος του μύκητα και η διαδικασία γινόταν υπό ασηπτικές συνθήκες. Στη συνέχεια τα τριβλία σφραγίζονταν με Parafilm, επωάζονταν σε θάλαμο θερμοκρασίας 27°C και γινόταν η μέτρηση της γραμμικής αύξησης του μυκηλίου και παρατήρηση της βλάστησης των κονιδίων.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

Εισαγωγή στο πειραματικό μέρος της μελέτης

Πραγματοποιήθηκε μία σειρά πειραμάτων που είχε ως σκοπό την εξεύρεση ενός θρεπτικού υλικού που θα ευνοούσε την ανάπτυξη μυκήτων του γένους *Arthrobotrys* παρεμποδίζοντας μύκητες άλλων γενών και άλλους οργανισμούς γενικά. Τα πειράματα που έγιναν κατά τη μελέτη αυτή αφορούσαν τη δράση διαφόρων παρεμποδιστών (αντιβιοτικά, μυκητοκτόνα και άλλα) στη βλάστηση σπορίων και την ανάπτυξη μυκήτων του γένους *Arthrobotrys*.

Έτσι έγινε μια σειρά πειραμάτων που μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες: στα "καθαρά" όπου δοκιμάζονταν οι μύκητες μόνοι (καθαρές καλλιέργειες) σε διάφορα υλικά και ουσίες και στα πειράματα που χρησιμοποιήθηκε έδαφος και αναπτύσσονταν ποικίλοι και συχνά ακαθόριστοι οργανισμοί του εδάφους μόνοι ή μαζί με τους υπό μελέτη μύκητες (*A. oligospora* και *A. dactyloides*).

Στην πρώτη κατηγορία μελετήθηκε η συμπεριφορά των *A. oligospora* και *A. dactyloides* μόνοι τους σε διάφορους συνδυασμούς υλικών-ουσιών. Πρώτο πρόβλημα που έπρεπε να λυθεί ήταν ότι προκειμένου να επινοηθεί το κατάλληλο εκλεκτικό υλικό, πρώτοι οργανισμοί που έπρεπε να παρεμποδιστούν ήταν τα βακτήρια. Ένα gr γόνιμου εδάφους περιέχει αριθμό της τάξης του 10^7 βακτήρια. Ταυτόχρονα οι ουσίες που θα παρεμποδίζουν τα βακτήρια δεν πρέπει να παρεμποδίζουν το μύκητα για τον οποίο φτιάχνεται το εκλεκτικό υλικό. Για την παρασκευή εκλεκτικών υλικών για μύκητες έχει χρησιμοποιηθεί μεγάλος αριθμός αντιβιοτικών. Από αυτά, τα αντιβιοτικά πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη και χλωραμφαινικόλη είναι τα πιο ευραίως χρησιμοποιούμενα λόγω των ιδιοτήτων τους αλλά και του χαμηλού τους κόστους.

Η τεχνική που ακολουθήθηκε σ' αυτήν την κατηγορία ήταν η τοποθέτηση μυκηλιακών δισκών και κονιδίων (εμβολιασμός) με καθαρή καλλιέργεια του υπό μελέτη μύκητα. Σε τριβλία που περιείχαν 10ml C.E.+M.A. και τις ανάλογες ουσίες, γινόταν εμβολιασμός με μυκήλιο μόνο ή με μυκήλιο και κονίδια μαζί. Συνολικά υπήρχαν τρεις επαναλήψεις (τριβλία) για κάθε επέμβαση και είδος μύκητα. Στη συνέχεια τα τριβλία σφραγίζονταν, επωάζονταν και γίνονταν οι μετρήσεις της γραμμικής αύξησης του μυκηλίου και παρατηρήσεις της βλάστησης των κονιδίων στο μικροσκόπιο.

Στη δεύτερη κατηγορία μελετήθηκε η συμπεριφορά των *A. oligospora* και *A. dactyloides* σε διάφορους συνδυασμούς υλικών-ουσιών μαζί με έδαφος δηλαδή όλη τη μικροβιακή εδαφική χλωρίδα. Υπήρξε προβληματισμός ως προς τον τρόπο μελέτης των υλικών αυτών με φυσικό πληθυσμό εδάφους. Έτσι το πρώτο ερώτημα που έπρεπε να απαντηθεί ήταν η ποσότητα, η προέλευση του εδάφους, η δειγματοληψία και η συντήρησή του. Το έδαφος που χρησιμοποιήθηκε ήταν από τον περίβολο του Μ.Φ.Ι. χώρου (πευκόχωμα, κοκκινόχωμα, χλοοτάπητας κλπ). Άλλο σημείο προβληματισμού ήταν η τεχνική τοποθέτησης του που έπρεπε να ακολουθηθεί. Η κλασική τεχνική της διασποράς αιωρήματος εδάφους στην επιφάνεια του υλικού είναι καλή για μύκητες που έχουν πολλαπλασιαστικές μονάδες σε διασπορά, που μπορούν να βλαστήσουν γρήγορα, να δώσουν συμπαγείς αποικίες και να παράγουν γρήγορα χαρακτηριστικές και αναγνωρίσιμες μορφολογικές δομές. Αυτή η τεχνική όμως δε γνωρίζουμε αν μπορεί να γίνει με τους μύκητες του γένους *Arthrobotrys*, δηλαδή αν παράγονται στο έδαφος σπόρια – χλαμυδοσπόρια, αν αυτά έχουν λήθαργο, αν μπορούν να ανταγωνιστούν άλλα μέλη της εδαφικής μικροχλωρίδας σε θρεπτικά υλικά, αν έχουν τη δυνατότητα να σποροποιούν γρήγορα

ώστε να γίνουν αντιληπτοί κλπ. Παράλληλα με την παραπάνω τεχνική της διασποράς εδάφους δοκιμάστηκε και η τοποθέτηση τεμαχίων (βόλων) εδάφους στο ίδιο υλικό. Η μέθοδος αυτή, παρόλο που γνωρίζουμε ότι δουλεύει καλά, έχει το μειονέκτημα να επιτρέπει ποιοτικές και όχι ποσοτικές εκτιμήσεις και είναι αργή.

Για τους μύκητες του γένους *Arthrobotrys* γνωρίζουμε ότι δεν έχει αναπτυχθεί εκλεκτικό υλικό που να επιτρέπει την ανίχνευση και οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι ποιοτικές και αργές (εβδομάδες). Βέβαια η τεχνική που προαναφέρθηκε μπορεί να "ποσοτικοποιηθεί" χρησιμοποιώντας τις στατιστικές τύπου "most probable number" που είναι όμως μικρής ακρίβειας. Γνωρίζουμε επίσης ότι οι μύκητες του γένους *Arthrobotrys* αναπτύσσονται μεν (βλαστάνουν σπόρια ή χλαμυδοσπόρια από υφές) στο υλικό, αλλά πρέπει να σχηματίζουν σπόρια (και παγίδες) και έτσι να γίνουν αντιληπτοί μετά από 2-3 εβδομάδες και εφόσον υπάρχουν νηματώδεις στο τριβλίο.

Τέθηκε λοιπόν το ζήτημα της παρουσίας νηματωδών σκωλήκων και η πιθανότητα να προστίθονται αυτοί από την αρχή. Υπήρξε όμως αδυναμία "παραγωγής" νηματωδών παρόλο που δοκιμάστηκαν αρκετές μέθοδοι.

Ένας άλλος παράγοντας που έπρεπε να μελετηθεί ήταν η φύση του βασικού υλικού και κυρίως η ποσότητα και η φύση των πηγών άνθρακα (ενέργειας) που διαθέτετε το υλικό. Δοκιμάστηκαν υλικά πολύ φτωχά σε πηγές άνθρακα (P.A.) (σκέτο άγαρ) όπου η ανάπτυξη του μύκητα εξαρτόταν σχεδόν εξ' ολοκλήρου από την ύπαρξη αποθεμάτων ενέργειας στο εμβόλιο (τεμάχιο – δίσκος σε άγαρ ή στο σπόριο). Αυτό το γεγονός μπορεί να αποτελέσει παράγοντα εκλεκτικότητας καθώς στο έδαφος επικρατεί "πεινά". Παράλληλα όμως οι πολλαπλασιαστικές μονάδες έχουν κάποια δύναμη βλάστησης (αλλά μειούμενη με το χρόνο). Ταυτόχρονα αν μπορεί ο μύκητας (εδώ *A. oligospora* και *A. dactyloides*) να "ερεθιστεί" για να βλαστήσει απλώς λόγω της παρουσίας νηματωδών, τότε ένα τέτοιο "φτωχό" υλικό είναι ιδανικό, καθώς λόγω της "φτώχειας" του αποκλείει το συντριπτικό ποσοστό των άλλων εδαφικών μικροοργανισμών. Όμως ένα τέτοιο υλικό έχει και μειονεκτήματα όπως: αποκλείει τις εξαντλημένες πολλαπλασιαστικές μονάδες που αδυνατούν να βλαστήσουν, δεν αναιρεί παρεμποδιστές τύπων μυκόστασης, δίνει αραιό μυκήλιο κλπ.

Στη συνέχεια γίνεται περιγραφή των εργαστηριακών δοκιμών αυτής της μελέτης.

1^η Δοκιμή

"Επίδραση των αντιβιοτικών χλωραμφαινικόλη και στρεπτομυκίνη στη γραμμική αύξηση *in vitro* των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides*".

●Σκοπός

Σκοπός του πειράματος ήταν η μελέτη της επίδρασης των πιο συχνά χρησιμοποιούμενων αντιβιοτικών στη γραμμική αύξηση *in vitro* των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides*.

●Εκτέλεση του πειράματος

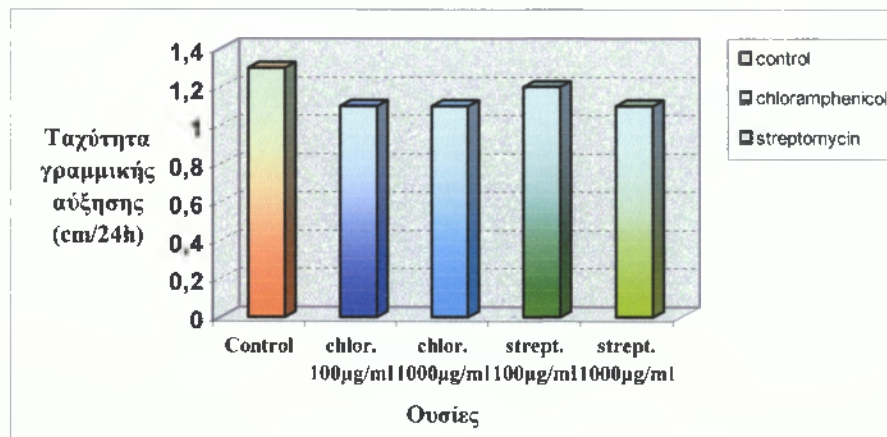
Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides* και τα αντιβιοτικά χλωραμφαινικόλη (chloramphenicol) και στρεπτομυκίνη (streptomycin) σε συγκεντρώσεις όπως φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Επεμβάσεις (Ουσίες)	Συγκέντρωση μg/ml σε C.E.+M.A.
χλωραμφαινικόλη	100
	1000
στρεπτομυκίνη	100
	1000
control	-

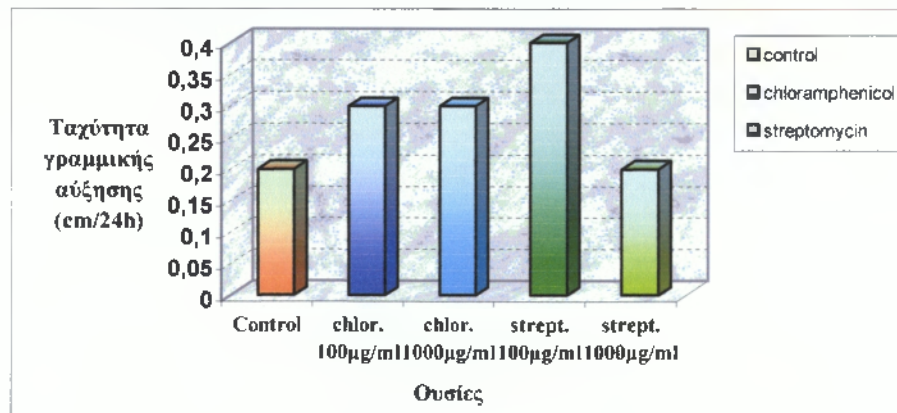
● Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα του πειράματος φαίνονται στα διαγράμματα 8 & 9:

Διάγραμμα 8: Ταχύτητα γραμμικής αύξησης του μύκητα *A. oligospora*



Διάγραμμα 9: Ταχύτητα γραμμικής αύξησης του μύκητα *A. dactyloides*



Τα διαγράμματα 8 και 9 εμφανίζουν την ταχύτητα γραμμικής αύξησης των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides* αντίστοιχα, σε διάφορα αντιβιοτικά και στο μάρτυρα.

Όπως έδειξαν οι μετρήσεις, μετά από επώαση 24 ωρών, η γραμμική ταχύτητα αύξησης του μυκηλίου των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides* που εμβολιάστηκαν σε υλικά που περιείχαν τα δύο αντιβιοτικά, ελάχιστα διέφεραν σε σχέση μ' αυτήν του μάρτυρα.

Ωστόσο οι διαφορές στην ταχύτητα αύξησης ανάμεσα στα δύο είδη του *Arthrobotrys* σ' όλα τα υλικά και σ' όλες τις δοκιμές που ακολούθησαν ήταν σημαντική. Για τον *A. oligospora* ο μέσος όρος της ταχύτητας αύξησης του μυκηλίου άγγιζε τα 10mm την ημέρα, ενώ η ταχύτητα αύξησης του *A. dactyloides* μετά βίας πλησίαζε τα 2mm την ημέρα. Η μορφολογία των αποικιών των μυκήτων δεν διέφερε στις επεμβάσεις απ' αυτές του μάρτυρα.

2^η Δοκιμή

"Μέτρηση της γραμμικής αύξησης του μυκηλίου του *Arthrobotrys oligospora* και *A. dactyloides* όταν αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό, με και χωρίς μυκητοκτόνα".

●Σκοπός

Σκοπός του πειράματος ήταν η μελέτη της επίδρασης μερικών μυκητοκτόνων στην ανάπτυξη *in vitro* των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides* ως προς τη γραμμική αύξηση του μυκηλίου τους.

●Εκτέλεση πειράματος

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides* και τα μυκητοκτόνα PCNB, thiram, thiadimefon, metalaxyl, thiophanate methyl, malachite green, fenaminosulf (dexion), iprodione σε συγκεντρώσεις όπως φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

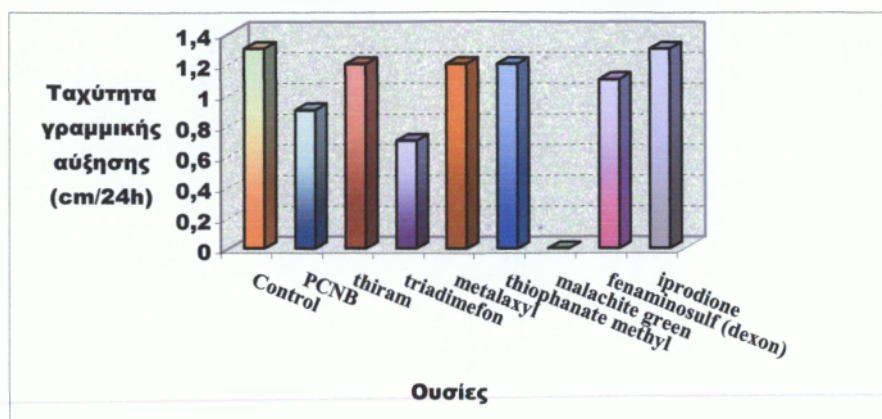
Επεμβάσεις (Ουσίες)	Συγκέντρωση μg/ml σε C.E.+M.A.
Control	-
PCNB	10
Thiram	1
Thiadimefon	1
Metalaxyl	1
Thiophanate methyl	1
Malachite green	10
Fenaminosulf	10
Iprodione	1

●Αποτελέσματα

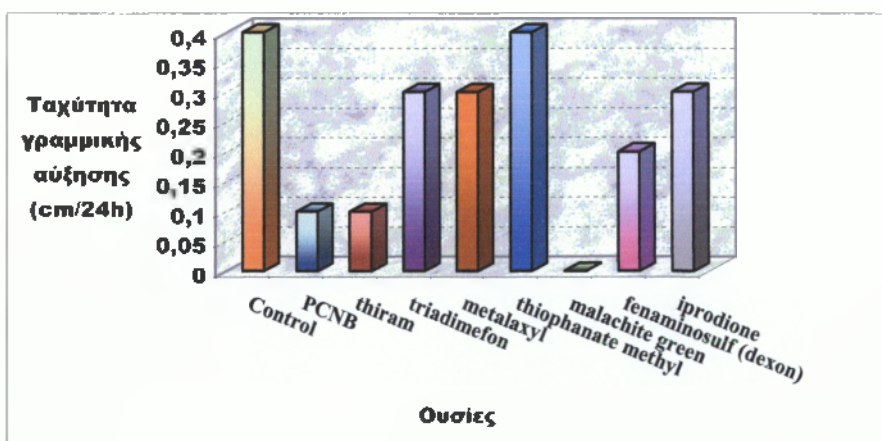
Τα αποτελέσματα του πειράματος φαίνονται στα διαγράμματα 10 & 11:

Στα διαγράμματα 10 και 11 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων της γραμμικής ταχύτητας αύξησης του μυκηλίου των μυκήτων *A. oligospora* και του *A. dactyloides*. Χαρακτηριστική είναι η γραμμική αύξηση του μυκηλίου στα δύο είδη του *Arthrobotrys* όλων των επαναλήψεων και του μάρτυρα που ήταν ομαλή καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης, όπως και η μορφολογία των αποικιών και των δύο μυκήτων που δεν διέφεραν στις επεμβάσεις μ' αυτή του μάρτυρα.

Διάγραμμα 10: Ταχύτητα γραμμικής αύξησης του μύκητα *A. oligospora*



Διάγραμμα 11: Ταχύτητα γραμμικής αύξησης του μύκητα *A. dactyloides*



Στο διάγραμμα 10 που αφορά τον *A. oligospora* φαίνεται χαρακτηριστικά η ολική παρεμπόδιση του malachite green στην αύξηση του μυκηλίου. Στα υπόλοιπα μυκητοκτόνα, ο μύκητας αναπτύχθηκε εκδηλώνοντας ελαφρή ή καθόλου παρεμπόδιση σε σχέση με το μάρτυρα.

Στο διάγραμμα 11 που αφορά τον *A. dactyloides* ο μύκητας στα μυκητοκτόνα PCNB και thiram υπέστη ισχυρή παρεμπόδιση, ενώ στο malachite green (όπως και παραπάνω) ο μύκητας δεν αναπτύχθηκε καθόλου. Επίσης το fenaminosulf (dexon) μείωσε στο 1/2 τη γραμμική αύξηση του μυκηλίου σε σύγκριση μ' αυτήν του μάρτυρα. Τέλος στα υπόλοιπα μυκητοκτόνα οι διαφορές ήταν μικρές σε σχέση με του μάρτυρα.

3^η Δοκιμή

"Μέτρηση της γραμμικής αύξησης του μυκηλίου του *Arthrobotrys oligospora* και *A. dactyloides* όταν αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό, με και χωρίς μυκητοκτόνα".

●Σκοπός

Σκοπός του πειράματος ήταν η μελέτη της επίδρασης μερικών μυκητοκτόνων στην ανάπτυξη *in vitro* των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides* ως προς την γραμμική αύξηση του μυκηλίου τους.

● Εκτέλεση πειράματος

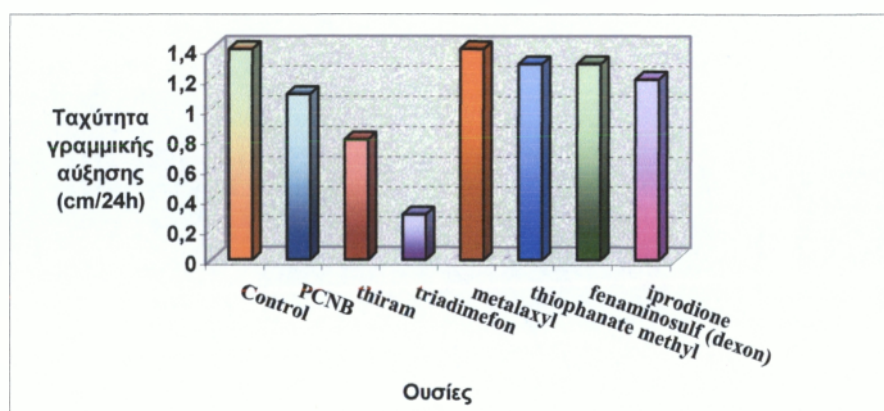
Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides* και τα μυκητοκτόνα PCNB, thiram, thiadimefon, metalaxyl, thiophanate methyl, fenaminosulf (dexon), iprodione σε συγκεντρώσεις όπως φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Επεμβάσεις (Ουσίες)	Συγκέντρωση μg/ml σε C.E.+M.A.
Control	-
PCNB	100
Thiram	10
Thiadimefon	10
Metalaxyl	10
Thiophanate methyl	10
Fenaminosulf (dexon)	100
Iprodione	10

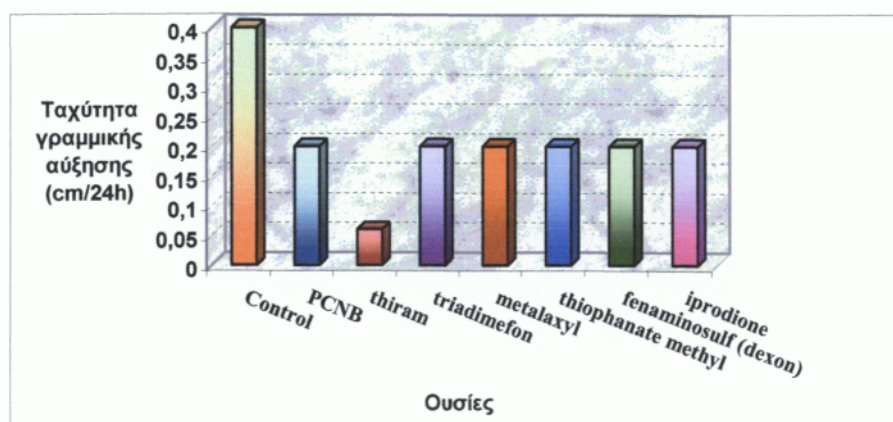
● Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα του πειράματος φαίνονται στα διαγράμματα 12 & 13:

Διάγραμμα 12: Ταχύτητα γραμμικής αύξησης του μύκητα *A. oligospora*



Διάγραμμα 13: Ταχύτητα γραμμικής αύξησης του μύκητα *A. dactyloides*



Στα παραπάνω διαγράμματα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων της γραμμικής ταχύτητας αύξησης του μυκηλίου των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides* σε διάφορα μυκητοκτόνα και στο μάρτυρα.

Στο διάγραμμα 12 που αναφέρεται στον *A. oligospora* γίνεται εμφανές ότι ο μύκητας αναπτύχθηκε ομαλά εκδηλώνοντας ελαφρή ή καθόλου παρεμπόδιση σε σύγκριση μ' αυτή του μάρτυρα σ' όλα τα μυκητοκτόνα και τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, πλην των thiram και thiadimefon που η παρεμπόδιση ήταν μεγαλύτερη.

Στο διάγραμμα 13 που αναφέρεται στον *A. dactyloides* χαρακτηριστική είναι η παρεμπόδιση που εμφάνισε στα μυκητοκτόνα σε σχέση με το μάρτυρα. Συγκεκριμένα όλα τα μυκητοκτόνα μείωσαν στο ½ τη γραμμική αύξηση του μυκηλίου, ενώ εκείνη του thiram ήταν ακόμη μεγαλύτερη.

4^η Δοκιμή

"Μέτρηση της γραμμικής αύξησης του μυκηλίου του *Arthrobotrys oligospora* και *A. dactyloides* όταν αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό με αντιβιοτικά και άλλες παρεμποδιστικές ουσίες".

●Σκοπός

Σκοπός του πειράματος ήταν η μελέτη της επίδρασης των παρακάτω ουσιών στην ανάπτυξη *in vitro* των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides* ως προς την γραμμική αύξηση του μυκηλίου τους.

●Εκτέλεση πειράματος

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides* και οι ουσίες tetracycline, oxgall, penicillin, gallic acid, malachite green σε συγκεντρώσεις όπως φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

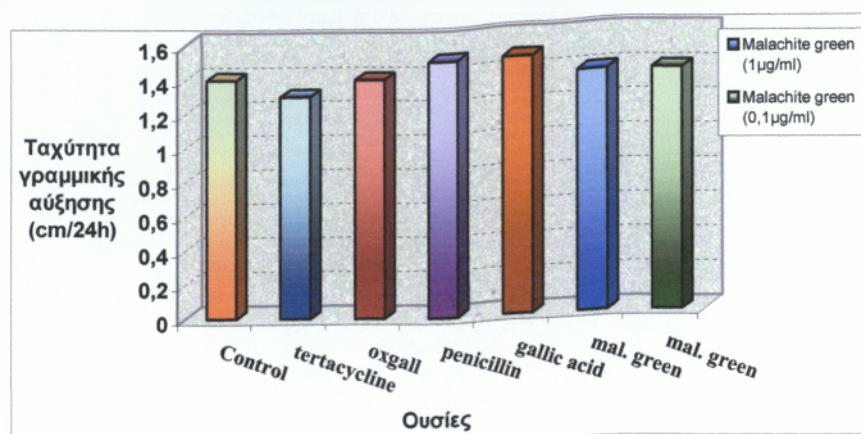
Επεμβάσεις (Ουσίες)	Συγκέντρωση μg/ml σε C.E+M.A.
Control	-
Tetracycline	100
Oxgall	100
Penicillin	50
Gallic acid	500
Malachite green	1
	0.1

●Αποτελέσματα

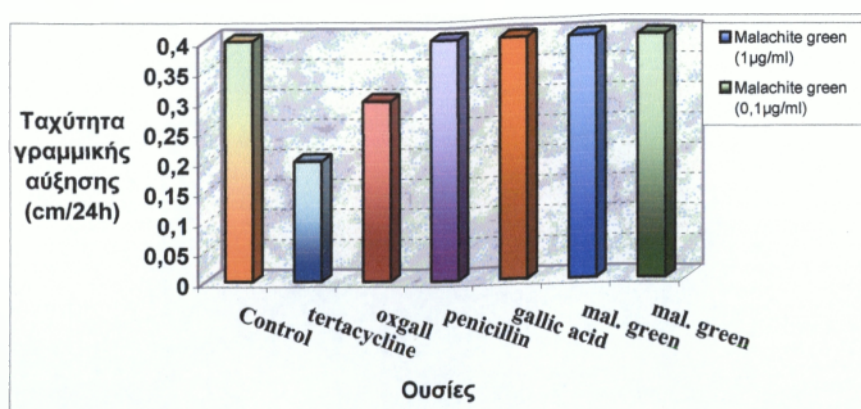
Τα αποτελέσματα του πειράματος φαίνονται στα διαγράμματα 14 & 15:

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις της αύξησης του μυκηλίου των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides* παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα.

Διάγραμμα 14: Ταχύτητα γραμμικής αύξησης του μύκητα *A. oligospora*



Διάγραμμα 15: Ταχύτητα γραμμικής αύξησης του μύκητα *A. dactyloides*



Όπως γίνεται εμφανές στο διάγραμμα 14 που αφορά τον *A. oligospora* ο μύκητας εμφάνισε ικανοποιητική αύξηση με ελαφρά μεγαλύτερη ταχύτητα και απ' αυτή του μάρτυρα να σημειώνεται στις ουσίες πενικιλίνη και γαλλικό οξύ. Αντίθετα στο αντιβιοτικό τετρακυκλίνη ο μύκητας εμφάνισε τη μικρότερη γραμμική ταχύτητα. Στις ουσίες oxgall και malachite green (και στις δύο συγκεντρώσεις) ο μύκητας αναπτύχθηκε χωρίς να εκδηλωθεί παρεμπόδιση σε σχέση με το μάρτυρα. Ωστόσο οι διαφορές αυτές κρίνονται αμελητέες.

Στο διάγραμμα 15 που αφορά τον *A. dactyloides* ομοίως παρατηρούνται ελάχιστες διαφορές σ' όλα τα υλικά πλην της τετρακυκλίνης και του oxgall όπου εμφάνισε μείωση της ταχύτητας γραμμικής αύξησης. Στην περίπτωση της τετρακυκλίνης η παρεμπόδιση έφτασε στο 50%.

5^η Δοκιμή

"Δοκιμή της επίδρασης των αντιβιοτικών χλωραμφαινικόλη, στρεπτομυκίνη και πενικιλίνη στη βλάστηση κονιδίων και ανάπτυξη μυκηλίου των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides*".

●Σκοπός

Σκοπός του πειράματος ήταν η μελέτη της επίδρασης των τριών πιο συχνά χρησιμοποιούμενων αντιβιοτικών μαζί, στη βλάστηση κονιδίων και ανάπτυξη μυκηλίου των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides*.

●Εκτέλεση πειράματος

Κατά το πείραμα αυτό διερευνήθηκε η δράση των αντιβιοτικών χλωραμφαινικόλη, στρεπτομυκίνη, και πενικιλίνη σε συγκέντρωση 100 µg/ml.

Η ταχύτητα της γραμμικής αύξησης μετρήθηκε και για τους δύο μύκητες για διάστημα τριών ημερών και έγινε αναγωγή σε cm/24h.

●Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα του πειράματος φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας 7: Ταχύτητα γραμμικής αύξησης του μυκηλίου των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides* σε υλικά με τα τρία αντιβιοτικά χλωραμφαινικόλη, στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη σε συγκέντρωση 100µg/ml έκαστο. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το υλικό χωρίς αντιβιοτικά.

Μύκητας	Ταχύτητα αύξησης σε cm/h	
	3 αντιβιοτικά	Μάρτυρας
<i>A. oligospora</i>	0.7	0.7
<i>A. dactyloides</i>	0.1	0.1

Τα αποτελέσματα των τριών επαναλήψεων έδειξαν ότι η γραμμική αύξηση του μυκηλίου των απομονώσεων των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides* δεν επηρεάστηκε από τα αντιβιοτικά. Αυτό δικαιολογείται από το γεγονός ότι αυτά τα αντιβιοτικά δρουν εναντίον βακτηρίων και όχι μυκήτων. Η γραμμική αύξηση και των δύο μυκήτων ήταν ομαλή, είχε ακτινωτή εξάπλωση και δεν διέφερε από αυτήν του μάρτυρα. Επίσης τα αντιβιοτικά δεν επηρέασαν τη βλάστηση των κονιδίων και έτσι το ποσοστό βλάστησης των κονιδίων ήταν το ίδιο μ' αυτό του μάρτυρα. Η μορφολογία του μυκηλίου και των κονιδίων του μύκητα δεν διέφερε στην επέμβαση απ' αυτή του μάρτυρα.

6^η Δοκιμή

"Δοκιμή της επίδρασης των αντιβιοτικών χλωραμφαινικόλη, στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη και των μυκητοκτόνων thiophanate methyl και iprodione στη βλάστηση κονιδίων και ανάπτυξη μυκηλίου των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides*".

●Σκοπός

Στη δοκιμή αυτή έγινε μελέτη της επίδρασης συνδυασμού των τριών πιο συχνά χρησιμοποιούμενων αντιβιοτικών μαζί με δύο μυκητοκτόνα στη βλάστηση κονιδίων και ανάπτυξη μυκηλίου των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides*. Σκοπός ήταν να διαπιστωθεί τυχόν αλληλεπίδραση των μυκητοκτόνων με τα αντιβιοτικά.

●Εκτέλεση πειράματος

Κατά το πείραμα αυτό διερευνήθηκε η δράση των αντιβιοτικών χλωραμφαινικόλη, στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη, thiophanate methyl και iprodione σε συγκεντρώσεις όπως φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Επεμβάσεις		Συγκέντρωση µg/ml σε C.E.+M.A.				
		penicillin	chloramphenicol	streptomycin	iprodione	thiophanate methyl
1	iprodione µε 3 αντιβιοτικά	20	20	20	20	-
2	thiophanate methyl µε 3 αντιβιοτικά	14	14	14	-	14
3	Μάρτυρας µε 3 αντιβιοτικά	50	50	50	-	-

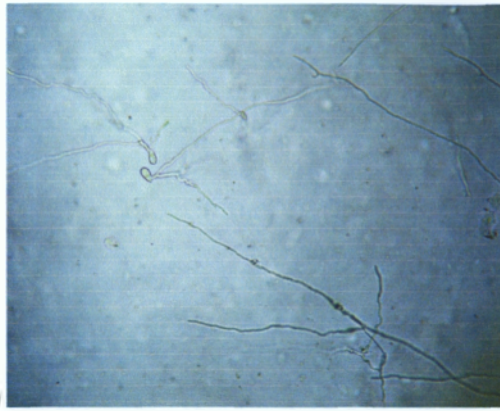
●Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα του πειράματος φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

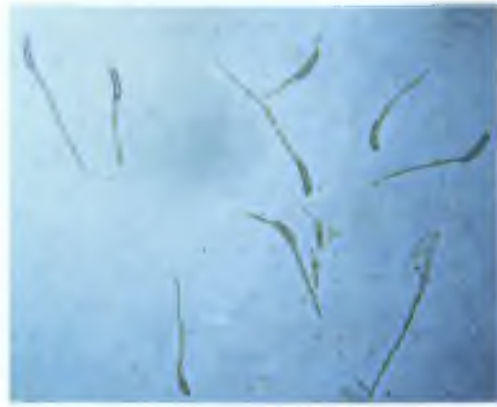
Πίνακας 9: Ταχύτητα γραμμικής αύξησης του μυκηλίου των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides* σε υλικά με τα αντιβιοτικά χλωραμφαινικόλη, στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη (συγκέντρωσης 50µg/ml), τα μυκητοκτόνα thiophanate methyl, iprodione (συγκέντρωσης 14µg/ml και 20µg/ml αντίστοιχα). Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το υλικό χωρίς αντιβιοτικά.

Μύκητας	Ταχύτητα αύξησης σε cm/h		
	iprodione µε 3 αντιβιοτικά	thiophanate methyl µε 3 αντιβιοτικά	Μάρτυρας µε 3 αντιβιοτικά
<i>A. oligospora</i>	0.6	0.8	0.8
<i>A. dactyloides</i>	0.1	0.1	0.2

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η γραμμική αύξηση του μυκηλίου των απομονώσεων των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides* υπό την επίδραση αντιβιοτικών και μυκητοκτόνων ήταν ικανοποιητική και τα κονίδια βλάστησαν κανονικά από την πρώτη μέρα εμβολιασμού. Η γραμμική αύξηση και των δύο μυκήτων ήταν ομαλή, είχε ακτινωτή εξάπλωση και ελάχιστα διέφερε από το μάρτυρα. Επίσης τα αντιβιοτικά σε συνδυασμό με τα μυκητοκτόνα δεν επηρέασαν τη βλάστηση των κονιδίων και έτσι το ποσοστό βλάστησης των κονιδίων ήταν το ίδιο μ' αυτό του μάρτυρα. Η μορφολογία του μυκηλίου και των κονιδίων του μύκητα δεν διέφερε στην επέμβαση απ' αυτή του μάρτυρα, εκτός από την επέμβαση που περιείχε iprodione και τα τρία αντιβιοτικά στην οποία οι βλαστικές υφές των κονιδίων ήταν πιο κοντές σε μήκος σε σχέση με τις άλλες επεμβάσεις και του μάρτυρα (Εικόνες 1,2,3).

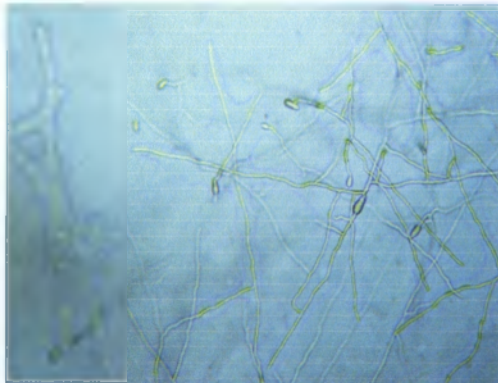


α)

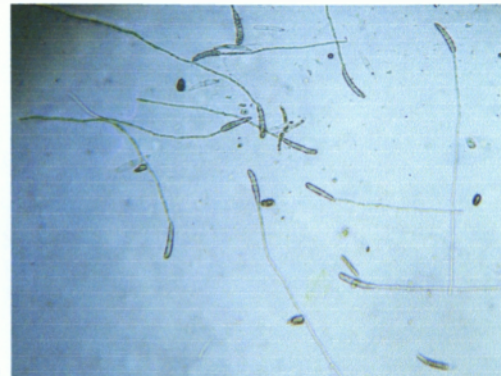


β)

Εικόνα 1: Βλάστηση σπορίων του α) *A. oligospora* και β) *A. dactyloides* μετά από 24 ώρες σε υλικό C.E.+M.A. του μάρτυρα.

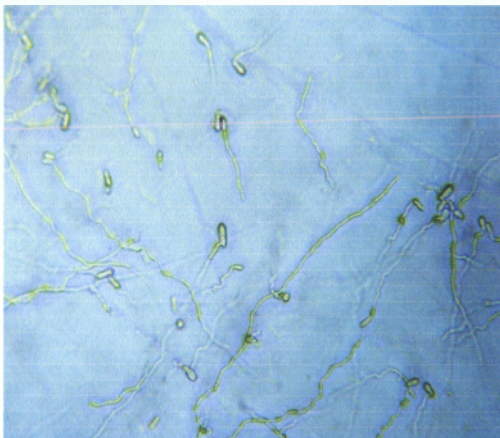


α)



β)

Εικόνα 2: Βλάστηση σπορίων του α) *A. oligospora* και β) *A. dactyloides* μετά από 24 ώρες σε υλικό C.E.+M.A. με τα τρία αντιβιοτικά και 20μg/ml iprodione.



α)



β)

Εικόνα 3: Βλάστηση σπορίων του α) *A. oligospora* και β) *A. dactyloides* μετά από 24 ώρες σε υλικό C.E.+M.A. με τα τρία αντιβιοτικά και 14μg/ml thiophanate methyl.

7^η Δοκιμή

"Δοκιμή της επίδρασης των αντιβιοτικών στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη και χλωραμφαινικόλη στη βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη αποικιών των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides* και στην παρεμπόδιση των εδαφικών βακτηρίων. Η

δοκιμή έγινε σε τριβλία με στερεό θρεπτικό υλικό C.E.+M.A. με προσθήκη βόλων εδάφους".

●Σκοπός

Σκοπός του πειράματος ήταν να ερευνηθεί τυχόν παρεμπόδιση της βλάστησης των спорίων των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides* σε στερεό θρεπτικό υλικό C.E.+M.A. με αντιβιοτικά και παράλληλα να βρεθεί ο καταλληλότερος τρόπος τοποθέτησης του εδάφους στο εκλεκτικό υλικό, ώστε να ανιχνεύεται η ύπαρξη των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides*.

Επίσης για την καλύτερη μελέτη των διαφόρων εδαφικών πληθυσμών, χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα διαφορετικής προέλευσης εδάφη (βλέπε υλικά και μέθοδοι).

●Εκτέλεση πειράματος

Κατά το πείραμα αυτό διερευνήθηκε η δράση των αντιβιοτικών στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη και χλωραμφαινικόλη σε συγκεντρώσεις όπως φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

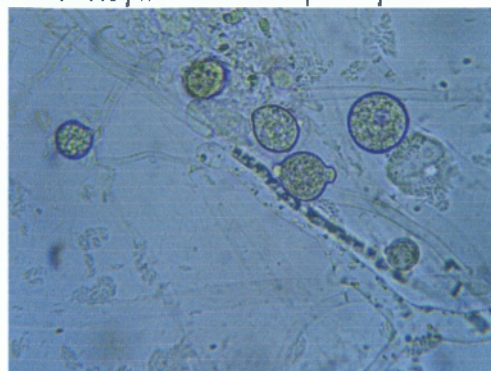
Επεμβάσεις	Συγκέντρωση µg/ml σε C.E.+M.A.		
	πενικιλίνη	χλωραμφαινικόλη	στρεπτομυκίνη
3 αντιβιοτικά	100	100	100
Μάρτυρας	-	-	-

Συνολικά γίνονταν 3 επαναλήψεις (τριβλία) για την κάθε επέμβαση και για το κάθε είδος εδάφους. Σε επόμενο στάδιο, επώαζονταν και γίνονταν η παρατήρηση των τριβλίων με σκοπό την αναγνώριση των αποικιών των μυκήτων.

●Αποτελέσματα

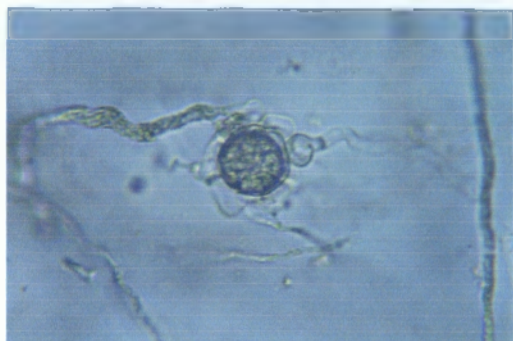
Αρχικά τα τριβλία όλων των επεμβάσεων εξετάζονταν με γυμνό οφθαλμό και παρατηρήθηκε ότι μετά από πέντε μέρες επώασης είχε αναπτυχθεί αρκετά πλούσιο εναέριο μυκήλιο σ' όλη την επιφάνεια των τριβλίων με τα αντιβιοτικά και αυτά του μάρτυρα. Στα τριβλία με τα αντιβιοτικά πρέπει να σημειωθεί ότι δεν υπήρξε ανάπτυξη βακτηρίων και ότι το μυκήλιο ήταν πιο πλούσιο λόγω του γεγονότος ότι αυτά τα αντιβιοτικά δρούσαν εναντίον των βακτηρίων και είχαν ως συνέπεια να δίνουν τη δυνατότητα στους μύκητες να δρουν κυριαρχικά και να αναπτύσσονται πολύ γρήγορα, σε αντίθεση με το μάρτυρα που λόγω του ανταγωνισμού των βακτηρίων το μυκήλιο ήταν μειωμένο.

Στα τριβλία του μάρτυρα αναγνωρίστηκαν φυκομύκητες και βακτήρια όχι μόνο στην επιφάνεια του τριβλίου αλλά και στο βάθος του υλικού, οι οποίοι εκμεταλλευόμενοι τα διαλυτά θρεπτικά υλικά (σάκχαρα) είχαν γρήγορη ανάπτυξη. Επίσης οι φυκομύκητες είχαν δημιουργήσει спорιάγγεια και οι υφές τους ήταν άδειες (Εικ. 4) και αναγνωρίστηκαν ωοσπόρια με ανθηρίδια (Εικ. 5). Μετά από επτά μέρες επώασης το εναέριο μυκήλιο άρχισε σιγά-σιγά να εξαφανίζεται αλλά η ανάπτυξη των φυκομυκήτων και των βακτηρίων εξακολουθούσε. Σπόρια *Alternaria*

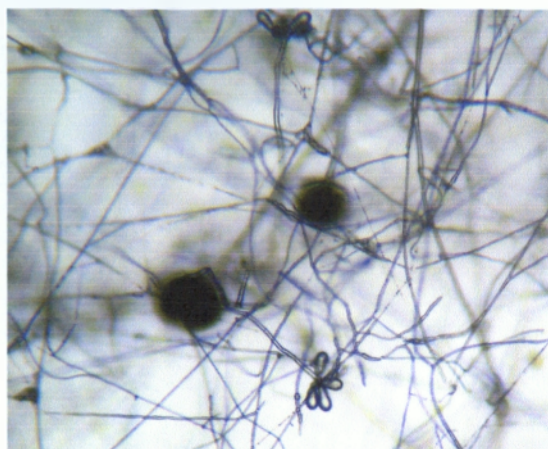


Εικόνα 4: Σποριάγγεια και άδειες υφές

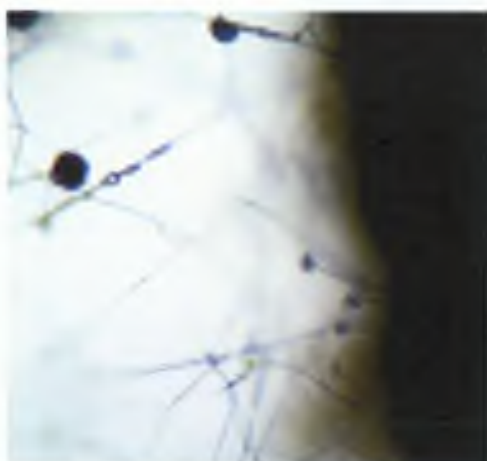
και κονιδιοφόροι του *Arthrobotrys oligospora* (Εικ. 6) και του *A. dactyloides* (Εικ. 7) αναγνωρίστηκαν μετά από 8 μέρες επώασης και τα δύο τελευταία είδη είχαν κάνει παγίδες και είχαν παγιδεύσει νηματώδεις (Εικ.8).



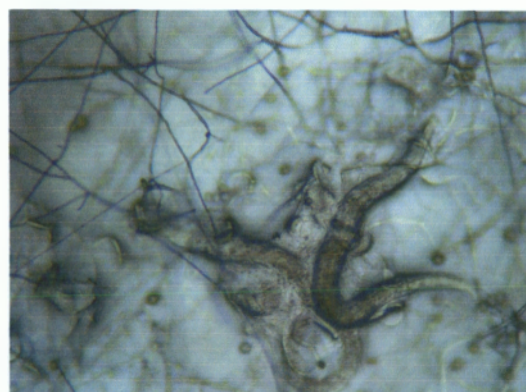
Εικόνα 5: Ανθοειδίο και ωσόνιο



Εικόνα 6: Σπόρια *A. oligospora*

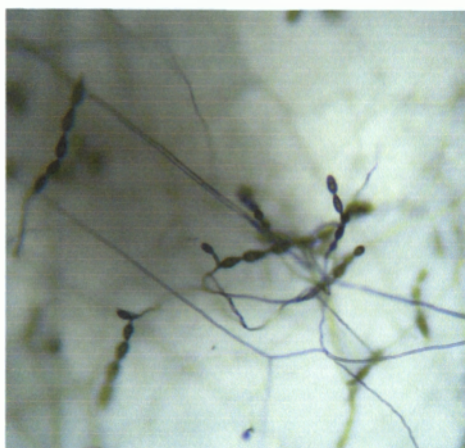


Εικόνα 7: Σπόρια *A. dactyloides*



Εικόνα 8: Νηματώδεις πιασμένοι σε δίχτυ *A. oligospora* και παρασιτισμένοι από το μύκητα

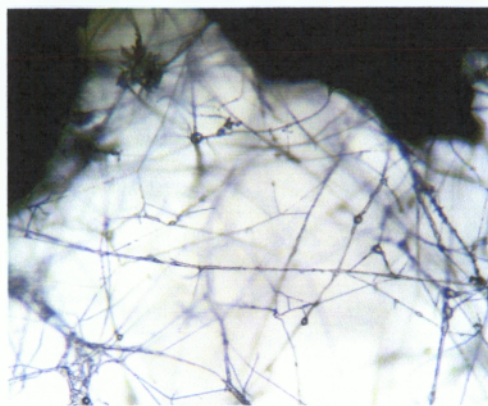
Στα τριβλία με τα αντιβιοτικά μετά από έξι μέρες επώασης υπήρχαν πολλοί φυκομύκητες, μαστιγωτά πρωτόζωα (γρήγορα κινούμενα), αμοιβάδες, σποριάγγεια και μύκητες του γένους *Fusarium* και *Alternaria* (Εικ. 9) που σχημάτιζαν σπόρια.



Εικόνα 9: Σπόρια του *Alternaria* spp.

Επίσης δεν υπήρξε ανάπτυξη βακτηρίων και οι αδηλομύκητες είχαν αναπτυχθεί κοντά στους βόλους εδάφους, διότι αναπτύσσονταν αργά σε αντίθεση με τους φυκομύκητες που αναπτύσσονταν γρήγορα. Παρατηρήθηκε ότι το μυκήλιο των φυκομυκήτων διέφερε μορφολογικά, ήταν πιο λεπτό και πυκνό, σε σχέση με το μάρτυρα και οι φυκομύκητες άρχιζαν να ολοκληρώνουν τον κύκλο της ανάπτυξης τους, οι υφές να αδειάζουν, το πρωτόπλασμα γίνονταν πυκνό σ' ορισμένα σημεία, εμφανίστηκαν κοκκώδη σποριάγγεια φυκομυκήτων και χλαμυδοσπόρια άρχιζαν να εμφανίζονται. Αποικίες αδηλομυκήτων αναπτύσσονταν με πυκνό εναέριο μυκήλιο στα

υλικά με τα αντιβιοτικά που ξεκινούσαν από το έδαφος και εξαπλώνονταν προς το κέντρο των τριβλίων και στο βάθος του υλικού (Εικ. 10). Υπήρξε μεγάλη ανάπτυξη μυκήτων λόγω της απουσίας βακτηρίων, οι οποίοι εκμεταλλεύονταν τα θρεπτικά υλικά και αυξάνονταν με γρήγορο ρυθμό. Μετά από 17 μέρες επώασης αναγνωρίστηκαν κονιδιοφόροι του *A. oligospora* και του *A. dactyloides*, οι οποίοι με τις παγίδες τους είχαν παγιδεύσει νηματώδεις.



Εικόνα 10: Μύκητες ξεκινούν από το έδαφος

8^η Δοκιμή

"Δοκιμή της επίδρασης των αντιβιοτικών στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη και χλωραμφαινικόλη στη βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη αποικιών των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides* και στην παρεμπόδιση των εδαφικών βακτηρίων. Η δοκιμή αυτή διαφέρει από την 7^η στο βασικό μέσο καλλιέργειας που ήταν σκέτο άγαρ. Η δοκιμή αυτή έγινε σε τριβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Plain Agar (P.A.) με προσθήκη βόλων εδάφους".

•Σκοπός

Σκοπός του πειράματος ήταν να ερευνηθεί τυχόν παρεμπόδιση της βλάστησης των σπορίων των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides* στα συγκεκριμένα αντιβιοτικά, σε περιβάλλον πτωχό σε ενέργεια και πόσο το συγκεκριμένο θρεπτικό υπόστρωμα θα επηρέαζε τη βλάστηση των σπορίων του μύκητα *A. oligospora* και *A. dactyloides*.

Επίσης για την καλύτερη μελέτη των διαφόρων εδαφικών πληθυσμών, χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα διαφορετικής προέλευσης εδάφη.

•Εκτέλεση πειράματος

Κατά το πείραμα αυτό, διερευνήθηκε η δράση των αντιβιοτικών στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη, χλωραμφαινικόλη σε συγκεντρώσεις όπως φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Επεμβάσεις	Συγκέντρωση μg/ml σε P.A.		
	πενικιλίνη	χλωραμφαινικόλη	στρεπτομυκίνη
3 αντιβιοτικά	100	100	100
Μάρτυρας	-	-	-

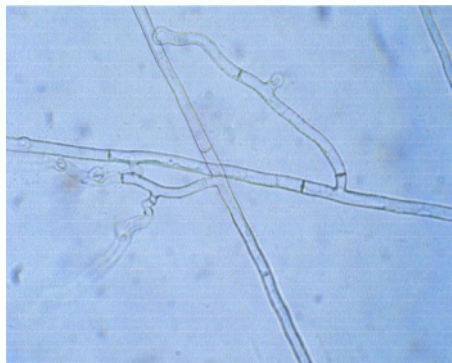
Συνολικά γίνονταν 3 επαναλήψεις (τριβλία) για την κάθε επέμβαση και για το κάθε είδος εδάφους. Σε επόμενο στάδιο, επωάζονταν και γίνονταν η παρατήρηση των τριβλίων με σκοπό την αναγνώριση των αποικιών των μυκήτων.

●Αποτελέσματα

Αρχικά τα τριβλία όλων των επεμβάσεων (και του μάρτυρα) εξετάζονταν με γυμνό οφθαλμό και παρατηρήθηκε ότι μετά από έξι μέρες επώασης η ανάπτυξη μυκηλίου των μυκήτων ήταν μειωμένη εξαιτίας του θρεπτικού υλικού Plain agar, το οποίο έχει πολύ μικρή ποσότητα θρεπτικών στοιχείων.

Στη συνέχεια αφού εξετάζονταν στο μικροσκόπιο με καλυπτρίδα πάνω στην επιφάνεια του υλικού, αναγνωρίστηκε σε πολλά σημεία η παρουσία κονιδιοφόρων μυκήτων του γένους *Fusarium*. Επίσης από μυκήλιο άρχισαν να αναπτύσσονται κονιδιοσπόρια.

Μετά από εννιά μέρες επώασης στα τριβλία με τα αντιβιοτικά αναγνωρίστηκε μυκήλιο μύκητα του γένους *Rhizoctonia* spp. το οποίο είχε κάνει αναστομώσεις (Εικόνα 11) και οι υφές του άρχιζαν να αδειάζουν.



Εικόνα 11: Αναστομώσεις *Rhizoctonia* spp.



Εικόνα 12: Σπόρια *Fusarium* και αμοιβάδες

Στο τριβλίο του μάρτυρα αναγνωρίστηκαν σπόρια του γένους *Fusarium* και πολλές αμοιβάδες (Εικόνα 12).

9^η Δοκιμή

"Δοκιμή της επίδρασης των αντιβιοτικών στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη και χλωραμφαινικόλη στη βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη αποικιών των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides* και στην παρεμπόδιση των εδαφικών βακτηρίων. Η δοκιμή έγινε σε τριβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Compost Extract (C.E.) με προσθήκη βόλων εδάφους".

●Σκοπός

Σκοπός του πειράματος ήταν να ερευνηθεί τυχόν παρεμπόδιση της βλάστησης των σπορίων των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides* στα συγκεκριμένα αντιβιοτικά και πόσο το συγκεκριμένο θρεπτικό υπόστρωμα θα επηρέαζε τη βλάστηση των σπορίων του μύκητα *A. oligospora* και *A. dactyloides* και την ανάπτυξη της εδαφικής μικροχλωρίδας.

Επίσης για την καλύτερη μελέτη των διαφόρων εδαφικών πληθυσμών, χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα διαφορετικής προέλευσης εδάφη.

● Εκτέλεση πειράματος

Κατά το πείραμα αυτό, χρησιμοποιήθηκαν τα αντιβιοτικά σε συγκεντρώσεις όπως φαίνονται στο πίνακα που ακολουθεί:

Επεμβάσεις	Συγκέντρωση µg/ml σε C.E.		
	πενικιλίνη	χλωραμφαινικόλη	στρεπτομυκίνη
3 αντιβιοτικά	100	100	100
Μάρτυρας	-	-	-

Συνολικά γίνονταν 3 επαναλήψεις (τριβλία) για την κάθε επέμβαση και για το κάθε είδος εδάφους. Σε επόμενο στάδιο, επώαζονταν και γίνονταν η παρατήρηση των τριβλίων με σκοπό την αναγνώριση των αποικιών των μυκήτων.

● Αποτελέσματα

Αρχικά τα τριβλία όλων των επεμβάσεων (και του μάρτυρα) εξετάζονταν στο μικροσκόπιο με καλυπτρίδα πάνω στην επιφάνεια του υλικού. Μετά από οκτώ μέρες επώασης παρατηρήθηκε στα τριβλία με τα αντιβιοτικά η ανάπτυξη χλαμυδοσπορίων από κάποιο φυκομύκητα και νηματώδεις με τα αυγά τους. Επίσης άρχιζαν να αναπτύσσονται κοντά στους βόλους εδάφους μύκητες και πολλά μυκήλια ήταν στείρα και άδεια. Επίσης στα τριβλία με τα αντιβιοτικά είχαμε την ανάπτυξη δύο ειδών κονιδιοφόρων και την εμφάνιση ελάχιστων νηματωδών. Μετά από δύο εβδομάδες επώασης αναγνωρίστηκαν στα τριβλία του μάρτυρα σπόρια του μύκητα *Arthrobotrys oligospora* ο οποίος είχε σχηματίσει παγίδες με τις οποίες είχε παγιδεύσει νηματώδεις (Εικόνα 13). Επίσης



στα τριβλία με τα αντιβιοτικά και στα τριβλία του μάρτυρα παρατηρήθηκε μυκήλιο του γένους *Rhizoctonia* spp.

Εικόνα 13: Νηματώδεις πιασμένοι σε δίχτυ *A. oligospora* και παρασιτισμένοι από το μύκητα

10^η Δοκιμή

"Δοκιμή της επίδρασης των θρεπτικών ουσιών peptone και yeast extract μαζί στη βλάστηση σπορίων και κονιδίων και στην ανάπτυξη αποικιών των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides*. Η δοκιμή έγινε σε τριβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα C.E.+M.A. με προσθήκη βόλων εδάφους".

● Σκοπός

Σκοπός του πειράματος ήταν να ερευνηθεί τυχόν δυνατότητα προώθησης της βλάστησης των σπορίων και αύξησης του μυκηλίου των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides* με θρεπτικές ουσίες που αποτελούν πλούσια τροφή, πηγή αζώτου και αυξητικών παραγόντων σε στερεό θρεπτικό υλικό C.E.+M.A. και παράλληλα να βρεθεί ο καταλληλότερος τρόπος τοποθέτησης του εδάφους στο εκλεκτικό υλικό, ώστε να ανιχνεύεται η ύπαρξη των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides*.

●Εκτέλεση πειράματος

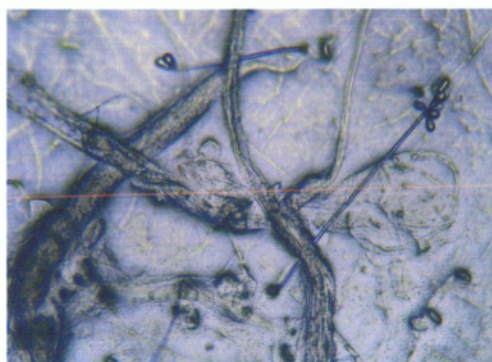
Κατά το πείραμα αυτό διερευνήθηκε η δράση των χημικών ουσιών πεπτόνη και yeast extract σε συγκεντρώσεις όπως φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Επεμβάσεις	Συγκέντρωση gr/lit σε C.E.+M.A.	
	Peptone	Yeast extract
1	1000	-
2	100	-
3	-	1000
4	-	100
5	1000	1000
6	100	100

Στα τριβλία το μπόλιασμα γινόταν στο αριστερό μέρος του τριβλίου με τους βόλους εδάφους και στο δεξί μέρος με κονίδια των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides*. Οι βόλοι εδάφους ήταν τριών διαφορετικών ειδών και επιλέχθηκαν από τα τέσσερα αρχικά είδη εδάφους λόγω του γεγονότος ότι και στα τρία εδάφη είχε παρατηρηθεί σε προηγούμενα πειράματα η ύπαρξη μυκήτων του γένους *Arthrobotrys*. Συνολικά υπήρχαν 3 επαναλήψεις για το κάθε είδος εδάφους και 3 επαναλήψεις για το μάρτυρα. Έτσι υπήρχαν τρεις επεμβάσεις, ίσες με τον αριθμό των ειδών του εδάφους.

●Αποτελέσματα

Μετά από 24h επώασης εξετάζονταν στο μικροσκόπιο όλα τα τριβλία των επεμβάσεων με τα κονίδια των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides*, και παρατηρήθηκε ότι η βλάστηση και η μορφολογία δεν διέφερε στην επέμβαση απ' αυτή του μάρτυρα. Επίσης μετά από επτά ημέρες επώασης παρατηρήθηκε στα τριβλία όλων των επεμβάσεων των θρεπτικών ουσιών και όλων των συγκεντρώσεων ανάπτυξη του μύκητα *A. oligospora*, ο οποίος είχε κάνει παγίδες με τις οποίες είχε παγιδεύσει νηματώδεις (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Νηματώδεις πιασμένοι σε δίκτυο *A. oligospora* και παρασιτισμένοι

11^η Δοκιμή

"Δοκιμή της επίδρασης των αντιβιοτικών χλωραμφαινικόλη, στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη και των μυκητοκτόνων thiophanate methyl και iprodione μαζί, στη βλάστηση σπορίων και την ανάπτυξη αποικιών των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides*. Η δοκιμή έγινε σε τριβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα C.E.+M.A. και προσθήκη αιωρήματος εδάφους".

●Σκοπός

Σκοπός του πειράματος ήταν να ερευνηθεί τυχόν παρεμπόδιση βλάστησης των σπορίων των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides* σε αντιβιοτικά και μυκητοκτόνα και παράλληλα να βρεθεί ο καταλληλότερος τρόπος τοποθέτησης του εδάφους στο εκλεκτικό υλικό, ώστε να ανιχνεύεται η ύπαρξη των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides*.

●Εκτέλεση πειράματος

Κατά το πείραμα αυτό διερευνήθηκε η δράση των χημικών ουσιών χλωραμφαινικόλη, στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη, thiophanate methyl και iprodione μαζί, σε συγκεντρώσεις όπως φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

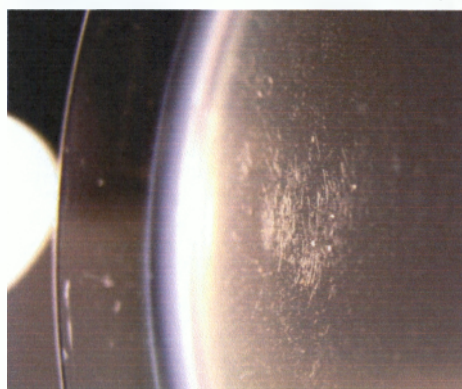
Επεμβάσεις	Συγκέντρωση µg/ml σε C.E.+M.A.				
	Penicillin	Chloramphenicol	Streptomycin	Thiophanate methyl	Iprodione
1	50	50	50	-	-
2	50	50	50	14	20

●Αποτελέσματα

Εξετάζονταν μετά από 24h τα τριβλία και των δύο επεμβάσεων με τις χημικές ουσίες και το αιώρημα σπορίων στο μικροσκόπιο και παρατηρήθηκε ότι τα σπόρια του *A. oligospora* και στις δύο επεμβάσεις είχαν βλαστήσει. Στα τριβλία που ήταν μπολιασμένα με το αιώρημα σκέτου εδάφους και εδάφους που περιείχε και σπόρια, όταν εξετάστηκαν μετά από επτά μέρες στο στερεοσκόπιο και το μικροσκόπιο, οι μύκητες που αναπτύχθηκαν ήταν κυρίως μύκητες των γενών *Aspergillus*, *Trichoderma* και *Penicillium*. Παρατηρήθηκαν σπόρια διαφόρων μυκήτων οι οποίοι θα ανταγωνίζονταν τον *Arthrobotrys* και πολλοί φυκομύκητες.



Εικόνα 15: Ορατές αποικίες μυκήτων



Εικόνα 16: Το ίδιο τριβλίο της διαφανής εικόνας όταν φωτίζεται με έντονο πλάγιο φως και "μαύρο φόντο" (dark field) όπου εμφανίζεται αποικία μύκητα του γένους *Arthrobotrys*.

Επίσης το υλικό με ή χωρίς τα μυκητοκτό

να επιτρέπει να αναπτυχθούν διάφοροι μύκητες του εδάφους και να σχηματίσουν ορατές αποικίες (Εικ. 15). Το ίδιο υλικό επιτρέπει την ανάπτυξη του *Arthrobotrys* αλλά η αποικία που σχηματίζεται είναι "αδιαφανής" σχεδόν αδιόρατη (Εικ. 16) και δεν επιτρέπει τη μέτρηση πολλαπλασιαστικών μονάδων του μύκητα στο έδαφος (Εικ. 17).



Εικόνα 17: Το ίδιο τριβλίο με "αδιόρατες" αποικίες του *Arthrobotrys*.

12η Δοκιμή

"Δοκιμή της επίδρασης των αντιβιοτικών χλωραμφαινικόλη, στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη και των μυκητοκτόνων metalaxyl, oxgall και rose bengal στη βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη αποικιών των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides*. Η δοκιμή έγινε σε τριβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα C.E.+M.A. με προσθήκη αιωρήματος εδάφους".

●Σκοπός

Σκοπός του πειράματος ήταν να γίνει μία απόπειρα να αξιοποιηθούν οι γνώσεις που αποκτήθηκαν από προηγούμενα πειράματα σε σχέση με τη χρήση διαφόρων ουσιών και πόσο αυτά παρεμποδίζουν τη βλάστηση των σπορίων των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides*.

●Εκτέλεση πειράματος

Κατά το πείραμα αυτό διερευνήθηκε η δράση των χημικών ουσιών χλωραμφαινικόλη, στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη, metalaxyl, oxgall και rose bengal σε συγκεντρώσεις όπως φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

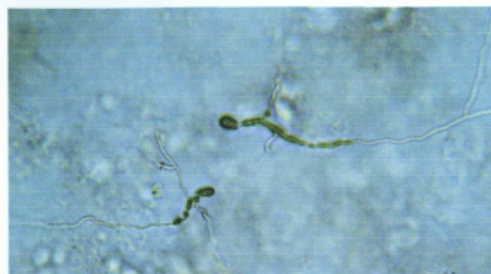
Επεμβάσεις	Συγκέντρωση µg/ml σε C.E.+M.A.					
	Penicillin	Chloramphenicol	Streptomycin	Metalaxyl	Oxgall	Rose bengal
1	50	50	50	-	-	-
2	50	50	50	25	-	-
3	50	50	50	-	1000	-
4	50	50	50	-	500	-
5	50	50	50	-	-	50

●Αποτελέσματα

Εξετάστηκαν μετά από 24h επώασης τα τριβλία των πέντε επεμβάσεων με τις χημικές ουσίες και το αιώρημα σπορίων στο μικροσκόπιο και παρατηρήθηκε ότι τα σπόρια του *A. oligospora* και στις πέντε επεμβάσεις είχαν βλαστήσει (Εικ. 18 & 19).



Εικόνα 19: Βλαστημένα σπόρια *A. oligospora* της 5^{ης} επέμβασης



Εικόνα 18: Βλαστημένα σπόρια *A. oligospora* της 3^{ης} επέμβασης

από πέντε ημέρες στο στερεοσκόπιο και το μικροσκόπιο, παρατηρήθηκε ότι στην πέμπτη επέμβαση δεν περιορίστηκαν οι αποικίες με αποτέλεσμα να αναπτυχθούν πολλοί μύκητες εδάφους (Εικ. 20) άσχετοι του *Arthrobotrys* spp. (Εικ. 21). Επίσης μετά από εννιά μέρες



Εικόνα 21: Πλήθος αποικιών στη 3^η επέμβαση

Στα τριβλία που ήταν μολιασμένα με το σκέτο αιώρημα εδάφους και το αιώρημα εδάφους που περιείχε και σπόρια, όταν εξετάστηκαν μετά

παρατηρήθηκε στη δεύτερη επέμβαση η ανάπτυξη διάχυτων

αποικιών διαφόρων γενών μυκήτων με χαρακτηριστικές τις αποικίες του γένους *Trichoderma* spp. (Εικ. 22). Ύστερα από

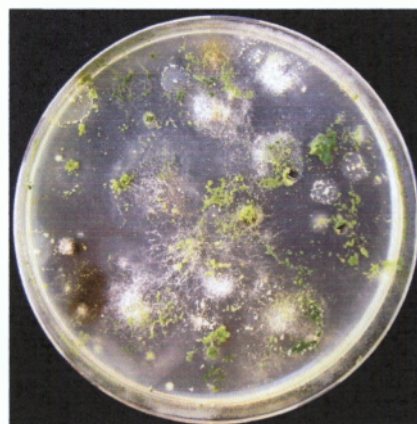
δύο εβδομάδες οι μύκητες που αναπτύχθηκαν στην τρίτη

επέμβαση ήταν κυρίως μύκητες των γενών *Verticillium*, *Penicillium*, και παρατηρήθηκαν σποριάγγεια του *Rhizopus* spp. και χλαμυδοσπόρια διαφόρων γενών μυκήτων. Στα τριβλία της δεύτερης επέμβασης παρατηρήθηκε ο σχηματισμός αποικιών και η παρουσία κονιδιοφόρων μυκήτων των γενών *Bipolaris*, *Trichoderma*, *Penicillium* και σπόρια του γένους *Fusarium*. Στα τριβλία του μάρτυρα αναγνωρίστηκαν κονιδιοφόροι του γένους *Aspergillus*. Στα τριβλία της τέταρτης επέμβασης αναπτύχθηκαν μύκητες των γενών *Aspergillus*, *Bipolaris* και παρατηρήθηκαν χλαμυδοσπόρια διαφόρων μυκήτων. Στην τελευταία

επέμβαση παρατηρήθηκε η παρουσία μυκήτων των γενών *Aspergillus*, *Bipolaris* και



Εικόνα 20: Πλήθος αποικιών στη 5^η επέμβαση



Εικόνα 22: Διάχυτες αποικίες και αποικίες του γένους *Trichoderma*

Helmithosporium. Η ανάπτυξη όλων των μυκήτων που προαναφέρθηκαν σ' όλες τις επεμβάσεις παρεμπόδισε την ανάπτυξη και εμφάνιση αποικιών του *Arthrobotrys* spp.

13^η Δοκιμή

"Δοκιμή της επίδρασης των αντιβιοτικών χλωραμφαινικόλη, στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη και των μυκητοκτόνων thiophanate methyl, iprodione, metalaxyl, oxgall, rose bengal στη βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη αποικιών των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides*. Η δοκιμή έγινε σε τριβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα C.E.+M.A. με προσθήκη αιώρηματος εδάφους".

● Σκοπός

Σκοπός του πειράματος ήταν να γίνει μία απόπειρα να αξιοποιηθούν οι γνώσεις που αποκτήθηκαν από προηγούμενα πειράματα σε σχέση με τη χρήση διαφόρων ουσιών και πόσο αυτά παρεμποδίζουν τη βλάστηση των σπορίων των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides*.

● Εκτέλεση πειράματος

Κατά το πείραμα αυτό διερευνήθηκε η δράση των χημικών ουσιών χλωραμφαινικόλη, στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη, thiophanate methyl, iprodione, metalaxyl, oxgall και rose bengal σε συγκεντρώσεις όπως φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Ουσίες	Επεμβάσεις-Συγκεντρώσεις µg/ml σε C.E.+M.A.			
	1	2	3	4
Penicillin	50	50	50	50
Chloramphenicol	50	50	50	50
Streptomycin	50	50	50	50
Thiophanate methyl	14	14	14	14
Iprodione	20	20	20	20
Metalaxyl	-	25	25	25
Oxgall	-	-	-	1000
Rose bengal	-	-	50	-

● Αποτελέσματα

Εξετάζοντας μετά από τέσσερις μέρες τα τριβλία των τεσσάρων επεμβάσεων με τις χημικές ουσίες και το αιώρημα σπορίων στο μικροσκόπιο, παρατηρήθηκε ότι τα σπόρια του *A. oligospora* και στις τέσσερις επεμβάσεις είχαν βλαστήσει. Επίσης οι αποικίες του μύκητα μετά από πέντε ημέρες ήταν μικρές και μετρήσιμες με γυμνό οφθαλμό. Στα τριβλία που είχανμπολιαστεί με το σκέτο αιώρημα εδάφους και το αιώρημα εδάφους που περιείχε και σπόρια των *Arthrobotrys* spp., οι μύκητες που



Εικόνα 23: Αποικίες στη 3^η επέμβαση

αναπτύχθηκαν ήταν κυρίως των γενών *Trichoderma* και *Fusarium* και παρατηρήθηκε ότι στην 3^η επέμβαση οι αποικίες ήταν μικρότερες (Εικ. 23).

14^η Δοκιμή

"Δοκιμή της επίδρασης των αντιβιοτικών χλωραμφαινικόλη, στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη, των μυκητοκτόνων thiophanate methyl, iprodione, metalaxyl, malachite green και της χημικής ουσίας tergitol στη βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη αποικιών των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides*. Η δοκιμή έγινε σε τριβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα C.E.+M.A. με προσθήκη αιωρήματος εδάφους και βόλων εδάφους".

●Σκοπός

Σκοπός του πειράματος ήταν να γίνει μία προσπάθεια ισόρροπης χρήσης των ουσιών που είχαν επιλεγεί ως κατάλληλες για τους υπό μελέτη μύκητες και παράλληλα η προσθήκη της tergitol και του malachite green ώστε να προκαλέσουν τη μείωση σε μέγεθος της ανάπτυξης της αποικίας του υπό μελέτη μύκητα ώστε να είναι αυτές μετρήσιμες με γυμνό οφθαλμό.

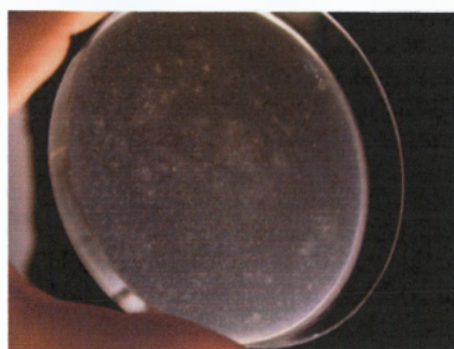
●Εκτέλεση πειράματος

Κατά το πείραμα αυτό, διερευνήθηκε η δράση των χημικών ουσιών στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη, χλωραμφαινικόλη, thiophanate methyl, iprodione, metalaxyl, tergitol, malachite green σε συγκεντρώσεις όπως φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

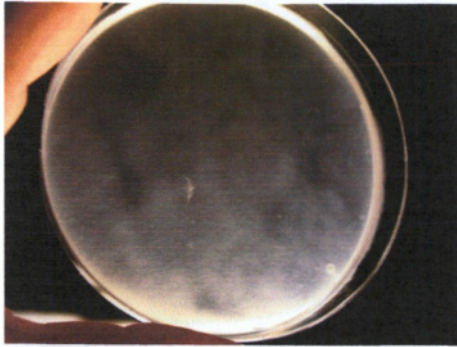
Ουσίες	Επεμβάσεις-Συγκεντρώσεις σε C.E.+M.A.			
	1	2	3	4
Penicillin	50µg/ml	50µg/ml	50µg/ml	50µg/ml
Chloramphenicol	50µg/ml	50µg/ml	50µg/ml	50µg/ml
Streptomycin	50µg/ml	50µg/ml	50µg/ml	50µg/ml
Thiophanate methyl	14µg/ml	14µg/ml	14µg/ml	14µg/ml
Iprodione	20µg/ml	20µg/ml	20µg/ml	20µg/ml
Metalaxyl	25µg/ml	25µg/ml	25µg/ml	25µg/ml
Tergitol	0,1µl/ml	0,5µl/ml	-	-
Malachite green	-	-	1µg/ml	5µg/ml

●Αποτελέσματα

Εξετάζοντας μετά από τέσσερις μέρες τα τριβλία των τεσσάρων επεμβάσεων με τις χημικές ουσίες και το αιώρημα σπορίων στο μικροσκόπιο, παρατηρήθηκε ότι τα σπόρια του *A. oligospora* και στις τέσσερις επεμβάσεις είχαν βλαστήσει. Στα τριβλία που περιείχαν tergitol οι αποικίες του μύκητα ήταν μικρότερες (Εικ. 24) σε αντίθεση με τις αποικίες των τριβλίων που ήταν μπολιασμένα με malachite green, όπου οι αποικίες είχαν αναπτυχθεί αρκετά (Εικ. 25). Παρατηρήθηκε επίσης στα τριβλία με το αιώρημα εδάφους που περιείχε



Εικόνα 24: Αποικίες μυκήτων σε τριβλίο που περιείχαν tergitol



Εικόνα 25: Αποικίες μυκήτων σε τριβλίο που περιείχαν malachite green

και σπόρια της πρώτης επέμβασης με την τεργκιτόλη (tergitol), ότι οι αποικίες του μύκητα ήταν μικρότερες (Εικ. 26) σε αντίθεση μ' αυτές της δεύτερης



Εικόνα 26: Αποικίες μυκήτων σε τριβλίο της πρώτης επέμβασης

επέμβασης (Εικ. 27) και ότι οι αποικίες του μύκητα στην τρίτη επέμβαση με το μαλαχίτο πράσινο (malachite green) ήταν μικρότερες (Εικ. 28) σε σύγκριση μ' αυτές της τέταρτης επέμβασης (Εικ. 29).



Εικόνα 27: Αποικίες μυκήτων σε τριβλίο της δεύτερης επέμβασης



Εικόνα 28: Αποικίες μυκήτων σε τριβλίο της τρίτης επέμβασης



Εικόνα 29: Αποικίες μυκήτων σε τριβλίο της τέταρτης επέμβασης

15^η Δοκιμή

"Δοκιμή της επίδρασης των αντιβιοτικών χλωραμφαινικόλη, στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη, των μυκητοκτόνων thiophanate methyl, iprodione, metalaxyl και των χημικών ουσιών tergitol και σακχαρόζης στη βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη

αποικιών των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides*. Η δοκιμή έγινε σε τριβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα C.E.+M.A. με προσθήκη αιωρήματος εδάφους και βόλων εδάφους".

●Σκοπός

Σκοπός του πειράματος ήταν να γίνει μία τελευταία προσπάθεια ισόρροπης χρήσης των ουσιών που είχαν επιλεγεί ως κατάλληλες για τους υπό μελέτη μύκητες και προσθήκης της σακχαρόζης με την ελπίδα να σχηματίζει συμπαγείς και διακριτές αποικίες.

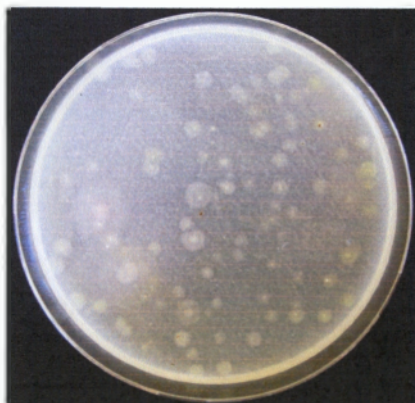
●Εκτέλεση πειράματος

Κατά το πείραμα αυτό, διερευνήθηκε η δράση των χημικών ουσιών στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη, χλωραμφαινικόλη, thiophanate methyl, iprodione, metalaxyl, tergitol, saccharose σε συγκεντρώσεις όπως φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

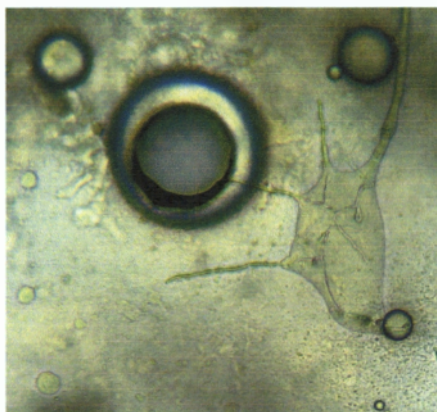
Ουσίες	Επεμβάσεις-Συγκεντρώσεις σε C.E.+M.A.			
	1	2	3	4
Penicillin	50μg/ml	50μg/ml	50μg/ml	50μg/ml
Chloramphenicol	50μg/ml	50μg/ml	50μg/ml	50μg/ml
Streptomycin	50μg/ml	50μg/ml	50μg/ml	50μg/ml
Thiophanate methyl	14μg/ml	14μg/ml	14μg/ml	14μg/ml
Iprodione	20μg/ml	20μg/ml	20μg/ml	20μg/ml
Metalaxyl	25μg/ml	25μg/ml	25μg/ml	25μg/ml
Tergitol	0,5μl/ml	0,5μl/ml	2,5μl/ml	2,5μl/ml
Saccharose	-	20mg/ml	-	20mg/ml

●Αποτελέσματα

Εξετάζοντας μετά από δύο μέρες τα τριβλία των τεσσάρων επεμβάσεων με τα αντιβιοτικά και το αιώρημα σπορίων στο μικροσκόπιο, παρατηρήθηκε ότι τα σπόρια του *A. oligospora* και στις τέσσερις επεμβάσεις είχαν βλαστήσει (Εικ. 30). Επίσης στα τριβλία που περιείχαν



Εικόνα 31: Ιζήματα της tergitol



Εικόνα 30: Βλάστηση σπορίων του *A. oligospora*

tergitol οι αποικίες του μύκητα ήταν μικρότερες σε σύγκριση με τις αποικίες των άλλων τριβλίων με τα αντιβιοτικά. Στα τριβλία που ήταν

μπολιασμένα με το αιώρημα σκέτου εδάφους όταν εξετάστηκαν στο στερεοσκόπιο και το μικροσκόπιο, παρατηρήθηκε από το σχηματισμό αποικιών και την παρουσία κονιδιοφόρων, μύκητες των γενών

Stemphylium, *Verticillium*, *Monilia* και *Botryoberma*. Επίσης στα τριβλία αυτά είχαμε

την παρουσία ίζημάτων (Εικ. 31) και απουσία βακτηρίων λόγω των τριών αντιβιοτικών (στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη, χλωραμφαινικόλη). Στα τριβλία που είχαν μπολιαστεί με το αιώρημα εδάφους που περιείχε και σπόρια, οι μύκητες που αναπτύχθηκαν ήταν κυρίως μύκητες των γενών *Trichoderma* και *Aspergillus*. Στα τριβλία που είχαν βόλους εδάφους παρατηρήθηκε η παρουσία μυκήτων των γενών *Aspergillus*, *Arthrobotrys*. Χαρακτηριστική ήταν και η εμφάνιση πολλών νηματωδών.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια ανάπτυξης ενός εκλεκτικού υλικού για την ανίχνευση, καταμέτρηση και απομόνωση μυκήτων του γένους *Arthrobotrys* από το έδαφος, με σκοπό να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια στην παρακολούθηση των πληθυσμών των μυκήτων αυτών στο έδαφος και στη ριζόσφαιρα των φυτών.

Ένα εκλεκτικό υλικό που οι συγκεκριμένοι μύκητες θα μπορούν να αναπτύσσονται χωρίς να παρεμποδίζονται από την υπόλοιπη εδαφική μικροχλωρίδα είναι απαραίτητο για την αξιοποίηση των μυκήτων αυτών στη βιολογική καταπολέμηση των βλαβερών σκωλήκων.

Η ανάπτυξη ενός τέτοιου υλικού σήμερα είναι δύσκολη, παρόλο που υπάρχει έντονη ανάγκη για χρησιμοποίηση των μυκήτων αυτών σε μεθόδους βιολογικής καταπολέμησης.

Ο *A. oligospora* και *A. dactyloides* που είναι είδη του γένους *Arthrobotrys* είναι αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη μας και προέρχονται από ελληνικά εδάφη. Η μελέτη των μυκήτων αυτών γίνεται τα τελευταία 5 χρόνια από το Εργαστήριο Μυκητολογίας του Μ.Φ.Ι. και είναι αξιοσημείωτο ότι αποτελούν συνήθη μέλη της εδαφικής μικροχλωρίδας των περισσότερων ελληνικών εδαφών.

Στη παρούσα μελέτη τι βρέθηκε:

Υπάρχει μια σειρά αρχών που πρέπει να ακολουθούνται για να βρεθεί ένα εκλεκτικό υλικό για ένα συγκεκριμένο μύκητα, αρχές που αναφέρονται από το Tsao. Είναι σημαντικό όμως να εκμεταλλευόμαστε τις ιδιαιτερότητες του κάθε μύκητα, ενώ ταυτόχρονα αντλήσαμε από τη βιβλιογραφία πολλές πληροφορίες για εκλεκτικά υλικά άλλων μυκήτων. Αυτή η βιβλιογραφική έρευνα παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον ενώ στη παρούσα μελέτη τη συναντούμε υπό μορφή στατιστικών διαγραμμάτων.

Διαπιστώσαμε ότι τα χρησιμοποιούμενα εκλεκτικά υλικά του δεύτερου μισού του 20^{ου} αιώνα αποτέλεσαν το σημαντικότερο εργαλείο για τη μελέτη των φυτοπαθογόνων μυκήτων που ζουν σε πολύπλοκα περιβάλλοντα όπως το έδαφος. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι τα εκλεκτικά υλικά που αναπτύσσονται και χρησιμοποιούνται με αυξανόμενο ρυθμό στην έρευνα και στις εργασίες ξεπερνούν τις σύγχρονες μοριακές τεχνικές (ανοσολογικές και DNA). Στη παρούσα μελέτη παρατίθενται οχετικά διαγράμματα.

Είναι γεγονός πως για τους μύκητες του γένους *Arthrobotrys* δεν υπάρχουν επαρκείς πληροφορίες ως προς τη φυσιολογία, την οικολογία και τις τροφικές απαιτήσεις τους, γι' αυτό το λόγο το πειραματικό μέρος στηρίχθηκε σε στοιχεία που είχαν συγκεντρωθεί από έρευνες που έγιναν στο Εργαστήριο Μυκητολογίας του Μ.Φ.Ι.

Πρώτα έπρεπε να αποφασιστεί σε πιο θρεπτικό υπόστρωμα θα αναπτύσσονταν οι μύκητες αυτοί που θα είχαν κάποια εκλεκτική δράση ευνοώντας τους συγκεκριμένους μύκητες και παρεμποδίζοντας τους άλλους. Από προηγούμενες έρευνες στο Εργ. Μυκητολογίας είχε γίνει γνωστό ότι «φτωχά» στερεά υποστρώματα όπως το αραιό (1/10 του κανονικού) εκχύλισμα καλαμποκιού με άγαρ (Μ.Α.) ήταν ιδανικό για την ταχεία γραμμική αύξηση της διαμέτρου της αποικίας και την παραγωγή κονιδιοφόρων του μύκητα. Προφανώς οι υπό μελέτη μύκητες έχουν αναπτυσσόμενους μηχανισμούς επιβίωσης σε φτωχά υλικά και ίσως γι' αυτό ανέπτυξαν και μηχανισμούς παγίδευσης νηματωδών.

Το υλικό αυτό χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, όμως διαπιστώθηκε ότι οι αποικίες που παράγονται σ' ένα τέτοιο υλικό είναι πολύ «αχνές» σχεδόν διαφανείς και δεν μπορούν να διακριθούν ανάμεσα σε αποικίες άλλων μυκήτων. Όταν δε τα τριβλία μπολιάζονται με πυκνό εδαφικό αιώρημα που περιέχει αδιαφανή κοκκώδη συστατικά η κατάσταση αυτή χειροτερεύει. Η παντελής έλλειψη ή η αργή εμφάνιση κονιδιοφόρων και σπορίων ήταν η άλλη αδυναμία του βασικού υλικού αυτού. Βέβαια όταν προσθέτουμε στο υλικό εκχύλισμα εδάφους ή εκχύλισμα κομπόστας που προορίζεται για ανθοκομική χρήση η κατάσταση βελτιώνεται.

Όταν το υλικό ενισχύονταν με θρεπτικά συστατικά όπως πλήρη συγκέντρωση Μ.Α., πεπτόνη, εκχύλισμα ζύμης κ.α. τότε οι αποικίες των *Arthrobotrys* spp., ήταν πιο συμπαγείς αλλά δεν σχημάτιζαν κονιδιοφόρους και έτσι χάνονταν τα πλεονεκτήματα για το γένος *Arthrobotrys* ενώ επωφελούνταν άλλα μέλη της εδαφικής μικροχλωρίδας, κυρίως αδηλομύκητες και φυκομύκητες.

Εν συνεχεία και για να αποκτήσει το υλικό μεγαλύτερη εκλεκτικότητα ήταν απαραίτητος ο εμπλουτισμός του με χημικούς εκλεκτικούς παράγοντες.

Ο κατάλληλος συνδυασμός αντιβακτηριακών αντιβιοτικών περιλαμβάνει στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη και γλωραμφαινικόλη και παρεμποδίζει πλήρως τα ποικίλα εδαφικά βακτήρια χωρίς να επηρεάζει τη βλάστηση των σπορίων και την ανάπτυξη του μυκηλίου των υπό μελέτη μυκήτων. Στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε υλικά με το παραπάνω συνδυασμό αντιβιοτικών και αιώρημα εδάφους για να δοκιμάσουμε ουσίες που παρεμποδίζουν μύκητες. Από τη διεθνή βιβλιογραφία αντήσαμε πληροφορίες για τη φύση και τη δοθολογία των ουσιών που εκλεκτικά παρεμποδίζουν την ανάπτυξη μυκήτων. Οι δοκιμές άρχισαν με τις χαμηλότερες χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις και τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά καθώς διαπιστώθηκε ότι οι δόσεις της τάξης του 1 ή 10 μg/ml των μυκητοκτόνων PCNB, thiram, triadimefon, metalaxyl, thiophanate methyl κ.α. που χρησιμοποιούνται συχνά σε εκλεκτικά υλικά, δεν επιδρούν σημαντικά στην ανάπτυξη των μυκήτων *Arthrobotrys* spp. ούτε στην βλάστηση των σπορίων, ενώ σε μεγαλύτερες δόσεις κάποιες από αυτές γίνονταν παρεμποδιστικές.

Ο πιο αργός στη ταχύτητα ανάπτυξης και ο πιο ευπαθής στα μυκητοκτόνα εμφανίστηκε να είναι ο *A. dactyloides*. Από αυτό αντιλαμβανόμαστε ότι για την ανάπτυξη ενός εκλεκτικού υλικού που θα απομονώνει όλα τα μέλη του γένους *Arthrobotrys* θα πρέπει να περιληφθούν στις δοκιμές και άλλα είδη αυτού του γένους.

Ενώ στις δοκιμές που έγιναν σε καθαρά υλικά με μόνους τους δύο υπό μελέτη μύκητες πολλοί συνδυασμοί αντιβιοτικών-μυκητοκτόνων φαίνονταν να είναι ικανοποιητικοί, όταν τα ίδια υλικά δοκιμάζονταν με φυσικό έδαφος, αναπτύσσονταν γρήγορα και πολλοί άλλοι μικροοργανισμοί κυρίως αδηλομύκητες και φυκομύκητες που καταλαμβάνουν την επιφάνεια του υλικού και «συσκότιζαν» τις αποικίες των *Arthrobotrys* spp.

Η έλλειψη πρώιμης καρποφορίας των υπό μελέτη μυκήτων ήταν άλλη μια αδυναμία των υλικών που δοκιμάστηκαν. Είναι απαραίτητη η παρουσία των καρποφοριών που βοηθούν στο βέβαιο προσδιορισμό τους επειδή οι αποικίες διαφορετικών μυκήτων μπορεί να μοιάζουν μεταξύ τους. Όταν οι αποικίες είχαν απλωθεί σ' όλη σχεδόν την επιφάνεια του τριβλίου, τότε εμφανίστηκαν οι καρποφορίες. Οι παγιδευτικοί μηχανισμοί που αναπτύσσουν οι μύκητες του γένους *Arthrobotrys* είναι χαρακτηριστικοί και βοηθούν στην αναγνώριση τους. Φαίνεται όμως πως αυτά τα όργανα εμφανίζονται μόνο με ταυτόχρονη παρουσία νηματώδων στο υλικό.

Όταν τα υλικά των δοκιμών εμβολιάζονταν με αιώρημα εδάφους υπήρχαν κατά κανόνα και λίγοι νηματώδεις ή αυγά νηματώδων και κατά την επώαση 2-3

εβδομάδων ο πληθυσμός αυτός αυξάνονταν. Τότε διαπιστώνονταν ότι σχηματίζονταν στο υλικό και τα όργανα παγίδευσης που έπιαναν νηματώδεις και παράλληλα σχηματίζονταν και κονιδιοφόροι. Το μέγεθος των αποικιών όμως ήταν τέτοιο που δεν επέτρεπε την απαρίθμηση τους. Το ίδιο συνέβαινε και στην περίπτωση που τοποθετούνταν στο υλικό βόλοι εδάφους, πράγμα που αποκλείει τη χρησιμοποίηση της τεχνικής αυτής για να υπάρχουν πολλές «επαναλήψεις» στο ίδιο τριβλίο και να βελτιωθεί έτσι η μέθοδος «Most Probable Number».

Είναι μάλλον μικρή η πιθανότητα να βρεθεί ένας ικανοποιητικός συνδυασμός ουσιών που να καθιστά το υλικό απόλυτα εκλεκτικό μιας και είχαμε συχνά την παρουσία ανεπιθύμητων μυκήτων στα υλικά. Ίσως στο μέλλον να χρησιμοποιηθεί ένα τέτοιο υλικό ως «ημιεκλεκτικό».

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Nordbring-Hertz Birgit, Jansson Hans-Börje, Tunlid Andres (2002). Nematophagous Fungi. Lund University, Lund, Sweden.

Cooke R. C. (1964). A key to the nematode-destroying fungi. Trans. Mycol. Soc. 47(1): 61-74.

Barron George-L. (1968). The genera of hyphomycetes from soil.

Drechsler C. (1937). Three hyphomycetes that capture nematodes in adhesive networks. Mycologia. 29: 464-487.

Higgins M. L., Pramer Danid (1967). Fungal morphogenesis: Ring formation and closure by *Arthrobotrys dactyloides*. Science 155:345-346.

Estey -R-H, Tzean -S-S (1976). Scanning electron microscopy of fungal nematode-trapping devices. Trans. Br. Mycol. Soc. 66 (3): 520-523.

Nordbring-Hertz Birgit, Neumeister Heike, Sjollema Klass, Veenhuis Marten (1995). A conidial trap-forming mutant of *Arthrobotrys oligospora*. Mycological Research 11: 1395-1398.

Tsao Peter H. (1970). Selective media for isolation of pathogenic fungi. University of California, Riverside, California. 157-179.

Δημόπουλος Βασίλης (1998). Φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Εκδόσεις Εμβryo, Αθήνα, 126-131.

<http://www.wikipedia.the free encyclopedia.htm>

<http://www.pesticide information profiles.htm>