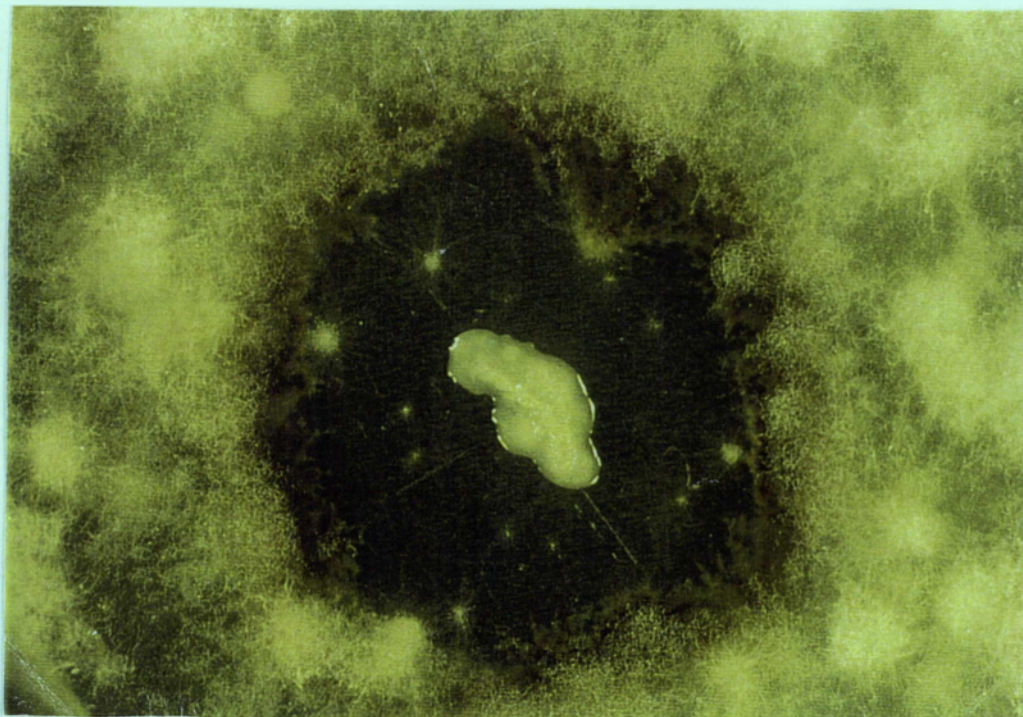


ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

93013

65

«ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
IN VITRO ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *Botrytis cinerea* ΑΠΟ
ΟΡΙΣΜΕΝΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ»



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΤΟΥ ΣΠΟΥΔΑΣΤΗ: ΤΖΙΟΛΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ

ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: ΗΛΙΟΠΟΥΛΟΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 1998

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε κατά την διάρκεια της πρακτικής μου άσκησης στο Εργαστήριο Βακτηριολογίας του Μπενακειού Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου.

Ευχαριστώ τον κ. Ψαλλίδα Πέτρο Γεωπόνο–Βακτηριολόγο του Μ.Φ.Ι και επιστημονικό επιβλέποντα στην πρακτική μου άσκηση. Χάρη στην πολύτιμη επιστημονική καθοδήγησή του, ήταν δυνατή η διεξαγωγή των πειραματικών δοκιμών, διάφορων άλλων επιστημονικών μεθόδων που εφαρμόστηκαν, καθώς και ο σωστός έλεγχος των αποτελεσμάτων.

Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ηλιόπουλο Αναστάσιο Γεωπόνο–Φυτοπαθολόγο, Επίκουρο Καθηγητή του ΤΕΙ Καλαμάτας και εισηγητή της εν λόγω πτυχιακής εργασίας, για την πολύτιμη συμβολή του στην τελική διαμόρφωσή της, την σύνταξή και διατύπωση του κειμένου και την παροχή πληροφοριών σχετικών με το θέμα.

Ευχαριστώ, επίσης, το προσωπικό του Εργαστηρίου Βακτηριολογίας του Μ.Φ.Ι και συγκεκριμένα τους κ.κ. Γlynό Παρασκευά, Δρακούλη Σπύρο και Καράφλα Χαρούλα, για την βοήθειά τους και τις συμβουλές τους στην διεξαγωγή των πειραματικών δοκιμών, καθώς και τον Γεωπόνο κ. Κοντοσφύρη Γιώργο για την βοήθεια του στην εύρεση της κατάλληλης βιβλιογραφίας στο συγκεκριμένο θέμα.

Τέλος, ευχαριστώ και όλους τους υπόλοιπους οι οποίοι συνέβαλαν σε οποιοδήποτε βαθμό, ώστε να ολοκληρωθεί η παρούσα μελέτη που διεξήχθη στα πλαίσια της πτυχιακής εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

Ο ΜΥΚΗΤΑΣ *Botrytis cinerea* ΩΣ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΟ

	Σελίδα
1.1 Η ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ <i>Botrytis cinerea</i> ΚΑΙ ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΙ	5
1.1.1 Γενικά	5
1.1.2 Μορφολογία – Συνθήκες ανάπτυξης	5
1.1.3 Συμπτώματα – Ζημιές	7
1.2 ΣΥΜΒΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ	10
1.2.1 Ρύθμιση συνθηκών περιβάλλοντος	10
1.2.2 Μυκητοκτόνα	13
1.2.3 Ανθεκτικότητα του <i>Botrytis cinerea</i> στα διάφορα μυκητοκτόνα και προσπάθεια αντιμετώπισης της.	14
1.3 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ	17
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ I	23

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ IN VITRO ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *Botrytis cinerea* ΑΠΟ ΟΡΙΣΜΕΝΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

2.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ	32
2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	33
2.2.1 Απομόνωση βακτηρίων από σπόρους και φυτά τομάτας και αγγουριού.	33
2.2.2 Πειραματικές δοκιμές	35
2.2.3 Ταυτοποίηση των βακτηρίων που παρουσίασαν αντιβίωση	36

2.3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	44
2.3.1	Δοκιμές αντιβιοτικής δράσης	44
2.3.2	Ταυτοποίηση	47
2.4	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	50
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ II	52
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	58

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

Ο ΜΥΚΗΤΑΣ *Botrytis cinerea* Ως ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΟ

1.1 ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ *Botrytis cinerea* ΚΑΙ ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΙ

1.1.1 Γενικά

Ο μύκητας *Botrytis cinerea* είναι το παθογόνο που προκαλεί την ασθένεια κοινώς γνωστή ως «τεφρά σήψη» και έχει ένα ευρύ φάσμα φυτών – ξενιστών, όπως κηπευτικές καλλιέργειες (τομάτα, μαρούλι, αγγούρι κ.λ.π), διάφορα καλλωπιστικά και ανθοκομικά (τριαντάφυλλα), σπυροφόρα, αμπέλι κ.α.

Ανήκει στους **Δευτερομύκητες** (Υποδιαίρεση *Deuteromycotina*), κλάση *Hyphomycetes*, τάξη *Moniliales*, οικογένεια *Moniliaceae*.

Η τέλεια μορφή του είναι ο **Ασκομύκητας** *Sclerotinia (Botryotinia) fuckeliana* της τάξης των *Helotiales* των **Δισκομυκήτων** (κλάση *Discomycetes*). Ωστόσο η μορφή αυτή σπανίως απαντάται στην φύση. (Παναγόπουλος, 1995)

1.1.2 Μορφολογία – Συνθήκες ανάπτυξης

Ο *Botrytis cinerea* κατά την ανάπτυξή του σχηματίζει κονιδιοφόρους που αποτελούνται από ένα μακρύ ποδίσκο, ο οποίος φέρει στην κορυφή του υαλώδη κονίδια. Τα κονίδια βρίσκονται επί μικρών διακλαδώσεων δίνοντας την μορφή βότρουσ, είναι μονοκύτταρα, ωοειδή, διαστάσεων 10-15 x 6-10 μm (εικ.1.1) (Ηλιόπουλος, 1996).

Πρόκειται για παθογόνο που η ανάπτυξή του ευνοείται από την ύπαρξη νεκρών ιστών πάνω στα φύλλα, ή πληγών από διάφορα αίτια (τομές κλαδέματος, κακοί καλλιεργητικοί χειρισμοί κ.λ.π). Προσβάλλει φυτά κάθε ηλικίας και όλα σχεδόν τα φυτικά όργανα. Οι κυριότεροι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την εκδήλωση επιδημίας είναι η υγρασία (απαιτήσεις σε υγρασία $\geq 95\%$) και η ύπαρξη θρεπτικών ουσιών για τη βλάστηση των κονιδίων (Marois, 1992).

Ο μύκητας δεν είναι ευαίσθητος στις διάφορες διακυμάνσεις της θερμοκρασίας αφού μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται μεταξύ 1°C και 30°C. Ωστόσο, άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης θεωρείται η μεταξύ 18-23°C, ενώ από 32°C και άνω η ανάπτυξη του παρεμποδίζεται (Παναγόπουλος, 1995).

Η ύπαρξη βροχοπτώσεων ή ομιχλών στο ύπαιθρο και η έλλειψη θέρμανσης, ο μειωμένος αερισμός και ο σχετικά ψυχρός καιρός 15-20°C στο θερμοκήπιο, αποτελούν ευνοϊκό παράγοντα για την ανάπτυξη της ασθένειας.

Ο άνεμος, συντελεί στην ελευθέρωση των κονιδίων και τη διάδοσή τους, περισσότερο απ' ό,τι το νερό ή οι καλλιεργητικοί χειρισμοί. Οι μολύνσεις, όμως γίνονται συνήθως με το σαπροφυτικό μυκήλιο, το οποίο αναπτύσσεται σε νεκρούς ιστούς, πληγές και στην συνέχεια απλώνεται στους επαπτόμενους υγιείς ιστούς (Μπουρνάκας, 1995). Η ανάπτυξη του μυκηλίου είναι ταχύτατη και σύντομα σχηματίζονται άφθονοι κονιδιοφόροι με τεράστιο αριθμό κονιδίων. Τα κονίδια βλαστάνουν γρήγορα στις σταγόνες του νερού και προκαλούν νέες μολύνσεις (εικ. 1.2). Η διάδοση των κονιδίων μπορεί, επίσης, να γίνει και με τα χέρια, τα ρούχα, τα εργαλεία ή την συγκομιδή (Παναγόπουλος, 1993).

Όπως αναφέρθηκε, οι μολύνσεις γίνονται επί νεκρών φυτικών ιστών από όπου το μυκήλιο εξαπλώνεται στους υγιείς ιστούς. Σε ό,τι αφορά το αμπέλι, οι μολύνσεις των ραγών οφείλονται στην προσβολή των ανθέων που γίνεται κατά την Άνοιξη, ή από πληγές εντόμων, ωίδιο, χαλάζι, τραυματισμό, ή την συγκομιδή (Παναγόπουλος, 1993).

Ο *Botrytis cinerea* ευθύνεται, επίσης και για το φαινόμενο της «ευγενούς σήψης» (noble rot) των σταφυλιών που προκαλείται υπό ορισμένες εδαφικές και κλιματολογικές συνθήκες. Το φαινόμενο αυτό είναι ιδιαίτερα επιθυμητό στην οινοποιία, ιδίως στην Γαλλία, για την παραγωγή οίνου από γλεύκος υψηλής συγκέντρωσης σακχάρων, που είναι πολύ αρωματικός και υψηλής ποιότητας (Μπουρνάκας, 1995).

1.1.3 Συμπτώματα – Ζημιές

Στο αμπέλι, η πιο σοβαρή ζημιά από την ασθένεια εκδηλώνεται στις ράγες, το φθινόπωρο κατά την ωρίμανσή τους. Στην επιφάνεια μερικών από αυτές εμφανίζεται μια διάχυτη καστανή κηλίδα εκτεινόμενη σε έκταση και βάθος. Η ράγα χάνει τη γυαλιστερή όψη της και η επιδερμίδα της αποκολλάται εύκολα από τη σάρκα. Αργότερα η προσβολή εκτείνεται σε όλη τη σάρκα και δημιουργείται μια μαλακή και υδαρής σήψη. Οι προσβεβλημένοι ιστοί γίνονται καστανοί, χάνουν υγρασία, ζαρώνουν και συχνά μумιοποιούνται (εικ.1.3). Λόγω ύπαρξης υγρασίας, η σήψη εξαπλώνεται εύκολα στις επαπτόμενες, με τις ήδη προσβεβλημένες ράγες. Σε συνθήκες υγρής ατμόσφαιρας, τα προσβεβλημένα όργανα καλύπτονται από την χαρακτηριστική τεφρά εξάνθιση που αποτελείται από κονιδιοφόρους και κονίδια (εικ.1.4). Επάνω, ή μέσα στους προσβεβλημένους ιστούς είναι δυνατό να σχηματιστούν σκληρώτια, τα οποία όταν βλαστήσουν, σχηματίζουν αποθήκια με ασκούς (τέλεια μορφή), ή απλώς βλαστική υφή (Ηλιόπουλος, 1996).

Την Άνοιξη, όταν επικρατεί υγρασία και βροχοπτώσεις είναι δυνατό να εμφανιστούν προσβολές σε τρυφερές κληματίδες και άνθη. Οι προσβολές αυτές, εκδηλώνονται υπό μορφή καστανών περιοχών στα μεσογονάτια διαστήματα ή στις τρυφερές κορυφές και προκαλούν σήψη και ξήρανση κορυφών και κληματίδων (εικ.1.5).

Στα φύλλα εμφανίζονται μεγάλες νεκρωτικές καστανές κηλίδες που αρχίζουν από την περιφέρεια του ελάσματος.

Στις κηπευτικές καλλιέργειες, η προσβολή από τον *Botrytis cinerea* προκαλεί συμπτώματα διαφόρων τύπων. Όταν πρόκειται για υδαρείς καρπούς και τρυφερούς βλαστούς (τομάτα, πιπεριά, μελιτζάνα), η προσβεβλημένη περιοχή έχει αρχικά ανοικτό πράσινο χρώμα και στην συνέχεια καστανό. Οι ιστοί που βρίσκονται κάτω από την επιδερμίδα, γίνονται μαλακοί και υδαρείς.

Στο μαρούλι, η προσβολή εκδηλώνεται σαν καστανέρυθρη σήψη του λαιμού και των φύλλων της βάσης. Διάφορα άλλα κονδυλόριζα, όπως καρότο, παρουσιάζονται με μολύνσεις μορφής υγρούς σήψης στις ρίζες.

Στην τομάτα, όπου ο βοτρυτής προκαλεί σοβαρές προσβολές, οι πρώτες μολύνσεις αρχίζουν από το στέλεχος, όπου προκαλείται μαλάκωμα και υδαρότητα των ιστών, κυρίως στο λαιμό (εικ.1.6). Η προσβολή εξελίσσεται κυκλικά και το φυτό μαραίνεται, πέφτοντας προς το έδαφος και τελικά ξηραίνεται.

Η προσβολή στα φύλλα, γίνεται με τη μορφή «κηλίδων στόχου», που είναι ομόκεντροι κύκλοι πρασινοκαστανού χρώματος. Οι κηλίδες εξαπλώνονται γρήγορα και μέσω του μίσχου η προσβολή επεκτείνεται στα άλλα φυλλίδια του σύνθετου φύλλου (εικ.1.7). Τέλος, το φύλλο ξηραίνεται και μέσω του μίσχου του προσβάλλεται και το στέλεχος, που εμφανίζει αρχικά έλκος καστανού χρώματος (εικ.1.8). Το μέρος του φυτού που είναι πάνω από το έλκος, αρχικά γίνεται χλωρωτικό, μαραίνεται και τέλος ξηραίνεται.

Στους καρπούς, η προσβολή προκαλεί μαλάκωμα, υδαρότητα και πλούσια εξάνθιση (κονιδιοφόροι με κονίδια) (εικ.1.9). Επίσης, η προσβολή μπορεί να εκδηλωθεί και με τη μορφή εμφάνισης «κηλίδων φάντασμα» που είναι μικρές δακτυλιοειδής, υπόλευκες και μπορεί να συνενωθούν σε μεγαλύτερες. Μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα, δημιουργείται στο κέντρο τους, νεκρωτικό στίγμα όμοιο με νύγμα εντόμου (εικ.1.10). Μια τέτοια μορφή, δημιουργείται όταν βλασάνουν σπόρια στην επιφάνεια μικρών καρπών (2-3 cm) αλλά στη συνέχεια το μυκήλιο θανατώνεται μόλις εισέλθει στον ζωντανό εσωτερικό ιστό. Έτσι, δεν αναπτύσσεται και δεν προκαλείται σήψη. Η μόνη ζημιά που προκαλείται, είναι η μείωση της εμπορικής αξίας, καθώς οι «κηλίδες φάντασμα», γίνονται αισθητές όταν ο πράσινος καρπός πάρει την τελική του ανάπτυξη (εικ.1.11)

Στην τριανταφυλλιά ο *Botrytis cinerea* αποτελεί, έναν από τους κυριότερους περιοριστικούς παράγοντες της παραγωγής τριαντάφυλλων, ειδικά στα σύγχρονα θερμοκήπια υψηλής ενέργειας, όπου η εναλλαγή του

αέρα έχει ελαχιστοποιηθεί. Επιπλέον, θεωρείται σοβαρή μετασυλλεκτική ασθένεια (post-harvest disease) που εμφανίζεται στα τριαντάφυλλα κατά την παραμονή τους στο βάζο. Παρουσιάζονται συμπτώματα εμφάνισης καστανών κηλίδων στα πέταλα που μειώνουν την ποιότητα και εμπορική αξία των ανθέων (Marois, 1992).

1.2 ΣΥΜΒΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ

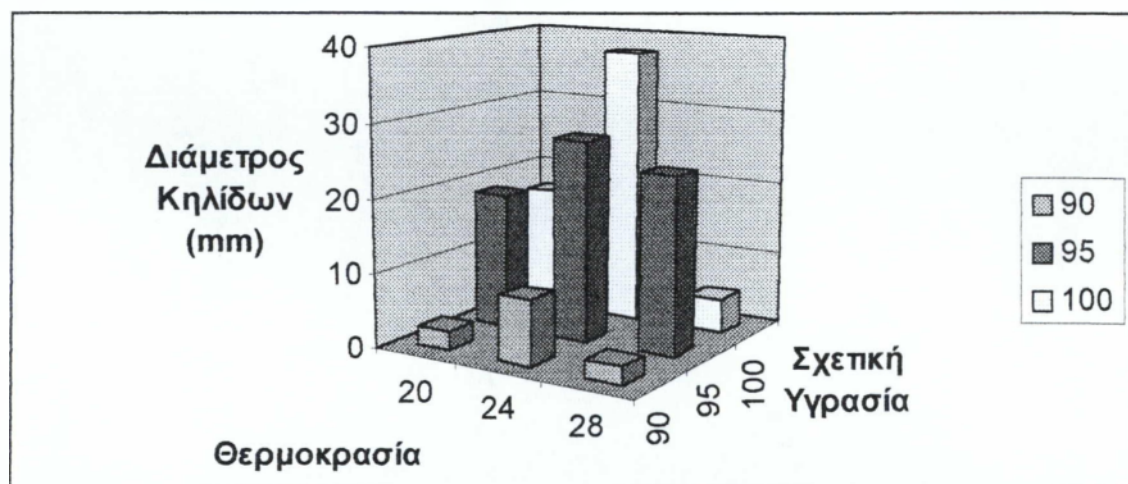
1.2.1 Ρύθμιση συνθηκών περιβάλλοντος

Όπως αναφέρθηκε, η ανάπτυξη του βοτρυτή ευνοείται, κυρίως, από συνθήκες υψηλής υγρασίας ($\geq 95\%$). Σε σειρά πειραμάτων που διεξήχθησαν από τους D.J. Hunnusch και G.J. Bolland το 1995, εξετάστηκαν οι αλληλεπιδράσεις της θερμοκρασίας, της σχετικής υγρασίας και διαφόρων μέσων βιολογικής αντιμετώπισης, στην ανάπτυξη του *Botrytis cinerea* σε σπορόφυτα φασολιού και συγκεκριμένα στην εμφάνιση κηλίδων τεφράς σήψης στα φύλλα. Από την εξέταση των επιδράσεων της θερμοκρασίας και σχετικής υγρασίας στην ανάπτυξη της ασθένειας, φαίνεται ότι ο *Botrytis cinerea* είναι ικανός να δημιουργήσει κηλίδες στα σπορόφυτα ακόμα και σε σχετική υγρασία μικρότερη του 95% (90-95%). Στον πίνακα 1.1 φαίνονται τα αποτελέσματα της επίδρασης της σχετικής υγρασίας και της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη των κηλίδων και το ποσοστό αποικισμού στην επιφάνεια των φύλλων.

Σε πρόσφατες αναφορές της ασθένειας σε διάφορους ξενιστές, η επίδραση της θερμοκρασίας συμπίπτει με εκείνη της τεφράς σήψης στο φασόλι. Θερμοκρασίες μεταξύ 18-25°C ήταν άριστες για την ανάπτυξη κηλίδων, ενώ η διαμόρφωσή τους παρουσιάζονταν σημαντικά μειωμένη σε επίπεδα άνω των 25°C. Στη μελέτη, όμως, των Hunnusch και Bolland, η επίδραση της θερμοκρασίας σε συνδυασμό με τη σχετική υγρασία, παρουσίασε ανάπτυξη μικρών κηλίδων στους 28°C και 100% σχετική υγρασία, ενώ μεγαλύτερες κηλίδες αναπτύχθηκαν στους 28°C και 95% σχετική υγρασία (πίνακας 1.1)

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.1 Η επίδραση της σχετικής υγρασίας και της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη κηλίδων τεφράς σήψης και ο βαθμός αποικισμού στην επιφάνεια φύλλων, σε σπορόφυτα φασολιού. (Hannusch and Bolland, 1996 "European journal of Plant Pathology" vol.102 p.136).

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (°C)	ΣΧ. ΥΓΡΑΣΙΑ (%)	ΔΙΑΜΕΤΡΟΣ ΚΗΛΙΔΩΝ (mm)	ΠΟΣΟΣΤΟ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΥ (%)
20	90	2,5	17
20	95	18,4	35,8
20	100	17	97,9
24	90	8,8	10,2
24	95	27,2	75
24	100	37,7	78,2
28	90	2,4	15,5
28	95	23,8	86,9
28	100	4,7	27,9



Η επίδραση της σχετικής υγρασίας και της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη κηλίδων τεφράς σήψης σε φύλλα φυτού φασολιού. (Hannusch and Bolland, 1996 "European journal of Plant Pathology" vol.120 p 137)

Η ρύθμιση, λοιπόν των συνθηκών περιβάλλοντος για την αντιμετώπιση της ασθένειας, ουσιαστικά έγκειται στη ρύθμιση της σχετικής υγρασίας στο περιβάλλον της καλλιέργειας. Σε υπαίθριες καλλιέργειες και συγκεκριμένα αυτή της αμπέλου, οι δυνατότητες μιας τέτοιας ρύθμισης είναι σχετικά περιορισμένες, σε αντίθεση με τις υπό κάλυψη καλλιέργειες. Ωστόσο, υπάρχουν διάφοροι καλλιεργητικοί χειρισμοί που μπορούν να μετριάσουν το πρόβλημα. Έτσι, ο έλεγχος της υψηλής σχετικής υγρασίας μπορεί να γίνει με τις πιο κάτω μεθόδους:

- α) Εφαρμογή κατάλληλου συστήματος κλαδέματος και κατάλληλου ξεφυλλίσματος. Μ' αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται καλύτερος αερισμός των φυτών και ειδικότερα των ραγών, μειώνοντας την υγρασία μεταξύ τους (Παναγόπουλος, 1993)
- β) Οι γραμμές φύτευσης κατά την εγκατάσταση του αμπελώνα, να προσανατολίζονται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να ευνοείται ο καλός αερισμός των φυτών (Ηλιόπουλος, 1996).
- γ) Αποφυγή υπερβολικής αζωτούχου λίπανσης, η οποία ευνοεί τη βλάστηση και συνεπώς τις συνθήκες ύπαρξης υγρασίας (Παναγόπουλος, 1993).
- δ) Προσεκτικοί χειρισμοί κατά τις καλλιεργητικές εργασίες και τη συγκομιδή, ώστε να αποφεύγονται οι πληγές που αποτελούν σημεία προσβολής από τον μύκητα.

Στις καλλιέργειες υπό κάλυψη, οι περιβαλλοντικές συνθήκες είναι δυνατό να ρυθμιστούν ανάλογα με τις φυτοπροστατευτικές απαιτήσεις κάθε καλλιέργειας. Έτσι, σχετικές ρυθμίσεις των συνθηκών περιβάλλοντος για την προστασία των κηπευτικών ή καλλωπιστικών από τον βοτρυτή μπορεί να είναι:

- α) Μείωση της σχετικής υγρασίας στον εσωτερικό χώρο του θερμοκηπίου. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί
 - με αύξηση της νυχτερινής θερμοκρασίας
 - με αύξηση του αερισμού την ημέρα
 - με αραιή φύτευση, επίκαιρο κλάδεμα, αποφύλλωση κ.α
 - με επιλογή ορθόφυλλων και αραιόφυλλων υβριδίων

- με εδαφοκάλυψη ώστε να μειώνεται η εξάτμιση του εδαφικού νερού (Μπουρνάκας, 1995).
- β)** Μείωση της διαφοράς θερμοκρασίας μεταξύ ημέρας και νύχτας, που είναι ο σπουδαιότερος παράγοντας εξασθένησης των φυτών . Για την επίτευξη αυτού, συμβάλλουν τα 2 πρώτα μέτρα μείωσης της υγρασίας (Μπουρνάκας, 1995).
- γ)** Σωστή άρδευση και λίπανση των φυτών, ώστε να εξασφαλίζεται η καλή ευρωστία τους, αφαίρεση και καταστροφή των προσβεβλημένων φυτών ή φυτικών οργάνων, καθώς και των νεκρών φυτικών ιστών ή τα υπολείμματα φυτών, που αποτελούν σημεία εισόδου των παθογόνων (Παναγόπουλος, 1995).
- δ)** Επιλογή και καλλιέργεια ανθεκτικών υβριδίων που αποβάλλουν γρήγορα τα πέταλα, με μικρά σέπαλα και σκληρό φλοιό (Μπουρνάκας, 1995).

1.2.2 Μυκητοκτόνα

Σχετικά ικανοποιητική αντιμετώπιση της ασθένειας του *Botrytis cinerea* μπορεί να επιτευχθεί με συνδυασμό ρύθμισης των συνθηκών περιβάλλοντος και χημικής αντιμετώπισης με τη χρήση διαφόρων μυκητοκτόνων. Τα μυκητοκτόνα που χρησιμοποιούνται για τον σκοπό αυτό, ουσιαστικά δεν διαφέρουν κατά καλλιέργεια. Ως προς την δραστική ουσία τους διακρίνονται 3 κύριες κατηγορίες:

- α)** **Οργανικά** μυκητοκτόνα ευρέως φάσματος δράσης (dichlofluanid, chlorothalonil, thiram κ.α)
- β)** **Διασυστηματικά** της ομάδας των βενζιμιδαζολικών (benomyl, cabendazim, thiophanate methyl κ.α)
- γ)** **Ειδικής δράσης**, της ομάδας των δικαρβοξιμιδικών (procymidone, viclozolin, iprodione κ.α)

(Παναγόπουλος, 1993)

Το κυριότερο πρόβλημα που παρουσιάζεται στην χημική καταπολέμηση της ασθένειας είναι η εμφάνιση ανθεκτικότητας στελεχών του παθογόνου στα διάφορα μυκητοκτόνα. Η εναλλαγή στην εφαρμογή ουσιών

των τριών παραπάνω κατηγοριών, μπορεί να μετριάσει το πρόβλημα, χωρίς όμως να δίνεται οριστική λύση (Elad, Gyllino, Shtienberg and Aloï, 1995)

Στις αμπελοκαλλιέργειες υγρών περιοχών και στις περιφέρειες όπου εμφανίζεται συχνά η τεφρά σήψη, συνιστώνται οι πιο κάτω ψεκασμοί :

α) Κατά την πλήρη άνθηση (60-70% ανοικτά άνθη)

β) Αμέσως μετά την άνθιση.

γ) Πριν τη διόγκωση των ραγών.

Το Φθινόπωρο, μετά την έναρξη της ωρίμανσης συνιστάται τουλάχιστον ένας ψεκασμός ο οποίος επαναλαμβάνεται μία έως δύο εβδομάδες πριν τη συγκομιδή (Παναγόπουλος, 1993).

Για την προστασία των εναέριων φυτικών μερών των κηπευτικών καλλιεργειών, συνιστώνται προληπτικοί ψεκασμοί ανά 7 ημέρες με οργανικό μυκητοκτόνο (thiram, dichlofluanid,...) ή με διασυστηματικό (benomyl, thiophanate, ή carbendazim), αν δεν έχει εμφανιστεί ανθεκτικότητα (Παναγόπουλος, 1995).

1.2.3 Ανθεκτικότητα του *Botrytis cinerea* στα διάφορα μυκητοκτόνα και προσπάθειες αντιμετώπισής της.

Η περίπτωση αποτυχίας της χημικής καταπολέμησης του *Botrytis cinerea* οφείλεται κατά κύριο λόγο στην εμφάνιση ανθεκτικότητας στελεχών του μύκητα στα διάφορα μυκητοκτόνα. Η ανθεκτικότητα είναι έκφραση γενετικών αλλαγών στο κυτταρικό επίπεδο. Προκαλείται με επικράτηση μη ευαίσθητων στελεχών στα μυκητοκτόνα, είναι σταθερή και κληρονομείται από γενιά σε γενιά. Τα ανθεκτικά άτομα, στην πρώτη εφαρμογή ενός μυκητοκτόνου είναι σπάνια. Όμως, η συχνή εφαρμογή του ίδιου μυκητοκτόνου ή μυκητοκτόνων με τον ίδιο τρόπο δράσης, αφήνει να επιβιώσουν τα περισσότερα ανθεκτικά άτομα. Αυτά, πολλαπλασιάζονται από γενιά σε γενιά και καθιστούν αδύνατη την αποτελεσματική αντιμετώπιση μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα.

Η εμφάνιση ανθεκτικότητας σε ένα μυκητοκτόνο, είναι δυνατό να επεκταθεί και σε άλλα μυκητοκτόνα με διαφορετικά δρώντα συστατικά. Διακρίνονται δύο κατηγορίες ανθεκτικότητας :

- α) Διασταυρωτή ανθεκτικότητα**, όπου ένας και μόνο γόνος ελέγχει την ανθεκτικότητα σε περισσότερα από ένα δρώντα συστατικά.
- β) Πολλαπλή ανθεκτικότητα**, όπου ανεξάρτητες μεταλλαγές δύο ή περισσότερων γόνων προκαλούν ανθεκτικότητα σε δύο ή περισσότερα μυκητοκτόνα ή ομάδες μυκητοκτόνων.

Η τελευταία περίπτωση έχει εμφανιστεί στη χώρα μας μόνο από τον *Botrytis cinerea* στα βενζιμιδαζολικά και δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα (Παναγιωτάρου, Χρυσάγη 1991).

Η παρουσία ανθεκτικών στελεχών του *Botrytis cinerea* στα διάφορα μυκητοκτόνα, είναι το πιο σημαντικό πρόβλημα που αντιμετωπίζεται παγκοσμίως. Σε έρευνες που έχουν γίνει το 1986 από τους Locke και Fletcher, σε 67 καλλιέργειες τομάτας στην Αγγλία και την Ουαλία, παρατηρήθηκε ανθεκτικότητα του βοτρώτη στο benomyl σε ποσοστό 62,7% και στο iprodione σε ποσοστό 43,2%. Άλλες έρευνες στην Βικτόρια της Αυστραλίας, σε καλλιέργειες φράουλας, έδειξαν την ύπαρξη ανθεκτικότητας του βοτρώτη στα μυκητοκτόνα benomyl, procymidone, iprodione, dichlofluanid, thiram ενώ περισσότερο αποτελεσματικά ήταν τα fluazinam και chlorothalonil (Washington, Shanmuganatan, Forbes, 1992).

Στην Ελλάδα, η περίπτωση ανθεκτικότητας του βοτρώτη εμφανίστηκε μέσα στις δύο προηγούμενες δεκαετίες. Κατά την περίοδο '79-'85, παρουσιάστηκαν πολύ αγνές προσβολές ανθεκτικών στελεχών στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα στις καλλιέργειες θερμοκηπίου. Η συχνότητα εμφάνισης ήταν σταθερή στη διάρκεια του χρόνου (περίπου 50%) και αμετάβλητη κατά την περίοδο αυτή με ένταση από μέτρια έως υψηλή (Παππάς, 1985). Στο 4^ο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο (1987), ανακοινώθηκε η παρουσία στελεχών μεγαλύτερη του 50% σε καλλιέργειες τομάτας θερμοκηπίου. Επίσης, παρουσιάστηκε αύξηση προσβολών (>20%) στην

αρχή της περιόδου από στελέχη μέτριας ανθεκτικότητας στα δικαρβοξυμιδικά (Παππάς, 1987). Τέλος, σε δειγματοληψίες προσβεβλημένων από βοτρυτή καρπών και ανθέων σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες των περιοχών Τυμπακίου Κρήτης (Απρίλιος 1993 και 1994), Τριφυλίας Μεσσηνίας (Ιανουάριος και Μάιος 1994) και Μαραθώνα Αττικής (Απρίλιος 1994), παρουσιάστηκαν ανθεκτικά στελέχη στα βενζιμιδαζολικά στις περιοχές Μαραθώνα και Τριφυλίας και στελέχη μέτριας ανθεκτικότητας στα δικαρβοξυμιδικά σε όλες τις περιοχές (Λάσκαρης, Παππάς, Κυριακόπουλος, 1994).

Το πρόβλημα μπορεί να μετριαστεί με την εναλλαγή ή τον συνδυασμό διαφόρων μυκητοκτόνων, πάντα σύμφωνα με τις υποδείξεις των τοπικών γεωπόνων. Στο 4^ο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, παρουσιάστηκε ο συνδυασμός dichlofluanid (0,1%) + iprodione (0,025%), ο οποίος έδωσε καλύτερη καταπολέμηση και αυξήθηκε η παραγωγή (Παππάς, 1987). Επίσης, ικανοποιητικά αποτελέσματα έχει δώσει το aminoctadine trachelane, καθώς και ο συνδυασμός carbendazim + diethofencarb, στην τομάτα (Τσαπικούνης, 1996).

1.3 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

Το πρόβλημα εμφάνισης ανθεκτικότητας του *Botrytis cinerea* στα διάφορα μυκητοκτόνα και η συχνή και η αλόγιστη χρήση των τελευταίων, με σκοπό την αντιμετώπισή του, έχουν οδηγήσει την χημική αντιμετώπιση σε αδιέξοδο. Πέρα από τις μελέτες που γίνονται πάνω στη ρύθμιση των περιβαλλοντικών συνθηκών των καλλιεργειών για την αντιμετώπιση του παθογόνου, τα τελευταία χρόνια διεξάγονται έρευνες πάνω στη βιολογική αντιμετώπιση του με διάφορους μηχανισμούς και βιολογικά μέσα.

Οι μηχανισμοί που συμμετέχουν στην βιολογική καταπολέμηση είναι πολυάριθμοι και ευμετάβλητοι, ενώ η συμβολή δύο ή περισσότερων από αυτούς, έχουν δείξει θετικά αποτελέσματα. Τέτοιοι συνδυασμοί, μπορούν να χαρακτηρίζονται από αντιβίωση με ένζυμα που καταστρέφουν τα κυτταρικά τοιχώματα του *Botrytis cinerea*, ανταγωνισμό στα θρεπτικά υλικά, ή αντιβίωση που προκαλεί μεταβολή στη συγκράτηση υγρασίας της φυτικής επιφάνειας (Elad, 1996).

Οι δραστηριότητες των διαφόρων μικροοργανισμών στην αντιμετώπιση του βοτρυτή, διαφέρουν για κάθε οργανισμό. Βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, μπορούν να μεταβάλλουν τη συγκράτηση υγρασίας των φυτών στην επιφάνειά τους, δημιουργώντας, έτσι, μη ευνοϊκές συνθήκες στην ανάπτυξη παθογόνου (Elad, 1996). Άλλη περίπτωση βιολογικής δραστηριότητας είναι η προσάρτηση βιολογικών μέσων αντιμετώπισης στις υφές ή στα κονίδια του μύκητα (Elad, 1996). Στην εικόνα 1.12 φαίνεται ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα, όπου κύτταρα της ζύμης *Pichia guilliermodi* έχουν προσαρτηθεί σε κονίδια και σε υφή του *Botrytis cinerea*. Το παθογόνο χρειάζεται εξωτερικά θρεπτικά υλικά για τη βλάστηση των κονιδίων. Η απουσία, λοιπόν, τέτοιων υλικών το αποδυναμώνουν δίνοντας έτσι τη δυνατότητα σε πολλούς μικροοργανισμούς, ικανούς στην κατανάλωση τέτοιων υλικών, να θεωρηθούν ικανοποιητικά μέσα βιολογικής αντιμετώπισης. Ο ανταγωνισμός σε θρεπτικά υλικά ή σε χώρο ανάπτυξης, εμποδίζει τη βλάστηση των κονιδίων, ή την περαιτέρω ανάπτυξη του

παθογόνου. Επίσης η βιωσιμότητα και βλαστική ικανότητα των κονιδίων επηρεάζεται, άμεσα, από την παρουσία αντιβιοτικών που προέρχονται από την παρουσία διαφόρων μέσων βιολογικού ελέγχου (Elad, 1996).

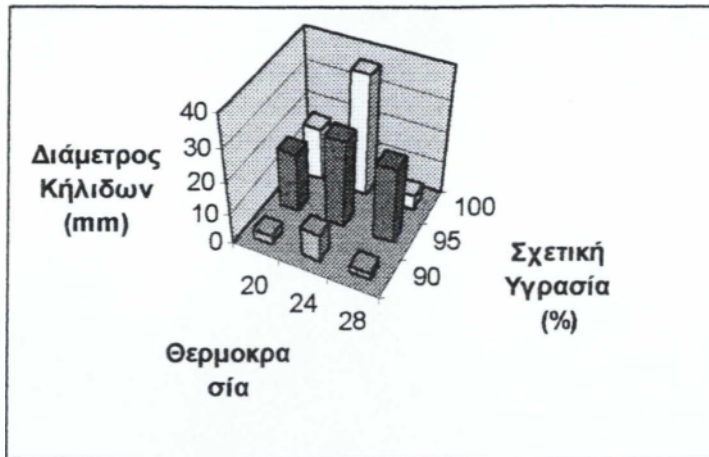
Το πλέον αποδεδειγμένο ως αποτελεσματικό μέσο βιολογικής καταπολέμησης, θεωρείται ο μύκητας *Trichoderma harzianum* (φυλή no 39), ο οποίος έχει απομονωθεί στο ερευνητικό ίδρυμα Volcani Centre του Ισραήλ. Ο μύκητας αυτός, ανταγωνίζεται τον βοτρύτη, καταλαμβάνοντας τις φυτικές επιφάνειες και καταναλώνοντας τις θρεπτικές ουσίες που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη του παθογόνου (Τσαπικούνης, 1996). Εφαρμογές του μύκητα σε αμπελοκαλλιέργειες, έδειξαν αποτελεσματικότητα ενάντια στην τεφρά σήψη (Elad, 1994). Αποτελεσματικότητα, επίσης, σημειώθηκε και σε εφαρμογές που έγιναν εναντίον της τεφράς σήψης φυτών τομάτας, από τους O' Neill, Niv, Elad και Shtienberg το 1996.

Στην Ελλάδα, κυκλοφορεί βιολογικό σκεύασμα του *Trichoderma harzianum* (T39) υπό την εμπορική ονομασία TrochoTex 20wp. Το σκεύασμα αυτό πρέπει να εφαρμόζεται πριν ή μετά την εμφάνιση του βοτρύτη σε θερμοκρασίες μεταξύ 15-25°C και υψηλή σχετική υγρασία (Τσαπικούνης, 1996).

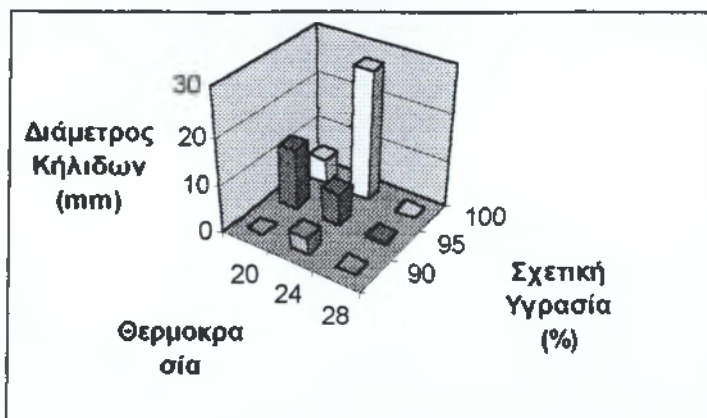
Έχουν δοκιμαστεί και άλλα βιολογικά σκευάσματα εναντίον του βοτρύτη. Οι Hannusch και Boland το 1995 δοκίμασαν 7 διαφορετικούς μικροοργανισμούς (*Alternaria alternata*, *Drechslera sp.*, *Epicoccum purpurascens*, *Gliocladium roseum*, *Myrothecium verrucaria*, *Trichoderma viride*, καθώς και μια άγνωστη ζύμη) με συνδυασμό διαφόρων εναλλαγών της θερμοκρασίας και σχετικής υγρασίας. Τα αποτελέσματα όλων των αλληλεπιδράσεων φαίνονται στα ακόλουθα διαγράμματα.

Η επίδραση της σχετικής υγρασίας και της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη κηλίδων τεφράς σήψης σε φύλλα φυτού φασολιού, προκαλούμενες από τον *Botrytis cinerea* εμβολιασμένο μόνο του και σε συνδυασμό με 7 μέσα βιολογικής αντιμετώπισης :

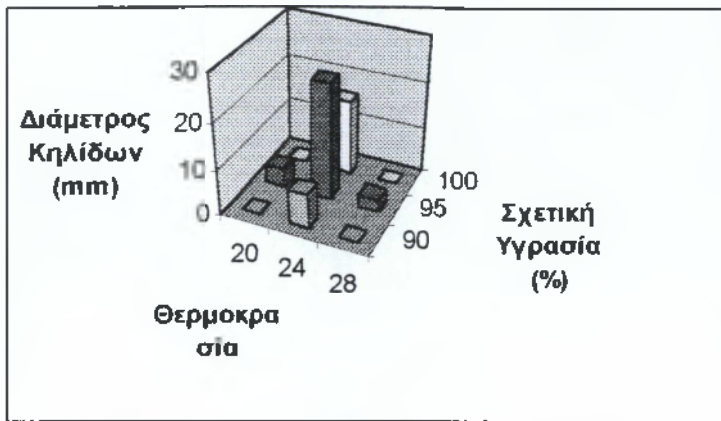
(Hannusch and Boland, 1996 "European journal of Plant Pathology" vol.102 p,137)



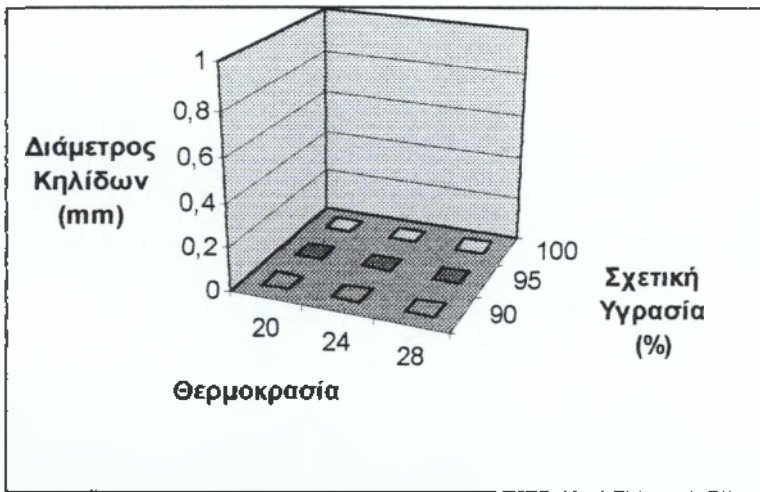
Ο *Botrytis cinerea* εμβολιασμένος μόνος του.



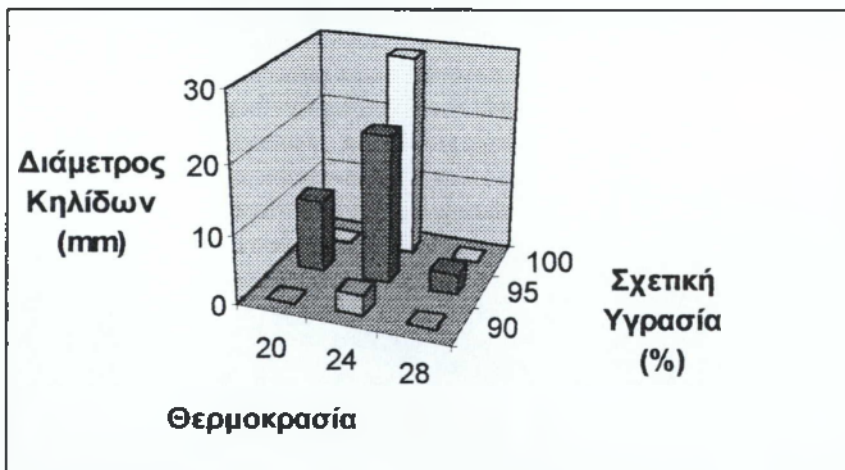
Ο *Botrytis cinerea* εμβολιασμένος με το *Alternaria alternata*



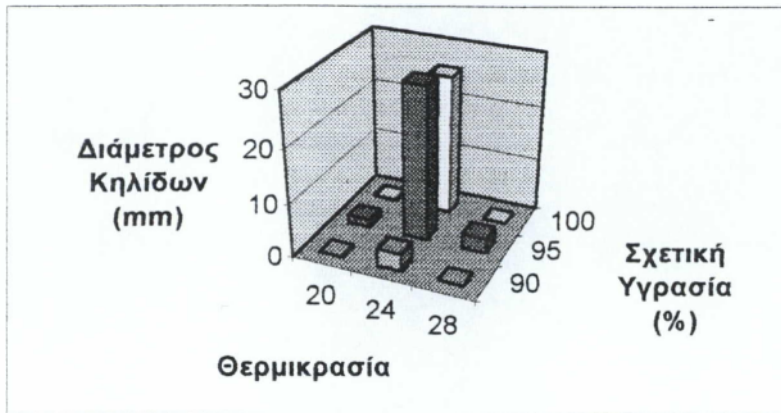
Ο *Botrytis cinerea* εμβολιασμένος με το *Drechslera sp*



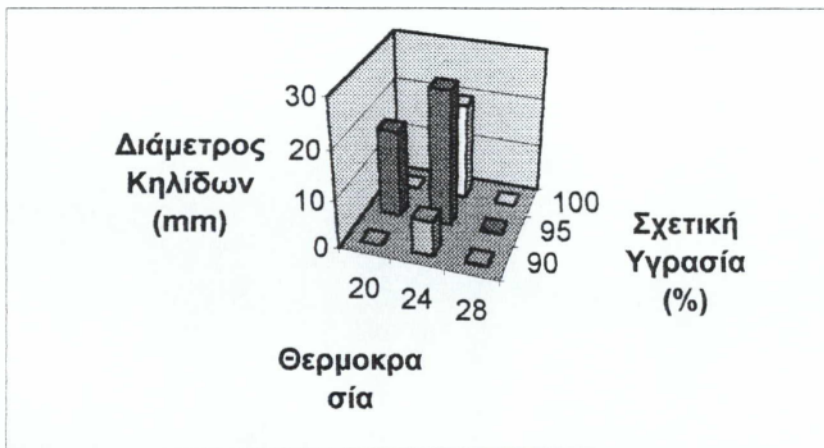
Ο *Botrytis cinerea* εμβολιασμένος με το *Epicoccum purpurascens*



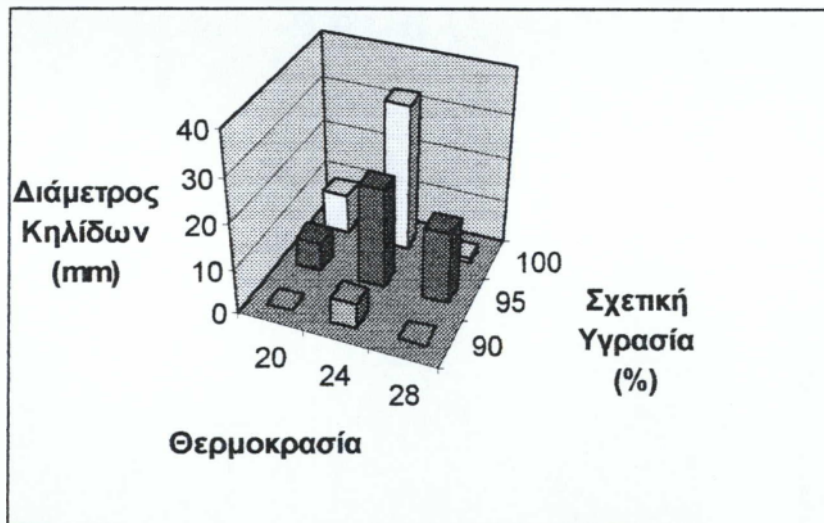
Ο *Botrytis cinerea* εμβολιασμένος με το *Gliocladium roseum*



Ο *Botrytis cinerea* εμβολιασμένος με το *Myrothecium verrucaria*



Ο *Botrytis cinerea* εμβολιασμένος με το *Tichoderma viride*.



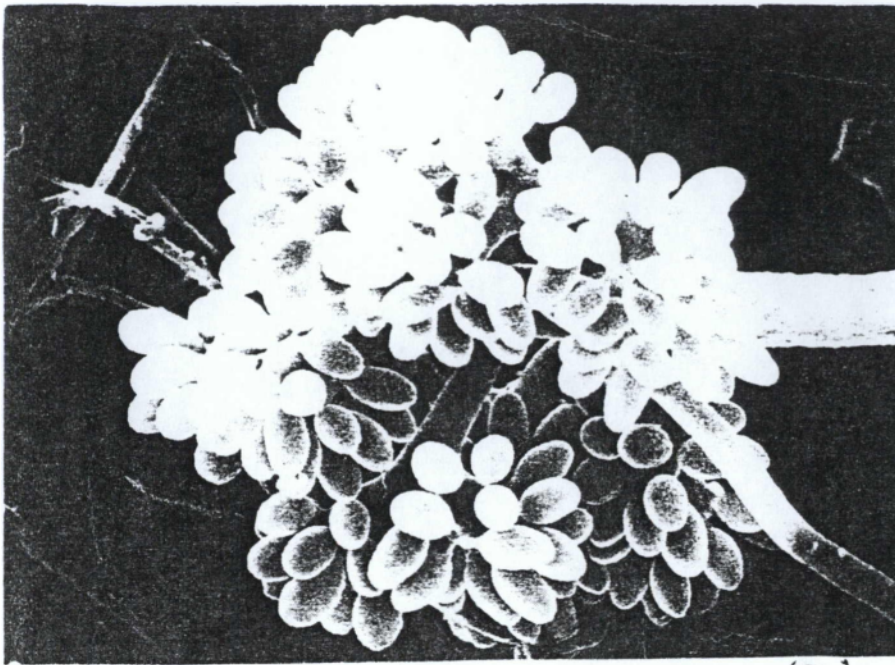
Ο *Botrytis cinerea* εμβολιασμένος με μία άγνωστης ταυτότητας ζύμης.

Άλλες έρευνες που έγιναν (Mari, Guizzardi, Brunelli και Folchi, 1996) περιελάμβαναν δοκιμές ανταγωνιστικών βακτηρίων ως προς την αποτελεσματικότητά τους ενάντια στον βοτρυτή σε καρπούς τομάτας, που βρίσκονται σε μετασυλλεκτικό στάδιο. Τα αποτελέσματα, έδειξαν μείωση της ασθένειας, ενώ το στέλεχος *Bacillus amyloliquefaciens*, αποδείχθηκε εξαιρετικά αποτελεσματικό.

Στην Ελλάδα, παρουσιάστηκε στο 6^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό συνέδριο το 1992, μια σύνοψη των ερευνών πάνω στη βιολογική αντιμετώπιση του βοτρυτή στην τομάτα, από τους Μαλαθράκης, Μαρκέλλου, Κληρονόμου, Μαζαράκη, Κριτσωτάκη και Παναγιωτάκης. Οι έρευνες έδειξαν ότι οι μύκητες *Trichoderma harzianum*, *Penicillium sp* και *Acremonium alternatum*, ήταν αρκετά αποτελεσματικοί εργαστηριακά, αλλά στο θερμοκήπιο, μόνο ο *Trichoderma harzianum* έδειξε αποτελέσματα. Παρόλα αυτά, αρκετά στελέχη του *Penicillium sp* και *Cladosporium sp*, δίνουν ελπιδοφόρα μηνύματα, τουλάχιστον εργαστηριακά.

Έως ότου η αποκλειστική βιολογική καταπολέμηση φτάσει σε ικανοποιητικό επίπεδο, αποτελεσματική λύση μπορεί να θεωρηθεί η χρήση συνδυασμένων βιολογικών και χημικών σκευασμάτων. Περιορίζεται, μ' αυτόν τον τρόπο, η αλόγιστη χρήση μυκητοκτόνων, ενώ παράλληλα καταπολεμάται το παθογόνο ακόμα και σε περίπτωση εμφάνισης ανθεκτικότητας.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ I



Εικ. 1.1

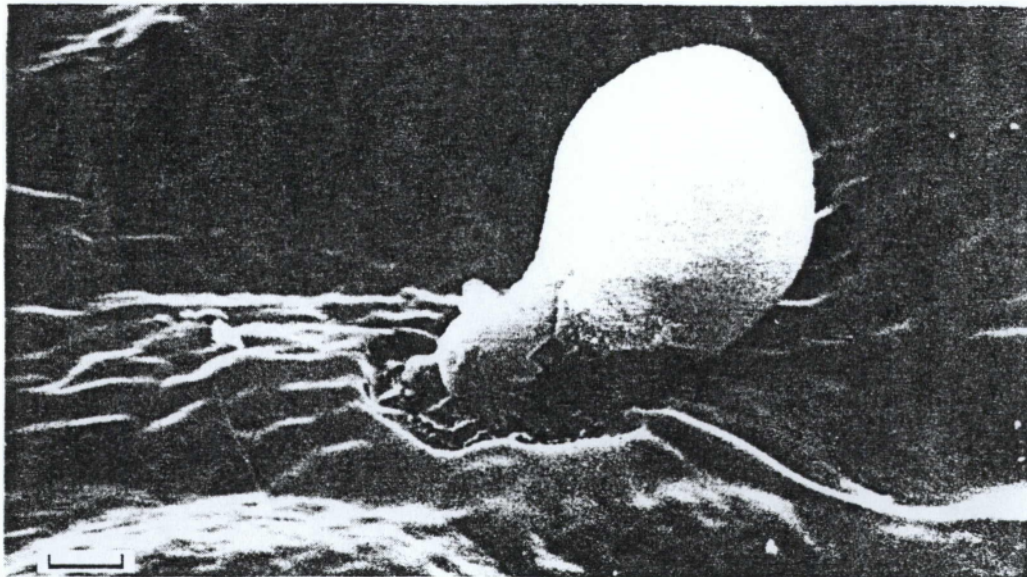
(α)



(β)

Εικ. 1.1 (α): Κονιδιοφόρος με κονίδια του μύκητα *Botrytis cinerea* (β): Χαρακτηριστικά του μεγέθους του σχήματος και της επιφάνειας ενός κονιδίου του μύκητα.
(Coley-Smith J.R, Verhoeff K. and Jarvis W R (1980) . 'The biology of *Botrytis*')

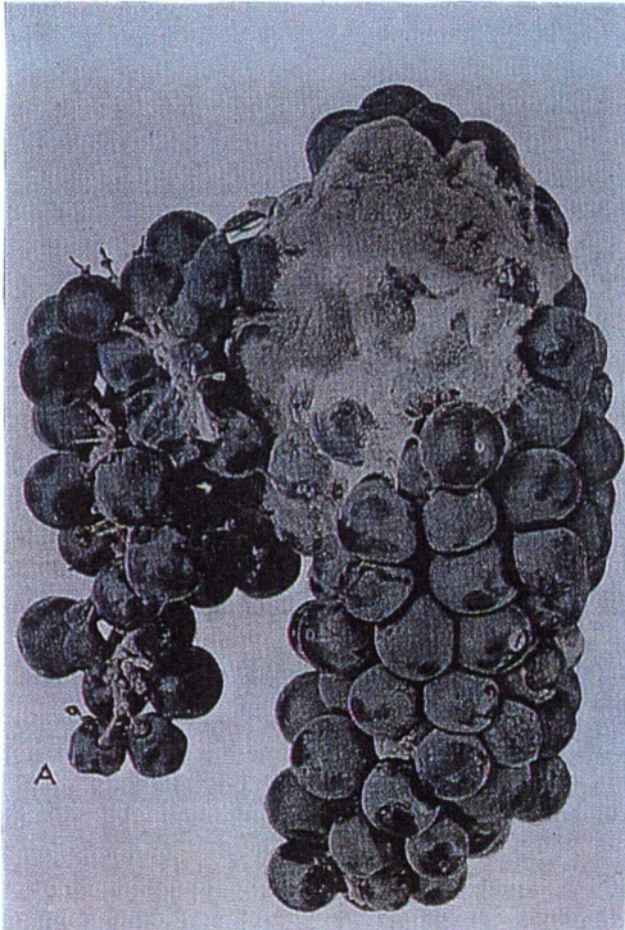
Εικ. 1.2 Βλάστηση κονιδίου του *Botrytis cinerea* στην επιφάνεια νεαρού καρπού τομάτας.
(Coley-Smith J.R, Verhoeff K. and Jarvis W R (1980) . 'The biology of *Botrytis*')



Εικ. 1.2



Εικ. 1.3 Συρρικνωμένες ράγες σταφυλιών, προσβεβλημένες από τον *Botrytis cinerea* (Παναγόπουλος Χ.Γ. (1993). 'Ασθένειες καρποφόρων δενδρών και αμπέλου')



Εικ. 1.4 Χαρακτηριστική τεφρά εξάνθιση – αποτελούμενη από κονιδιοφόρους με κονίδια που καλύπτει την επιφάνεια των ραγών. (Παναγόπουλος Χ.Γ. (1993). 'Ασθένειες καρποφόρων δένδρων και αμπέλου')

Εικ. 1.5 Εμφάνιση τεφράς εξάνθισης σε προσβεβλημένη από τον μύκητα κληματίδα. (Παναγόπουλος Χ.Γ. (1993). 'Ασθένειες καρποφόρων δένδρων και αμπέλου')

Εικ. 1.4



Εικ. 1.5



Εικ. 1.6



Εικ. 1.6 Έναρξη της τεφράς σήψης από μέρος του στελέχους φυτού τομάτας.
(Blancard D. (1994) 'A colour atlas of tomato diseases')

Εικ. 1.7 Χαρακτηριστικό σύμπτωμα 'κηλίδας στόχου' σε προσβεβλημένο φύλλο φυτού τομάτας.
(Blancard D. (1994) 'A colour atlas of tomato diseases')

Εικ. 1.7



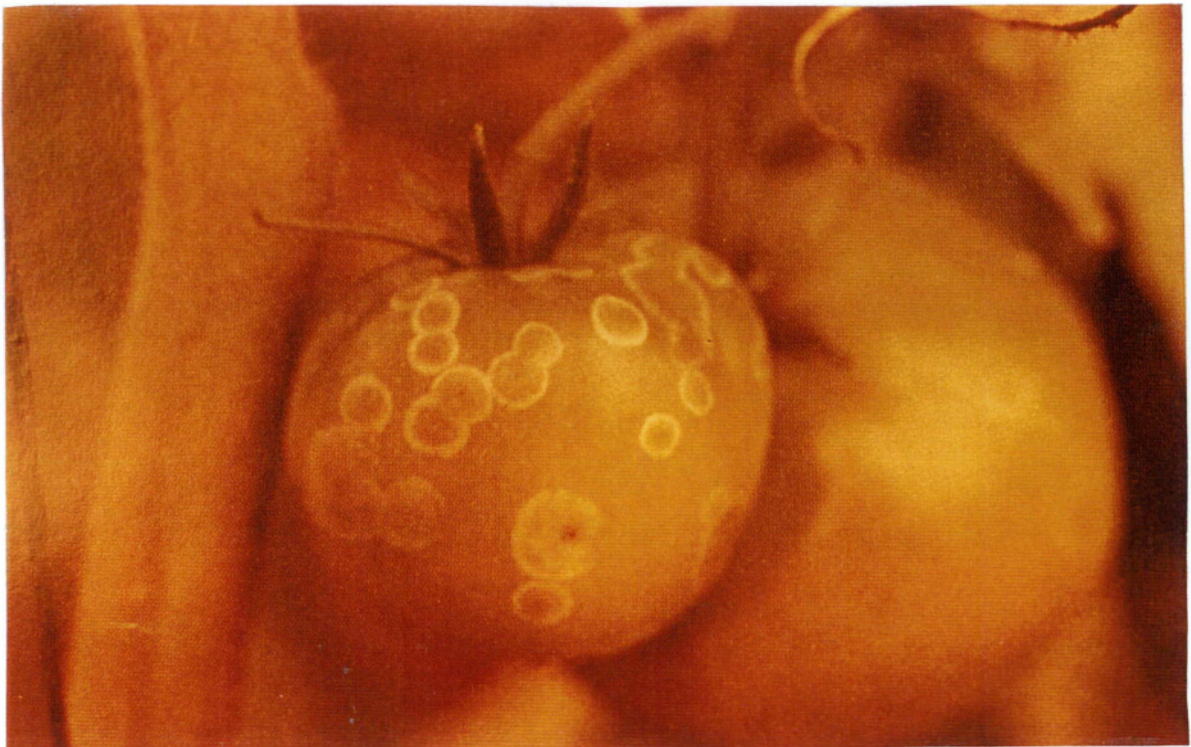
Εικ. 1.8 Εμφάνιση έλκους στην βάση νεαρού φυτού τομάτας, προκαλούμενο από τον *Botrytis cinerea* (Blancard D. (1994) 'A colour atlas of tomato diseases')

Εικ. 1.9 Χαρακτηριστική τεφρά εξάνθηση που καλύπτει την επιφάνεια νεαρού καρπού τομάτας. (Blancard D. (1994) 'A colour atlas of tomato diseases')

Εικ. 1.8

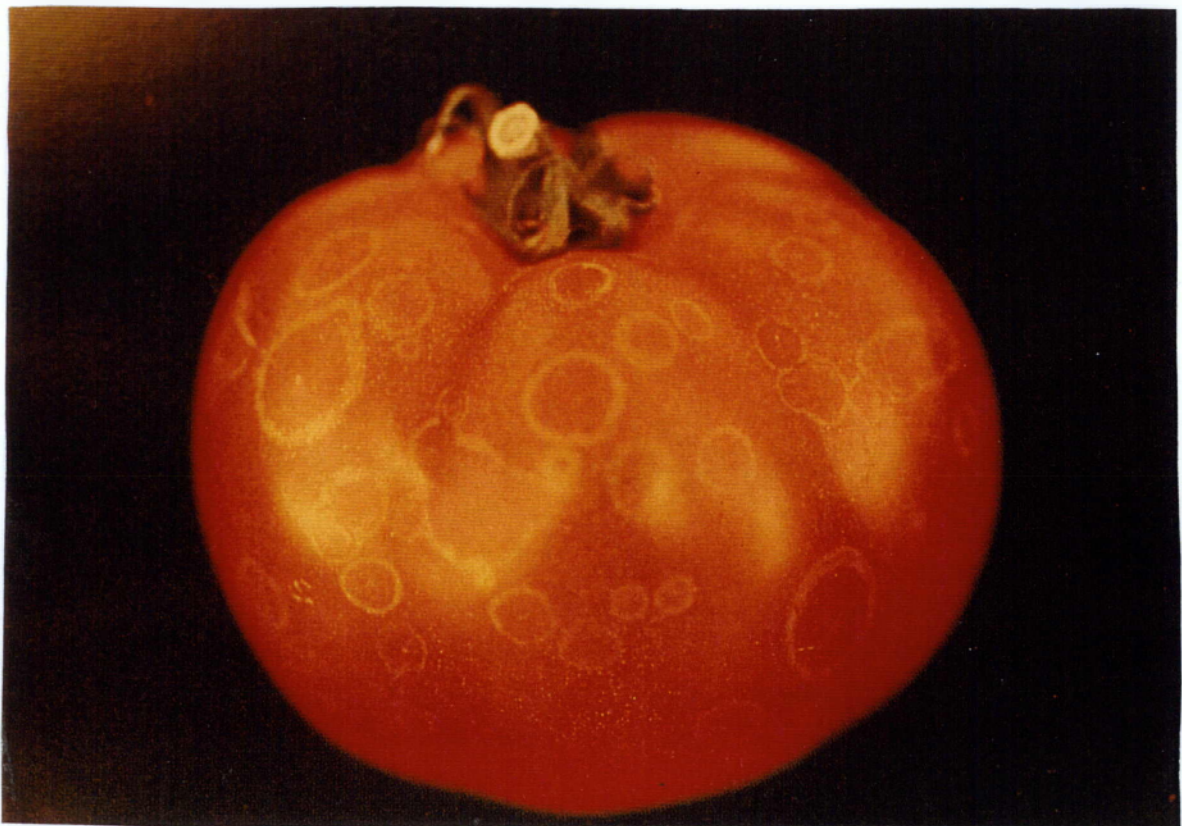


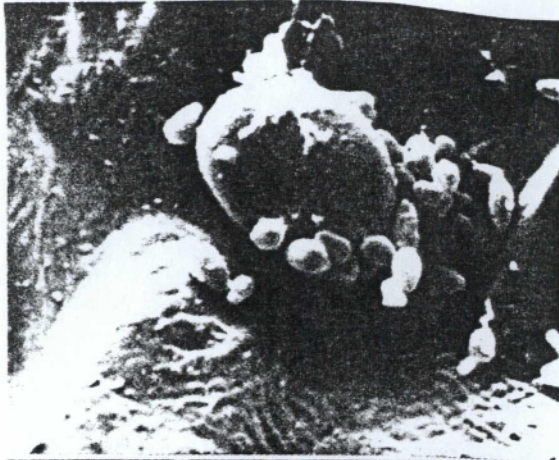
Εικ. 1.9



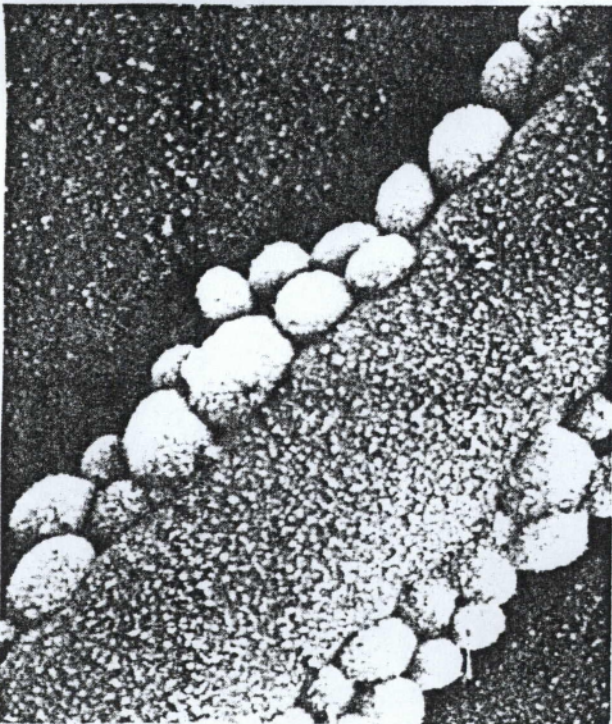
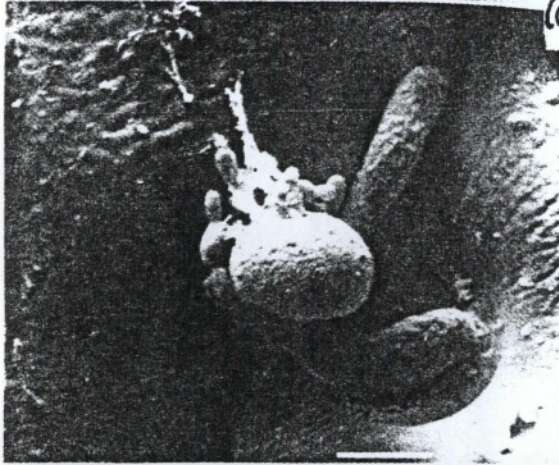
Εικ. 1.10 Εμφάνιση 'κηλίδων φάντασμα' σε νεαρό καρπό τομάτας. Διακρίνεται το χαρακτηριστικό νεκρωτικό στίγμα που δημιουργείται στο κέντρο τους.
(Blancard D. (1994) 'A colour atlas of tomato diseases')

Εικ. 1.11 'Κηλίδες φάντασμα' σε ώριμο καρπό τομάτας ο οποίος κατά τα άλλα είναι υγιής.
(Blancard D. (1994) 'A colour atlas of tomato diseases')





(α)



(β)

Εικ. 1.12 Προσάρτηση κυττάρων της ζύμης *Pichia guilliermondi* σε κονίδια (α) και σε υφή (β) του μύκητα *Botrytis cinerea* (α: *European Journal of Plant Pathology* (1996) vol.2 p.721 β: Agrios G.N (1997). 'Plant Pathology')

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ IN VITRO ΤΟΥ
ΜΥΚΗΤΑ *Botrytis cinerea* ΑΠΟ ΟΡΙΣΜΕΝΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

2.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της ερευνητικής εργασίας που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της πτυχιακής διατριβής, είναι η μελέτη ύπαρξης αντιβιοτικής δραστηριότητας διαφόρων βακτηρίων, που έχουν απομονωθεί από σπόρους και φυτά τομάτας και αγγουριού, στην ανάπτυξη *in vitro* το μύκητα *Botrytis cinerea*. Δοκιμάστηκαν συνολικά 61 διαφορετικές απομονώσεις βακτηρίων, από τις οποίες 9, τελικά, έδειξαν ικανοποιητική αντιβίωση παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη του μύκητα *in vitro*.

Η παρεμπόδιση της ανάπτυξης οφείλεται σε προϊόντα μεταβολισμού των βακτηρίων, τα οποία διαχέονται στο θρεπτικό υλικό, όπου αναπτύσσονται τα βακτήρια για 24, 48 και 72 ώρες. Τα βακτήρια που έδειξαν αντιβίωση, δοκιμάστηκαν ξανά 2-3 φορές για την καλύτερη πιστοποίηση της θετικότητάς τους.

Τέλος, από τις δοκιμές ταυτοποίησης που ακολούθησαν, προκύπτει το συμπέρασμα ότι και τα 9 θετικά βακτήρια ανήκουν στο γένος *Bacillus*.

Η όλη ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βακτηριολογίας του Μπεννακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου υπό τις οδηγίες του κ. Πέτρου Ψαλλίδα Γεωπόνου-Βακτηριολόγου.

2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα αντιδραστήρια και υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία της πειραματικής μελέτης, παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο βακτηριολογίας του ΜΦΙ. Στο ίδιο εργαστήριο ανήκουν και τα διάφορα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν κατά η διαδικασία των δοκιμών.

2.2.1 Απομόνωση βακτηρίων από σπόρους και φυτά τομάτας και αγγουριού.

Σε κωνικές φιάλες που περιέχουν 100ml αποιονισμένο και αποστειρωμένο νερό, εναποτίθενται 10gr φυτικών ιστών τοματιάς ή αγγουριού. Οι φιάλες ανακινούνται για 1h σε ειδική συσκευή ανάδευσης και από το υγρό διάλυμα που προκύπτει γίνονται διαδοχικές αραιώσεις. Οι αραιώσεις γίνονται σε μικρά αποστειρωμένα φιαλίδια του 1ml (ependorfs) σε ειδικό χώρο συσκευής διοχέτευσης αποστειρωμένου αέρα (Laminar air flow), υπό ασηπτικές συνθήκες. Ακολουθεί εξάπλωση (plating) των αραιωμένων ποσοτήτων, στην επιφάνεια θρεπτικού υλικού σε τρυβλία Petri. Οι αραιώσεις γίνονται ως εξής :

- Αραίωση 1/10 : Λαμβάνονται με πιπέτα (pipette) των 200μl, 100μl υγρού διαλύματος από την κωνική φιάλη και προστίθενται σε ένα endorff που περιέχει 900μl αποιονισμένο- αποστειρωμένο νερό.
- Αραίωση 1/100: Λαμβάνεται ποσότητα 100μl από το πρώτο endorff (αραίωση 1/10) και εναποτίθεται σε 900μl αποιονισμένο- αποστειρωμένο νερό σε ένα δεύτερο.
- Αραίωση 1/1000: Με τον ίδιο τρόπο, ένα τρίτο endorff περιέχει 100μl ποσότητα από το δεύτερο (αραίωση 1/100) και 900μl αποιονισμένο-αποστειρωμένο νερό.

Μικρές ποσότητες (100μl) από κάθε αραιώση απλώνονται (plating) σε τρυβλία Petri με θρεπτικό υλικό N.A (Nutrient Agar: ζυμός κρέατος + άγαρ)+ κυκλοεξαμίδη (Cyclohexamide), με τη βοήθεια γυάλινης τριγωνικής ράβδου

κάτω από ασηπτικές συνθήκες στο Laminar air flow. Η κυκλοεξαμίδη που περιέχεται στο υλικό σε ποσοστό 0.02%, παρεμποδίζει την ανάπτυξη μυκήτων στο υλικό.

Μετά από επώαση 2-4 ημερών ελέγχεται η ανάπτυξη βακτηριακών αποικιών. Η επώαση γίνεται σε κλίβανο θερμοκρασίας 25°C. Στη συνέχεια, αποικίες με διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά λαμβάνονται με ειδική βακτηριολογική βελόνη (loop) και γίνεται καθαρισμός με επανειλημμένες γραμμικές εξαπλώσεις (streaking) στη επιφάνεια τρυβλίων με θρεπτικό υλικό NA+Cyclohexamide (εικ.2.1). Μετά τον καθαρισμό τους, οι απομονώσεις μεταφέρονται σε κεκλιμένους δοκιμαστικούς σωλήνες με N.A. για διατήρηση και παραπέρα μελέτη.

Κατά τη διάρκεια της μελέτης δοκιμάστηκαν και απομονώσεις βακτηρίων από δείγματα σπόρων τομάτας διαφορετικών ποικιλιών. Οι απομονώσεις αυτές γίνονται ως εξής :

30 σπόροι από κάθε ποικιλία τοποθετούνται σε αποστειρωμένα μικρά μπουκάλια των 5ml (bizoux), που περιέχουν 5ml αποιονισμένο-αποστειρωμένο νερό. Μετά από παραμονή τους για 1h, σχηματίζονται υγρά διαλύματα από τα οποία γίνονται διαδοχικές αραιώσεις (1/10,1/100,1/1000) σύμφωνα με τον τρόπο που περιγράφεται παραπάνω. Ακολουθεί γραμμική εξάπλωση σε τρυβλία με NA+Cyclohexamide, καθαρισμός των αποικιών που προκύπτουν και μεταφορά τους σε δοκιμαστικούς σωλήνες με N.A.

Στην μελέτη συμπεριελήφθησαν, επίσης, απομονώσεις βακτηρίων-σαπρόφυτων από σπόρους και νεαρά φυτά τομάτας, που υπήρχαν στο εργαστήριο και είχαν απομονωθεί από την κ. Χαρούλα Καραφλα τεχνολόγο-γεωπόνο του εργαστηρίου βακτηριολογίας του Μ.Φ.Ι., στα πλαίσια άλλου ερευνητικού προγράμματος του εργαστηρίου. Και στην περίπτωση αυτή, έγινε εξάπλωση σε θρεπτικό υλικό N.A ώστε να ελεγχθεί η καθαρότητα των απομονώσεων.

Κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων αντιβίωσης στην ανάπτυξη του *Botrytis cinerea*, παρουσιάστηκαν διάφορες ξένες επιμολύνσεις, που αναπτύχθηκαν τυχαία στα τρυβλία Petri. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία

απομόνωσης, καθαρισμού και διατήρησης των αποικιών τους, ώστε να δοκιμαστεί η αντιβιοτική τους δράση.

Οι βακτηριακές καλλιέργειες που δοκιμάστηκαν καθώς και η προέλευσή τους φαίνονται στον πίνακα 2.1, σελ 44,45 και 46.

Η καλλιέργεια του *Botrytis cinerea* που χρησιμοποιήθηκε στην εργασία, αποκτήθηκε από το Εργαστήριο Μυκητολογίας του Μ.Φ.Ι.. Η ανάπτυξη και διατήρηση της καλλιέργειας γίνεται σε κεκλιμένους δοκιμαστικούς σωλήνες με υλικό PDA (Potato Dextrose Agar).

2.2.2 Πειραματικές δοκιμές

Ο έλεγχος της αντιβιοτικής δραστηριότητας in vitro των βακτηριακών απομονώσεων έγινε σε θρεπτικό υλικό PDA. Χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα τρυβλία Petri, επειδή τα πλαστικά δεν αντέχουν στους ατμούς χλωροφορμίου που χρησιμοποιείται για την θανάτωση των βακτηρίων.

Σε κάθε Petri που περιέχει περίπου 12 κ.ε. θρεπτικού υλικού PDA τοποθετούνται περιμετρικά 4-5 καλλιέργειες, ηλικίας 24-48h. Τα τρυβλία αφήνονται για επώαση σε θερμοκρασία ανάπτυξης 25 °C για το χρονικό διάστημα 24h.

Μετά την 24ωρη ανάπτυξη των βακτηρίων, ακολουθεί η θανάτωσή τους. Κάθε τρυβλίο τοποθετείται με το καπάκι του προς τα κάτω και στο εσωτερικό του βρίσκεται διηθητικό χαρτί το οποίο εμποτίζεται με χλωροφόρμιο. Το τρυβλίο μένει σ' αυτή την κατάσταση για 20min. Μέσα σε αυτό το χρονικό διάστημα τα βακτήρια θανατώνονται από τους ατμούς του χλωροφορμίου. Κατόπιν, όλα τα τρυβλία αφήνονται ανοικτά σε κλίβανο θερμοκρασίας 28-30 °C για την πλήρη εξάτμιση του χλωροφορμίου.

Στη συνέχεια, γίνεται η τεχνητή μόλυνση των τρυβλίων με τον μύκητα *Botrytis cinerea*. Η μόλυνση γίνεται με αιώρημα σπορίων και τεμαχίων υφών του μύκητα, το οποίο παρασκευάζεται ως εξής:

Σε δοκιμαστικό σωλήνα με καλλιέργεια του μύκητα 4 ημερών, εκχύνονται 10-15ml απιονισμένο-αποστειρωμένο νερό. Ο σωλήνας αναδεύεται, έτσι ώστε να γίνει απόσπαση από την καλλιέργεια προς το νερό, σπορίων και τεμαχίων

υφών του μύκητά. Το υγρό διάλυμα, το οποίο αποτελεί και το αιώρημα του μύκητα, εκχύνεται σε αποστειρωμένο μπουκάλι των 20ml (McCartney). Χρησιμοποιείται καλλιέργεια του μύκητα 4 ημερών ώστε να είναι βέβαιη η ύπαρξη κονιδίων σε αυτή.

Κατά τη μόλυνση, το αιώρημα ψεκάζεται στο θρεπτικό υπόστρωμα των τρυβλίων, με τη βοήθεια ειδικού ψεκαστήρα ο οποίος λειτουργεί με πεπιεσμένο αέρα. Ο ψεκασμός γίνεται στον εξωτερικό χώρο του εργαστηρίου και φροντίζεται να καλυφθεί ολόκληρη η επιφάνεια του υποστρώματος κάθε τρυβλίου με το αιώρημα.

Έπειτα, τα τρυβλία τοποθετούνται ανοικτά σε κλίβανο θερμοκρασίας 28-30 °C για την εξάτμιση του νερού. Ακολουθεί επώασή τους στους 21 °C, για 48h, ώστε να αναπτυχθεί ο μύκητας.

2.2.3 Ταυτοποίηση των βακτηρίων που παρουσίασαν αντιβίωση.

Τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν και περιγράφονται, αναφέρονται στο βιβλίο 'Identification of medical bacteria' των Cowan και Steel (1965). Τα αποτελέσματα των ελέγχων και η ταυτοποίηση των στελεχών, έγιναν σύμφωνα με το 'Bergey's manual of systematic bacteriology' (vol.2) του Sneath Peter (1986).

Δοκιμή χρώσης Gram

Η μέθοδος στηρίζεται στην εφαρμογή της χρωστικής ουσίας 'carbomethyl violet' η οποία βάφει τα βακτηριακά κύτταρα και έχει την ιδιότητα στα θετικά βακτήρια να συγκρατείται από το κυτταρικό τοίχωμα και να μην απομακρύνεται με διάλυμα ιωδίνης. Ο τρόπος εφαρμογής της περιλαμβάνει τα πιο κάτω στάδια :

- Παρασκευάζεται σχετικά πυκνό αιώρημα (1ml) βακτηρίων από πρόσφατη καλλιέργεια 24-48h.
- Σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα, γίνεται εναπόθεση μικρής ποσότητας αιωρήματος (50ml) και αφήνεται να στεγνώσει.

- Ακολουθεί προσήλωση των βακτηριακών κυττάρων στην πλάκα, περνώντας την ελαφρά πάνω από φλόγα 2-3 φορές.
- Καλύπτεται όλη η επιφάνεια της πλάκας στην οποία βρίσκονται τα βακτήρια με διάλυμα χρωστικής carbomethyl violet. Η χρωστική αφήνεται να ενεργήσει σε 1 min.
- Στη συνέχεια, χύνεται η χρωστική και η πλάκα καλύπτεται με ποσότητα ιωδίνης, η οποία παραμένει για 1 min.
- Τέλος, γίνεται καλή έκπλυση με καθαρό οινόπνευμα και η πλάκα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

Ακολουθεί μικροσκοπική παρατήρηση. Η πρώτη παρατήρηση γίνεται με ελαιοκαταδυτικό φακό 'αντίθεσης φάσεων' (phase contrast) όπου τα βακτηριακά κύτταρα παρουσιάζονται με ανάγλυφη όψη. Έπειτα, γίνεται παρατήρηση σε φακό 'διερχομένου φωτός'. Αν κατά την παρατήρηση αυτή, τα ίδια βακτηριακά κύτταρα εμφανίζονται με **ιώδες** χρώμα, θεωρούνται **θετικά κατά Gram** (εικ. 2.2). Τα αρνητικά στελέχη δεν εμφανίζονται καθόλου στο οπτικό πεδίο σε φακό 'διερχομένου φωτός'.

Ως μάρτυρας για την σύγκριση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιείται το βακτήριο *Bacillus thurigiensis* που είναι θετικό κατά Gram.

Χρώση σπορίων

Η δοκιμή χρώσης σπορίων βασίζεται στην μέθοδο 'Schaeffer and Fulton' και πραγματοποιείται για να διαπιστωθεί η ύπαρξη ενδοσπορίων στα βακτηριακά στελέχη με την χρήση των χρωστικών ουσιών '**malachite green**' **5%** και **σαφρανίνη 0.5%**. Ακολουθούνται τα πιο κάτω στάδια :

- Παρασκευάζεται αιώρημα βακτηρίων πρόσφατης καλλιέργειας 24-48h (1ml).
- Σε αντικειμενοφόρο πλάκα γίνεται εναπόθεση μικρής ποσότητας αιωρήματος (50ml) και αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

- Γίνεται προσήλωση των βακτηριακών κυττάρων στην πλάκα με ελαφρό πέρασμα της από φλόγα 2-3 φορές.
- Εφαρμόζεται η χρωστική 'malachite green' 5% και η πλάκα αφήνεται στον ατμό για 1 min
- Ακολουθεί έκπλυση με απιονισμένο νερό.
- Εφαρμόζεται η σαφρανίνη 0,5% για 15sec.
- Η πλάκα εκπλένεται με απιονισμένο νερό και αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

Έπειτα, γίνεται παρατήρηση στο μικροσκόπιο με ελαιοκαταδυτικό φακό 'διερχομένου φωτός'. Τα βακτηριακά κύτταρα εμφανίζονται με χρώμα κόκκινο λόγω της σαφρανίνης ενώ τα ενδοσπόρια εμφανίζονται με πράσινο χρώμα, λόγω του malachite green (εικ. 2.3).

Χρησιμοποιήθηκε θετικός μάρτυρας το *B. thurigiensis*.

Δοκιμή οξειδάσης

Η δοκιμή οξειδάσης πραγματοποιείται σύμφωνα με την μέθοδο 'Konacs' και βασίζεται στον έλεγχο παραγωγής από το βακτήριο του ένζυμου της οξειδάσης.

- Παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα 2ml που περιέχει 20mg της ουσίας **tetramethyl - p- phenyldiamine**.
- Το διάλυμα εκχύνεται σε τρυβλίο ανοιχτό και εμβαπτίζεται σε αυτό, διηθητικό χαρτί ώστε να εμποτιστεί ολόκληρη η επιφάνειά του.
- Με μια βακτηριολογική βελόνη λευκόχρυσου, λαμβάνεται ποσότητα βακτηρίων από πρόσφατη καλλιέργεια (24-48h) και εναποτίθεται στο διηθητικό χαρτί.

Το βακτήριο θεωρείται **θετικό στην οξειδάση** αν μέσα σε διάστημα 10sec πάρει χρώμα βαθύ μοβ. Αυτό σημαίνει ότι το βακτήριο παράγει το ένζυμο της οξειδάσης, το οποίο αντιδρά με την ουσία του διαλύματος και προκύπτει, έτσι, το βαθύ μοβ χρώμα (εικ.2.4.).

Θετικός μάρτυρας στην προκειμένη περίπτωση είναι το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens*.

Δοκιμή καταλάσης

Ο βιοχημικός αυτός έλεγχος πραγματοποιείται για να διαπιστωθεί η ύπαρξη του ενζύμου της **καταλάσης** εντός των βακτηριακών κυττάρων.

- Με μια βακτηριολογική βελόνη, λαμβάνεται αρκετή ποσότητα βακτηρίων και εναποτίθεται σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα.
- Πάνω στην ποσότητα των βακτηρίων ρίχνεται σταγόνα H_2O_2 (οξυζενέ).

Αν υπάρχει στο βακτήριο το ένζυμο της καταλάσης, τότε αυτό διασπά το H_2O_2 σε H_2O και O_2 . Το οξυγόνο εμφανίζεται υπό μορφή φυσαλίδων (εικ.2.5).

Και στην προκειμένη περίπτωση το *B. thurigiensis* χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας.

Έλεγχος χρησιμοποίησης της γλυκόζης αερόβια και αναερόβια

Ο έλεγχος βασίζεται στην μέθοδο 'Hugh and Leifson' σύμφωνα με την οποία, ελέγχεται ο τρόπος με τον οποίο τα βακτήρια διασπούν και χρησιμοποιούν σάκχαρα.

Γενικά, τα βακτήρια χρησιμοποιούν τα σάκχαρα και άλλες οργανικές ουσίες σαν πηγές άνθρακα και ενέργειας για την ανάπτυξή τους. Χρησιμοποιούν τα σάκχαρα διασπώντας τα με δύο τρόπους:

- α) *Οξειδωτικά*, όπου είναι απαραίτητη η παρουσία οξυγόνου και
- β) *Ενζυματικά*, όπου η διάσπαση οφείλεται σε ενζυματική δραστηριότητα εντός των κυττάρων.

Τα βακτήρια που διασπούν τα σάκχαρα μόνο με τον πρώτο τρόπο ονομάζονται **υποχρεωτικά αερόβια**, αντίθετα αν η διάσπαση των σακχάρων γίνεται μόνο με τον δεύτερο τρόπο, τότε πρόκειται για **υποχρεωτικά αναερόβια**. Επίσης υπάρχουν βακτήρια τα οποία μπορούν να

διασπούν τα σάκχαρα και με τους δύο τρόπους. Τα βακτήρια αυτά ονομάζονται **προαιρετικά αναερόβια**.

Για την παρασκευή του κατάλληλου υλικού χρησιμοποιούνται τα πιο κάτω υλικά:

- Πεπτόνη : 0,1%
- NaCl : 0,5%
- K₂HPO₄ : 0,03%
- Άγαρ : 0,3%
- 20% υδατικό διάλυμα γλυκόζης : 1%
- Bromothymol blue : 0,003%

Το 'Bromothymol blue' χρησιμοποιείται ως δείκτης για την τιμή του PH του τελικού μίγματος, το οποίο πρέπει να είναι 7.2. Η τιμή αυτή του PH δίνει στο υλικό πράσινο-μπλε χρώμα.

Παρασκευάζεται, αρχικά το βασικό υλικό το οποίο δεν περιέχει πηγή άνθρακος συμπυκνωμένο κατά 10%. Το υλικό λιώνει στους 70 °C ώστε να σχηματιστεί ομοιογενές μίγμα και τοποθετείται σε δοκιμαστικούς σωλήνες, σε ποσότητα 10% λιγότερη της τελικής (π.χ 4.5 ml αντί για 5ml ανά σωλήνα). Στην συνέχεια, παρασκευάζεται διάλυμα γλυκόζης 20% το οποίο τοποθετείται στους δοκιμαστικούς σωλήνες σε ποσότητες 10% της τελικής ποσότητας (0.5 ml στα 4.5ml βάσης σε κάθε σωλήνα). Η προσθήκη αυτή γίνεται εφόσον το υλικό στους σωλήνες βρίσκεται στους 50 °C. Τέλος, το τελικό μίγμα αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

Κατά την τεχνητή μόλυνση του υλικού με τα βακτήρια χρησιμοποιούνται 2 σωλήνες για κάθε καλλιέργεια. Λαμβάνεται ποσότητα βακτηρίων από μία καλλιέργεια με τη μύτη μιας βελόνης (όχι loop) που στη συνέχεια εισχωρεί σε σχετικό βάθος στο υλικό του δοκιμαστικού σωλήνα. Η ίδια κίνηση γίνεται και στον δεύτερο σωλήνα χωρίς να ληφθεί νέα ποσότητα βακτηρίων. Τα βακτήρια εναποτίθενται με αυτό τον τρόπο στο υλικό όπου και αναπτύσσονται. Στη συνέχεια, στον έναν από τους δύο σωλήνες εκχύνονται 3-5 κ.εκ. λιωμένης βαζελίνης η οποία κατά την πήξη της, απομονώνει το

υλικό από τον ατμοσφαιρικό αέρα. Τα βακτήρια αφήνονται να αναπτυχθούν αερόβια και αναερόβια για 24h.

Η διάσπαση της γλυκόζης από τα βακτήρια, διαπιστώνεται από την μεταβολή του χρώματος του υλικού από πράσινο-μπλε σε κίτρινο (εικ.2.6). Η αλλαγή στο χρώμα προδίδει μεταβολή στο PH του θρεπτικού υλικού προς το όξινο από ουδέτερο που ήταν αρχικά.

Γίνεται έλεγχος για κάθε βακτήριο στην ικανότητά του να διασπά την γλυκόζη αερόβια και αναερόβια. Ως μάρτυρας, χρησιμοποιείται το *Erwinia carotovora* που είναι προαιρετικά αναερόβιο.

Δοκιμή διαπίστωσης κινητικότητας

Από σχετικά αραιό αιώρημα βακτηρίων, δημιουργείται παρασκεύασμα προς μικροσκοπική παρατήρηση.

Στο μικροσκόπιο η παρατήρηση γίνεται σε φακό 'αντίθεσης φάσεων' (phase contrast). Τα βακτήρια που έχουν αυτόνομη κίνηση, ανεξάρτητη από την 'κίνηση brown', φαίνονται να κινούνται γραμμικά στο οπτικό πεδίο, ή να περιστρέφονται αξονικά. Η ύπαρξη κινητικότητας μαρτυρεί την ύπαρξη μαστιγίων στα βακτηριακά κύτταρα.

Χρώση μαστιγίων

Η χρώση βασίζεται στην μέθοδο 'Cesares – Gill's' με την οποία γίνεται δυνατή η παρατήρησή των μαστιγίων στο μικροσκόπιο. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται, παρασκευάζονται με τον εξής τρόπο:

- **Plimmer's mordant:** Για την παρασκευή ποσότητας 100ml χρησιμοποιήθηκαν 20gr Tannic acid, 36gr $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, 20gr $ZnCl_2$, 3gr Basic fuchsin, 80ml Αιθανόλη 60%. Τα στερεά υλικά συνθλίβονται σε ένα γουδί, ενώ κατά διαστήματα προστίθεται η αιθανόλη μέχρι το τελικό μίγμα να έχει διαλυθεί και ομογενοποιηθεί. Πριν χρησιμοποιηθεί, αραιώνεται με απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:3 και φιλτράρεται διπλά.

- **Kickpartick's fixative προσηλωτικό:** Για την παρασκευή ποσότητας 100ml χρησιμοποιούνται 60ml απόλυτη αιθανόλη, 30ml χλωροφόρμιο, 10ml formaldehyde soln 40%.
- **Carbol fuchsin (αραιό):** Διαλύεται έτοιμο πυκνό διάλυμα carbol fushsin σε απιονισμένο νερό, σε αναλογία 1:15.

Η διαδικασία χρώσης ακολουθεί τα πιο κάτω στάδια:

- Παρασκευάζεται, προσεκτικά, βακτηριακό αιώρημα πρόσφατης καλλιέργειας, φροντίζοντας να μην γίνει ισχυρή ανάδευση και καταστραφούν τα μαστίγια.
- Σε μια όσο το δυνατό καθαρή αντικειμενοφόρο πλάκα, εναποτίθεται σταγόνα αιωρήματος στο ένα άκρο της. Η πλάκα τοποθετείται σε κάθετη θέση με το μέρος της σταγόνας προς τα πάνω. Έτσι, η σταγόνα κυλά αργά προς το άλλο άκρο και αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.
- Εφαρμόζεται το προσηλωτικό Kickpatrick's fixative για 5min ώστε να προσηλωθούν τα κύτταρα στην πλάκα.
- Γίνεται πλήρης έκπλυση του προσηλωτικού με απιονισμένο νερό.
- Εφαρμόζεται το Plimmer's mordant και αφήνεται να δράσει για 5min.
- Εκπλένεται με νερό βρύσης.
- Εφαρμόζεται το carbol fuchsin για 2min.
- Εκπλένεται και αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

Ακολουθεί μικροσκοπική παρατήρηση με ελαιοκαταδυτικό φακό 'αντίθεσης φάσεως' (phase contrast). Τα βακτήρια παρουσιάζονται με μπλε χρώμα, ενώ τα μαστίγια εμφανίζονται σαν νημάτια τα οποία εκφύονται από τα βακτηριακά κύτταρα (εικ.2.7).

Τα μαστίγια αποτελούν βασικό ταξινομικό χαρακτήρα για τα βακτήρια, κυρίως ο αριθμός τους και ο τρόπος έκφυσης από το κυτταρικό τοίχωμα. Όταν τα βακτήρια φέρουν ένα μόνο μαστίγιο στον έναν ή και στους δύο πόλους τους, ονομάζονται αντίστοιχα **μονότριχα ή αμφίτριχα**. Αν στον έναν

ή και στους δύο πόλους τους εκφύονται περισσότερα από ένα μαστίγια, σε μορφή θυσάνου, ονομάζονται αντίστοιχα **λοφότριχα** ή **αμφιλοφότριχα**. Τέλος όταν τα μαστίγια εκφύονται από πολλά σημεία του βακτηριακού κυττάρου λέγονται **περίτριχα**. Το γένος *Xanthomonas* περιλαμβάνει μονότριχα είδη, το γένος *Pseudomonas* λοφότριχα, ενώ διάφορα γένη, όπως *Erwinia*, *Bacillus*, *Agrobacterium* είναι περίτριχα (Ηλιόπουλος, 1993).

Κατά τη διαδικασία της χρώσης, χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας το *B. thuringiensis* το οποίο επίσης, είναι περίτριχο βακτήριο.

2.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.3.1 Δοκιμές αντιβιοτικής δράσης

Εξετάσθηκαν συνολικά 61 διαφορετικές απομονώσεις, από τις οποίες βρέθηκαν 16 που παρεμπόδισαν την ανάπτυξη του *Botrytis cinerea* κατά την πρώτη εφαρμογή των δοκιμών. Το πείραμα επαναλήφθηκε για όλες τις απομονώσεις και την δεύτερη φορά παρουσιάστηκαν 9 οι οποίες έδειξαν αντιβίωση. Ακολούθησε και δεύτερη επανάληψη, που αυτή την φορά δοκιμάστηκαν οι 16 πρώτες θετικές απομονώσεις. Και στην προκειμένη περίπτωση επαληθεύτηκαν τα αποτελέσματα της δεύτερης δοκιμής.

Και στις τρεις δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν, τα βακτήρια αφήθηκαν προς ανάπτυξη στο θρεπτικό υλικό PDA των τρυβλίων, για χρονικό διάστημα 24h.

Αναλυτικότερα τα αποτελέσματα και των τριών επαναλήψεων φαίνονται στον πίνακα 2.1.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.1 Προέλευση των βακτηριακών απομονώσεων και αντιβιοτική δραστηριότητά τους μετά από 24ωρη επώαση σε υλικό PDA.

Κωδική Ονομασία	Προέλευση	1 ^η Δοκιμή	2 ^η Δοκιμή	3 ^η Δοκιμή
T.S. – 1	Φυτικοί ιστοί τομάτας	-	-	-
T.S. – 2	>>	-	-	-
T.S. – 3	>>	-	-	-
T.S. – 4	>>	-	-	-
T.S. – 5	Σπόροι τομάτας	-	-	-
T.S. – 6	>>	-	-	-
T.S. – 7	>>	-	-	-
T.S. – 8	>>	-	-	-
T.S. – 9	>>	-	-	-

Κωδική Ονομασία	Προέλευση	1 ^η Δοκιμή	2 ^η Δοκιμή	3 ^η Δοκιμή
T.S. – 10	Σπόροι τομάτας	-	-	-
T.S. – 11	>>	-	-	-
T.S. – 12	>>	-	-	-
T.S. – 13	>>	-	-	-
T.S. – 14	>>	+	-	-
T.S. – 15	>>	-	-	-
T.S. – 16	>>	+	+	+
T.S. – 17	>>	+	+	+
T.S. – 18	>>	-	-	-
T.S. – 19	>>	-	-	-
T.S. – 20	>>	-	-	-
T.S. – 21	>>	-	-	-
T.S. – 22	>>	-	-	-
T.S. – 23	>>	-	-	-
T.S. – 24	>>	+	+	+
T.S. – 25	>>	+	+	+
T.S. – 26	Φυτικοί ιστοί τομάτας	-	-	-
T.S. – 27	>>	-	-	-
T.S. – 28	>>	+	+	+
T.S. – 29	>>	-	-	-
T.S. – 30	>>	-	-	-
T.S. – 31	>>	-	-	-
T.S. – 32	>>	-	-	-
T.S. – 33	>>	+	-	-
T.S. – 34	Σπόροι τομάτας	-	-	-
T.S. – 35	>>	-	-	-
T.S. – 36	>>	+	-	-

Κωδική Ονομασία	Προέλευση	1 ^η Δοκιμή	2 ^η Δοκιμή	3 ^η Δοκιμή
T.S. – 37	Σπόροι τομάτας	-	-	-
T.S. – 38	>>	-	-	-
T.S. – 39	>>	-	-	-
T.S. – 40	>>	-	-	-
T.S. – 41	>>	-	-	-
T.S. – 42	>>	+	-	-
T.S. – 43	>>	-	-	-
T.S. – 44	>>	-	-	-
T.S. – 45	>>	-	-	-
T.S. – 46	>>	-	-	-
T.S. – 47	>>	-	-	-
C.S. – 1	Φυτικοί ιστοί αγγουριού	-	-	-
C.S. – 2	>>	-	-	-
S. – 1	Ξένες επιμολύνσεις	+	-	-
S. – 2	>>	-	-	-
S. – 3	>>	+	-	-
S. – 4	>>	-	-	-
S. – 5	>>	+	+	+
S. – 6	>>	+	+	+
S. – 7	>>	+	+	+
S. – 8	>>	-	-	-
S. – 9	>>	-	-	-
S. – 10	>>	+	+	+
S. – 11	>>	+	-	-
S. – 12	>>	-	-	-

Η μορφή της αντιβίωσης την οποία παρουσίασαν τα βακτήρια ενάντια στην ανάπτυξη του *Botrytis cinerea* φαίνεται στην εικόνα 2.8.

Ακολούθησαν δύο ακόμα πειραματικές δοκιμές, στις οποίες δοκιμάστηκαν τα 9 βακτήρια, αφού προηγουμένως αφέθηκαν να αναπτυχθούν στα τρυβλία υλικού PDA για 48h και 72h αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα των δοκιμών φαίνονται στον πίνακα 2.2, ενώ στην εικόνα 2.9 φαίνεται η διαφορά στην αντιβιοτική τους δράση.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.2 Συγκριτικές διαστάσεις των μορφών αντιβίωσης που παρουσίασαν τα 9 θετικά βακτήρια κατά την παραμονή τους στο υλικό PDA για 48h και 72h.

Κωδική ονομασία	48h (mm)	72h (mm)
TS-16	40,5	50,9
TS-17	31,7	38,4
TS-24	30,3	44,3
TS-25	25,8	31,7
TS-28	22	25,8
S-5	38,4	46,5
S-6	14,8	22,9
S-7	17,7	22,6
S-10	16,2	21,5

2.3.2 Ταυτοποίηση

Τα αποτελέσματα των βιοχημικών, μορφολογικών και φυσιολογικών δοκιμών, φαίνονται στον πιο κάτω πίνακα

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.3 Αποτελέσματα των δοκιμών ταυτοποίησης των θετικών απομονώσεων στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης του *Botrytis cinerea*.

	TS 16	TS 17	TS 24	TS 25	TS 28	S 5	S 6	S 7	S 10
Χρώση Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Παραγωγή Ενδοσπορίων	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Παραγωγή οξειδάσης	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Ύπαρξη Καταλάσης	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Αναερόβια διάσπαση σακχάρων	+	+	-	+	-	+	+	+	+
Κινητικότητα	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Χρώση μαστιγίων	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Διάμετρος άνω των 2,5μm*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ραβδοειδές σχήμα	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(*) : Η σύγκριση της διαμέτρου των βακτηριακών κυττάρων πραγματοποιήθηκε στο μικροσκόπιο του εργαστηρίου μυκητολογίας του Μ.Φ.Ι.

Από τον παραπάνω πίνακα προκύπτει ότι όλα τα βακτήρια παρουσιάζονται θετικά κατά Gram, παράγουν ενδοσπόρια, ενώ στην οξείδωση έδειξαν διάφορα αποτελέσματα. Το ένζυμο της καταλάσης υπάρχει στα βακτήρια όλων των απομονώσεων, ενώ τα περισσότερα παρουσιάζονται θετικά ως προς την αναερόβια διάσπαση σακχάρων. Κάθε βακτηριακό κύτταρο διαθέτει αυτόνομη κίνηση και στη χρώση μαστιγίων που έγινε, υπήρχαν περίτριχα μαστίγια σε όλες τις απομονώσεις. Το πάχος κάθε κυττάρου δεν υπερβαίνει τα 2,5μm, όπως φάνηκε κατά την μικρομέτρηση στο εργαστήριο μυκητολογίας και το σχήμα όλων των κυττάρων είναι ραβδοειδές.

Στον πίνακα 2.4 αναφέρονται τα διάφορα χαρακτηριστικά από γένη βακτηρίων που παρουσιάζονται θετικά κατά Gram, σύμφωνα με το 'Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology' (Sneath Peter H.A., 1986).

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.4 Χαρακτηριστικά βακτηριακών γενών που παρουσιάζονται θετικά κατά Gram (Sneath Peter H.A., 1986 'Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology' vol 2, p 1104)

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	Γένη με ενδοσπόρια						Γένη χωρίς ενδοσπόρια		
	Bacillus	Sporolactobacillus	Clostridium	Desulfotomaculum	Sporosarcina	Osscillo-Spira	Planococcus	Lactobacillus	kurthia
Ραβδοειδές σχήμα	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Διάμετρος άνω των 2,5μm	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Παραγωγή ενδοσπορίων	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Κινητικότητα	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Gram-Θετικά, σε πρόσφατες καλλιέργειες	+	+	+	-	+	-	+	+	+
Προαιρετικά αναερόβια	Δ	+	-	-	-	MA	-	+	-
Κατάλυση	+	-	-	-	+	MA	+	-	+
Οξειδάση	Δ	MA	-	MA	+	MA	-	-	-
Καρτυλωτά στελέχη	-	-	Δ	Δ	ME	+	ME	-	-
Κόκκοι κατά ομάδες ή τετράδες	-	-	-	-	+	-	δ	-	-

Σύμβολα :

(+) : ≥ 90 % Θετικά

(-) : ≤ 10 % αρνητικά

(δ) : 11%-89% θετικά

(Δ) : Σημαντική αναλογία των ειδών, διάφορη

(MA) : Μη Αποδεδειγμένο

(ME) : Μη Εφαρμόσιμο.

Σύμφωνα με τον πίνακα 2.4 και τα αποτελέσματα των δοκιμών ταυτοποίησης (πίνακας 2.3), εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι 9 απομονώσεις που δοκιμάστηκαν και παρουσίασαν αντιβίωση, ανήκουν στο γένος **Bacillus**.

2.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η δυνατότητα ορισμένων βακτηρίων, δημιουργίας αντιβιοτικής δράσης ενάντια στην ανάπτυξη *In vitro* του μύκητα *Botrytis cinerea*. Από τις 61 απομονώσεις βακτηρίων, οι οποίες προέρχονται από σπόρους και φυτά τομάτας και αγγουριάς, και εξετάστηκαν *in vitro*, προκύπτει το συμπέρασμα ότι υπάρχουν βακτήρια τα οποία είναι δυνατό να δράουν ενάντια στην ανάπτυξη του μύκητα έστω και υπό εργαστηριακές συνθήκες.

Η παρεμπόδιση στην ανάπτυξη του μύκητα οφείλεται σε διάφορα προϊόντα του μεταβολισμού των βακτηριακών κυττάρων, καθώς αυτά παραμένουν για ορισμένο χρονικό διάστημα στο ίδιο θρεπτικό υλικό στο οποίο θα αναπτυχθεί ο βοτρυτής αργότερα. Τα προϊόντα αυτά, καθώς τα βακτήρια αναπτύσσονται, διαχέονται στο θρεπτικό υλικό, γύρω από το σημείο στο οποίο βρίσκεται η αποικία των. Κατά την ανάπτυξή του, ο μύκητας τείνει να καταλάβει ολόκληρη της επιφάνεια του θρεπτικού υλικού στο οποίο ψεκάστηκε υπό μορφή υγρού αιωρήματος, όμως παρεμποδίζεται στην περιοχή γύρω από την βακτηριακή αποικία. Έτσι, στην περιοχή γύρω από την αποικία σχηματίζεται μία «άλως» (εικ.2.8).

Δοκιμάστηκε η παραμονή των βακτηρίων στο θρεπτικό υλικό, για χρονικά διαστήματα 24, 48 και 72 ωρών. Η μορφή της αντιβίωσης παρουσιάστηκε σχετικά διαφορετική κατά τα χρονικά αυτά διαστήματα. Η «άλως», στις δοκιμές των 72 ωρών, παρουσιάζεται σαφώς μεγαλύτερη από εκείνη των 24 ωρών, ενώ εκείνη ωρών 48 ωρών παρουσιάζει μια μέση διάμετρο σε σχέση με τις υπόλοιπες.

Η παρεμπόδιση της ανάπτυξης είχε κατά μέσο όρο διάρκεια 1-2 εβδομάδες. Από εκεί και έπειτα υφές τους μύκητα σιγά - σιγά εξαπλώνονταν και πλησίαζαν προς τη βακτηριακή αποικία. Συγκεκριμένα, μετά από 11 ημέρες ανάπτυξης του μύκητα, στα βακτήρια TS-24, TS-28, S-5 και S-7 η αντιβίωση έχει εξασθενήσει και ο μύκητας έχει πλησιάσει τη βακτηριακή αποικία. Στο ίδιο χρονικό διάστημα, η επιφάνεια γύρω από τα βακτήρια

TS-17 και S-10 έχει καλυφθεί πλήρως από τις υφές του μύκητα. Υπήρξε και περίπτωση (TS-16) όπου η αντιβίωση διήρκεσε πέραν των 2 εβδομάδων.

Έγινε προσπάθεια ταυτοποίησης των θετικών βακτηρίων μέσα από διάφορους βιοχημικούς ελέγχους. Από την προσπάθεια αυτή, προσδιορίστηκε το γένος του και όπως φάνηκε, όλα τα βακτήρια ανήκουν στο ίδιο γένος *Bacillus*.

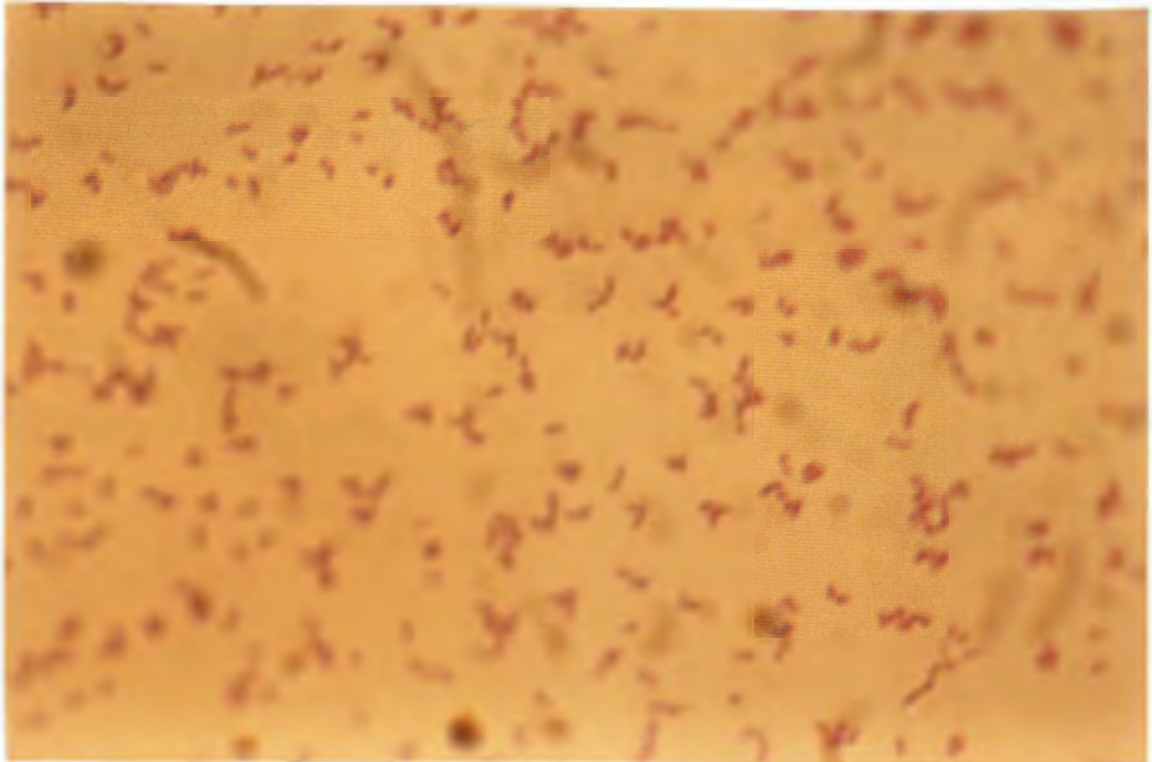
Η εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο, και η παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μύκητα, μελετήθηκε *in vitro*. Παρόλα τα θετικά αποτελέσματα που προέκυψαν θα ήταν λάθος να θεωρηθεί, ότι αυτή η μορφή βιολογικής αντιμετώπισης, είναι απόλυτα επιτυχημένη. Είναι αναγκαίο η μελέτη να διεξαχθεί και *in vivo*, σε κηπευτικά φυτά ή φυτά αμπελιού και να εξετασθεί λεπτομερειακά η αποτελεσματικότητα της αντιβιοτικής δράσης σε συνθήκες αγρού. Ωστόσο, η εργασία αυτή, θα μπορούσε να θεωρηθεί ένα πρώτο βήμα σε ένα νέο πεδίο έρευνας που ανοίγεται και αφορά τη βιολογική καταπολέμηση του *Botrytis cinerea*.

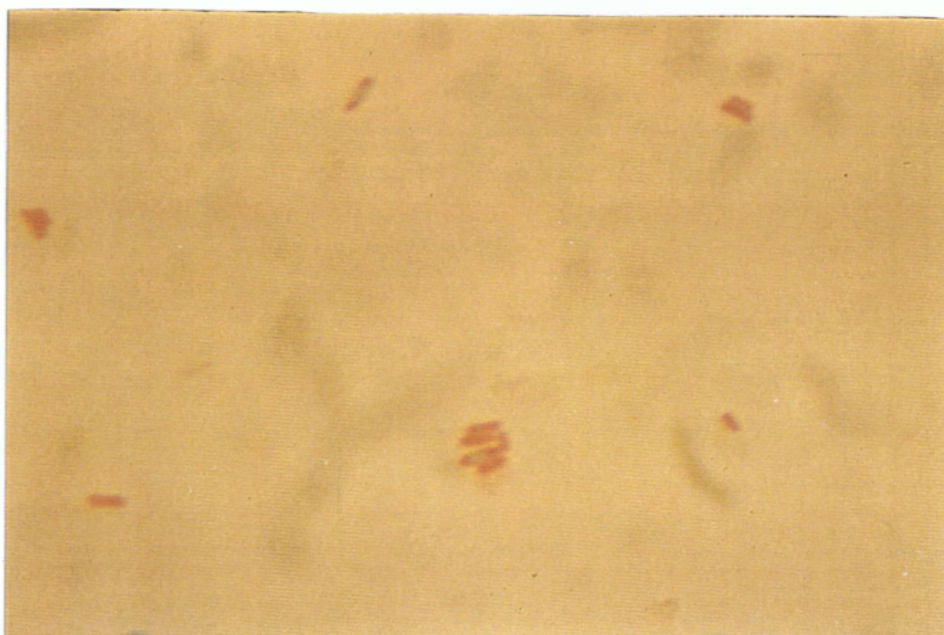
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ II



Εικ. 2.1 Γραμμική εξάπλωση (streaking) βακτηρίων σε θρεπτικό υπόστρωμα NA+Cyclohexamide

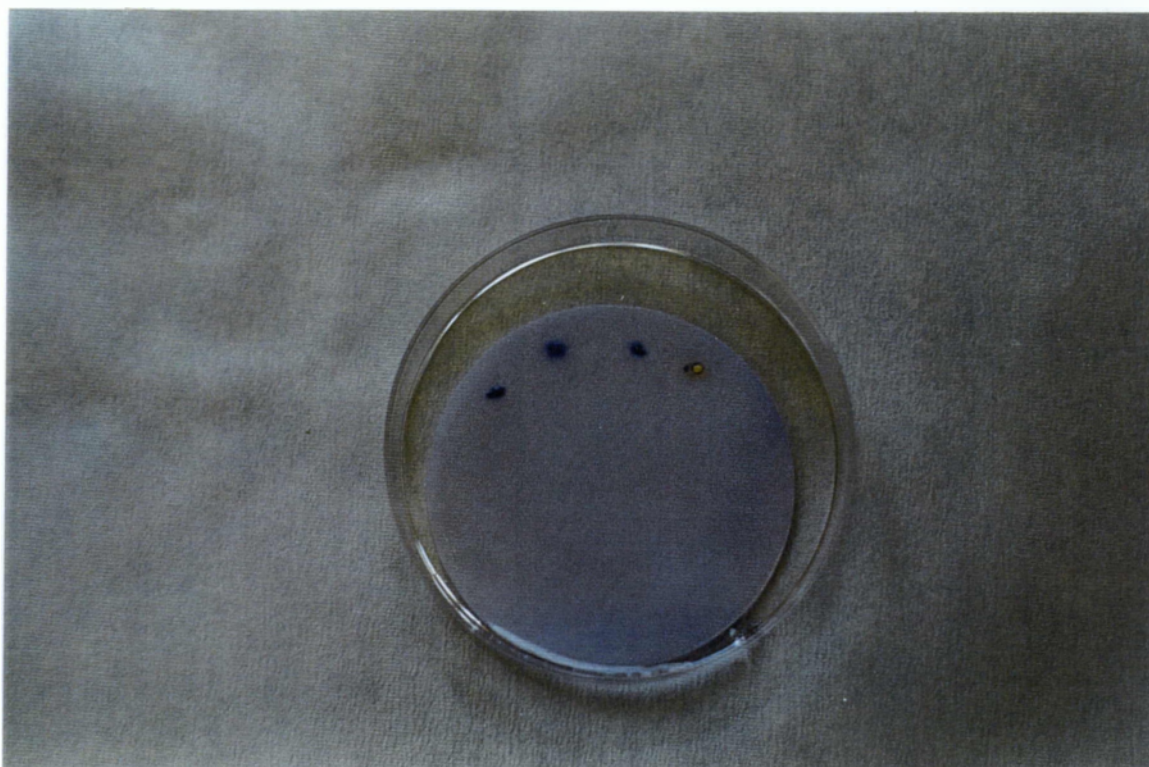
Εικ. 2.2 Δοκιμή χρώσης Gram στην οποία τα θετικά βακτήρια εμφανίζονται στο μικροσκόπιο με ιώδες χρώμα σε φακό 'διερχομένου φωτός'

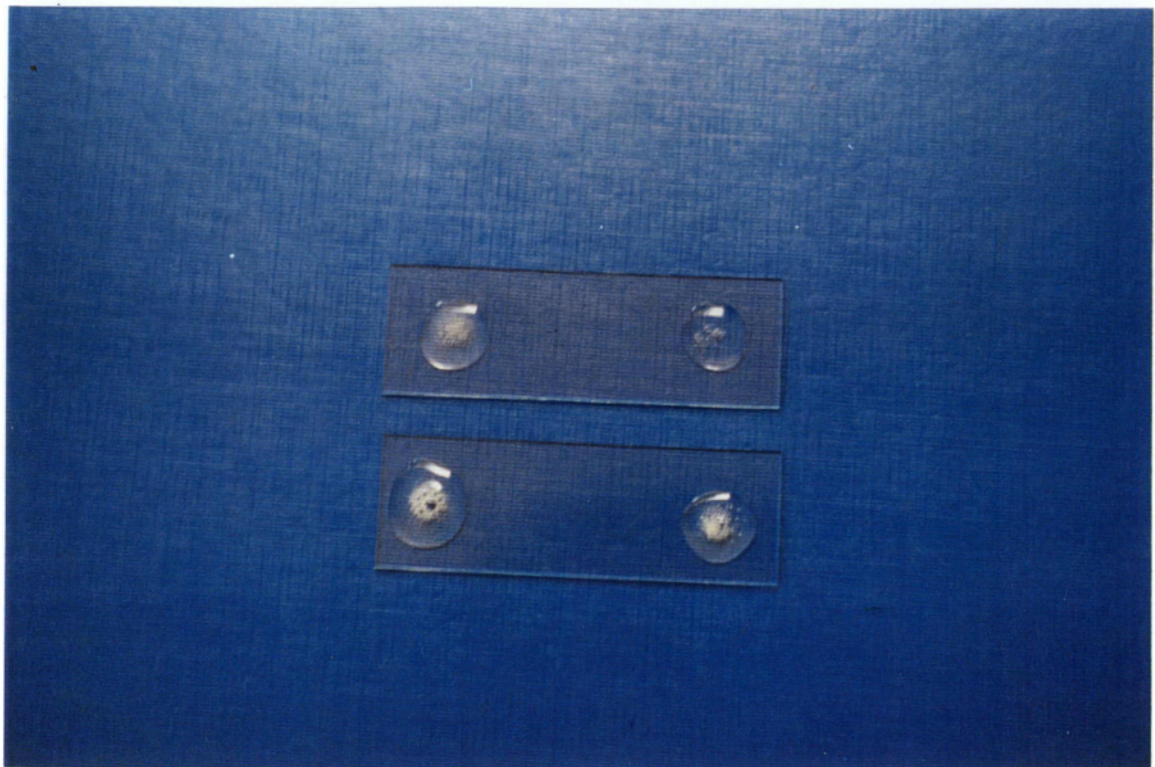




Εικ. 2.3 Στην χρώση σπορίων τα βακτήρια στο μικροσκόπιο εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα, ενώ τα σπόρια τους με πράσινο.

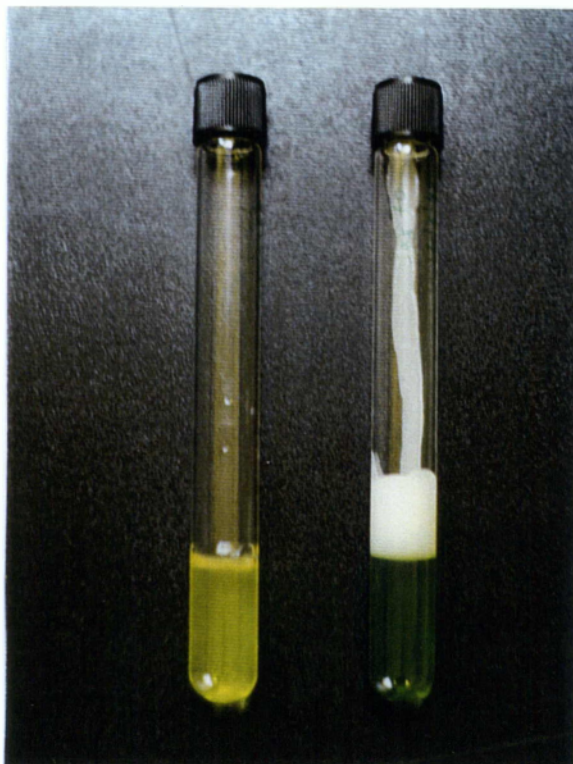
Εικ. 2.4 Δοκιμή οξειδάσης. Τα θετικά βακτήρια χρωματίζονται μοβ σε διάστημα 10 sec από την εφαρμογή τους, σε αντίθεση με τα αρνητικά (δεξιά).





Εικ. 2.5 Το ένζυμο της καταλάσης προκαλεί φυσαλίδες στην σταγόνα H_2O_2 (οξυζενέ), εφόσον υπάρχει στα βακτήρια. Στην αντίθετη περίπτωση (πάνω δεξιά) τα βακτήρια μένουν αδρανή.

Εικ. 2.6 Χαρακτηριστικό παράδειγμα υποχρεωτικά αερόβιου βακτηρίου (α) και προαιρετικά αναερόβιου (β). Στην πρώτη περίπτωση το βακτήριο δεν διασπά την γλυκόζη υπό αναερόβιες συνθήκες (δεξιά), σε αντίθεση με την δεύτερη, όπου μεταβάλλεται το χρώμα του υλικού ανάπτυξης λόγω της μεταβολής του pH από την διάσπαση της γλυκόζης.

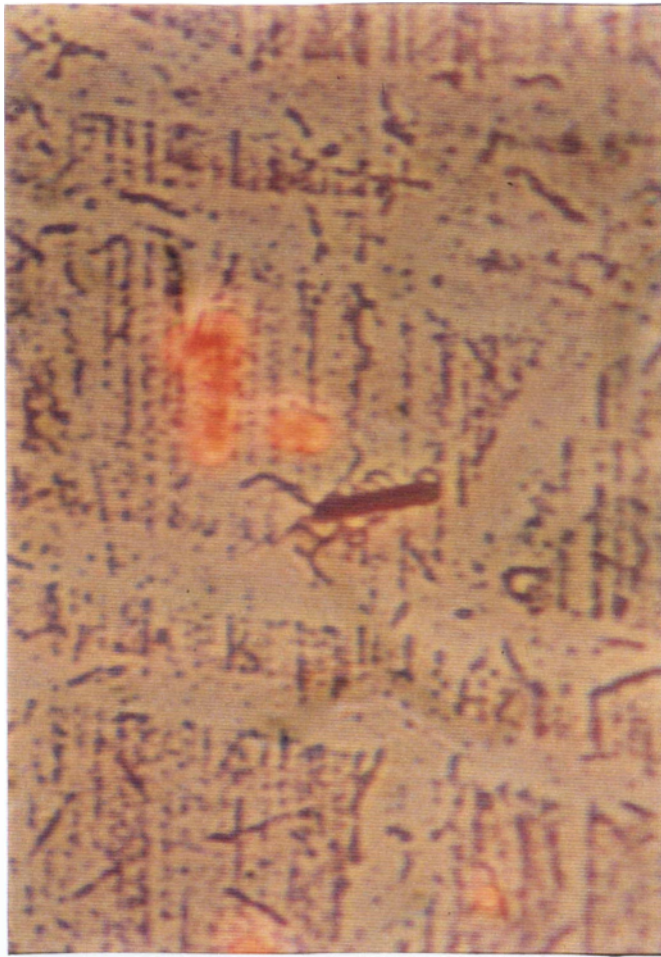


(α)

55



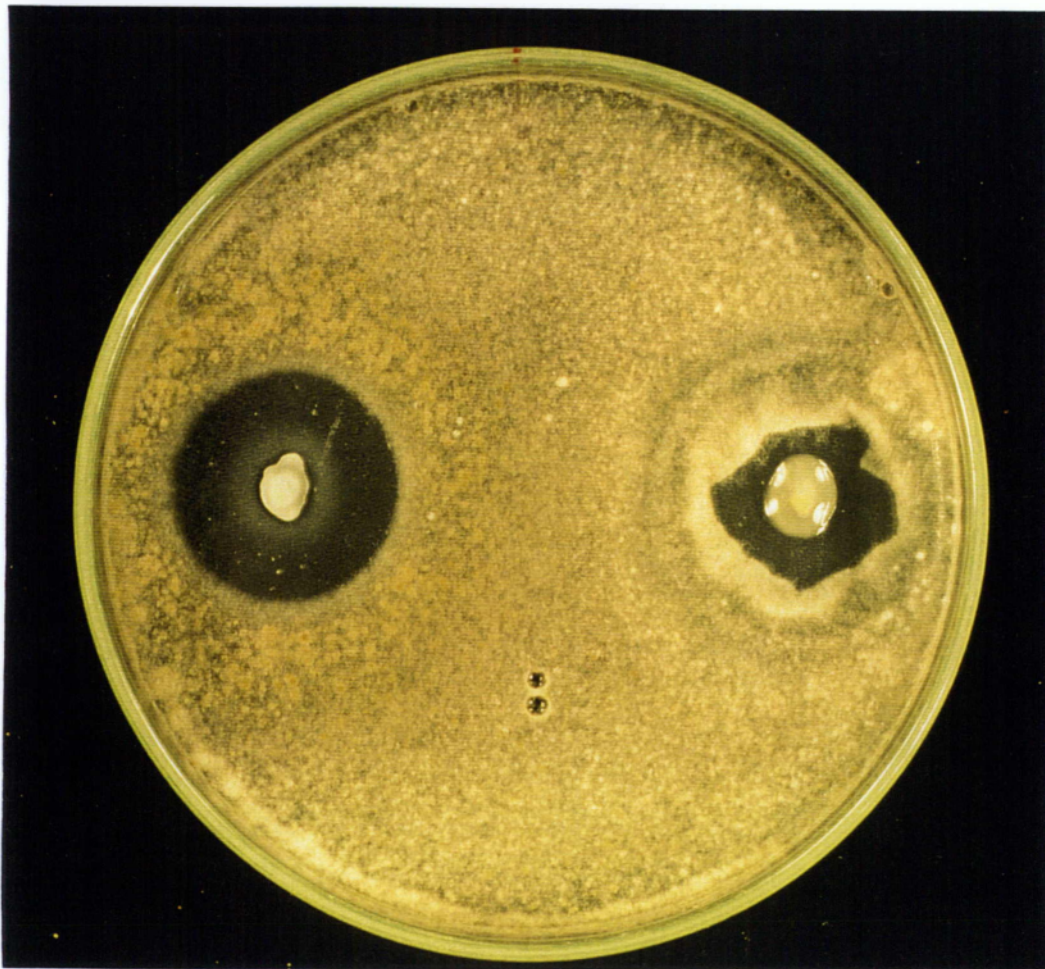
(β)



Εικ. 2.7 Χρώση μαστιγίων βακτηρίου του γένους *Bacillus*

Εικ.2.8 Τρυβλίο Petri με την χαρακτηριστική μορφή της αντιβίωσης που παρουσίασαν δύο διαφορετικές βακτηριακές αποικίες. Ο μύκητας *Botrytis cinerea* έχει εξαπλωθεί σε όλη την επιφάνεια του θρεπτικού υποστρώματος, εκτός από την περιοχή γύρω από τις αποικίες, όπου σχηματίζεται μια 'άλω'

Εικ. 2.7



Εικ. 2.8



Εικ. 2.9 Σύγκριση της διαφοράς στην μορφή της αντιβίωσης που παρουσίασαν δύο διαφορετικές αποικίες βακτηρίων κατά την παραμονή τους στο θρεπτικό υλικό για 42h (αριστερά) και 72h (δεξιά).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- AGRIOS G.N (1997) : 'Plant Pathology', p 184, 341. Academic Press, London
- BLANCARD D. (1994) : 'A Colour Atlas Of Tomato Diseases'. Manson Publishing, London
- COLEY- SMITH J.R, VERHOEFF K. and JARVIS W.R.(1980): 'The Biology Of *Botrytis*'. p 5,65,158. Academic Press, London
- COWAN S.T. and STEEL K.J (1965): 'Manual For The Identification Of Medical Bacteria'. p22,45,46,142,145,150. Cambridge At The University Press
- ELAD Y. (1994): 'Biological Control Of Grape Grey Mould By *Trichoderma harzianum*'. Crop Protection vol 13 p.35-38
- ELAD Y. (1996): 'Mechanisms Involved In The Biological Control Of *Botrytis cinerea* Incited Diseases'. European Journal of Plant Pathology, vol 102 p. 719-732
- ELAD Y. GULLINO M.L, SHTIENBERG D and ALOI C. (1995): 'Managing *Botrytis conerea* On Tomatoes In Greenhouses In The Mediterranean'. Crop Protection vol 14 p 105-109
- ELAD Y. KIRSHNER B. and GOTLIB Y. (1993): 'Attempts to control *Botrytis conerea* on roses by pre- and postharvest treatments with biological and chemical agents'. Crop Protection vol 12 p 69-73
- ELAD Y., MALATHRAKIS N.E., DIK A.J (1996): 'Biological control in greenhouse crops'. Crop Protection vol 15,p229-238
- ΖΑΧΟΣ Δ.Γ., ΠΑΝΑΓΟΠΟΥΛΟΣ Χ.Γ., ΘΑΝΑΣΟΠΟΥΛΟΣ Κ.Κ, ΜΠΙΡΗΣ Δ.Α. και ΚΥΡΙΑΚΟΠΟΥΛΟΣ Π.Η (1984): 'Λεξικό Φυτοπαθολογικών Όρων'. Ελληνική Φυτοπαθολογική Εταιρεία, Αθήνα.
- HANNUSCH D.J and BOLAND G.J (1996): 'Interactions of air temperature, relative humidity and biological control agents on gray mold of bean'. European Journal of Plant Pathology, vol 102. P 133-142
- ΗΛΙΟΠΟΥΛΟΣ Α.Γ. (1993): Φυτοπροστασία Ι, Στοιχεία Φυτοπαθολογίας', σελ 107-131. ΤΕΙ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ.

- ΗΛΙΟΠΟΥΛΟΣ Α.Γ (1996): 'Ειδική Φυτοπροστασία Δενδρωδών Καλλιέργειών και Αμπέλου'. σελ 246-250 ΤΕΙ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
- ΛΑΣΚΑΡΗΣ Δ., ΠΑΠΠΑΣ Α.Χ και ΚΥΡΙΑΚΟΠΟΥΛΟΣ Χ.Κ(1994): 'Εμφάνιση στελεχών του *Botrytis cinerea* με διασταυρωτή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά και φαινολοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα σε καλλιέργειες θερμοκηπίου'. 7^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο σελ 74-75. Ελληνική Φυτοπαθολογική Εταιρεία, Αθήνα.
- LELLIOT R.A. and STEAD D.E.: 'Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants'. Methods in Plant Pathology v.2, Blackwell Scientific Publications ,Oxford.
- LOCKE T. and FLETCHER J.T. (1988): 'Incidence of benomyl and iprodione resistance in isolates of *Botrytis cinerea* in tomato crops in England and Wales in 1986'. Plant Pathology vol 37 p 381-384.
- ΜΑΛΑΘΡΑΚΗΣ Ν.Ε. (1987): 'Ανθεκτικότητα του *Botrytis cinerea* στο dichlofluanid σε κηπευτικά καλλιεργούμενα σε θερμοκήπια'. 4^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο σελ 34. Ελληνική Φυτοπαθολογική Εταιρεία, Αθήνα.
- ΜΑΛΑΘΡΑΚΗΣ Ν.Ε., ΠΑΝΑΓΙΟΤΑΚΗΣ Γ., ΜΑΡΚΕΛΛΟΥ Α. and ΜΑΡΑΖΑΚΙ Μ. (1992): 'Synopsis of research on biological control of gray mould (*Botrytis cinerea*) of tomato'. 6th National Phytopathological Congress. P.47. Greek Phytopathological Society, Athens.
- MARI M. GUIZARDI M., BRUNELLI M. and FOLCHI A. (1996): 'Postharvest biological control of gray mould (*Botrytis cinerea*) on fresh - market tomatoes with *Bacillus amyloliquefasciens*'. Crop Protection vol 15 p 699-704.
- MAROIS J.J. (1992): 'Biological control of *Botrytis cinerea*'. Biological control of plant diseases, Progress and Challenges for the future. p. 109-111. Plenum Press, New York and London.
- ΜΠΟΥΡΝΑΚΑΣ Β. (1995): 'Μυκητολογικές ασθένειες της τομάτας'. Γεωργία και Κτηνοτροφία. Τ. 5 Ιούνιος - Ιούλιος '95 σελ 15-30

- O' NEILL T.M., NIV A., ELAD Y. and SHTIENBERG D. (1996): 'Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato stem wounds with *Trichoderma harzianum*'. European Journal of Plant Pathology. vol 102 p 635-643.
- ΠΑΝΑΓΙΩΤΑΡΟΥ Ν. και ΧΡΥΣΑΓΗ Μ.(1991) : 'Εγχειρίδιο χημικής καταπολέμησης ασθενειών και καλλιεργούμενων φυτών'. Σελ 23-28 Μ.Φ.Ι., Κηφισιά.
- ΠΑΝΑΓΟΠΟΥΛΟΣ Χ.Γ (1993): 'Ασθένειες καρποφόρων δένδρων και αμπέλου'. σελ. 387-392. Α Σταμούλης, Αθήνα.
- ΠΑΝΑΓΟΠΟΥΛΟΣ Χ.Γ (1995): 'Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών'. σελ 76-89. Α Σταμούλης, Αθήνα.
- ΠΑΠΠΑΣ Α.Χ (1987): 'Καταπολέμηση του βοτρυτή σε καλλιέργεια τομάτας θερμοκηπίου'. 4^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, σελ 37, Ελληνική Φυτοπαθολογική Εταιρεία, Αθήνα.
- ΠΟΛΙΤΗΣ Δ.Ι (1995): 'Εγκεκριμένα Γεωργικά Φάρμακα στην Ελλάδα (Μυκητοκτόνα – Βακτηριοκτόνα)'. Μ.Φ.Ι , Κηφισιά.
- QUESNELL L.B.(1971): 'Microscopy and Micrometry'. Methods in Microbiology. Norris, Ribbons vol 5A p 2-102. Academic Press, London.
- ΡΟΥΜΠΙΟΣ Ι.Χ. (1987) : 'Ασθένειες και εχθροί της Αμπέλου'. Σελ. 26-29. Σύγχρονα θέματα.
- ΡΟΥΜΠΙΟΣ Ι.Χ. (1996) : ' Οδηγός Φυτοπροστασίας της Αμπέλου'. Σελ. 39-37. Ωρες.
- SNEATH P.H.A. (1986) : 'Endospore forming Gram-Positive rods and cocci'. Bergey's manual of systematic bacteriology v.2, p. 1104-1138. Williams and Wilkins. Baltimore, London, L.A., Sydney.
- SNOWDON A.L. (1991) : 'A color Atlas of postharvest diseases and disorders of fruits and vegetables'.
- ΤΣΑΠΙΚΟΥΝΗΣ Φ. (1996) : ' Βιολογική και ολοκληρωμένη καταπολέμηση στο θερμοκήπιο'. Σελ. 191-198.

- WASHINGTON W.S., SHANMUNGANATAN N. and FOBRES C. (1992) : 'Fungicide control of strawberry fruit rots and the field occurrence of resistance of *Botrytis cinerea* to iprodinone, benomyl and dichlofluanid'. Crop Protection vol. 11 p.355-360.