

**Τ.Ε.Ι. ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**ΣΥΜΒΟΛΗ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ**  
**ΘΗΡΕΥΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΜΥΚΗΤΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ**  
***ARTHROBOTRYS* ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ**  
**ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΝΗΜΑΤΩΔΩΝ.**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**  
**Του σπουδαστή**  
**ΚΟΥΤΣΟΥΜΑΡΗ ΙΩΑΝΝΗ**

**Επιβλέπων καθηγητής: Αναστάσιος Ηλιόπουλος**

**ΑΘΗΝΑ 2004**

**Τ.Ε.Ι. ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**ΣΥΜΒΟΛΗ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ  
ΘΗΡΕΥΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΜΥΚΗΤΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ  
*ARTHROBOTRYS* ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ  
ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΝΗΜΑΤΩΔΩΝ.**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ  
Του σπουδαστή  
ΚΟΥΤΣΟΥΜΑΡΗ ΙΩΑΝΝΗ**

**Επιβλέπων καθηγητής: Αναστάσιος Ηλιόπουλος**

**ΑΘΗΝΑ 2004**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την πραγματοποίηση αυτής της μελέτης θέλω να ευχαριστήσω θερμά όσους συνέβαλαν και με βοήθησαν με οποιοδήποτε τρόπο.

Πιο συγκεκριμένα, ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή του ΤΕΙ Καλαμάτας κ. Ηλιόπουλο Αναστάσιο, για την εισήγηση του θέματος της παρούσας μελέτης καθώς και για την κριτική ανάγνωση και διόρθωση της.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Φυτοπαθολόγο του Εργαστηρίου Μυκητολογίας του Μπεννακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (ΜΦΙ) Δρ Λάσκαρη Δημήτριο, που με τις συνεχές συμβουλές του με οδήγησε στην επιτυχή ολοκλήρωση της μελέτης μου καθώς και στην καλύτερη παρουσίαση της.

Επιπλέον, ευχαριστώ την Νηματωδόλογο του ΜΦΙ Καραναστάση Ειρήνη για την διάθεση του Εργαστηρίου της και την επιστημονική της καθοδήγηση για να επιτευχθεί το πειραματικό τμήμα της μελέτης που αφορούσε αναγνώριση και καταμέτρηση νηματωδών στο έδαφος και επίσης για την κριτική της ανάγνωση.

Ακόμα, ευχαριστώ το υπόλοιπο προσωπικό, επιστημονικό και τεχνικό, του τμήματος Μυκητολογίας του ΜΦΙ και ιδιαίτερα την Φυτοπαθολόγο Δρα Βλουτόγλου Ειρήνη για την ευγενή και πρόθυμη διάθεση του συστήματος ανάλυσης εικόνας και την καθοδήγηση της.

Τέλος, ευχαριστώ τους λοιπούς εξασκούμενους στο ΜΦΙ συμφοιτητές μου για την φιλική τους συμπεριφορά.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ (ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ).....	2
1.1. ΜΥΚΗΤΕΣ ΓΕΝΙΚΑ.....	2
1.1.1. ΘΗΡΕΥΤΙΚΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ.....	5
1.2. ΕΙΔΗ ΠΑΓΙΔΩΝ.....	6
1.3. ΤΟ ΓΕΝΟΣ <i>Arthrobotrys</i> .....	8
1.3.1. ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ <i>ARTHROBOTRYS</i> .....	8
1.3.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ.....	10
1.3.3. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ <i>Arthrobotrys dactyloides</i> .....	10
1.3.4. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ <i>Arthrobotrys dactyloides</i> .....	12
1.4. ΠΕΡΙ ΦΥΤΟΠΑΡΑΣΙΤΙΚΩΝ ΝΗΜΑΤΩΔΩΝ ΓΕΝΙΚΑ.....	14
1.4.1. ΟΙ ΝΗΜΑΤΩΔΕΙΣ <i>Meloidogyne</i> .....	16
1.4.1.2. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ.....	16
1.4.1.3. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ-ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ.....	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ (ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ).....	20
2.1. ΓΕΝΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	20
2.1.1. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ.....	20
2.1.2. ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ.....	21
2.1.3. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΥΤΩΝ.....	22
2.1.4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ.....	22
2.1.5. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΟΝΟΚΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ.....	23
2.1.6. ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ.....	24
2.1.7. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΟΛΥΣΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ.....	24
2.1.8. ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΜΗΚΟΥΣ ΡΙΖΑΣ.....	25
2.1.9. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΝΗΜΑΤΩΔΩΝ ΣΚΩΛΗΚΩΝ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΒΑΕΡΜΑΝΝ (ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗ).....	26
2.1.10. ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΝΗΜΑΤΩΔΩΝ.....	26
2.1.11. ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΣΑΠΡΟΦΥΤΙΚΩΝ ΝΗΜΑΤΩΔΩΝ.....	27
2.1.12. ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΘΗΡΕΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ.....	27
2.1.13. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	28
2.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ.....	29

2.3. ΜΕΤΡΗΣΗ ΓΡΑΜΜΙΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΜΥΚΗΛΙΟΥ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ <i>Arthrobotrys oligospora</i> ΚΑΙ <i>Arthrobotrys dactyloides</i> .....	31
2.3.1. ΣΚΟΠΟΣ .....	31
2.3.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	31
2.3.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	32
2.4. ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΩΝ ΚΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΑ $CM^2$ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΗΝ ΗΛΙΚΙΑ ΤΟΥΣ ΣΕ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ P.D.A. ....	34
2.4.1. ΣΚΟΠΟΣ .....	34
2.4.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	34
2.4.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	36
2.5. ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ ΜΕ ΘΗΡΕΥΤΙΚΟΥΣ ΜΥΚΗΤΕΣ ΣΕ ΦΥΣΙΚΑ ΜΟΛΥΣΜΕΝΟ ΧΩΜΑ ΟΠΟΥ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΝΤΑΝ ΦΥΤΑ ΤΟΜΑΤΑΣ .....	38
2.5.1. ΣΚΟΠΟΣ .....	38
2.5.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	38
2.5.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	39
ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	43
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	49
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ: ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ .....	53

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Αφορμή για την μελέτη αυτή, όπου συνέπεσε με την πρακτική μου εξάσκηση, ήταν η παρατήρηση θηρευτικών μυκήτων σε δείγματα που είχαν έρθει στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο για διάγνωση. Η ιδέα να τους μελετήσουμε οφείλεται ότι δεν υπήρχαν καθόλου πληροφορίες και δεν έχει ασχοληθεί κανείς στον ελληνικό χώρο, από όσο γνωρίζουμε, με τους μύκητες αυτούς.

Είναι γνωστό ότι για την καταπολέμηση των φυτοπαθογόνων νηματωδών εφαρμόζονται στο έδαφος ισχυρά νηματωδοκτόνα και υπάρχουν λίγες εναλλακτικές μέθοδοι (η ηλιοαπολύμανση είναι μη αποτελεσματική καθώς οι νηματώδεις κατεβαίνουν σε μεγάλο βάθος όταν ανεβαίνει η θερμοκρασία). Μια επιπλέον ανάγκη εξεύρεσης εναλλακτικών μέσων καταπολέμησης είναι η απαγόρευση χρήσης του βρωμιούχου μεθυλίου.

Η διερεύνηση της παλαιότερης βιβλιογραφίας δείχνει ότι έγιναν και παλαιότερα προσπάθειες χρησιμοποίησης αυτών των μυκήτων για βιολογική καταπολέμηση νηματωδών χωρίς όμως επιτυχία. Η δυσκολία της έρευνας σε αυτόν τον τομέα έγκειται στη μελέτη του πολύπλοκου συστήματος που λέγεται έδαφος και στην εμπλοκή δύο πολύ διαφορετικών οργανισμών (μυκήτων-ζώων).

Αναλάβαμε το ρίσκο για μια τέτοια μελέτη, γιατί τι θέμα αυτό είναι γοητευτικό και όπως φαίνεται από τα καλά αποτελέσματα του πειράματος ανταμειφθήκαμε.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ (ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ)

### 1.1. ΜΥΚΗΤΕΣ ΓΕΝΙΚΑ

Οι μύκητες είναι ευκαρυωτικοί οργανισμοί, οι οποίοι στερούνται χλωροφύλλης. Τα κύτταρα τους περιβάλλονται από κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο αποτελείται από χιτίνη ή κυτταρίνη ή και από τις δύο και σχηματίζουν νηματοειδές διακλαδιζόμενο ή αμοιβαδοειδές σώμα που λέγεται θαλλός. Αναπαράγονται με αγενή ή εγγενή σπόρια που ζουν σε ποικιλία υποστρωμάτων και συνθηκών ως παράσιτα ή σαπρόφυτα. Οι περισσότεροι μύκητες σχηματίζουν τον θαλλό τους από διακλαδιζόμενα νήματα τα οποία λέγονται υφές. Ο θαλλός που αποτελείται από υφές λέγεται νηματοειδής θαλλός ή μυκήλιο. Οι υφές των περισσότερων μυκήτων που σχηματίζουν μυκήλιο χωρίζονται σε κύτταρα με εγκάρσια διαφράγματα που ονομάζονται σέπτα. Τα σέπτα φέρουν στο μέσο οπή μέσω της οποίας επικοινωνούν τα πρωτοπλάσματα γειτονικών κυττάρων. Το μυκήλιο που φέρει σέπτα ονομάζεται πολυκύτταρο και είναι χαρακτηριστικό των ανώτερων μυκήτων (Ασκομύκητες, Βασιδιομύκητες, Δευτερομύκητες). Το μυκήλιο το οποίο δεν φέρει σέπτα ονομάζεται κοινोकύτταρο και είναι χαρακτηριστικό των φυκομυκήτων (Ωομύκητες, Ζυγομύκητες κ.α.). Οι κυριότερες μυκηλιακές κατασκευές που διακρίνουμε κατά την μακροσκοπική και μικροσκοπική παρατήρηση του μυκηλίου εκτός των οργάνων αναπαραγωγής είναι: α) οι μυζητήρες β) οι πλάκες συγκράτησης ή προσκόλλησης γ) τα στολόνια δ) τα ριζοειδή ε) οι αναστομώσεις στ) οι ψευδοιστοί ζ) το στρώμα η) τα σκληρώτια θ) τα ριζόμορφα.

Κριτήρια για την ταξινόμηση των μυκήτων αποτελούν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά και η φυλογενετική εξέλιξη. Η ταξινόμηση αποβλέπει σε δύο στόχους. Πρώτον να ονομάσει έναν οργανισμό σύμφωνα προς ένα διεθνές ταξινομικό σύστημα και δεύτερον να δείχνει την συγγένεια μεταξύ των οργανισμών. Έτσι το βασίλειο των μυκήτων έχει δύο διαιρέσεις. Τους Μυξομύκητες και τους Ευμύκητες. Οι τελευταίοι χωρίζονται σε πέντε Υποδιαιρέσεις, τους Μαστιγομύκητες, τους Ζυγομύκητες, τους Ασκομύκητες, τους Βασιδιομύκητες και τους Δευτερομύκητες.

Ο τυπικός τρόπος αναπαραγωγής των μυκήτων είναι με εγγενή και αγενή σπόρια. Ένα είδος μύκητα μπορεί να παράγει και αγενή και εγγενή σπόρια. Σε αυτούς τους μύκητες τα αγενή σπόρια παίζουν σημαντικό ρόλο στη διασπορά του μύκητα, γιατί παράγονται συχνότερα και σε μεγαλύτερους αριθμούς. Τα εγγενή σπόρια παίζουν μεγάλο ρόλο στην διατήρηση της ποικιλομορφίας καθώς δίνεται έτσι η δυνατότητα ανασυνδυασμού διαφορετικού γονιδιώματος αλλά βοηθούν και στην επιβίωση των μυκήτων από μια βλαστική περίοδο του ξενιστή στην

επόμενη. Τα σπόρια των μυκήτων, είτε είναι αγενή είτε είναι εγγενή έχουν ν αριθμό χρωμοσωμάτων.

Τα σπόρια (αγενή και εγγενή) χαρακτηρίζονται από μεγάλη ποικιλομορφία, έτσι ώστε να διακρίνονται ανάλογα με:

- Τον αριθμό των κυττάρων από τα οποία αποτελούνται, σε μονοκύτταρα, δικύτταρα, πολυκύτταρα.
- Το χρώμα τους, σε άχροα, υαλώδη και έγχρωμα
- Το σχήμα τους, σε ωσειδή, σφαιρικά, σκωληκοειδή κ.λ.π.
- Την δυνατότητα τους να κινούνται, σε απλανοσπόρια (αυτά που δεν έχουν την δυνατότητα να κινούνται αυτόνομα) και σε ζωοσπόρια (αυτά που έχουν την δυνατότητα κίνησης με μαστίγια ή βλεφαρίδες).
- Το πάχος του τοιχώματος τους σε εφήμερα και σε υπνοσπόρια.
- Το αν είναι επιφανειακά υγρά (υδροφιλή επιφάνεια) ή ξηρά (υδροφοβη επιφάνεια).

Το μέγεθος των σπορίων κυμαίνεται από 1μm μέχρι μερικές εκατοντάδες μm ανάλογα με το είδος του μύκητα.

Εκτός των αγενών σπορίων, η αγενής αναπαραγωγή των μυκήτων συντελείται επίσης με τους παρακάτω τρόπους: α) με τμήματα του μυκηλίου β) με σκληρώτια γ) με ριζόμορφα.

Τα σπόρια εγγενούς αναπαραγωγής είναι προϊόντα εγγενούς γενέσεως και παράγονται από τις λεγόμενες τέλειες μορφές των μυκήτων. Τα σπόρια εγγενούς αναπαραγωγής είναι: α) Ωοσπόρια β) Ζυγοσπόρια γ) Ασκοσπόρια δ) Βασιδιοσπόρια.

Οι καρποφορίες εγγενούς αναπαραγωγής είναι για τους ασκομύκητες α) το αποθήκιο β) το περιθήκιο γ) το κλειστοθήκιο δ) το ασκόστρωμα και για τους βασιδιομύκητες τα βασιδιοκάρπια (μανιτάρια κ.λ.π.).

Οι μύκητες ως ετερότροφοι, μη φωτοσυνθέτοντες οργανισμοί χρησιμοποιούν για την ανάπτυξη τους έτοιμες οργανικές ενώσεις που χρησιμοποιούν ως υποστρώματα πάνω στα οποία αναπτύσσονται παρασιτικά ή σαπροφυτικά. Η χημική ανάλυση του θαλλού των μυκήτων δείχνει ότι όπως και οι άλλοι οργανισμοί αποτελούνται από νερό και ξηρά ουσία η οποία αποτελείται από οργανικές και ανόργανες ενώσεις. Η περιεκτικότητα σε νερό ποικίλει στα διάφορα όργανα του μύκητα. Το πρωτόπλασμα περιέχει μέχρι 80-90%, ενώ τα σπόρια 15-25%. Ορισμένοι σχηματισμοί όπως τα σκληρώτια έχουν ακόμη μικρότερη περιεκτικότητα. Τα απαραίτητα στοιχεία για την ανάπτυξη των μυκήτων είναι κυρίως ο άνθρακας, το υδρογόνο, το οξυγόνο, το άζωτο, ο φώσφορος, το κάλιο, το θείο, το μαγνήσιο και το ασβέστιο. Ακόμη χρειάζονται σε μικρότερες ποσότητες σίδηρο, ψευδάργυρο, χαλκό κ.α.. Εκτός από τα στοιχεία



αυτά, οι μύκητες μπορεί να χρειάζονται και ορισμένες άλλες ουσίες που λέγονται αυξητικές, όπως η θειαμίνη (βιταμίνη Β<sub>1</sub> ή ανευρίνη), η βιοτίνη (βιταμίνη Β<sub>7</sub>), η πυριδοξίνη (βιταμίνη Β<sub>6</sub>), η ριζοφλαμίνη (βιταμίνη Β<sub>2</sub>), το νικοτινικό οξύ κ.α..

Η αναπνοή είναι απαραίτητη λειτουργία στους μύκητες, προκειμένου να εξασφαλίσουν ενέργεια για την διατήρηση της ζωής και την αύξηση τους. Η αναπνευστική λειτουργία γίνεται με αερόβιο και αναερόβιο τρόπο.

Η βλάστηση των σπορίων των μυκήτων όπως και η ανάπτυξη τους εξαρτάται όχι μόνο από το υπόστρωμα ανάπτυξης, αλλά και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Από τις συνθήκες αυτές σημαντικό ρόλο παίζουν: η θερμοκρασία, η υγρασία, το pH και το φως. Ως προς την θερμοκρασία υπάρχουν διάφορες διαβαθμίσεις απαιτήσεων. Μερικά είδη αναπτύσσονται και σε θερμοκρασίες κάτω του 0°C και γι' αυτό ονομάζονται ψυχρόφιλοι. Άλλα είδη αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες πάνω από 30°C και γι' αυτό ονομάζονται θερμόφιλοι. Οι περισσότερες όμως, φυτοπαθογόνοι μύκητες ευνοούνται σε θερμοκρασίες 20-30°C και γι' αυτό λέγονται μεσοθερμόφιλοι. Η αντοχή σε αντίξοες συνθήκες θερμοκρασίας εξαρτάται και από το στάδιο του βιολογικού κύκλου. Η υγρασία είναι τις περισσότερες φορές ο καθοριστικότερος παράγοντας για την ανάπτυξη των μυκήτων. Οι περισσότεροι ζουν σε περιβάλλον με σχετική υγρασία πάνω από 85%. Κατά κανόνα οι φυκομύκητες ζουν σε υψηλά ποσοστά υγρασίας ενώ οι υπόλοιποι μύκητες σε χαμηλότερα. Η επίδραση της υγρασίας του υποστρώματος στη θρέψη των μυκήτων είναι σημαντική γιατί οι μύκητες απορροφούν από αυτό τα θρεπτικά στοιχεία οσμωτικά. Πρέπει το υπόστρωμα να έχει μικρότερη οσμωτική πίεση από το περιεχόμενο των κυττάρων ή υφών ώστε να απορροφούνται τα θρεπτικά συστατικά. Συνεπώς η αραίωση του υποστρώματος με νερό βοηθά στην απορρόφηση. Ως προς το pH, γενικά οι μύκητες θεωρούνται οξύφιλοι οργανισμοί και ευνοούνται σε υποστρώματα με pH 4,5 – 6,5 με ακραίες τιμές 3 και 8. Τέλος το φως σε ορισμένες περιπτώσεις παίζει σημαντικό ρόλο, ενώ στις περισσότερες όχι. Ορισμένοι μύκητες σχηματίζουν σπόρια μόνο παρουσία φωτός, ενώ σε άλλους το ηλιακό φως και γενικά οι υπεριώδεις ακτίνες έχουν καταστρεπτική επίδραση.

Για την αποίκηση του εδάφους από μύκητες θα πρέπει να υπάρχει ικανότητα του μολύσματος για ανάπτυξη και εκφράζεται με το δυναμικό μολύσματος, με την ύπαρξη των κατάλληλων συνθηκών του περιβάλλοντος και με την λεγόμενη αντίσταση του υποστρώματος. Στο έδαφος οι μύκητες ζουν πολύ κοντά με άλλους μικροοργανισμούς και η ικανότητα τους να επιζήσουν εξαρτάται από την ικανότητα ανταγωνισμού. Η ύπαρξη ενός οργανισμού που αναπτύσσεται εύκολα και γρήγορα θα αποκλείσει τους οργανισμούς που αναπτύσσονται βραδύτερα. Οι πιο επιτυχημένοι οργανισμοί στην αποίκηση είναι α) αυτοί που έχουν γρήγορη βλάστηση των σπορίων και γρήγορη ταχύτητα μυκηλιακής ανάπτυξης β) παράγουν ένζυμα που

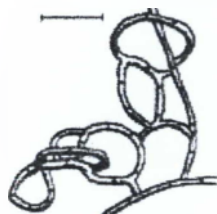
βοηθούν στην εκμετάλλευση των θρεπτικών υλών του περιβάλλοντος γ) παράγουν τοξικές ουσίες που εμποδίζουν άλλους οργανισμούς να αναπτυχθούν δ) αντέχουν στις αντιβιοτικές ουσίες που παράγουν άλλοι μικροοργανισμοί. Αν και λίγοι μύκητες έχουν όλες αυτές τις ιδιότητες οι περισσότεροι έχουν τουλάχιστον μία για να μπορούν να επιζούν. Όταν ένας μύκητας ή μια μυκηλιακή αποικία αρχίσει να αναπτύσσεται πρώτος σε ένα υπόστρωμα θα αποσυνθέσει όλες τις οργανικές ουσίες που μπορεί να προσβάλλει. Όταν οι ουσίες εξαντληθούν το μυκήλιο θα πέσει σε αδρανή κατάσταση ή θα πεθάνει. Το υπόστρωμα ενδεχομένως θα έχει ουσίες που θα μπορούν να χρησιμοποιήσουν άλλοι μύκητες, αλλά και ο ίδιος ο μύκητας θα γίνει τροφή για άλλους. Η διαδοχή αυτή θα γίνει μέχρι η οργανική ουσία να εξαντληθεί τελείως.

### 1.1.1. ΘΗΡΕΥΤΙΚΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ

Υπάρχουν μύκητες οι οποίοι σχηματίζουν ειδικά όργανα-παγίδες με τα οποία αιχμαλωτίζουν νηματώδεις και τρέφονται από αυτούς αφού τους σκοτώσουν. Οι περισσότεροι αρπακτικοί μύκητες νηματωδών ανήκουν στην οικογένεια *Moniliaceae*. Τα κυριότερα γένη θηρευτικών μυκήτων είναι τα: *Arthrobotrys*, *Dactylaria*, *Dactyllela*, *Monacrosporium*, *Nematoctonus*.

## 1.2. ΕΙΔΗ ΠΑΓΙΩΝ

- **Τριών διαστάσεων κολλώδη πλέγματα.**



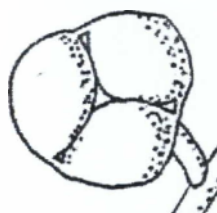
Το πλέγμα επικαλύπτεται με κολλώδη ουσία. Η διάμετρος της θηλιάς είναι 20-59μm. Έχει μεγάλη παγιδευτική ικανότητα σε συνθετικά θρεπτικά υποστρώματα (*in-vitro*), λόγω των τρισδιάστατων κατασκευών (Τα περισσότερα είδη του γένους *Arthrobotrys* όπως *Arthrobotrys superba*, *Arthrobotrys oligospora* κ.α.).

- **Μη συσφικτικά δαχτυλίδια**



Τα δαχτυλίδια είναι τρι-κύτταρα, έμισχα, με διάμετρο 20-50μm. Το θύμα εμπλέκεται καθώς προσπαθεί να περάσει (*Dactylaria candida*, *Dactyllela leptospora*).

- **Συσφικτικά δαχτυλίδια**



Τα δαχτυλίδια είναι τρι-κύτταρα, έμισχα, με διάμετρο 20-50μm. Τα κύτταρα επεκτείνονται προς το εσωτερικό μέρος μετά από επαφή και παγιδεύει το θύμα. π.χ. νηματώδεις και άλλα μικρά ζώα (*Arthrobotrys dactyloides*, *Dactylaria brochopaga*, *Monacrosporium deodicyoides*).

- **Κολλώδεις κιονοειδείς διακλαδώσεις.**



Μυκηλιακές διακλαδώσεις που αποτελούνται από 1-3 κύτταρα που καλύπτονται με κολλώδη ουσία. Μερικές φορές σχηματίζει κατασκευές που μοιάζουν με πλέγμα ή σκάλες (*Monacrosporium cionopagum*, *Monacrosporium gephyropagum*, *Dactyllela lobata*).

- **Σφαιρικοί ή οβάλ κολλώδεις κόμποι.**



Πολυπύρρηνοι σχηματισμοί επικαλυπτόμενη με κολλώδη ουσία με διάμετρο 6-10μm. Σχηματίζονται πάνω σε μη κολλώδη στηρίγματα που έχουν 1-3 κύτταρα (*Dactylaria candida*, *Dactyllela leptospora*, *Monacrosporium elliposporum*).

- Κολλώδης κόμποι σε σχήμα κλεψύδρας.



Πολυπύρηντοι σχηματισμοί επικαλυπτόμενοι με κολλώδης ουσία με διάμετρο 12-20μm. Σχηματίζονται πάνω σε στηρίγματα (κοντά, μη κυτταρικά στηρίγματα). Είναι πολύ κολλώδη (*Nematocytus leiosporus*, *Nematocytus geogenius* / *Hohenbuehelia petalodes*).

### 1.3. ΤΟ ΓΕΝΟΣ *Artrobotrys*

#### 1.3.1. ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *ARTHROBOTRYS*

Τα κυριότερα είδη που έχουν αναφερθεί στο είδος *Arthrobotrys* είναι: *A. cladodes*, *A. robusta*, *A. arthrobotryoides*, *A. dolioformis*, *A. oviformis*, *A. musiformis*, *A. anchonia*, *A. dactyloides*, *A. conoides*, *A. oligospora*, *A. superba*, *A. entomopaga* (Haard 1968).

Σύμφωνα με τον Drechsler (1937) το μυκήλιο αποτελείται από υφές πλάτους 2-7μ, είναι υαλώδες και φέρει σέπτα.

Οι κονιδιοφόροι είναι υαλώδεις, έχουν σέπτα, είναι ανυψωμένοι, μονοί, ελεύθεροι και ευδιάκριτοι. Έχουν ύψος 20-500μ και 3,5 – 9μ πλάτος στη βάση και βαθμιαία γίνονται λεπτοί προς την κορυφή. Οι κονιδιοφόροι εκφύονται από έρπον ή εναέριο μυκήλιο και μπορεί να διακλαδίζονται ή όχι.

Όλα τα είδη, σχηματίζουν τα κονίδια σε ακραίες ομάδες-θυσάνους. Σε μερικά είδη, οι κονιδιοφόροι επιμηκύνονται και σχηματίζουν 3-10 πρόσθετες ομάδες κονιδίων σε 'κόμβους'. Η ικανότητα να σχηματίζουν διακλαδώσεις και να παράγουν κόμβους, δεν γίνεται συχνά σε καλλιέργειες που περιέχουν νηματώδεις. Το τμήμα του κονιδιοφόρου που φέρει σπόρια μπορεί να είναι διογκωμένο και να φέρει κοντά στηρίγματα ή μπορεί να μην είναι διογκωμένο και να φέρει μακρύτερα διακλαδιζόμενα στηρίγματα. Και οι δύο τύποι απαντούν σε σφονδυλοειδή διευθέτηση υπάρχουν όμως και όλες οι ενδιάμεσες μορφές των δύο τύπων.

Τα κονίδια είναι υαλώδη με ένα ευρύ επάκριο κύτταρο και ένα βασικό κύτταρο με προεξοχή στη βάση. Το κάθε κονίδιο, εκφύεται από ένα στήριγμα. Το σχήμα και το μέγεθος των κονιδίων, ποικίλει ανάλογα με το είδος. Μπορεί να είναι ωοειδές, επίμηκες - ωοειδές (μυτερή κορυφή αγγλ: ovoid), αντίστροφα - ωοειδές (μυτερή βάση, αγγλ: obovoid), επίμηκες αντίστροφο ωοειδές ή ελλειψοειδές. Μερικά σπόρια είναι λίγο καμπυλοειδή, ενώ άλλα είναι αισθητά συσφιγμένα στο σημείο του σέπτου. Το μέγεθος των σπορίων, κυμαίνεται από 10-50μ μήκος και 4,5-16μ πλάτος.

Σε καλλιέργειες που περιέχουν νηματώδεις (Haard 1968) και περιστασιακά σε καθαρές καλλιέργειες το μυκήλιο σχηματίζει παγίδες με τροποποιημένες διακλαδώσεις υφών. Οι παγίδες χωρίζονται σε τρεις τύπους: α) δίχτυα β) συσφικτικά δαχτυλίδια γ) εναέριους κολλώδης κόμπους.

Τα δίχτυα χωρίζονται σε δύο τύπους:

α) τριών διαστάσεων δίχτυα από πολλές τρι-πέντα κύτταρες θηλιές, που ενώνονται προς όλες τις κατευθύνσεις και με τον τρόπο αυτό επιτρέπουν σε ένα μέρος των δίχτυων να έρπει στο υπόστρωμα και ένα άλλο μέρος να ανυψώνονται πάνω στο υπόστρωμα.

β) δύο διαστάσεων δίχτυα τα οποία σχηματίζονται από μία τετρακύτταρη, κολλώδους,



Εικόνα 1: Παγιδευμένος νηματώδης από τον μύκητα *A. dactyloides*

πεταλοειδούς σχήματος θηλιά, έτσι ώστε ολόκληρο το δίχτυ, να βρίσκεται σε ένα επίπεδο, συνήθως κατακόρυφα στο επίπεδο του υποστρώματος.

Και στους δύο τύπους οι νηματώδεις κολλάνε και περιπλέκονται στα δίχτυα.

Τα συσφικτικά δαχτυλίδια αποτελούνται από δύο μέρη, ένα δαχτυλίδι και ένα ποδίσκο. Το δαχτυλίδι σχηματίζεται από τρία τοξοειδή κύτταρα.

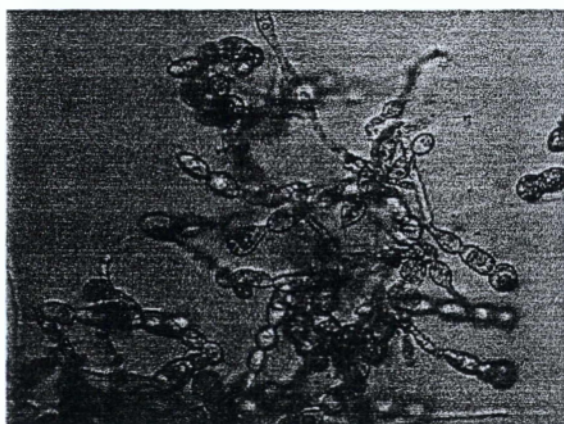
Το πρώτο και το τρίτο κύτταρο, ενώνονται στον κυρτό ποδίσκο, ο οποίος στηρίζει το δαχτυλίδι κατακόρυφα

στο υπόστρωμα. Ο ποδίσκος αποτελείται από ένα μικρό κύτταρο της βάσης και ένα λίγο μεγαλύτερο επάκριο κύτταρο.

Καθώς οι νηματώδεις, προσπαθούν να περάσουν μέσα από τα δαχτυλίδια, αυτά διεγείρονται, διογκώνονται γρήγορα και παγιδεύουν τους νηματώδεις. Αν ένα δαχτυλίδι διεγερθεί και είναι έτοιμο να κλείσει, όλα τα δαχτυλίδια της ίδιας υφής συνήθως κλείνουν.

Οι εναέριοι κολλώδεις κόμποι, είναι γνωστοί μόνο σε ένα είδος, *Arthrobotrys entomopaga Drechs*, το οποίο δεν έχει μελετηθεί αρκετά ακόμα.

Όταν ένας νηματώδης ή ένα κολέμβολο παγιδευτεί, οι παγίδες παράγουν μια υφή, η οποία διατρύπα το εξωτερικό περιβλημά του θύματος και δημιουργεί μια κύστη στο εσωτερικό. Η κύστη με την σειρά της, παράγει πολλές υφές, οι οποίες μεγαλώνουν μέσα σε όλο το σώμα του θύματος, αφομοιώνουν όλα τα θρεπτικά συστατικά που αποσύρονται και



Εικόνα 2: Χλαμυδοσπόρια του μύκητα *A. oligospora*

τελικά παραμένει μόνο το δέρμα του θύματος.

Σε μερικά είδη, σχηματίζονται κιτρινωπά και σφαιρικά προς επιμήκη χλαμυδοσπόρια, αλλά αυτά παράγονται συνήθως σε παλιές-γερασμένες καλλιέργειες. Εμφανίζονται μεμονωμένα ή σε αλυσίδες ανάλογα του εάν σχηματίζονται από διαφοροποίηση ενός κυττάρου ή διαδοχικών

κυττάρων μιας υφής και μπορεί, να εμφανίζονται

ενδιάμεσα σε ηλικιωμένες υφές ή στην άκρη των ηλικιωμένων διακλαδιζόμενων υφών.

Τα χλαμυδοσπόρια, αποχωριζόμενα από την υφή παίζουν ρόλο υπνοσπορίων. Προέρχονται από διαφοροποίηση κυττάρων υφών τα οποία είναι πλούσια σε αποθησαυριστικές ουσίες και τα οποία αποκτούν παχιά κυτταρικά τοιχώματα.

Οι αποικίες, που εμφανίζονται σε καλλιέργειες σκέτου άγαρ που περιέχουν νηματώδεις, αποτελούνται από σχεδόν πλήρως εξαντλημένο μυκήλιο, το οποίο δίνει αραιή ανάπτυξη στους κονιδιοφόρους της καλλιέργειας αυτής. Οι κονιδιοφόροι, συχνά, δεν διακλαδίζονται και δεν σχηματίζουν κόμβους, σε αντίθεση με τις καθαρές καλλιέργειες σε πλούσια υλικά όπου οι αποικίες αποτελούνται από έρπον και εναέριο μυκήλιο.

### 1.3.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Οι μύκητες *Arthrobotrys oligospora* και *Arthrobotrys dactyloides* ανήκουν ταξινομικά στην Οικογένεια *Moniliaceae*, στην Τάξη *Moniliales*, στην Κλάση *Deyteromycetes* και στην Διαίρεση *Eumycota*.

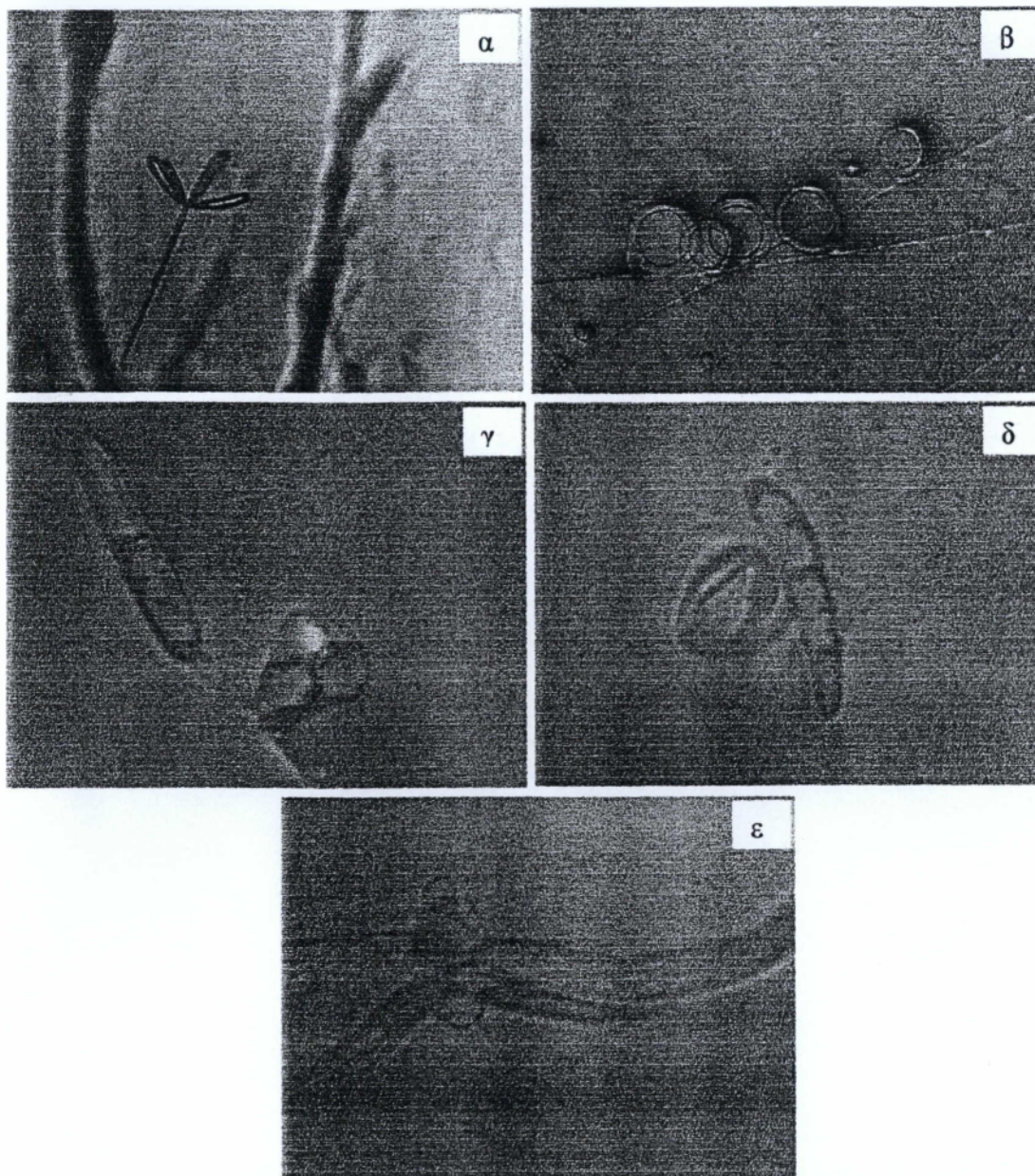
### 1.3.3. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ *Arthrobotrys dactyloides*

Ο *Arthrobotrys dactyloides* (Drechsler 1937), έχει σημαντικά μικρότερη ταχύτητα ανάπτυξης, σε σχέση με τα περισσότερα είδη που σχηματίζουν δίχτυα, όπως ο *Arthrobotrys oligospora* και ο *Arthrobotrys superba*.

Σε *in-vitro* καλλιέργεια, το μυκήλιο του *Arthrobotrys dactyloides*, μακροσκοπικά είναι λευκού χρώματος και το εναέριο μυκήλιο έχει μορφή “χνουδωτή”. Η εξάπλωση του μυκηλίου είναι ακτινωτή, με υφές υαλώδεις, με σέπτα. Το πλάτος των υφών του είναι 2-5μ. Σε καθαρές καλλιέργειες σχηματίζει εναέριο μυκήλιο. Ειδικά, με την παρουσία νηματωδών, σχηματίζει σχεδόν κυκλικά δαχτυλίδια, διαμέτρου 20-30μ, αποτελούμενα από 3 τοξοειδή κύτταρα, 12-28μ μήκος, 4,5-7μ πλάτος στην μέση και 2,5-6μ στις άκρες. Το πρώτο και το τρίτο κύτταρο, ενώνονται στο κυρτό ποδίσκο, το οποίο στηρίζει το δαχτυλίδι κατακόρυφα. Ο ποδίσκος έχει 7-14μ μήκος, 4-5μ πλάτος και αποτελείται συνήθως, από δύο κύτταρα, όπου το κύτταρο της βάσης είναι γενικά μικρότερο. Όταν παγιδευτεί ο νηματώδης, το δαχτυλίδι συστέλλεται και διογκώνεται συσφίγγοντας το θύμα μέχρι να πεθάνει ή να βρεθεί σε κατάσταση παράλυσης, στην συνέχεια παράγει μια υφή, η οποία διαπερνά το εξωτερικό περιβλήμα του θύματος και τέλος, σχηματίζει εσωτερικά πολλές υφές, οι οποίες καταλαμβάνουν όλο το σώμα του θύματος

και αφομοιώνουν τα θρεπτικά συστατικά. Μερικές φορές, τα σπόρια βλαστάνοντας σχηματίζουν κατ'ευθείαν συσφικτικά δαχτυλίδια αντί βλαστικής υφής.

Οι κονιδιοφόροι είναι κατακόρυφοι, με σέπτα, υαλώδεις, διαστάσεων 200-400μ ύψος, 4-6μ πλάτος στην βάση και βαθμιαία γίνονται λεπτοί, από 2,5-3,5μ στην άκρη. Στην άκρη των



Εικόνα 3: α) Κονιδιοφόρος του μύκητα *Arthrobotrys dactyloides* β) δαχτυλίδια γ) Σπόριο του μύκητα *A. dactyloides* και συσφιγμένο δαχτυλίδι δ) Βλαστάνον σπόριο με άμεσο σχηματισμό δαχτυλιδιού του μύκητα *A. dactyloides* ε) Πιασμένος νηματώδης από συσφιγμένο δαχτυλίδι

κονιδιοφόρου φέρουν πάνω στα στηρίγματα, συστάδες από 4-13 κονίδια.

Τα κονίδια, είναι υαλώδη, δικύτταρα, συνήθως επιμήκη ελλειψοειδή, ευθεία ή ελαφρώς κυρτά. Τα δύο κύτταρα, έχουν περίπου το ίδιο μέγεθος. Το μέγεθος των κονιδίων κυμαίνεται από 32-48μ μήκος και 7-9,5μ πλάτος. Σπάνια σχηματίζονται και σπόρια με δύο σέπτα. Σε



ηλικιωμένες καλλιέργειες, σχηματίζει, κίτρινα, σφαιρικά χλαμυδοσπόρια που το μέγεθος τους φτάνει τα 15μ.

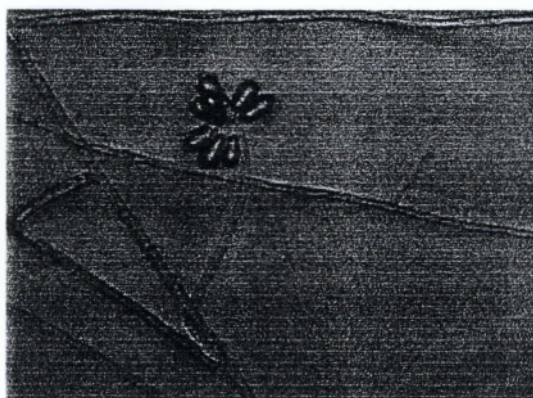
#### 1.3.4. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ *Arthrobotrys dactyloides*

Ο μύκητας *Arthrobotrys oligospora* (Drechsler 1937) είναι ο πιο συχνά απαντόμενος και το πιο καλά μελετημένο είδος που παρασιτεί τους νηματώδεις.

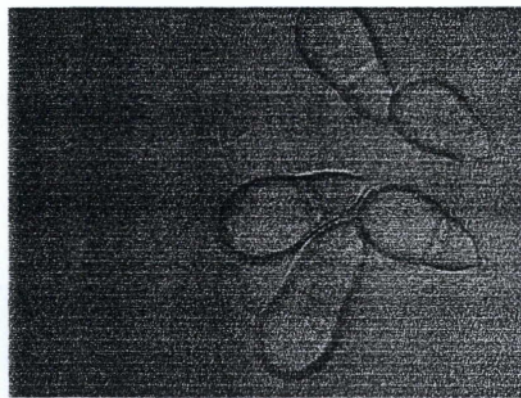
Σε *in-vitro* καλλιέργεια το μυκήλιο του *A. Oligospora*, έχει ακτινωτή εξάπλωση. Μακροσκοπικά είναι λευκού προς κίτρινου χρώματος. Στο μικροσκόπιο φαίνεται υαλώδες, έχει πλάτος 2-6μ. και φέρει σέπτα. Σε καθαρές καλλιέργειες σχηματίζει εναέριο μυκήλιο 'χνουδωτής' μορφής.

Ειδικά, με την παρουσία νηματωδών, σχηματίζονται τριών διαστάσεων δίχτυα σε τυχαία κατανομή. Οι θηλιές έχουν σέπτα και η διάμετρος τους είναι 20-59μ. Αυτή η κατασκευή αποτελείται αρχικά από μυκηλιακούς βρόγχους που είναι στην αρχή διακριτοί, αργότερα σχηματίζουν σύνθετα δίχτυα. Αυτού του είδους η παγίδα, εκκρίνει κολλώδη ουσία, η οποία είναι πολύ σημαντική στην παγίδευση με εμπλοκή του θύματος. Αφού το θύμα παγιδευτεί και πεθάνει ή μένει σε κατάσταση ακινησίας, παράγεται μια υφή, η οποία διαπερνά το εξωτερικό περιβλήμα του θύματος και στην συνέχεια σχηματίζει πολλές υφές σε όλο το σώμα του νηματώδους αφομοιώνοντας τα περιεχόμενα θρεπτικά συστατικά.

Οι κονιδιοφόροι έχουν σέπτα, είναι υαλώδεις, κατακόρυφοι, ύψους 350-450μ, 6-8μ στην βάση και βαθμιαία γίνονται λεπτοί, (4-5,5μ) στην κορυφή. Στην κορυφή των



Εικόνα 4: Κονιδιοφόρος του μύκητα *Arthrobotrys oligospora*



Εικόνα 5: Σπόρια του μύκητα *Arthrobotrys oligospora*

κονιδιοφόρων φέρουν πάνω στα στηρίγματα, 20-30 συστάδες με 5-20 κονίδια.

Τα κονίδια είναι υαλώδη, δικύτταρα, αντιστρόφως ωοειδή (μυτερή βάση, αγγλ: obonoid), συσφιγμένα στο σημείο των σέπτων με εξόγκωμα στη βάση. Το μέγεθος των

κονιδίων, κυμαίνεται από 16-30μ μήκος και 10-16μ πλάτος. Το επάκριο κύτταρο, είναι περίπου δύο φορές μεγαλύτερο, από αυτό της βάσης. Σπάνια σχηματίζονται και κονίδια με δύο σέπτα.

Οι κονιδιοφόροι και τα κονίδια, είναι μεγαλύτερα σε καλλιέργειες που περιέχουν νηματώδεις.

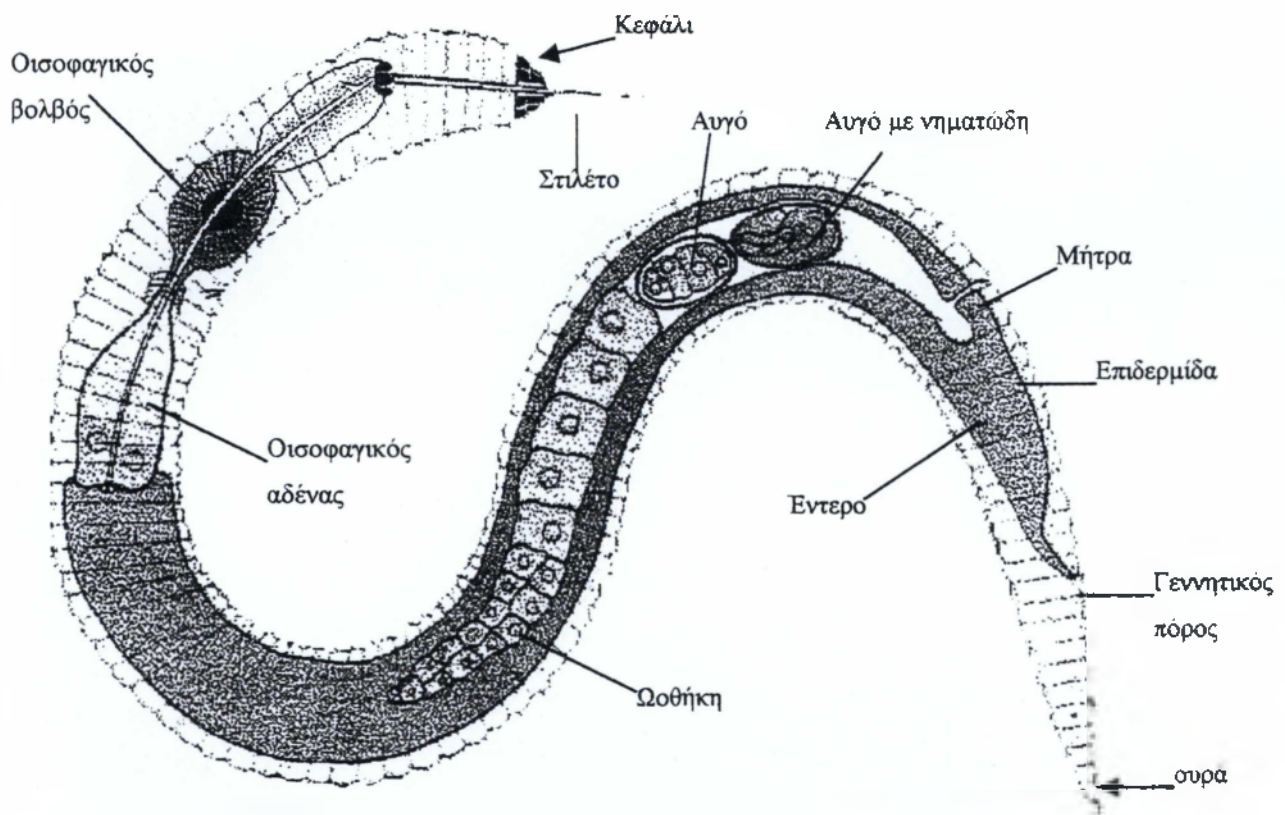
Σε συνήθως ηλικιωμένες καλλιέργειες, σχηματίζονται κίτρινα, κυλινδρικά, υποστρόγγυλα ή ελλειψοειδή χλαμυδοσπόρια.

#### 1.4. ΠΕΡΙ ΦΥΤΟΠΑΡΑΣΙΤΙΚΩΝ ΝΗΜΑΤΩΔΩΝ ΓΕΝΙΚΑ

Οι νηματώδεις είναι ζώα σκωληκόμορφα πολύ μικρού μήκους, το οποίο κυμαίνεται από 0,2mm μέχρι 10mm, αλλά κατά μέσο όρο 0,5-1,5mm.

Οι νηματώδεις σκώληκες ή απλώς νηματώδεις αποτελούν μία από τις πολυπληθέστερες ομάδες του ζωικού βασιλείου, είδη της οποίας μπορούν να υπάρχουν σε ποικιλία οικολογικών περιβαλλόντων. Με βάση την οικολογική προσαρμογή τους οι νηματώδεις μπορούν να διακριθούν σε: α) Παρασιτικούς του ανθρώπου και των ζώων β) Ελεύθερους στο έδαφος και στα νερά (σαπροφυτικοί) γ) Φυτοпараσιτικούς.

Αν και το σώμα των νηματωδών δεν χωρίζεται σε τμήματα, αναφερόμαστε συμβατικά σε τρεις περιοχές του σώματος: α) την κεφαλική χώρα, από το πρόσθιο άκρο μέχρι και τον οισοφάγο β) το κυρίως σώμα, από το έντερο μέχρι την έδρα των θηλυκών ή την αμάρα των αρσενικών γ) την ουρά, που είναι το υπόλοιπο μέρος του σώματος.



Εικόνα 6: Φυτοπαράσιτικός νηματώδης (The University of Georgia: Plant pathology department. [www.plant.uga.edu/labrat/nama.pdf](http://www.plant.uga.edu/labrat/nama.pdf))

Το σώμα των νηματωδών αποτελείται κατά βάση από δύο σκωληκίδια, ενός εξωτερικού, που αποτελεί το τοίχωμα του σώματος και ενός εσωτερικού, ο οποίος συνιστά τον πεπτικό

σωλήνα. Στον μεταξύ των δύο σωλήνων χώρο βρίσκονται τα όργανα του αναπαραγωγικού συστήματος και διάφορα αδενικά κύτταρα. Οι νηματώδεις στερούνται εξωτερικών εξαρτημάτων ή κυτταρικών επεκτάσεων και καλύπτονται από την επιδερμίδα, που έχει λιποπρωτεϊνική σύσταση. Κάτω από την επιδερμίδα βρίσκεται η υποδερμίδα, που αποτελείται από επιθηλιακά κύτταρα και στη συνέχεια το μυϊκό στρώμα. Στην κοιλιακή πλευρά πολλών ειδών νηματωδών διακρίνεται ζεύγος θηλών αδενώδους υφής, που ονομάζονται φασμίδια και αποτελούν ταξινομικό χαρακτήρα. Στους φυτοпараσιτικούς νηματώδεις εντός της στοματικής κοιλότητας βρίσκεται μυζητικό-διατρητικό όργανο με μορφή μικρού σωληνίσκου, που ονομάζεται στίλετο ή δόρυ.

Οι φυτοпараσιτικοί νηματώδεις βρίσκονται κυρίως στα ανώτερα 40-50cm εδάφους, αλλά μερικές φορές και βαθύτερα. Αυτόνομα μπορούν να κινηθούν οφιοειδώς σε πολύ μικρές αποστάσεις (μέχρι ένα μέτρο τον χρόνο). Παθητικά όμως, με την βοήθεια του νερού, του αέρα, των καλλιεργητικών μέσων και του πολλαπλασιαστικού υλικού μεταφέρονται σε μεγαλύτερες αποστάσεις.

Οι διάφοροι νηματώδεις ανάλογα με την θέση διατροφής τους στο φυτό μπορεί να διακριθούν σε εκτοпараσιτικούς και ενδοпараσιτικούς. Οι εκτοпараσιτικοί νηματώδεις τρέφονται από επιφανειακούς ιστούς ή βυθίζουν το στίλετο τους σε βαθύτερους ιστούς με αποτέλεσμα τοπικές νεκρώσεις ή την καθήλωση της αύξησης λόγω ελάττωσης των μιτωτικών διαιρέσεων. Οι μετακινούμενοι (πλανώμενοι) ενδοпараσιτικοί νηματώδεις, κινούνται με ευκολία εντός των ριζών τις οποίες και καταστρέφουν. Οι μόνιμοι (στατικοί) ενδοпараσιτικοί νηματώδεις, παραμένουν σε μία θέση ολοκληρωτικά ή μερικά εντός της ρίζας και τρέφονται από ομάδες διαφοροποιημένων κυττάρων.

Για την επιβίωση και δραστηριοποίηση τους οι νηματώδεις έχουν ανάγκη ορισμένων ευνοϊκών συνθηκών και κυρίως οξυγόνου, που εισέρχεται στο σώμα μέσω της επιδερμίδας τους. Ευνοϊκότερες συνθήκες για την ανάπτυξη και αναπαραγωγή τους είναι εδαφική υγρασία 50-75%, θερμοκρασία 10-30°C, εδαφική οξύτητα PH 5-8 και η παρουσία του κατάλληλου ξενιστή.

Για την διατροφή τους οι φυτοпараσιτικοί νηματώδεις χρησιμοποιούν το στίλετο τους, με το οποίο διατρύπουν τα κυτταρικά τοιχώματα των φυτικών κυττάρων ασκώντας εναντίον τους συνεχή κτυπήματα σαν έμβολο, εκκρίνοντας ταυτόχρονα ένζυμα π.χ. πηκτινάση. Μετά την διάτρηση του κυτταρικού τοιχώματος ακολουθεί η απομύζηση μέρους ή όλων των κυτταρικών συστατικών.

Ο παρασιτισμός των φυτών από νηματώδεις έχει ως συνέπεια την εξασθένηση των φυτών, την μείωση της παραγωγής και την υποβάθμιση των προϊόντων. Γενικά οι

προκαλούμενες στα φυτά ζημιές μπορεί να είναι: α) Καθαρά μηχανικές βλάβες, που προκαλούνται από τον τρόπο εισόδου του νηματώδη στον ξενιστή και μπορεί να ευνοήσουν δευτερογενείς προσβολές από διάφορα παθογόνα, κυρίως μύκητες εδάφους και βακτήρια β) Νεκρώσεις κυττάρων του ριζικού συστήματος με επακόλουθο την δυσλειτουργία ή την καταστροφή του γ) Απομόζηση θρεπτικών στοιχείων από τον ξενιστή δ) Διαταραχή της βιοχημείας του ξενιστή ε) Ορισμένοι νηματώδεις είναι φορείς φυτοπαθογόνων ιών.

Η καταπολέμηση των νηματώδων δεν είναι πάντα εύκολη. Η επιτυχία της εξαρτάται από το είδος του νηματώδη και του ξενιστή, από τον βαθμό της προσβολής κ.τ.λ.. Γενικά οι τρόποι αντιμετώπισης είναι: α) Φυτοϋγειονομικός έλεγχος β) Εναλλαγή καλλιεργειών γ) Αγρανάπαυση δ) Ανθεκτικές ποικιλίες ε) Βιολογική καταπολέμηση στ) Χημική καταπολέμηση

#### **1.4.1. ΟΙ ΝΗΜΑΤΩΔΕΙΣ *Meloidogyne***

##### **1.4.1.1. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ**

Στο γένος *Meloidogyne* (Ferraz & Barker 2002), παρατηρείται έντονος διμορφισμός, δηλαδή οι νύμφες 2<sup>ου</sup> σταδίου και τα τέλεια αρσενικά άτομα έχουν σχήμα νηματόμορφο, ενώ το 3<sup>ο</sup> και το 4<sup>ο</sup> ατελή (αμφότερων των φύλων) στάδια καθώς και τα τέλεια θηλυκά είναι διογκωμένα, και έχουν σχήμα απόμορφο έως σχεδόν σφαιρικό, με την διάμετρο των θηλυκών να φτάνει μέχρι 2mm.

Επιπλέον, στα θηλυκά άτομα, το στίλετο είναι καλώς αναπτυγμένο και φέρει βασικά εξογκώματα. Υπάρχουν δύο ωοθήκες και τα ωά παράγονται εντός ζελατινώδους μάζας.

Τα αρσενικά άτομα είναι πάντοτε νηματόμορφα, έχουν μήκος 1-1,5mm και φέρουν ισχυρό στίλετο, οξύληκτη ουρά και συνήθως ένα ή σπανιότερα δύο όρχεις.

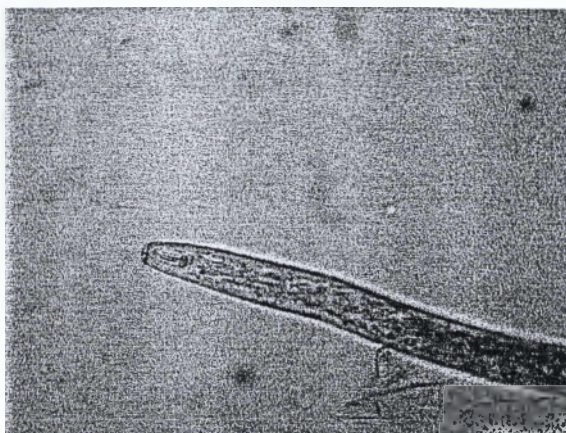
Οι νύμφες 2ου σταδίου, έχουν σχήμα νηματόμορφο και μήκος 0,3-0,5mm. Το στίλετο τους έχει μήκος περίπου 0,010mm, με βασικά εξογκώματα. Η ουρά τους είναι κανοειδής με οξύ άκρο.

##### **1.4.1.2. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ**

Μετά την ολοκλήρωση της εμβρυογένεσης, η πρώτη έκδυση λαμβάνει χώρα εντός του ωού οπότε εμφανίζεται η νύμφη 1<sup>ου</sup> σταδίου (J1) και μετά την εκκόλαψη του ωού, εξέρχεται η νύμφη 2ου σταδίου (J2), που είναι το παρασιτικό παθογόνο στάδιο των *Meloidogyne*. Η κινητή αυτή μορφή, η οποία έχει αποθέματα ενέργειας συσσωρευμένα στο έντερο, μεταναστεύει στο

έδαφος ψάχνοντας ρίζες από κατάλληλους ξενιστές, φαινόμενο το οποίο μπορεί να διαρκέσει από λίγες ώρες έως μερικούς μήνες ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες.

Η είσοδος των J2 εντός των φυτικών ιστών της ρίζας γίνεται με διάτρηση των κυττάρων από το στίλετο κατόπιν πολλαπλών χτυπημάτων. Μετά την διάτρηση των επιδερμικών κυττάρων, οι νηματώδεις εκκρίνουν μια ουσία πλήρη ενζύμων, η οποία προκαλεί τη διάλυση των κυτταρικών τοιχωμάτων με αποτέλεσμα τη δημιουργία γιγαντιαίων κυττάρων που καλούνται κοινοκύτταρα.



Εικόνα 7: Φυτοпараσιτικός νηματώδης.

Στη συνέχεια, οι νύμφες J2 μεταναστεύουν εντός των φυτικών ιστών και φθάνουν στον κεντρικό κύλινδρο. Στη θέση αυτή πραγματοποιούνται η 2<sup>η</sup>, 3<sup>η</sup> και η 4<sup>η</sup> έκδυση, οπότε τελικά έχουμε τα τέλεια θηλυκά και αρσενικά άτομα.

Υπάρχουν δύο τύποι αναπαραγωγής, η αμφίμιξη και η παρθενογένεση. Στην αμφίμιξη τα αρσενικά άτομα είναι σεξουαλικά ενεργά ενώ στην παρθενογένεση δεν είναι, γεγονός το οποίο συμβαίνει συνήθως σε περιπτώσεις υπερπληθυσμού των αρσενικών ατόμων. Αντίθετα σε περιπτώσεις υπερπληθυσμού των θηλυκών, ο μηχανισμός ανάπτυξης των θηλυκών ατόμων αλλάζει οπότε αρχίζουν να παράγονται πολυάριθμα αρσενικά τα οποία φέρουν δύο όρχεις εξ' αιτίας την ύπαρξη δύο γονάδων.

Μετά την είσοδο των J2 εντός του ξενιστή απαιτούνται 20-30 μέρες ώσπου τα θηλυκά να αρχίσουν να γεννούν αυγά. Τα θηλυκά άτομα γεννάνε κατά μέσο όρο 300-500 αυγά, τα οποία εναποθέτουν εντός ζελατινώδους μάζας όπως προαναφέρθηκε. Το μήκος του βιολογικού κύκλου, εξαρτάται κυρίως από την θερμοκρασία, τη σχετική υγρασία, τον ξενιστή και την διαθεσιμότητα O<sub>2</sub> στο έδαφος.

#### 1.4.1.3. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ-ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

Οι νηματώδεις *Meloidogyne* είναι από τους πιο γνωστούς νηματώδεις στους καλλιεργητές, οι οποίοι συνήθως όταν αναφέρονται σε προσβολές φυτών από νηματώδεις, εννοούν προσβολή από *Meloidogyne*.

Ο παρασιτισμός στις ρίζες των φυτών από τους *Meloidogyne* (Ferraz & Barker 2002) χαρακτηρίζεται από: α) δημιουργία γιγαντιαίων κυττάρων τα οποία καλούνται κοινοκύτταρα

και διαφέρουν στην μορφολογία και φυσιολογία από τα γειτονικά τους υγιή. Αυτά τα τροποποιημένα κύτταρα, τα οποία οι νύμφες παρασιτούν μέχρι να γίνουν ενήλικα άτομα, προκαλούν σοβαρές ανατομικές μεταβολές στους φυτικούς ιστούς και οδηγούν σε δυσλειτουργία του αγγειακού κυλίνδρου, β) το σχηματισμό χαρακτηριστικών εξογκωμάτων επί των ριζών και επί υπόγειων βλαστών (σπανιότερα δε επί των υπέργειων μερών ορισμένων φυλλωδών καλλωπιστικών), τα οποία ποικίλουν σε μέγεθος και σχήμα, ονομάζονται φυμάτια και είναι αποτέλεσμα υπερτροφίας και υπερπλασίας των κυττάρων της ρίζας που βρίσκονται κοντά στο σώμα του νηματώδη. Τα γιγαντιαία κοινοκύτταρα, σχηματίζονται συνήθως μέσα στα φυμάτια και είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη και αναπαραγωγή των νηματωδών ενώ τα ίδια τα φυμάτια δεν παίζουν κανένα ρόλο για τον νηματώδη.



Εικόνα 8: Προσβολή από νηματώδεις *Meloidogyne* sp. σε ρίζα φυτού τομάτας

Υπάρχουν πολλά καλλιεργούμενα είδη, όπως καρότο, καπνός, τομάτα, φασόλι, κολοκύθι, αγγούρι, μαρούλι και μπάμια τα οποία αντιδρούν στον παρασιτισμό από τους *Meloidogyne* δημιουργώντας μεγάλα και ευδιάκριτα φυμάτια, σύμπτωμα το οποίο είναι γνωστό στους καλλιεργητές ως “σύμπτωμα του κομπολογιού”. Αντίθετα, σε ορισμένα καλλιεργούμενα είδη όπως καλαμπόκι, βαμβάκι, κρεμμύδι, πιπεριά και ρύζι, τα φυμάτια που σχηματίζονται είναι μικρά

και λεπτά, η αναγνώριση τους απαιτεί πολύ προσεκτική εξέταση και για να γίνει διάγνωση στο πλείστο των περιπτώσεων απαιτείται μεγεθυντικός φακός.

Το μέγεθος των φυματίων επί των ριζών εξαρτάται αφενός από την αλληλεπίδραση νηματώδους-φυτού (πόσο ευαίσθητο είναι το φυτό στην προσβολή από το νηματώδη) και αφετέρου από το πλήθος των νηματωδών (μέγεθος του πληθυσμού) που προσβάλλουν το φυτό. Τα φυμάτια μπορεί να είναι ανώμαλου σχήματος, στενόμακρα ή σφαιρικά. Εάν ένα μεγάλο φυμάτιο κοπεί προσεκτικά, πολλά σχεδόν σφαιρικά, λευκού χρώματος θηλυκά άτομα παρατηρούνται ενσωματωμένα στους φυτικούς ιστούς της ρίζας.

Γενικά η παρουσία πολλών μεγάλων φυματίων, τα οποία δημιουργούνται συνήθως από τα είδη *M. incognita*, *M. javanica*, συσχετίζεται με μείωση του ριζικού συστήματος, και παρουσία λίγων παρασιτισμένων ριζών. Αντιστρόφως πολλές φορές παρατηρείται υπερβολική ριζοφυΐα και δημιουργία θυσανωτών ριζών (*M. hapla*).

Σε άλλες περιπτώσεις όπως το καρότο, σε παρασιτισμένα φυτά από *Meloidogyne* spp., αρχικά δημιουργούνται τυπικά φυμάτια στο ριζικό σύστημα και αργότερα σχηματίζονται

πολυσχιδή ριζώματα ή σκάσιμο του ριζώματος, με συνέπεια το προϊόν να μην είναι εμπορεύσιμο.

Όσον αφορά τα συμπτώματα στα υπέργεια μέρη των φυτών, οφείλονται στην έλλειψη θρεπτικών συστατικών λόγω της δυσλειτουργίας του αγγειακού συστήματος και της κινητοποίησης των προϊόντων της φωτοσύνθεσης προς τα φυμάτια και τα κοινοκύτταρα. Οι κομβοηματοώδεις λαμβάνουν συμπλαστικά τα απαραίτητα για την ανάπτυξη τους θρεπτικά στοιχεία από τα κοινοκύτταρα όπου αυτά συσσωρεύονται μέσω του ηθμού.

Στα φυτά με έντονη προσβολή, μειώνεται η ικανότητα απορρόφησης νερού και θρεπτικών στοιχείων ενώ η μεταφορά των θρεπτικών στοιχείων από την ρίζα προς τον βλαστό δεν γίνεται ομαλά. Έτσι το κυριότερο υπέργειο σύμπτωμα είναι καχεξία των φυτών. Σε περιόδους ξηρασίας, τα προσβεβλημένα φυτά μαραίνονται κατά τις θερμότερες ώρες της ημέρας γιατί υπάρχει μεγαλύτερη διαπνοή και οι ρίζες δεν μπορούν να ανταποκριθούν στις ανάγκες διαπνοής. Σε μερικές καλλιέργειες (μελιτζάνα, καπνός), η μάρανση των φυτών μπορεί να ανακαμφθεί κατά τις νυκτερινές ώρες ή με άρδευση. Ωστόσο σε έντονη προσβολή τα φυτά παθαίνουν χλωρώσεις και δεν μπορούν να αναλάβουν.

Επίσης, σε έντονη προσβολή, παρατηρούνται τυπικά συμπτώματα τροφοπενιών ακόμα και αν έχει δοθεί κατάλληλη λίπανση. Έτσι οι παραγωγοί μπορεί να οδηγηθούν σε περισσότερες και ακριβότερες λιπάνσεις, όμως χωρίς αποτέλεσμα.

Σε μερικές πολυετείς καλλιέργειες, ιδιαίτερα σε περιόδους ξηρασίας μπορεί να παρατηρηθεί φυλλόπτωση και μάρανση των φυτών, και τα φυτά καθίστανται ευπρόσβλητα από άλλα παθογόνα.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ (ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ)

### 2.1. ΓΕΝΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 2.1.1. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω θρεπτικά υλικά ανάπτυξης μυκήτων:

##### 1) Potato Dextrose Agar (P.D.A.)

- Potato Dextrose Agar (Biocar Diagnostics).....39g
- Απεσταγμένο νερό ..... 1lt

##### 2) Plain Agar (P.A.)

- Άγαρ (Biocar Diagnostics)..... 15g
- Απεσταγμένο νερό..... 1lt

##### 3) Maize Agar (M.A.)

- Καλαμπόκι.....50g
- Άγαρ (Biocar Diagnostics)..... 15g
- Απεσταγμένο νερό..... 1lt

Πριν την αποστείρωση του υλικού, προσθέτουμε το καλαμπόκι σε 1lt νερό και το βράζουμε 50 λεπτά και στην συνέχεια το περνάμε από τουλπάνι.

ΣΗΜ: Το καλαμπόκι πρέπει να είναι θρυμματισμένο.

##### 4) Czapek

- Χλωριούχο Κάλι (KCl).....0,5g
- Φωσφορικό Κάλι ( $K_2HPO_4$ )..... 1g
- Νιτρικό Νάτριο ( $NaNO_3$ ).....2g
- Θεικό Μαγνήσιο ( $MgSO_4+7H_2O$ ).....0,5g
- Θεικός Σίδηρος ( $FeSO_4+7H_2O$ ).....0,01g
- Σακχαρόζη.....20g
- Απεσταγμένο νερό..... 1lt

Εάν φτιάξουμε στερεό υπόστρωμα προσθέτουμε 15gr άγαρ και η σακχαρόζη γίνεται 30gr.

ΣΗΜ: Το Φωσφορικό Κάλι αφού το διαλύσουμε χωριστά το ρίχνουμε τελευταίο στο ολικό διάλυμα.

### 5) Czapek-Peptone-Yeast Extract (Czapek-PY)

- Χλωριούχο Κάλι (KCl).....0,5g
- Φωσφορικό Κάλι ( $K_2HPO_4$ ).....1g
- Νιτρικό Νάτριο ( $NaNO_3$ ).....2g
- Θεϊκό Μαγνήσιο ( $MgSO_4+7H_2O$ ).....0,5g
- Θεϊκός Σίδηρος ( $FeSO_4+7H_2O$ ).....0,01g
- Peptone.....1g
- Yeast Extract.....1g
- Σακχαρόζη.....20g
- Απεσταγμένο νερό..... 1lt

Εάν φτιάξουμε στερεό υπόστρωμα προσθέτουμε 15gr άγαρ και η σακχαρόζη γίνεται 30gr.

ΣΗΜ: Το Φωσφορικό Κάλι αφού το διαλύσουμε χωριστά το ρίχνουμε τελευταίο στο διάλυμα το ολικό.

Όλα τα παραπάνω θρεπτικά υλικά, αποστειρώνονται σε υγρό κλίβανο στους 121°C για 20-30min και υπό πίεση 1atm. Στην συνέχεια τοποθετούνται κάτω από ασηπτικές συνθήκες σε πλαστικά τριβλία Petri διαμέτρου 9εκ. (15ml υλικό/τριβλίο).

### 2.1.2. ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Για την ανάπτυξη φυτών τομάτας (*Solanum lycopersicum* ή *Lycopersicum esculentum*), χρησιμοποιήθηκε εδαφικό υπόστρωμα Klasmann (κομπόστα), γερμανικής προέλευσης. Η περιεκτικότητα στα βασικά θρεπτικά στοιχεία ήταν η εξής:

- Άζωτο : 120-260mg/l
- Φώσφορος : 180-260mg/l-εκφρασμένος σε πεντοξείδιο του φωσφόρου ( $BO_5$ )
- Κάλιο : 230-350mg/l-εκφρασμένο σε οξείδιο του Καλίου ( $K_2O$ )
- Μαγνήσιο : 80-150mg/l-εκφρασμένο σε οξείδιο του μαγνησίου ( $MgO$ )

### 2.1.3. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΥΤΩΝ

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν σπόροι τομάτας (*Solanum lycopersicum* ή *Lycopersicon esculentum*) της ποικιλίας Marmande. Η σπορά έγινε σε πλαστικές γλάστρες (σπορεία) διαστάσεων 33x21x12εκ. που περιείχαν κομπόστα εδάφους. Σε κάθε γλάστρα φυτεύονταν 300 σπόροι περίπου, σε βάθος 2-3εκ. Η ανάπτυξη των φυτών γινόταν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών. Η θερμοκρασία του θαλάμου ήταν 26°C ±2. Τα φυτά δέχονταν τεχνητό φωτισμό από λάμπες φθορισμού και ατμών νατρίου με φωτοπερίοδο 12h φως/12h σκότος. Για την διεξαγωγή των πειραμάτων τα φυτά μεταφυτεύονταν όταν βρίσκονταν σε ηλικία 22 ημερών.

### 2.1.4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ

Οι απομονώσεις έγιναν από υπόστρωμα υδροπονικής καλλιέργειας φυτών που στάλθηκε στο Εργαστήριο Μυκητολογίας του ΜΦΙ από την Ιεράπετρα Κρήτης και από χώμα του κήπου του ΜΦΙ όπου διαπιστώθηκε η παρουσία νηματωδών σκωλήκων. Για την απομόνωση, τοποθετήθηκαν μικρές ποσότητες χώματος σε σωρούς περιμετρικά σε πλαστικά τριβλία Petri διαμέτρου 9εκ. με θρεπτικό υλικό [M.A.,P.D.A.,P.A.] και M.A. αντίστοιχα.

Μετά από 5 μέρες περίπου, τα τριβλία εξετάστηκαν στο στερεοσκόπιο για την ύπαρξη αποικιών μυκήτων και κονιδιοφόρων μυκήτων του γένους *Arthrobotrys*. Με την βοήθεια μικροβιολογικής βελόνας έγινε επιλεκτική μεταφορά κονιδίων και κονιδιοφόρων περιμετρικά σε τριβλία (4-5 μεταφορές/τριβλίο) με θρεπτικό υλικό P.D.A. (15ml υλικό/τριβλίο) και κλείστηκαν με Parafilm. Τα τριβλία επώαστηκαν σε θάλαμο επώασης στους 21°C. Ύστερα από περίπου 2 ημέρες για τον *Arthrobotrys oligospora* και 7 για τον *Arthrobotrys dactyloides*, έγινε μεταφορά των αποικιών υπό ασηπτικές συνθήκες (Laminar), σε δοκιμαστικούς σωλήνες με θρεπτικά υλικό P.D.A. (5ml υλικό/σωλήνα) και οι σωλήνες επώαστηκαν εκ νέου. Κατόπιν, έγιναν παρασκευάσματα από τις καλλιέργειες, εξετάστηκαν στο μικροσκόπιο και έγινε αναγνώριση τους. Αντιπροσωπευτικές απομονώσεις (βλέπε πίνακα 1), από τους απομονωθέντες μύκητες διατηρήθηκαν στους 21°C για την παραπέρα ταυτοποίηση τους.

**Πίνακας 1: Απομονώσεις των μυκήτων.**

A/A*	Είδος**	Ήμερα απομόνωσης	Τόπος Προέλευσης
Ao5	<i>Arthrotrrys oligospora</i>	03/04/03	Κρήτη
Ao6	<i>A. oligospora</i>	14/04/03	Κρήτη
Ao8	<i>A. oligospora</i>	11/04/03	Κηφισιά
Ao9	<i>A. oligospora</i>	11/04/03	Κηφισιά
Ao12	<i>A. oligospora</i>	02/05/03	Κηφισιά
Ao13	<i>A. oligospora</i>	02/05/03	Κηφισιά
Ao14	<i>A. oligospora</i>	02/05/03	Κηφισιά
Ad16	<i>Arthrotrrys dactyloides</i>	25/07/03	Κηφισιά
Ad18	<i>A. dactyloides</i>	25/07/03	Κηφισιά
Ad22	<i>A. dactyloides</i>	28/07/03	Κηφισιά
Ad24	<i>A. dactyloides</i>	28/07/03	Κηφισιά

\*Σύμβολα που αναγράφηκαν στους δοκιμαστικούς σωλήνες ανάλογα με την απομόνωση.

\*\*Τελική κατάταξη μετά την μελέτη των χαρακτηριστικών της κάθε απομόνωσης.

### 2.1.5. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΟΝΟΚΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ

Υπό ασηπτικές συνθήκες, κόπηκε μικρό τεμάχιο από κάθε απομόνωση και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα μπουκαλάκια McCartney χωρητικότητας 20ml, και με την βοήθεια αποστειρωμένης πιπέτας (1ml), προστέθηκε 1ml αποστειρωμένο νερό στο οποίο είχε προστεθεί 0,1ml του διαβρεκτικού παράγοντα Tween (0,01% polyethylene sorbitan monooleate) για την αποφυγή δημιουργίας συσσωματωμάτων των κονιδίων. Στη συνέχεια με την χρησιμοποίηση του αιματοκυττόμετρου, μετρήθηκε στο μικροσκόπιο η συγκέντρωση των σπορίων της κάθε απομόνωσης, και έγινε αναγωγή των σπορίων με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας αποστειρωμένου νερού στα 2000σπόρια/1ml νερού. Κατόπιν, από το αιώρημα των μυκήτων μεταφέρθηκε με ένα αποστειρωμένο σιφόνιο Pasteur, 0,1ml αιωρήματος σε τριβλίο με θρεπτικό υλικό Plain Agar (PA). Ακολούθησε άπλωμα των κονιδίων σε όλη την επιφάνεια του θρεπτικού υλικού (plating) με την βοήθεια αποστειρωμένης κεκαμένης γυάλινης ράβδου. Με τον τρόπο αυτό σε κάθε τριβλίο τοποθετήθηκαν περίπου 200 κονίδια του μύκητα. Τα τριβλία σφραγίστηκαν με Parafilm και επώαστηκαν για μία ημέρα σε θερμοκρασία 21°C. Σε επόμενο στάδιο, τα τριβλία εξετάστηκαν στο μικροσκόπιο (μεγένθυση x10) με σκοπό τον εντοπισμό στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού μεμονωμένων βλαστημένων κονιδίων του

μύκητα. Στην συνέχεια με την βοήθεια αποστειρωμένης μικροβιολογικής βελόνας έγινε μεταφορά μεμονωμένων κονιδίων σε τριβλία με θρεπτικό υλικό P.D.A. για τον *A. oligospora* και M.A για τον *A. dactyloides* και επώαστηκαν στους 21°C. Μετά από μερικές μέρες, όταν βεβαιώθηκε η ταυτότητα του γένους και η καθαρότητα των απομονώσεων έγινε μεταφορά των αποικιών υπό ασηπτικές συνθήκες σε δοκιμαστικούς σωλήνες με P.D.A. και M.A. αντίστοιχα (10ml/σωλήνα).

Παρά τις επανειλημμένες προσπάθειες δεν έγινε δυνατή η απόκτηση μονόσπορων καλλιεργειών του μύκητα *A. dactyloides* γιατί δεν βρέθηκε κατάλληλο θρεπτικό υλικό που να βλαστάνουν τα κονίδια γρήγορα και να αναπτύσσονται (βλέπε συζήτηση-συμπεράσματα). Για το λόγο αυτό οι απομονώσεις του *A. dactyloides* που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αυτής της μελέτης δεν ήταν μονόσπορες αλλά όπως απομονώθηκαν αρχικά.

#### 2.1.6. ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ

Για την διατήρηση των απομονώσεων χρησιμοποιήθηκαν δοκιμαστικοί σωλήνες με θρεπτικό υλικό P.D.A. για τον *A. oligospora* και M.A. για τον *A. dactyloides* (10ml/σωλήνα). Η ανανέωση των μυκήτων γινόταν με μεταφορά μικρών τεμαχίων θρεπτικού υλικού, που είχε μυκήλιο και κονίδια της απομόνωσης, σε σωλήνες με νέο υλικό αντίστοιχα. Η μεταφορά γινόταν με τη χρήση της μικροβιολογικής βελόνας υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο γραμμικής ροής (Laminar flow). Οι απομονώσεις διατηρούνταν σε θερμοκρασία 21°C.

#### 2.1.7. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΟΛΥΣΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΣΤΟ ΕΛΑΦΟΣ

Για την παραγωγή μολύσματος, χρησιμοποιήθηκαν μία μονόσπορη απομόνωση του μύκητα *A. oligospora* (Ao14) και μια απομόνωση του *A. Dactyloides* (Ad22), που διατηρούνταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με θρεπτικό υλικό P.D.A. και M.A αντίστοιχα.



Εικόνα 9: Μόλυσμα των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides* σε υγρό θρεπτικό

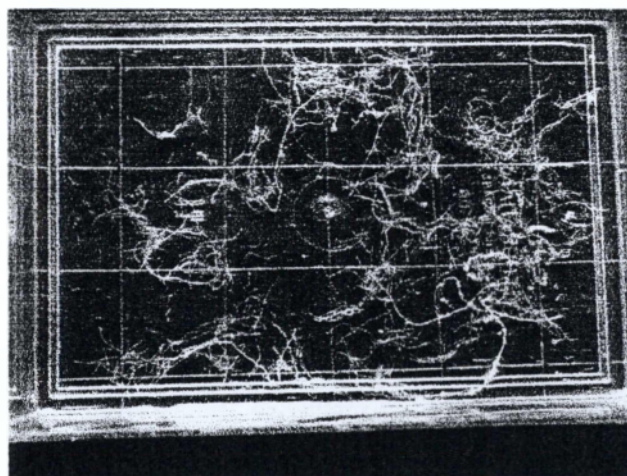
Το μόλυσμα αναπτύχθηκε σε στερεό υλικό που αποτελούνταν από περλίτη που είχε τοποθετηθεί σε φιάλες των 500 ml (300 κυβ. εκ. περλίτη) είχε διαβραχεί με περίπου 100ml Czapek-PY αποστειρωθεί σε κλίβανο για 20-30

λεπτά στους 121°C και υπό πίεση 1atm. Μετά την αποστείρωση και το κρύωμα των κωνικών φιαλών σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, το υλικό μολιάστηκε με μόλυσμα των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides* που είχε αναπτυχθεί σε φιάλες με υγρό θρεπτικό υλικό Czapek και επωάστηκαν για 7 ημέρες σε θερμοκρασία 21°C.

Οι φιάλες με το στερεό υλικό ανακινούνταν κάθε ημέρα για να αναπτυχθούν γρήγορα και ομοιόμορφα οι μύκητες.

### 2.1.8. ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΜΗΚΟΥΣ ΡΙΖΑΣ

Σε πλαστικό διάφανο τριβλίο 11x17cm στον πυθμένα του οποίου είχαν χαραχθεί κάθετες και οριζόντιες γραμμές ανά 5cm, προσθέτονταν λίγο νερό (περίπου 5ml), και τοποθετούνταν η ρίζα και απλώνονταν με την βοήθεια εργαστηριακής λαβίδας. Στην συνέχεια μετρούνταν πόσες φορές τέμνονται οι ρίζες πάνω στις κάθετες και οριζόντιες γραμμές (GIOVANNETTI M. 1979). Το μήκος της ρίζας υπολογιζόταν από τον εξής τύπο:



Εικόνα 10: Ρίζες φυτού τομάτας εντός πλαστικού τριβλίου για την μέτρηση του συνολικού μήκους ρίζας.

$$R=(\pi + A)n/2H$$

Όπου R= μήκος ρίζας

$$\pi= 3.14$$

A= επιφάνεια του δοχείου μέτρησης

n= αριθμός σημείων που η ρίζα τέμνει μια από τις γραμμές του πλέγματος

H= συνολικό μήκος γραμμών πλέγματος

Στη συγκεκριμένη πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε, το δοχείο είχε διαστάσεις 11x17 cm και συνεπώς  $A=187\text{cm}^2$ ,  $H=123\text{cm}$  και ο πιο πάνω τύπος μετατρέπεται στον:

$$R=2,388xn$$

### 2.1.9. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΝΗΜΑΤΩΔΩΝ ΣΚΩΛΗΚΩΝ ΣΤΟ ΕΛΑΦΟΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΒΑΕΡΜΑΝΝ (ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗ)

Το δείγμα χώματος τοποθετούνταν εντός δοχείου με νερό, αναδευόταν καλά με νερό υπό πίεση, και αφήνονταν για 30-40" ώστε να κατακαθίσουν τα αδρανή υλικά και στη συνέχεια



κόνα 11: α) ανάδευση νηματώδων, β) κοσκίνισμα των νηματώδων και συλλογή τους, γ) τοποθέτηση των νηματώδων στο χωνιό.

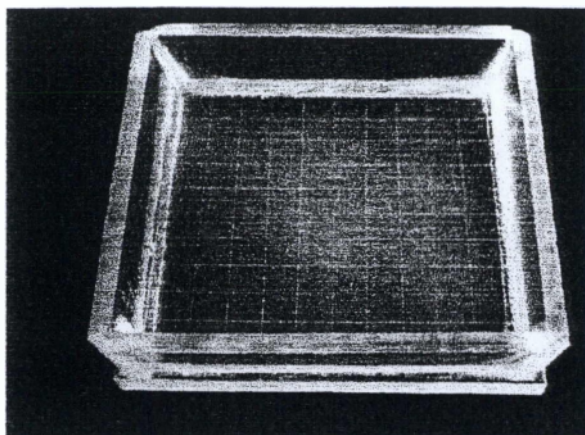
το αιώρημα με τους επιπλέοντες νηματώδεις ρίχνονταν σε σειρά από κόσκινα με άνοιγμα πόρων (630,71,56μm). Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνονταν 2 φορές.

Ένα κομμάτι πορώδες χαρτί, τοποθετούνταν επί δικτυωτού πλέγματος και το δικτυωτό πλέγμα εντός γυάλινου χωνιού διαμέτρου 10-15εκ. Στο σωληνωτό τμήμα του χωνιού προσαρμόζονταν τεμάχιο ελαστικού σωλήνα μήκους 10εκ. περίπου, επί του οποίου προσαρμόζονταν ειδικός σφιγκτήρας, που κλείνει τον σωλήνα υδατοστεγώς. Εντός του χωνιού προστίθονταν νερό μέχρι να καλύψει το χώμα. Τα υπολείμματα χώματος και οι νηματώδεις που βρίσκονται στα κατώτερα κόσκινα (71,56μm) μεταφέρονται έτσι στο πορώδες χαρτί. Οι νηματώδεις διαπερνούν ενεργητικά το χαρτί, καθιζάνουν εντός του ελαστικού σωλήνα και συλλέγονται προς εξέταση, μετά από 36-48 ώρες.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρέως για δείγματα βάρους 50-500γρ. χώματος, και δίνει πολύ καλά αποτελέσματα, αφού πάνει τα 85-95% του πληθυσμού.

### 2.1.10. ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΝΗΜΑΤΩΔΩΝ

Μετά την πάροδο του απαιτούμενου χρόνου παραμονής των δειγμάτων στα χωνιά Baermann λαμβάνονταν νερό από το άκρο του ελαστικού σωλήνα σε μπουκαλάκια των 10ml. Τα μπουκαλάκια αφήνονταν σε ηρεμία για 15-20 λεπτά ώστε να κατακαθίσουν οι περιεχόμενοι σε αυτά νηματώδεις. Στη συνέχεια όταν είχαν κατακαθίσει οι νηματώδεις αφαιρούνταν



Εικόνα 12: Τριβλίο καταμέτρησης νηματωδών (counting dish).

περίπου το μισό νερό (επιφανειακά) με την βοήθεια πιπέττας με προσοχή ώστε να μην δημιουργηθεί ανατάραξη. Κατόπιν το υπόλοιπο νερό αφού ανακτιούνται, ρίχνονταν σε ειδικό τριβλίο καταμέτρησης (counting dish) και με την χρησιμοποίηση στερεοσκοπίου γίνονταν εκτίμηση του πληθυσμού των νηματωδών.

### 2.1.11. ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΣΑΠΡΟΦΥΤΙΚΩΝ ΝΗΜΑΤΩΔΩΝ

Σύμφωνα με τον Singh (1995) καρότα πλένονταν και κόβονταν σε φέτες πάχους περίπου 5εκ.

Σε γυάλινα τριβλία διαμέτρου 9εκ. στρώμα με βρεμένο βαμβάκι και πάνω σε αυτό διηθητικό χαρτί (το οποίο είχε κοπεί στην διάμετρο του τριβλίου) και στην συνέχεια τοποθετούνταν οι φέτες καρότου.

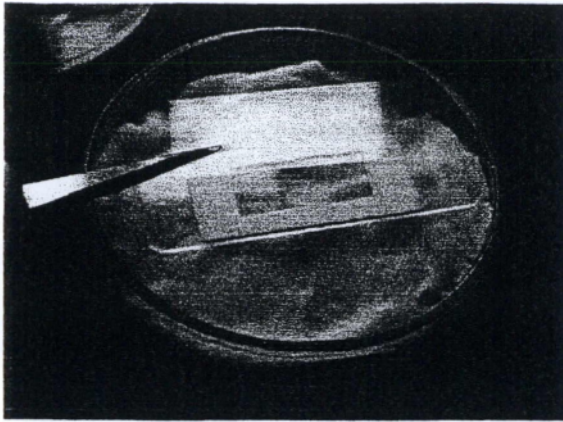
Χρησιμοποιώντας την μέθοδο του Baermann , με την βοήθεια πιπέττας τοποθετούνταν μικρός πληθυσμός νηματωδών (περίπου 50) πάνω στην επιφάνεια των καρότων. Τα τριβλία διατηρούνταν σε θερμοκρασία  $23^{\circ}\text{C} \pm 2$  σε σκοτεινό μέρος. Μετά από περίπου 20–35 μέρες είχε αναπτυχθεί σημαντικός αριθμός νηματωδών.

### 2.1.12. ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΘΗΡΕΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ

Αποστειρωμένες καλυπτρίδες (25x50mm) τοποθετούνταν για 1-2 λεπτά σε κωνική φιάλη που περιείχε Plain Agar 1,5% (περίπου  $50^{\circ}\text{C}$ ) και στη συνέχεια έβγαιναν και κρατιόνταν σε κάθετη θέση έτσι ώστε να στάξει το περίσσιο υλικό και να μείνει ένα λεπτό στρώμα υλικού πάνω στην καλυπτρίδα.

Στη συνέχεια ειδικά διαμορφωμένο (ορθογώνιο πλαστικό πλαίσιο ύψους 1mm περίπου) στο σχήμα της καλυπτρίδας εφαρμοζόταν πάνω στην καλυπτρίδα χρησιμοποιώντας βαζελίνη ως στεγανανοποιητικό. Κατόπιν οι καλυπτρίδες τοποθετούνταν αμέσως για να μην αφυδατωθούν σε κλειστό τριβλίο (Petri dish) που ήταν στρωμένο με βρεγμένο βαμβάκι αφού πρώτα εμβολιαζόταν με μικρό κομμάτι μυκηλίου των μυκήτων *A. oligospora* ή *A. dactyloides*





**Εικόνα 13: Διάταξη της μικροσκοπικής παρατήρησης-βιντεοσκόπησης της θηρευτικής ικανότητας.**

και στην συνέχεια με την βοήθεια πιπέτας τοποθετούνταν μικρή ποσότητα νηματώδων που είχαν ληφθεί με την μέθοδο Baermann. Μετά από 1 ημέρα και στην συνέχεια καθημερινά οι καλυπτρίδες μαζί με το πλαίσιο τοποθετούνταν αντίστροφα σε αντικειμενοφόρο και γινόντουσαν παρατηρήσεις στο μικροσκόπιο το οποίο είχε ειδικά διαμορφωμένη έγχρωμη video-camera (Philips toUcam) χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Ulead Photo Express.

Μετά τις παρατηρήσεις στο μικροσκόπιο η καλυπτρίδα με το μυκήλιο και τους νηματώδεις επανατοποθετείτο στο κλειστό τριβλίο (υγρό θάλαμο) ώστε να μην αφυδατωθεί και επωάζονταν σε θερμοκρασία  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  στο εργαστήριο.

### **2.1.13. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, έγινε σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με το πρόγραμμα SPSS, εφαρμόζοντας ανάλυση παραλλακτικότητας (Analysis Of Variance) και διαχωρισμό των μέσων με την δοκιμή Duncan.

## 2.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ

Μετά από παρατηρήσεις στο μικροσκόπιο, για τον διαχωρισμό των μυκήτων του γένους *Arthrobotrys* χρησιμοποιήθηκε η κλείδα (COOKE, 1964) που διαφοροποιεί (ξεχωρίζει) τους παρασιτικούς μύκητες, σε σχέση με τους παρακάτω χαρακτήρες που είναι:

- **Κονιδιοφόροι**

Μόνοι ή σε δέσμες, απλοί ή διακλαδισμένοι, εξογκωμένοι ή 'φουσκωτοί' στην κορυφή, ομοιόμορφης ή μη διαμέτρου (tapered), χρώμα, μήκος, διακλαδισμένα ή εξογκωμένα (wartlike) στηρίγματα.

- **Κονίδια**

Σχήμα, διαστάσεις (και σχέσεις όπως μέσοι όροι διαστάσεων, μήκος προς πλάτος, μήκος του επάκριου κυττάρου σε σχέση με το κύτταρο της βάσης), κονίδια συσφιγμένα στο σημείο του σέπτου, χρώμα, τονισμένα σκούρα σέπτα, σχηματισμός εξογκώματος στη βάση.

- **Παγίδες**

Τριών διαστάσεων κολλώδη πλέγματα, μη συσφικτικά δαχτυλίδια, συσφικτικά δαχτυλίδια, κολλώδη κιονοειδείς διακλαδώσεις, σφαιρικοί ή οβάλ κολλώδης κόμποι, κολλώδης κόμποι σε σχήμα κλεψύδρας.

- **Χαρακτήρες καλλιέργειας**

Ταχύτητα ανάπτυξης καλλιέργειας και σχηματισμού κονιδίων, χρώμα, εναέριο μυκήλιο.

Σύμφωνα με την κλείδα του COOKE (1964) έγινε η αναγνώριση των μυκήτων. Τα κοινά τους μορφολογικά χαρακτηριστικά είναι τα παρακάτω:

Μη ενδοζωικοί παγιδευτικοί μύκητες, αιχμαλωτίζοντας τους νηματώδεις με ποικίλους τρόπους, εισέρχονται στο σώμα του νηματώδη και αφομοιώνουν τα συστατικά του. Οι νηματώδεις παγιδεύονται μέσα ή πάνω σε παγίδες σχηματισμένες από μορφολογικά τροποποιημένες διακλαδώσεις υφών. Το μυκήλιο έχει υφές με σέπτα.

Στην συνέχεια οι δύο μύκητες διαφοροποιούνται. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του μύκητα *Arthrobotrys dactyloides* είναι:

Οι διακλαδώσεις των υφών τροποποιούνται σε έμμισχα συσφικτικά δαχτυλίδια. Επιμήκη-ελλειψοειδή, 32-48 x 7-9,5μ κονίδια συχνά λίγο κεκαμένα με ένα σέπτο με το επάκριο κύτταρο να είναι μεγαλύτερο από αυτό της βάσης σχηματίζονται σε ακραίες ομάδες στην άκρη του κονιδιοφόρου.

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του μύκητα *Arthrobotrys oligospora* είναι:

Οι διακλαδώσεις υφών τροποποιούνται σε απλά ή σύνθετα δύο ή τριών διαστάσεων δίχτυα όπου οι νηματώδεις παγιδεύονται κολλώντας πάνω ή μέσα σε αυτά. Κονίδια με ένα σέπτο, αντιστρόφως ωοειδή (μυτερή βάση, αγγλ: obovoid) 22-32 x 12-20μ, αδρομερή, συσφιγμένα στο σημείο του σέπτου με το επάκριο κύτταρο να είναι μεγαλύτερο από αυτό της βάσης σχηματίζονται σε ακραίες μικρές 'κεφαλωτές' ομάδες σε απλούς ή διακλαδιζόμενους κονιδιοφόρους, μερικές φορές αναπτύσσονται 'κόμβοι' κονιδίων σε όλο το μήκος των κονιδιοφόρων. Σε συνήθως ηλικιωμένες καλλιέργειες, σχηματίζονται κίτρινα, κυλινδρικά, υποστρόγγυλα ή ελλειψοειδή χλαμυδοσπόρια.

## 2.3. ΜΕΤΡΗΣΗ ΓΡΑΜΜΙΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΜΥΚΗΛΙΟΥ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ *Arthrobotrys oligospora* ΚΑΙ *Arthrobotrys dactyloides*

### 2.3.1. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός του πειράματος ήταν η μελέτη τριών μονόσπορων απομονώσεων του μύκητα *A. oligospora* και τριών απομονώσεων του μύκητα *A. dactyloides* ως προς την *in vitro* γραμμική αύξηση του μυκηλίου τους.

### 2.3.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν οι μονόσπορες απομονώσεις Ao12, Ao13, Ao14 του μύκητα *A. oligospora* και οι απομονώσεις Ad16, Ad18, Ad22 του μύκητα *A. dactyloides*.

Αρχικά οι απομονώσεις μεταφέρθηκαν από την συλλογή (δοκιμαστικούς σωλήνες) σε τριβλία Petri με θρεπτικό υλικό P.D.A. για τον *A. oligospora* και M.A για τον *A. dactyloides*, τα οποία ακολούθως επώαστηκαν σε θερμοκρασία 21°C για 5 και 9 μέρες αντίστοιχα. Ακολούθως, από την περιφέρεια της αναπτυσσόμενης αποικίας της κάθε απομόνωσης κόπηκαν με την βοήθεια φελλοτρυπητή (cork borer) μυκηλιακοί δίσκοι διαμέτρου 0,7cm οι οποίοι τοποθετήθηκαν ανεστραμμένοι (το μυκήλιο σε επαφή με την επιφάνεια του υλικού) και κάτω από ασηπτικές συνθήκες στο κέντρο τριβλίων Petri που περιείχαν θρεπτικό υλικό M.A., P.D.A., CZAPEK, CZAPEK-PY (15ml/τριβλίο). Για κάθε απομόνωση χρησιμοποιήθηκαν 4 τριβλία (επαναλήψεις). Τα τριβλία κλείστηκαν με Parafilm και επώαστηκαν σε θερμοκρασία 21°C. Η μέτρηση της γραμμικής αύξησης του μυκηλίου της κάθε απομόνωσης άρχισε 24 ώρες μετά την μόλυνση των τριβλίων και συνολικά έγιναν 5 μετρήσεις σε διάστημα 5 ημερών εκτός του *A. oligospora* στα υλικά M.A., CZAPEK, και CZAPEK-PY στα οποία έγιναν 4 μετρήσεις σε διάστημα 4 ημερών, επειδή οι αποικίες είχαν καλύψει όλη περίπου την επιφάνεια των τριβλίων. Ο υπολογισμός της γραμμικής αύξησης του μυκηλίου γινόταν με μέτρηση της διαμέτρου της αποικίας σε cm και σε δύο κατευθύνσεις (μέγιστη-ελάχιστη), εύρεση του μέσου όρου των δύο αυτών τιμών και αφαίρεση της σταθεράς τιμής 0,7cm (διάμετρος του δίσκου του αρχικού μολύσματος) σύμφωνα με τον τύπο:

$$x = \frac{(\delta 1 + \delta 2)}{2} - y$$

Όπου x : γραμμική αύξηση μυκηλίου (cm)

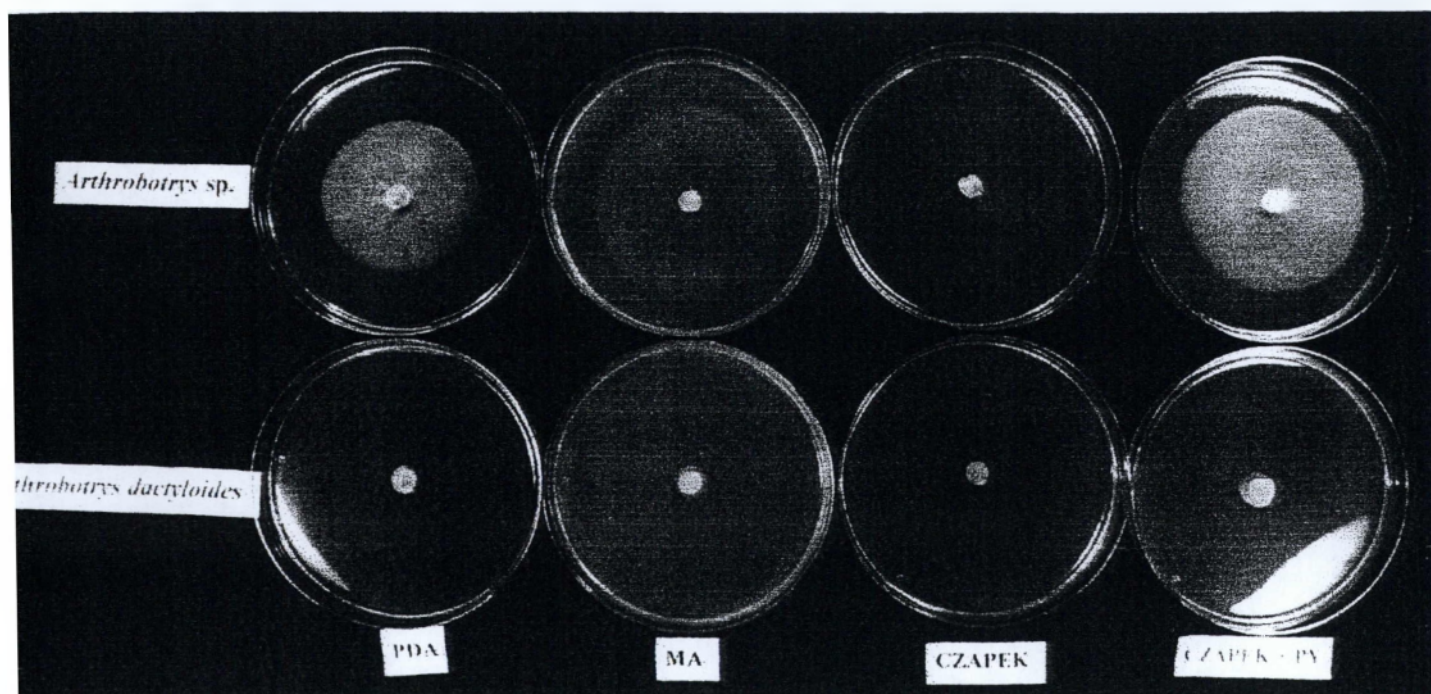
$\delta 1$  &  $\delta 2$ : κάθετοι διάμετροι αποικίας (cm), και

y : σταθερά ίση με την διάμετρο του δίσκου του αρχικού μολύσματος

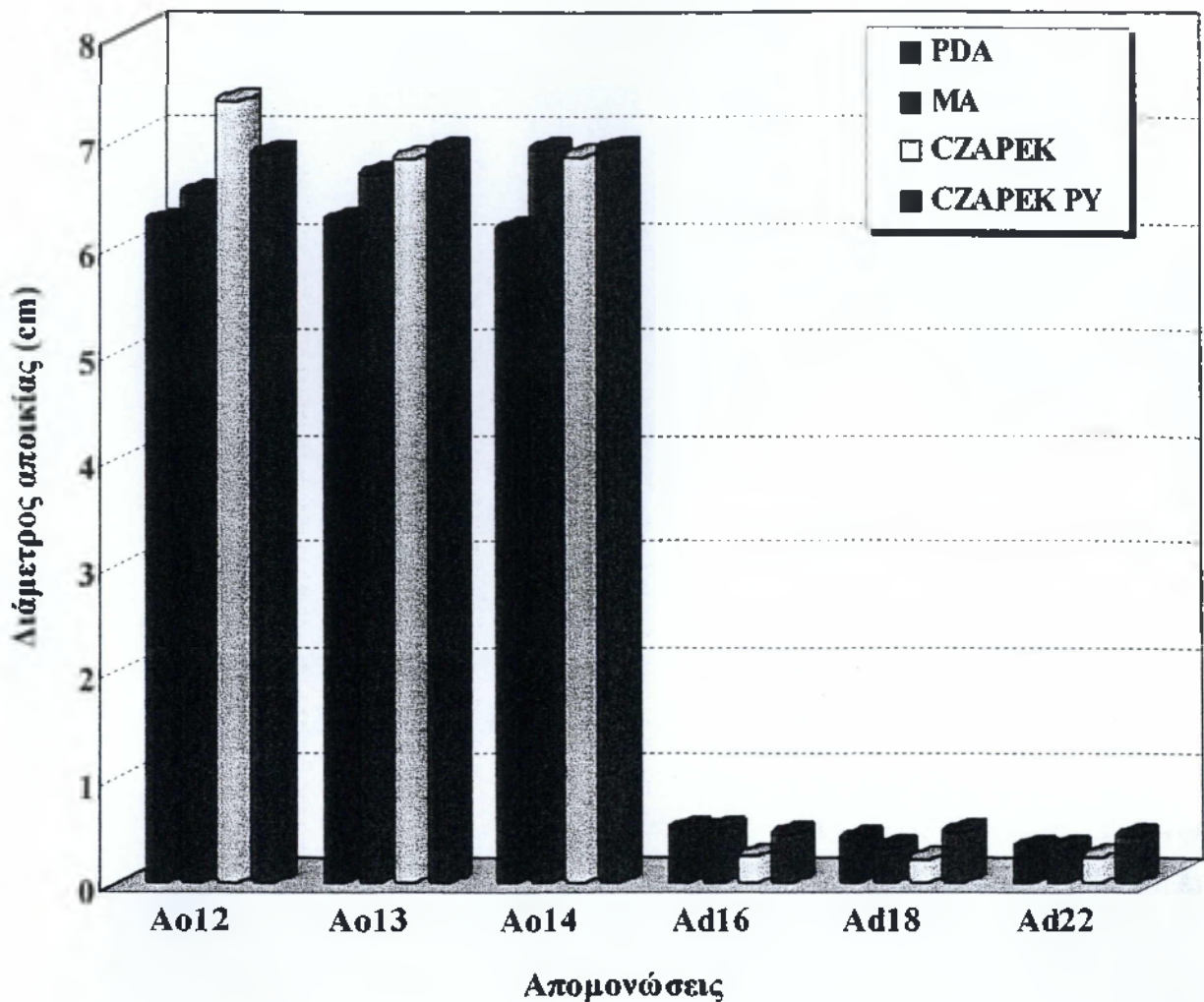
### 2.3.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι η γραμμική αύξηση του μυκηλίου των απομονώσεων των μυκήτων *A. oligospora* και *A. dactyloides* εξαρτιόταν από το είδος.

Πιο συγκεκριμένα διαπιστώθηκε ότι η *in vitro* γραμμική αύξηση του μυκηλίου όλων των απομονώσεων του *A. oligospora*, ήταν ομαλή κατά την διάρκεια της επώασης ενώ αντιθέτως ο *A. dactyloides* άρχισε να αναπτύσσεται μία ή δύο ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Στο διάγραμμα (1) φαίνεται η γραμμική αύξηση του μυκηλίου τριών μονόσπορων απομονώσεων του μύκητα *A. oligospora* και τριών απομονώσεων του μύκητα *A. dactyloides* σε τέσσερα θρεπτικά υλικά, μετά από επώαση τεσσάρων ημερών. Χαρακτηριστική είναι η διαφορά ταχύτητας αύξησης των δύο ειδών σε όλα τα υλικά. Ενώ ο *A. oligospora* αυξάνεται γραμμικά με ταχύτητα 8mm την ημέρα ο *A. dactyloides* μετά βίας πλησιάζει την ταχύτητα του 1mm την ημέρα. Η ανάπτυξη του είναι ιδιαίτερα αργή στο υλικό Czapek που ενώ είναι πλούσια σε 'ενέργεια' (δηλ. σάκχαρα) στερείται της ποικιλίας των οργανικών ουσιών και αυξητικών παραγόντων που έχουν τα άλλα υλικά. Όταν το υλικό εμπλουτίζεται με πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης πλούσια σε αμινοξέα, βιταμίνες κ.λ.π. (Czapek-PY) διπλασιάζεται η ταχύτητα αύξησης και είναι ίδια με αυτή που επιτυγχάνεται στα υλικά PDA και MA που επίσης είναι πλούσια σε ποικίλες οργανικές ουσίες.



Εικόνα 14: Γραμμική αύξηση μυκηλίου των μυκήτων *Arthrobotrys oligospora* (*Arthrobotrys sp.* στην εικόνα) και *Arthrobotrys dactyloides* 4 ημέρες μετά τον εμβολιασμό.



Διάγραμμα1: Γραμμική αύξηση μυκηλίου (cm) σε θρεπτικά υλικά (PDA, MA, CZAPEK, CZAPEK-PY) τριών μονόσπορων απομονώσεων του μύκητα *Arthrobotrys oligospora* (Ao12, Ao13, Ao14) και τριών απομονώσεων του *Arthrobotrys dactyloides* (Ad16, Ad18, Ad22) μετά από επώαση για 4 μέρες σε θερμοκρασία 21°C.

Όμως και στα πλούσια υλικά η ταχύτητα του μύκητα αυτού παραμένει πολύ αργή σε σύγκριση με αυτή του *A. oligospora* πράγμα που δείχνει ότι πιθανόν η απουσία (ή παρουσία) ενός ή περισσότερων παραγόντων (θρεπτικών ή περιβαλλοντικών) δεν επιτρέπουν την ταχεία αύξηση του μύκητα *in-vitro*. Αντίθετα όλες οι απομονώσεις του μύκητα *A. oligospora* αναπτύχθηκαν ικανοποιητικά σε όλα τα υλικά που δοκιμάστηκαν.

Εντούτοις μεταξύ των απομονώσεων του ίδιου είδους μύκητα *Arthrobotrys* που δοκιμάστηκαν (τρεις απομονώσεις ανά είδος) δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P > 0,05$ ) όσον αφορά την ταχύτητα γραμμικής αύξησης του μυκηλίου.

## 2.4. ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΩΝ ΚΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΑ CM<sup>2</sup> ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΗΝ ΗΛΙΚΙΑ ΤΟΥΣ ΣΕ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ P.D.A.

### 2.4.1. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός του πειράματος ήταν η μελέτη τριών μονόσπορων απομονώσεων του μύκητα *A. oligospora* και τριών απομονώσεων του μύκητα *A. dactyloides* ως προς την παραγωγή κονιδίων και μέτρηση των διαστάσεων τους ανάλογα με την ηλικία τους προκειμένου να αξιολογηθεί η δυνατότητα παραγωγής σπορίων (μολύσματος) για πρακτική χρήση και συγχρόνως να γίνει μια μελέτη των ακριβών διαστάσεων των σπορίων σε σχέση με την ηλικία τους αξιοποιώντας την δυνατότητα του προγράμματος ψηφιακής μικροσκοπικής φωτογράφησης και ανάλυσης εικόνας (Image-pro) που προσφάτως εγκαταστάθηκε και λειτούργησε στο εργαστήριο Μυκητολογίας του ΜΦΙ.

### 2.4.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν οι μονόσπορες απομονώσεις Ao12, Ao13 και Ao14 του μύκητα *A. oligospora* και οι απομονώσεις Ad16, Ad18 και Ad22 του μύκητα *A. dactyloides*. Αρχικά οι απομονώσεις μεταφέρθηκαν από την συλλογή (δοκιμαστικούς σωλήνες) σε τριβλία Petri με θρεπτικό υλικό P.D.A. τα οποία ακολούθως επώαστηκαν σε θερμοκρασία 21°C για 5 ημέρες για τον *A. oligospora* και για 9 ημέρες για τον *A. dactyloides*. Ακολούθως, από την περιφέρεια της αναπτυσσόμενης αποικίας της κάθε απομόνωσης κόπηκαν με την βοήθεια φελλοτρυπητή μυκηλιακοί δίσκοι διαμέτρου 0,7cm οι οποίοι τοποθετήθηκαν ανεστραμμένοι (το μυκήλιο σε επαφή με την επιφάνεια του υλικού) και κάτω από ασηπτικές συνθήκες στο κέντρο τριβλίων Petri που περιείχαν θρεπτικό υλικό P.D.A. (15ml/τριβλίο). Για κάθε απομόνωση χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία (επαναλήψεις). Τα τριβλία κλείστηκαν με Parafilm και επώαστηκαν σε θερμοκρασία 21°C. Η μέτρηση του αριθμού των παραγόμενων κονιδίων ανά μονάδα επιφάνειας (cm<sup>2</sup>) της αποικίας της κάθε απομόνωσης του μύκητα *A. oligospora* έγινε 5 ημέρες μετά την μόλυνση των τριβλίων και σε σημεία που η αποικία ήταν ηλικίας 1,2,3,4 και 5 ημερών κόπηκαν με την βοήθεια φελλοτρυπητή και κάτω από ασηπτικές συνθήκες από τέσσερις μυκηλιακοί δίσκοι διαμέτρου 0,7cm. Κατόπιν, οι τέσσερις δίσκοι ίδιου τριβλίου και ίδιας ηλικίας κάθε απομόνωσης τοποθετήθηκαν χωριστά σε αποστειρωμένα μπουκαλάκια McCarthney που περιείχαν 5ml αποστειρωμένο-απιονισμένο νερό στο οποίο είχε προστεθεί 0,01ml από διάλυμα 0,01% του διαβρεκτικού παράγοντα Tween 80. Τα

μπουκαλάκια ανακινήθηκαν πολύ καλά με σκοπό την απελευθέρωση των κονιδίων του μύκητα από τους μυκηλιακούς δίσκους και η συγκέντρωση των κονιδίων στο κάθε αιώρημα μετρήθηκε με την βοήθεια αιματοκυττόμετρου.

Λόγω του βραδύτερου ρυθμού ανάπτυξης, η μέτρηση του αριθμού των παραγόμενων κονιδίων ανά μονάδα επιφάνειας ( $\text{cm}^2$ ) της αποικίας της κάθε απομόνωσης του μύκητα *A. dactyloides* έγινε 9 ημέρες μετά την μόλυνση των τριβλίων. Από κάθε τριβλίο και απομόνωση (σύνολο τριών τριβλίων ανά απομόνωση), κόπηκαν με την βοήθεια φελλοτρυπητή και κάτω από ασηπτικές συνθήκες τέσσερις μυκηλιακοί δίσκοι διαμέτρου 0,7cm. Στην συνέχεια οι μυκηλιακοί δίσκοι της κάθε απομόνωσης τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα μπουκαλάκια McCarthy όπως παραπάνω. Η συγκέντρωση των κονιδίων στο κάθε αιώρημα δεν μετρήθηκε με αιματοκυττόμετρο, γιατί το συγκεκριμένο αιματοκυττόμετρο μπορούσε να κάνει ακριβείς μετρήσεις για συγκεντρώσεις πάνω από 10.000 σπόρια/ml. Έτσι για γίνει η μέτρηση της συγκέντρωσης των κονιδίων του μύκητα *A. dactyloides*, με την βοήθεια πιπέτας ακριβείας, τοποθετήθηκαν 50μl αιωρήματος σπορίων πάνω σε αντικειμενοφόρο και μετρήθηκαν τα σπόρια στο μικροσκοπίου σε μικρή μεγέθυνση ( $\times 10$ ). Ο αριθμός των κονιδίων που μετριάτανε πολλαπλασιαζόταν επί 20 για να γίνει αναγωγή σε όγκο 1ml. Στην απομόνωση Ad16 έγιναν μετρήσεις μόνο δύο επαναλήψεων λόγω μόλυνσης της τρίτης.

Κατόπιν, και για τους δύο μύκητες, έγινε αναγωγή της συγκέντρωσης κονιδίων/ml του κάθε αιωρήματος στην μονάδα επιφάνειας της αποικίας από την οποία προήλθαν τα κονίδια σύμφωνα με τον τύπο:

$$x = y z / 4a$$

Όπου:  $x$  = αριθμός παραγόμενων κονιδίων ανά  $\text{cm}^2$  επιφάνειας της αποικίας,

$y$  = αριθμός κονιδίων/ml αιωρήματος,

$z$  = όγκος αιωρήματος (ml), και

$a$  = εμβαδόν μυκηλιακού δίσκου ( $\text{cm}^2$ ) [ $a = \pi r^2 = 3.14 \text{ r}^2$ ]

Τα ίδια αιωρήματα και των δύο μυκήτων χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση των διαστάσεων των κονιδίων (από μία έως πέντε μέρες) του μύκητα *A. oligospora* και για κονίδια 9 ημερών του μύκητα *A. dactyloides*. Οι μετρήσεις έγιναν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με το πρόγραμμα Image-Pro Plus 4.5.1 για Windows 2000 (Media Cybernetics, Inc., USA).



### 2.4.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

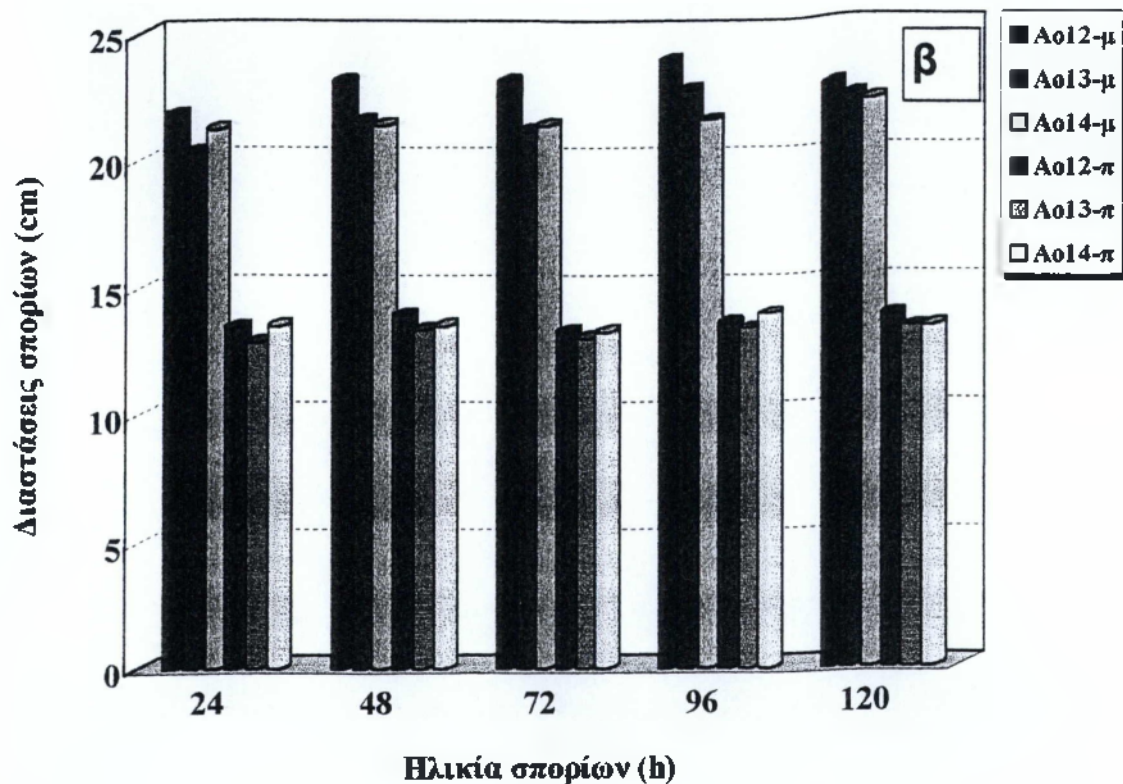
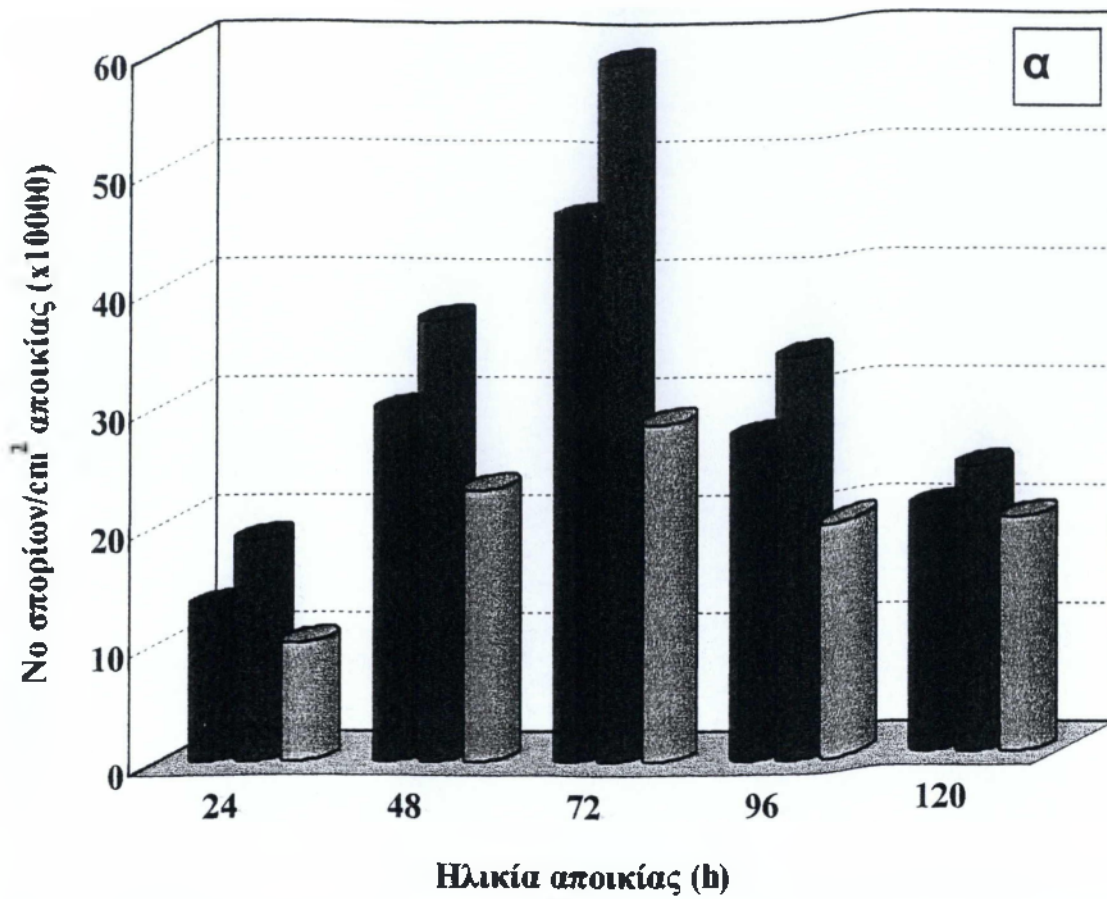
Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη της παραγωγής σπορίων σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα *in-vitro*. Σε αυτή την περίπτωση υπήρχε μεγάλη διαφορά μεταξύ των ειδών. Συγκεκριμένα, αποικίες 5 ημερών του μύκητα *A. oligospora* σε PDA μετρήθηκαν πυκνότητες σπορίων της τάξης των  $2 \times 10^5$  /cm<sup>2</sup> (βλέπε διάγραμμα 2α) ενώ οι αποικίες του 9 ημερών του μύκητα *A. dactyloides* σε PDA δεν μπόρεσε σε καμία περίπτωση να ξεπεράσει τα  $1,5 \times 10^4$  και ήταν συνήθως της τάξης  $10^3$ - $10^4$  σπόρια/cm<sup>2</sup> (βλέπε πίνακα2). Στην *in-vitro* παραγωγή κονιδίων του μύκητα *A. dactyloides* 9 μέρες μετά την επώαση των τριβλίων δεν έγινε στατιστική ανάλυση λόγω της μόλυνσης μιας επανάληψης της απομόνωσης Ad16.

**Πίνακας 2:** Αριθμός παραγόμενων σπορίων/cm<sup>2</sup> του μύκητα *Arthrotrrys dactyloides* 9 ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

Επανάληψη	Ad16	Ad18	Ad22
1	14013,1	13750	12565,7
2	12236,8	2565,7	3223,6
3		1710,5	855,2

Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι υπήρχαν διαφορές ως προς την παραγωγή σπορίων μεταξύ των διαφορετικών απομονώσεων και στα δύο είδη *Arthrotrrys* που εξετάστηκαν. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η διάταξη παραγωγής σπορίων του μύκητα *A. oligospora* πάνω στην αναπτυγμένη αποικία. Στον αριθμό των παραγόμενων κονιδίων του μύκητα *A. oligospora* ανάλογα με την ηλικία τους διαπιστώθηκε ότι υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0,05$ ) στον αριθμό των παραγόμενων σπορίων του στις διάφορες «ζώνες ηλικίας» και ίδιας αποικίας. Η διάταξη παραγωγής σπορίων είναι πυκνότερη στον δακτύλιο που αντιπροσωπεύει μυκήλιο μέσης ηλικίας 3 ημερών ενώ σε παλαιότερα τμήματα της αποικίας (5 ημερών) παράχθηκαν λιγότερα σπόρια.

Όσον αφορά τις διαστάσεις των κονιδίων των απομονώσεων, Ao12, Ao13 και Ao14 του μύκητα *A. oligospora*, ανάλογα με την ηλικία τους δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P > 0,05$ ). Στο διάγραμμα (2β) φαίνονται οι μέσες διαστάσεις (μήκος-πλάτος) διαφόρων ηλικιών (2-5 ημέρες) των σπορίων τριών απομονώσεων του *A. oligospora*. Όπως φαίνεται σαφώς από το διάγραμμα δεν υπήρχαν διαφορές στις διαστάσεις των σπορίων διαφόρων ηλικιών.



Διάγραμμα 2: Αριθμός παραγόμενων σπορίων ανά  $\text{cm}^2$  θρεπτικού υλικού PDA (α), διαστάσεις σπορίων (μ: μήκος, π: πλάτος) σπορίων (β) τριών απομονώσεων του μύκητα *Arthrobotrys oligospora* (■ Ao12 ■ Ao13 ▨ Ao14) μετά από 5 μέρες επώασης των καλλιιεργειών σε θερμοκρασία 21°C.

## 2.5. ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ ΜΕ ΘΗΡΕΥΤΙΚΟΥΣ ΜΥΚΗΤΕΣ ΣΕ ΦΥΣΙΚΑ ΜΟΛΥΣΜΕΝΟ ΧΩΜΑ ΟΠΟΥ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΝΤΑΝ ΦΥΤΑ ΤΟΜΑΤΑΣ

### 2.5.1. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός του πειράματος ήταν η μελέτη της επίδρασης που έχει η προσθήκη μολύσματος θηρευτικών μυκήτων (*A. oligospora*, *A. dactyloides*) στον πληθυσμό των σαπροφυτικών και των φυτοπαρασιτικών νηματωδών *Meloidogyne sp.* και των επιπτώσεων στην ανάπτυξη και βαθμό προσβολής των ριζών φυτών τομάτας.

### 2.5.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Αρχικά, εντοπίστηκε ένα χωράφι στη Βαρυμπόμπη το οποίο είχε εμφανίσει πρόβλημα από νηματώδεις. Έγινε δειγματοληψία εδάφους και σε 10 δείγματα από αυτό (200gr) έγινε καταμέτρηση του πληθυσμού σαπροφυτικών και φυτοπαρασιτικών νηματωδών με την μέθοδο Baermann (τροποποιημένη). Βρέθηκε αριθμός σαπροφυτικών νηματωδών 729 και φυτοπαρασιτικών 93.



Εικόνα 15: Φυτά πειράματος

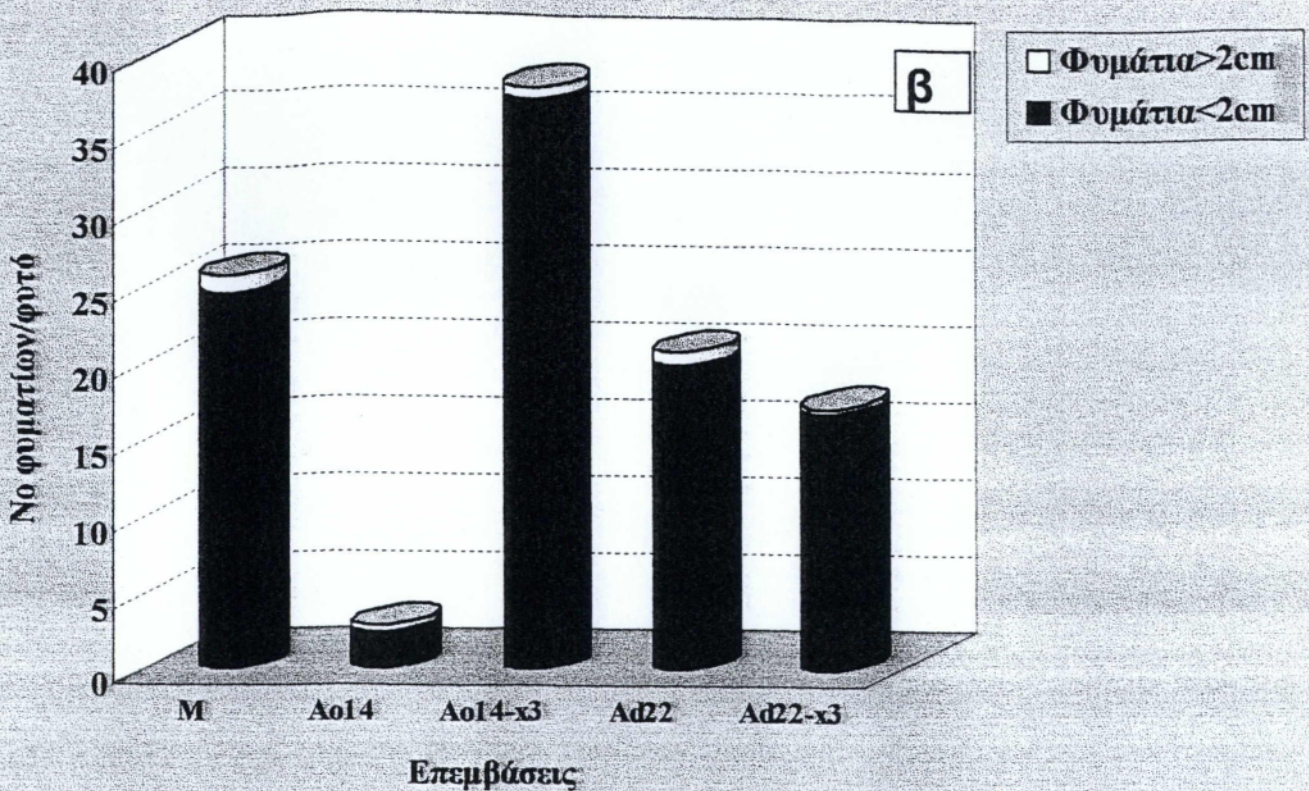
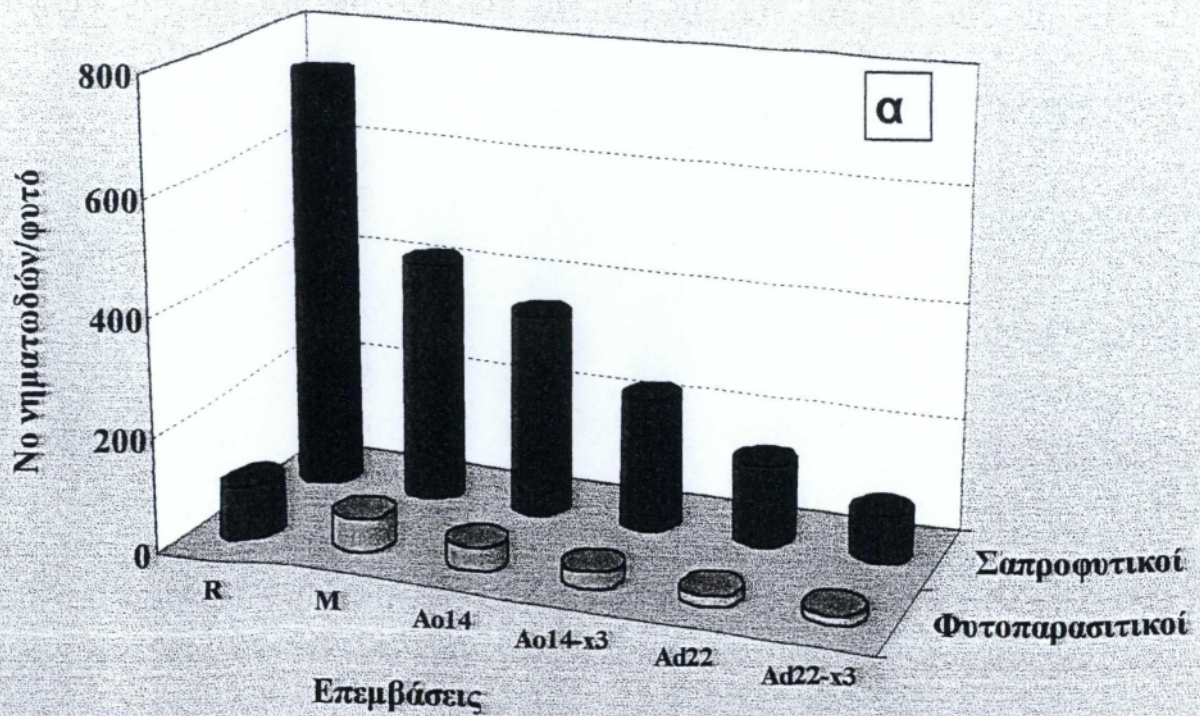
Κατόπιν, χώμα από τον ίδιο αγρό τοποθετήθηκε σε 90 πλαστικά γλαστράκια (περίπου 200gr/γλαστράκι) χωρίς τρύπες στο κάτω μέρος τους για να μην υπάρχει απώλεια νηματωδών. Στην συνέχεια τα γλαστράκια χωρίστηκαν σε 6 ομάδες (επεμβάσεις) των 15. Στην πρώτη επέμβαση του μάρτυρα (M), μέσα στα γλαστράκια τοποθετήθηκε το χώμα χωρίς κανένα άλλο χειρισμό. Στην δεύτερη επέμβαση του μάρτυρα (C), το χώμα αποστειρώθηκε για περίπου 20

λεπτά στους 121°C, στον κλίβανο σε σακούλα αποστείρωσης ώστε να σκοτωθούν όλοι οι νηματώδεις. Στην τρίτη επέμβαση (Aο14) το χώμα από κάθε γλαστράκι ανακατεύτηκε με 5 κυβικά εκατοστά μολύσματος (σε περλίτη, βλέπε γενικά υλικά και μέθοδοι) του μύκητα *A. oligospora*. Στην τέταρτη επέμβαση (Aο14-x3) το χώμα από κάθε γλαστράκι ανακατεύτηκε με την τριπλάσια ποσότητα μολύσματος (15 κυβικά εκατοστά μολύσματος του μύκητα *A. oligospora*). Στην πέμπτη επέμβαση (Ad22) το χώμα από κάθε γλαστράκι ανακατεύτηκε με 5 κυβικά εκατοστά μολύσματος του μύκητα *A. dactyloides*. Και στην έκτη επέμβαση (Ad22-x3) το χώμα από κάθε γλαστράκι ανακατεύτηκε με την τριπλάσια ποσότητα μολύσματος (15 κυβικά εκατοστά μολύσματος του μύκητα *A. dactyloides*). Στην συνέχεια στα γλαστράκια φυτεύτηκαν φυτά τομάτας της ποικιλίας Matmande 22 ημερών και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών σε θερμοκρασία 25±3 °C και φωτοπερίοδο 12h light/12h σκότος). Τα φυτά δέχονταν τεχνητό φωτισμό από λάμπες φθορίου και ατμών νατρίου. Τα φυτά ποτίζονταν περίπου κάθε 2 ημέρες με ποσότητα νερού ώστε να μην υπερβαίνει την υδατοϊκανότητα. Μετά από 40 ημέρες άρχισε η δειγματοληψία και οι μετρήσεις του πειράματος. Επειδή οι εργασίες αυτές ήταν χρονοβόρες και δεν ήταν δυνατόν να γίνουν σε μία ημέρα τα φυτά κάθε επέμβασης χωρίστηκαν σε 3 ομάδες και διαδοχικά την 40<sup>η</sup>, 42<sup>η</sup> και 44<sup>η</sup> ημέρα κόπηκε το υπέργειο τμήμα του φυτού, μετρήθηκε το νωπό βάρος και στην συνέχεια έγινε καταμέτρηση του πληθυσμού των νηματωδών με τη μέθοδο Baermann (τροποποιημένη). Οι ρίζες των φυτών τοποθετήθηκαν και αυτές στο πορώδες χαρτί στην μέθοδο Baermann. Στην συνέχεια μετρήθηκε το συνολικό μήκος των ριζών όπως περιγράφεται στα γενικά υλικά και μέθοδοι και ταυτόχρονα έγινε και η καταμέτρηση των φυματίων.

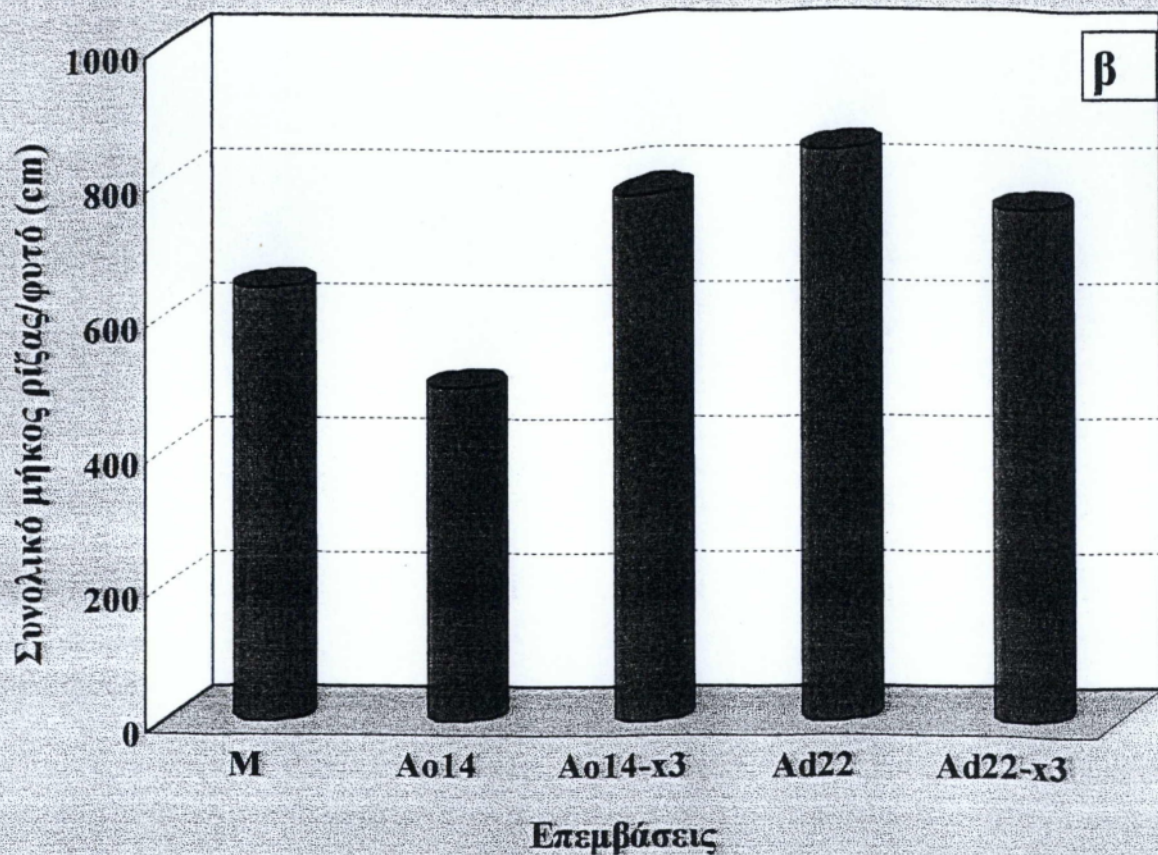
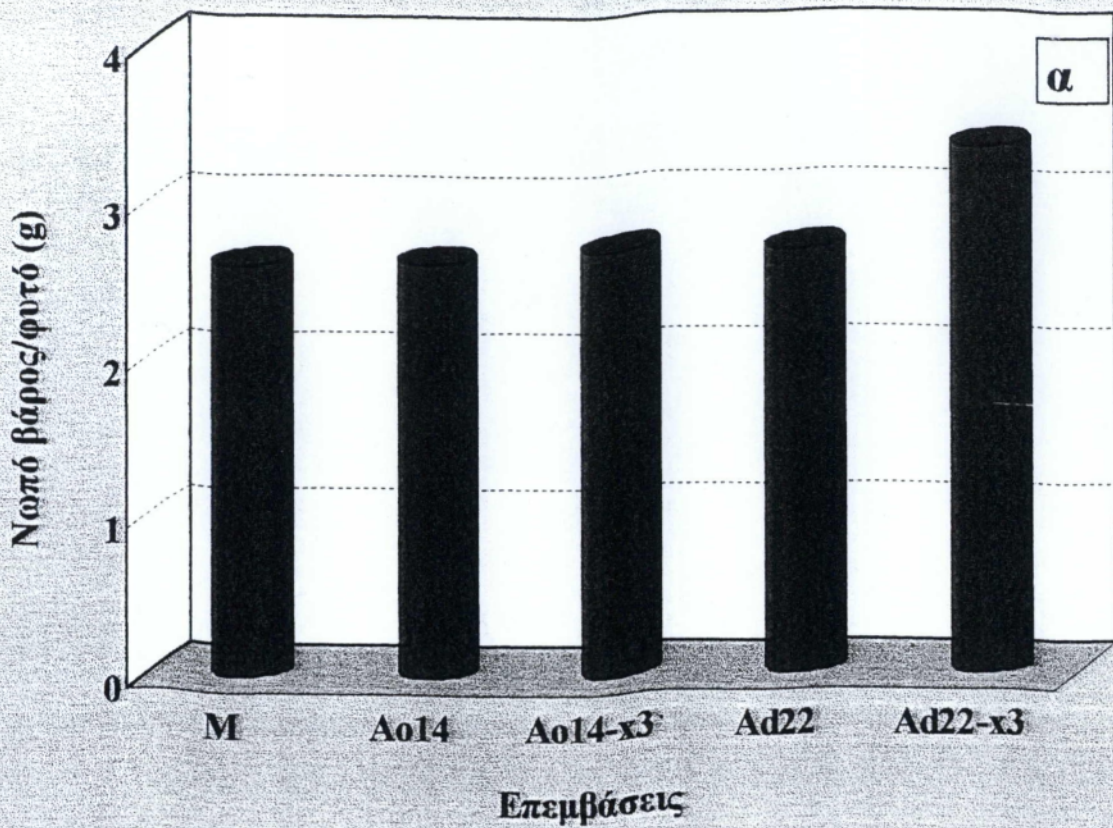
Όσον αφορά την καταμέτρηση του πληθυσμού των νηματωδών, οι νηματώδεις σκοτώθηκαν στους 60°C για 2 περίπου λεπτά και διατηρήθηκαν με μονιμοποιητικό υλικό 1% φορμαλδεΐνη εμπορίου και 1% γλυκερόλη.

### 2.5.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο αριθμός των νηματωδών μειώθηκε αισθητά όταν προστέθηκε στο χώμα μολύσμα των δύο μυκήτων. Η μεγαλύτερη μείωση του πληθυσμού των νηματωδών, παρασιτικών και σαπροφυτικών υπήρχε στις επεμβάσεις με τον μύκητα *A. dactyloides*, ενώ στις επεμβάσεις με τον μύκητα *A. oligospora* η μείωση ήταν μικρότερη (διάγραμμα 3α). Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε ότι υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0,05$ ) μεταξύ των επεμβάσεων με τον μάρτυρα καθώς και με τον αρχικό (R) πληθυσμό νηματωδών. Ως προς τα αποτελέσματα σχετικά με τους



Διάγραμμα 3: Επίδραση διαφορετικών ποσοτήτων μόλυνσης ( $Ax = 5$  κυβ. εκ.  $Ax-x3 = 15$  κυβ. εκ.) των μυκήτων *Arthrobotrys oligospora* (Ao14) *Arthrobotrys dactyloides* (Ad22) στον πληθυσμό νηματωδών (σαπροφυτικών και φυτοπαθογόνων) σε σχέση με τον αρχικό (R) τους πληθυσμό (α) καθώς και στον αριθμό των φυματίων/φυτό τομάτας (β) τομάτας 42 ημέρες μετά την μόλυνση του εδάφους με τους μύκητες. Τα φυτά επώαστηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών θερμοκρασίας  $26 \pm 3^\circ C$  με φωτοπερίοδο 12h φως/12h σκότος.



Διάγραμμα 4: Επίδραση διαφορετικών ποσοτήτων μολύσματος (Ax= 5 κυβ. εκ. Ax-x3= 15 κυβ. εκ.) των μυκήτων *Arthrobotrys oligospora* (Ao14) *Arthrobotrys dactyloides* (Ad22) στο νωπό βάρος (α) και στο συνολικό μήκος ρίζας (β) ανά φυτό τομάτας 42 ημέρες μετά την μόλυνση του εδάφους με τους μύκητες. Τα φυτά επωάστηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών θερμοκρασίας  $26 \pm 3^{\circ}\text{C}$  με φωτοπερίοδο 12h

σαπροφυτικούς νηματώδεις (διάγραμμα 3α), αν και η μείωση του πληθυσμού τους στις διάφορες επεμβάσεις ήταν αισθητή, δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές εκτός της επέμβασης με την τριπλή ποσότητα μολύσματος του μύκητα *A. dactyloides* (Ad22-x3).

Στην επέμβαση 'αποστειρωμένο χώμα' αναπτύχθηκε μεγάλος πληθυσμός νηματωδών (μέσος όρος 1107 νηματωδών/δοχείο, τα αποτελέσματα δεν εμφανίζονται στο διάγραμμα). Το φαινόμενο αυτό θα πρέπει να οφείλεται σε επιμολύνσεις των χωμάτων, πιθανώς με το πότισμα ή άλλες αιτίες (έντομα, κ.τ.λ.). Καθώς το χώμα αυτό είχε αποστειρωθεί σε κλίβανο ήταν φυσικό να υπάρχει αφθονία τροφής για τους σαπροφυτικούς νηματώδεις (λόγω λύσης και ανάπτυξης νέας μικροβιακής μικροχλωρίδας) που είχε σαν αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό τους. Όμως στο χώμα αυτό δεν βρέθηκε κανένας φυτοπαθογόνος νηματώδης πράγμα που σημαίνει ότι η αποστείρωση ήταν αποτελεσματική.

Στο πείραμα με τις επεμβάσεις των δύο μυκήτων έγινε προσπάθεια να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα ως προς την αντίδραση του ξενιστή, με την εκτίμηση των σχηματιζόμενων φυματίων και την ανάπτυξη του υπόγειου και υπέργειου τμήματος. Φαίνεται ότι κάτω από την συγκεκριμένη πειραματική διάταξη και διαδικασία δεν υπάρχει απόλυτη συσχέτιση μεταξύ του τελικού αριθμού των παρασιτικών νηματωδών και του αριθμού των φυματίων στις αντίστοιχες επεμβάσεις. Ωστόσο υπάρχει σαφής τάση μείωσης του αριθμού των φυματίων στις επεμβάσεις με τους μύκητες που είναι ενδεικτικό της καταστολής της δράσης των παρασιτικών νηματωδών. Η στατιστική επεξεργασία (βλέπε παράρτημα) έδειξε ότι όλες οι επεμβάσεις είχαν στατιστικά σημαντική μείωση του αριθμού των φυματίων που είχαν διάμετρο μεγαλύτερη από 2cm σε σύγκριση με τον μάρτυρα (διάγραμμα 3β). Ως προς τα μικρότερα φυμάτια υπάρχει μείωση σε όλες τις επεμβάσεις πλην της επέμβασης με την τριπλή δόση μολύσματος του μύκητα *A. oligospora* (Ao14) χωρίς να είναι οι διαφορές στατιστικά σημαντικές (διάγραμμα).

Όσον αφορά το συνολικό μήκος ρίζας στις επεμβάσεις με τους μύκητες σε σχέση με το μάρτυρα δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P > 0,05$ ). Όμως και εδώ παρατηρείται (διάγραμμα 4β) μια τάση αύξησης του συνολικού μήκους των ριζών σε όλες τις επεμβάσεις με τους μύκητες πλην της επέμβασης με τον μύκητα *A. oligospora* (Ao14).

Όσον αφορά το νωπό βάρος των φυτών στην επέμβαση με τον μύκητα *Arthrobotrys dactyloides* με την τριπλή δόση (Ad22-x3) παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με όλες τις άλλες επεμβάσεις (διάγραμμα 4α). Πιο συγκεκριμένα τα φυτά της επέμβασης (Ad22-x3) είχαν το μεγαλύτερο νωπό βάρος. Όμως λόγω μικρής χωρητικότητας των δοχείων-γλαστρών τα φυτά κλαδεύτηκαν και το νωπό βάρος δεν μπορεί να αποτελέσει ασφαλές κριτήριο.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη μελέτη αυτή έγινε προσπάθεια να μελετηθούν στοιχεία βιολογίας ορισμένων μυκήτων που απαντούν συχνά στο έδαφος και κατατάσσονται στο γένος *Arthrobotrys* και επίσης να διερευνηθεί η δυνατότητα εκμετάλλευσης της θηρευτικής τους ικανότητας (predation) με στόχο την εκμετάλλευση τους για την καταπολέμηση φυτοпараσιτικών νηματώδων σκωλήκων.

Η μελέτη αυτή επιλέχτηκε με την αφορμή διαπίστωσης της παρουσίας των παραπάνω μυκήτων σε υπόστρωμα υδροπονικής καλλιέργειας φυτών και σε εδάφη που εξετάστηκαν στο Εργαστήριο Μυκητολογίας του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου. Οι παρατηρήσεις και τα πειράματα που αναφέρονται σε αυτή τη μελέτη έγιναν με σαπροφυτικούς νηματώδεις και με φυτοπαρασιτικούς του γένους *Meloidogyne*. Οι νηματώδεις αυτού του γένους σίγουρα δεν είναι οι πιο καταστρεπτικοί στη γεωργία καθώς υπάρχουν και άλλα γένη νηματώδων που ενώ βλάπτουν τα φυτά άμεσα ή έμμεσα (φορείς ών), η παρουσία τους είναι λιγότερο εμφανής. Για τα πειράματα όμως επιλέχτηκαν νηματώδεις *Meloidogyne* γιατί είναι διαδεδομένοι, προξενούν σοβαρές ζημιές σε μεγάλο εύρος φυτών – ξενιστών και η παρουσία τους καθώς και το αποτέλεσμα του παρασιτισμού τους (φυμάτια) γίνεται εύκολα αντιληπτό και είναι μετρήσιμο.

Ο κύριος στόχος των εργασιών αυτής της μελέτης ήταν η διερεύνηση της δυνατότητας πρακτικής αξιοποίησης των θηρευτικών μυκήτων που απομονώθηκαν σε σύντομο χρόνο που διαρκεί μια παρόμοια μελέτη. Για τον σκοπό αυτό ακολουθήθηκε μια κάπως «βιαστική» διαδικασία για να γίνει το τελικό πείραμα χωρίς να έχουν πρώτα απαντηθεί κρίσιμα ερωτήματα που αφορούν θεωρητικά και πρακτικά ζητήματα. Η μελέτη έγινε στο Εργαστήριο Μυκητολογίας και ένα πρόβλημα που προέκυψε ήταν η ανάγκη συνδυασμού των υπάρχοντων γνώσεων, εμπειριών και κυρίως των τεχνικών με αντίστοιχες που προέρχονταν από ένα διαφορετικό γνωστικό αντικείμενο την Νηματοδολογία. Στη προσπάθεια αυτή είχαμε μεγάλη βοήθεια από το Εργαστήριο της Νηματοδολογίας του Μ.Φ.Ι. όπου μας επιτράπη να εξοικειωθούμε με τις κατάλληλες τεχνικές αναγνώρισης και καταμέτρησης των φυτοπαρασιτικών και σαπροφυτικών νηματώδων και να χρησιμοποιήσουμε τις εγκαταστάσεις και τα όργανα του Εργαστηρίου για τις εργασίες αυτές.

Από τους θηρευτικούς μύκητες δοκιμάστηκαν απομονώσεις των *Arthrobotrys oligospora* και *Arthrobotrys dactyloides* που προέρχονται από τον ελληνικό χώρο καθώς θεωρήσαμε ότι αυτά είναι είδη προσαρμοσμένα σε δικές μας εδαφοκλιματικές και οικολογικές συνθήκες. Εξ άλλου η χρησιμοποίηση και διάδοση “εξωτικών” ειδών και στελεχών ενέχει



κινδύνους δημιουργίας απρόβλεπτων καταστάσεων και η έγκριση εισαγωγής στη χώρα και της χρήσης τους υπόκειται σε αυστηρούς νόμους και κανονισμούς. Αν και οι μύκητες του γένους *Arthrobotrys* είναι από τους πιο συχνά απαντώμενους στο έδαφος, ελάχιστα έχουν μελετηθεί στη χώρα μας γι' αυτό και αντιμετωπίσαμε δυσκολίες τόσο την απομόνωση τους όσο και στον προσδιορισμό τους. Η απομόνωση του *Arthrobotrys dactyloides* ήταν ιδιαίτερα δύσκολη καθώς τα σπόρια που μπόρεσαν να παραχθούν σε «βρώμικα» τριβλία με νηματώδεις και χώμα δεν βλάστησαν όταν τοποθετήθηκαν σε τυπικά θρεπτικά υλικά (PDA, MA κ.α) και όταν τελικά απομονώθηκε, η καλλιέργεια του ήταν προβληματική καθώς η αύξηση του ήταν πολύ αργή σε όλα τα υλικά που δοκιμάστηκαν. Το ίδιο πρόβλημα του μικρού ρυθμού αύξησης του αντιμετωπίζουν και άλλη ερευνητές. Επίσης ένα άλλο πρόβλημα που αντιμετωπίζεται για την παραγωγή εμπορεύσιμου προϊόντος (formulation) είναι η δυσκολία στην «ξήρανση» της παραγόμενης βιομάζας για να μπορέσει να διατηρηθεί και να διατεθεί στο εμπόριο (Stirling *et al* 1998).

· Η αναγνώριση των απομονωθέντων μυκήτων έγινε σύμφωνα με τις περιγραφές (και τις επικρατούσες ,αντιλήψεις) της κλασικής συστηματικής Μυκητολογίας. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε η κλείδα του COOKE (1964) που σε μεγάλο βαθμό βασίζεται σε περιγραφές του μεγάλου συστηματικού μυκητολόγου Dreschler που πρώτος περιέγραψε τα περισσότερα είδη *Arthrobotrys*. Όμως στην περίπτωση του γένους *Arthrobotrys* είναι πια γνωστό ότι υπάρχει τεράστια ποικιλομορφία πράγμα που αποδυναμώνει την κλασική έννοια του είδους και δημιουργεί σύγχυση ως προς την ταυτότητα πολλών απομονώσεων που έχουν ασαφή ή «ενδιάμεσα» χαρακτηριστικά. Το κενό στην συστηματική αυτών των μυκήτων θα καλυφθεί ελπίζουμε σύντομα με την χρήση των νεότερων μοριακών τεχνικών που δίνουν σαφέστερες ενδείξεις για την συστηματική τους κατάταξη και την θέση τους στην εξέλιξη. Αυτό είναι απαραίτητο να γίνει ώστε να διευκρινιστεί αν τα «ομώνυμα» είδη που απομονώνονται στη χώρα μας είναι πράγματι ίδια με αυτά που απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν σε βορειότερες χώρες. Έτσι θα καταστεί δυνατή η μελέτη του κάθε είδους ως προς την εξειδίκευση του και την ικανότητα του να προσαρμόζεται και να δρα αποτελεσματικά σε διαφορετικές συνθήκες ώστε να γίνει δυνατή η αξιοποίηση τους σε υφιστάμενα γεωργικά συστήματα.

Μια ιδιότητα που δεν έγινε δυνατόν να μελετηθεί επαρκώς κατά το σύντομο διάστημα που έγινε η παρούσα μελέτη ήταν ο προσδιορισμός των αναγκών σε συνθήκες, θρεπτικά υλικά και αυξητικούς παράγοντες που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των μυκήτων σε τεχνητά υποστρώματα. Ο μύκητας που έδωσε το καλύτερο αποτέλεσμα στο πείραμα καταπολέμησης των νηματωδών ήταν αυτός με την βραδύτερη ταχύτητα ανάπτυξης *in-vitro*. Το γεγονός αυτό

αποτελεί πρόβλημα στην ανάπτυξη ενός πρακτικού τρόπου καταπολέμησης των νηματωδών και θα πρέπει είτε να βρεθούν άλλα στελέχη ή είδη που αναπτύσσονται πιο γρήγορα.

Μια ιδιότητα των μυκήτων που μελετήθηκε ιδιαίτερα στην μελέτη αυτή ήταν η παραγωγή σπορίων σε στερεά υποστρώματα με άγαρ *in-vitro*. Το ενδιαφέρον γι' αυτά συνίσταται στην μεγάλη εγγενή ικανότητα επιβίωσης που έχουν τα σπόρια σε σχέση με το μυκήλιο και την ελπιδοφόρα προοπτική να χρησιμοποιηθούν ως εμπορικό σκεύασμα με κάποια μορφή τυποποίησης. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι τα σπόρια πολλών από τους μύκητες αυτού του γένους βλαστάνουν παράγοντας κατευθείαν συσφικτικό δακτύλιο (Bagton 1977, Dreschler 1937, Pegg 1972) όταν υπάρχουν νηματώδεις πλησίον. Αυτή η ιδιότητα μπορεί να αξιοποιηθεί για άμεσα αποτελέσματα αφού η παραγωγή του συσφικτικού δακτυλίου γίνεται σε διάστημα λίγων μόνο ωρών. Επίσης μια σπουδαία πληροφορία (Balan & Gerber 1972) είναι ότι ο *Arthrobotrys dactyloides* παράγει ουσίες που είναι ελκυστικές για τους νηματώδεις αυξάνοντας έτσι την ικανότητα του για παγίδευση.

Από την εργασία αυτή προκύπτει ότι τα περισσότερα σπόρια δεν παράγονται όπως συνήθως στα παλαιότερα τμήμα της αποικίας αλλά ο αριθμός τους αυξάνεται σταδιακά από το παλαιότερο στο νεώτερο μέρος της αποικίας και στη συνέχεια ο αριθμός τους πάλι φθίνει προς το πολύ νεότερο τμήμα της αποικίας. Η ιδιότητα αυτή μπορεί ίσως να αξιοποιηθεί στην περίπτωση που θα χρειαστεί να γίνει παραγωγή σπορίων. Θα πρέπει όμως να μελετηθούν και άλλοι παράγοντες όπως το θρεπτικό υπόστρωμα, το φως κτλ. που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τόσο την παραγωγή όσο και την βιωσιμότητα των παραγομένων σπορίων. Ένας άλλος λόγος που έγινε λεπτομερέστερη μελέτη της παραγωγής σπορίων από τους δύο μύκητες ήταν και η ανάγκη αναγνώρισης και συστηματικής κατάταξης των δύο μυκήτων που βασίζεται σε μορφολογικά χαρακτηριστικά κυρίως των κονιδιοφόρων και των σπορίων. Καθώς οι διαστάσεις των σπορίων είναι σοβαρός ταξινομικός χαρακτήρας έγινε εκμετάλλευση του προσφάτως εγκατασταθέντος το Εργαστήριο Μυκητολογίας συστήματος ανάλυσης εικόνας μικροσκοπίου που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση των ακριβών διαστάσεων μεγάλου αριθμού σπορίων και την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων στην συνέχεια.

Από τα αποτελέσματα αυτής τη έρευνας φαίνεται ότι δεν υπάρχουν διαφορές στις διαστάσεις των σπορίων διαφορετικών ηλικιών άρα αποτελούν σταθερό και αξιόπιστο ταξινομικό χαρακτήρα αλλά πρέπει όμως να ερευνηθεί αν αυτό συμβαίνει και κάτω από διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης των μυκήτων.

Οι θηρευτικοί μύκητες συνεξελίχθησαν μαζί με το θήραμά και μπόρεσαν να επιβιώσουν και τα δύο μέρη στο πέρασμα των γεωλογικών αιώνων διατηρώντας πάντα μια ισορροπία. Μια τέτοια ισορροπία διαπιστώνεται ότι υπάρχει και σήμερα στα φυσικά αδιατάραχτα εδάφη όπου

τόσο οι νηματώδεις όσο και οι μύκητες έχουν ως κύριο έργο της αποδόμηση της οργανικής ουσίας συμβάλλοντας ουσιαστικά στον κύκλο του άνθρακα και των λοιπών στοιχείων. Συγκεκριμένα, οι μύκητες του γένους *Arthrobotrys* είναι στην πλειοψηφία τους κυρίως σαπροφυτικοί και ευκαιριακοί «σαρκοφάγοι» παράγοντας τις παγίδες τους μόνο όταν υπάρχουν νηματώδεις πλησίον και παγιδεύουν κυρίως σαπροφυτικούς νηματώδεις χωρίς όμως να τους εξαλείφουν εντελώς, αλλά να διατηρείται δυναμική ισορροπία στους δύο πληθυσμούς. Κάποιοι ερευνητές πιστεύουν ότι οι μύκητες αυτοί είναι πρακτικά «υποχρεωτικά παράσιτα» και η οργανική ουσία αυξάνει τα βακτήρια και τους νηματώδεις που τρέφονται από αυτά και έτσι αυξάνεται τελικά ο πληθυσμός των μυκήτων που παγιδεύουν νηματώδεις στα εδάφη που είναι πλούσια σε οργανική ουσία (Jaffee *et al* 1998). Φαίνεται ότι οι θηρευτικοί μύκητες υπάρχουν εκεί για να ελέγχονται οι πληθυσμοί των νηματωδών. Το φυσικό ενδιαίτημα, η φυσική «οικολογική φωλιά» του παραπάνω συστήματος δεν μπορεί παρά να είναι το φυσικό αδιατάρακτο έδαφος και συγκεκριμένα τα ανώτερα στρώματα, οι στοιβάδες με πολλή οργανική ουσία που αποδομείται από την εδαφική μικροχλωρίδα και μικροπανίδα. Ο παρασιτισμός των νηματωδών από τους μύκητες εντάσσεται στις δευτερεύουσες αλληλεπιδράσεις και μηχανισμούς ισορροπίας μεταξύ της μικροχλωρίδας και μικροπανίδας που συνήθως και οι δύο είναι υψηλοί στις οργανικές εδαφικές στοιβάδες.

Το ενδιαίτημα των φυτοπαρασιτικών νηματωδών είναι διαφορετικό. Περιλαμβάνει ολόκληρο τον όγκο του εδάφους που αναπτύσσεται το ριζικό σύστημα των φυτών και κυρίως τα σημεία κοντά στις ρίζες, αυτό που ορίζεται και ως ριζόσφαιρα.

Από τα παραπάνω γίνεται εμφανές το κύριο πρόβλημα που υπάρχει στην απόπειρα να χρησιμοποιηθούν θηρευτικοί μύκητες στην καταπολέμηση φυτοπαρασιτικών νηματωδών. Θα πρέπει να αναπτυχθούν (ή να επιβιώσουν έστω και πρόσκαιρα) σε ένα περιβάλλον διαφορετικό από αυτό που έχουν προσαρμοστεί.

Επίσης ένα πρόβλημα που προκύπτει από πρακτικές δοκιμές (Stirling *et al* 1998, Al Hazmi *et al* 1988, Cabanilas & Barker 1989) που έγιναν για την εφαρμογή των μυκήτων αυτών (σε γλαστράκια ή στο θερμοκήπιο) για την καταπολέμηση των φυτοπαρασιτικών νηματωδών, είναι οι ποσότητες του μολύσματος που χρησιμοποιήθηκαν, που ήταν πολύ μεγάλες (αναγόμενες στο επίπεδο αγρού αντιστοιχούν με μερικούς τόνους το στρέμμα). Αυτό σημαίνει ότι χρειάζεται πολύ δουλειά ακόμα για να βρεθούν τρόποι που θα ευνοούν την αποτελεσματικότητα αυτών των επεμβάσεων.

Για τους νηματώδεις – φορείς νόσων μια μέθοδος καταπολέμησης που βασίζεται στην θηρευτική ικανότητα των μυκήτων δεν μπορεί να είναι αποτελεσματική γιατί στην περίπτωση αυτή χρειάζεται εξαίλεψη όλων των μολυσμένων ατόμων και όχι απλώς μείωση του

πληθυσμού τους που ενδεχομένως επιτυγχάνεται με μια τέτοια μέθοδο γιατί πάντα θα μένουν, έστω και λίγα άτομα μολυσμένα με τον ιό. Στην περίπτωση νηματωδών φορέων ιών οι λύσεις που απομένουν είναι η αλλαγή της καλλιέργειας ή χρήση ανθεκτικών ποικιλιών.

Εκεί που ίσως δώσει αποτελέσματα η χρήση θηρευτικών μυκήτων είναι στην περίπτωση που επιθυμούμε να μειώσουμε τους πληθυσμούς των φυτοπαρασιτικών νηματωδών σε επίπεδα που πρακτικά δεν αποτελούν πρόβλημα για την παραγωγή. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί αν με την χρήση των κατάλληλων ειδών και στελεχών θηρευτικών μυκήτων ή με την τροποποίηση των συνθηκών που αναπτύσσονται οι ρίζες ώστε να γίνει δυνατή η εγκατάσταση ικανού πληθυσμού των μυκήτων αυτών στο καλλιεργούμενο έδαφος και ιδίως στην ριζόσφαιρα. Ιδανική θα είναι μία μόνιμη εγκατάστασή τους που θα αλλάξει τις ισορροπίες στο έδαφος και θα τους προσδώσει μόνιμη ικανότητα καταστολής των μεγάλων πληθυσμών των φυτοπαρασιτικών νηματωδών, πράγμα δύσκολο αν κρίνουμε από τις αναρίθμητες αποτυχημένες απόπειρες εισαγωγής ποικίλων παραγόντων βιολογικής καταπολέμησης στο φυσικό έδαφος. Η εδαφική μικροχλωρίδα αντιστέκεται στις αλλαγές και θα πρέπει να γίνουν παράλληλα σημαντικές αλλαγές στις εδαφικές συνθήκες (δομή, οργανική ουσία, χημική σύσταση κτλ) προκειμένου να αλλάξει η μικροχλωρίδα στην επιθυμητή κατεύθυνση.

Μια άλλη ενδεχόμενη δυνατότητα εκμετάλλευσης των μυκήτων αυτών είναι να εγκαθίσταται στο έδαφος ένας μεγάλος αρχικά πληθυσμός τους που θα διατηρείται για ένα διάστημα αλλά που βαθμιαία θα φθίνει, με την προσδοκία να δράσει αποτελεσματικά κατά των φυτοπαρασιτικών νηματωδών στη διάρκεια της επιβίωσής του. Η εφαρμογή αυτή είναι κατάλληλη στην περίπτωση που το έδαφος είναι προβληματικό και έχει ήδη μεγάλο αριθμό νηματωδών πράγμα που θα δώσει το ερέθισμα στον μύκητα να παράγει τις παγίδες του και θα τον τροφοδοτήσει για ένα διάστημα με ενέργεια. Αυτή η προσπάθεια έγινε με το κύριο πείραμα αυτής της μελέτης.

Μια τρίτη δυνατότητα αφορά τις καλλιέργειες σε τεχνητά υποστρώματα όπου οι συνθήκες που αναπτύσσονται οι ρίζες είναι τεχνητές και σε μεγάλο βαθμό ελεγχόμενες. Η εκμετάλλευση των μυκήτων αυτών σε τέτοια γεωργικά συστήματα φαίνεται πιο ρεαλιστική και η διαπίστωση της παρουσίας μεγάλου πληθυσμού του *Arthrobotrys dactyloides* σε υποστρώματα εμπορικής υδροπονικής καλλιέργειας και στην συνέχεια απομόνωσής του για να χρησιμοποιηθεί στην παρούσα μελέτη δείχνει ότι αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε τέτοια συστήματα.

Η μελέτη αυτή δίνει ελπίδες να αναπτυχθεί μια «οικολογική» μέθοδος καταπολέμησης των φυτοπαρασιτικών νηματωδών. Όμως, όπως προαναφέρθηκε και πιο πάνω, πρώτα θα πρέπει να απαντηθούν πολλά ερωτήματα όπως:

- Ποιοι άλλοι βιολογικοί παράγοντες υπάρχουν στο έδαφος που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην καταπολέμηση των φυτοпараσιτικών νηματωδών. Είναι γνωστό ότι εκτός από τα γένη των μυκήτων που αναφέρθηκαν στην εισαγωγή υπάρχουν και άλλα γένη καθώς και άλλοι μικροοργανισμοί που δεν ανήκουν στο βασίλειο των μυκήτων και είναι σχεδόν βέβαιο ότι στο μέλλον θα ανακαλυφθούν πολλοί περισσότεροι.
- Ποιοι από τους υπάρχοντες θρεπτικούς μύκητες είναι οι καταλληλότεροι για να χρησιμοποιηθούν στην πράξη. Δηλαδή να μπορούν να δίνουν εύκολα μεγάλες ποσότητες μολύσματος με μικρό κόστος, να έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής, αντοχή σε δυσμενείς συνθήκες, να επιβιώνουν και να δραστηριοποιούνται στο έδαφος για μακρό χρονικό διάστημα και να μην έχουν τυχόν παρενέργειες στην καλλιέργεια και την οικολογική ισορροπία.
- Πως επηρεάζονται από παράγοντες όπως η μηχανική και χημική σύσταση του εδάφους, την υγρασία, την ανταγωνιστική εδαφική μικροχλωρίδα, την καλλιέργεια, τις ποικίλες εισροές και την παρουσία φυτοпараσιτικών και σαπροφυτικών νηματωδών.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **AL-HAZMI, A.S. (1981).** *Population dynamic of Meloidogyne incognita on corn grown in soil infested with Arthrobotrys conoides<sup>1</sup>.* Journal of Nematology **14(1):** 44-49
- **BARRON, G.L. (1969).** *Isolation and maintenance of endoparasitic nematophagous Hyphomycetes.* Canadian journal of Botany **47:** 1899-1901
- **BALAN, J. & GERBER, N.N. (1972).** *Attraction and killing of the nematode Panagrellus redividus by the predaceous fungus Arthrobotrys dactyloides.* Nematologica **18:** 163-173
- **CABANILLAS, E., BARKER, K.R., DAYKIN, M.E. (1988).** *Histology of the interaction of Paecilomyces lilacinus with Meloidogyne incognita on tomato.* Journal of Nematology **20(3):** 362-365
- **COOKE, R.C. (1964).** *A key to the nematode-destroying fungi.* Trans. Mycol. Soc. **47(1):** 61-74
- **COOKE, R.C. (1968).** *Relationships between nematode-destroying fungi and soil-borne phytonematodes.* Phytopathology **58:** 909-913
- **ΓΡΑΒΑΝΗΣ, Φ.Θ. (1995).** Φυτοπροστασία Ι, Γενική φυτοπαθολογία. Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα (ΤΕΙ) Λάρισας. σελ: 45-61
- **DRECHSLER, C. (1937).** *Some hyppomycetes that prey on free living terricolous nematodes.* Mycologia **29:** 464-487
- **DRECHSLER, C. (1944).** *Three hyphomycetes that capture nematodes in adhesive networks.* Mycologia **36:** 138-155
- **DUDDINGTON, C.L. (1955).** *Notes on the technique of handling predacious fungi.* Trans. Brit. Soc. **38:** 97-103

- **EMMANOYHΛ, ΝΙΚ.Γ. (1998).** Γεωργική ζωολογία. Ειδικό Μέρος Α' Φυτοφάγα Είδη. Εργαστήριο Γεωργικής Ζωολογίας & Εντομολογίας Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- **FERRAZ, L.C.C.B. & BROWN, D.J.F. (2002).** *Endoparasitic nematodes of major economic importance: root-knot and cyst nematodes.* An introduction to nematodes: Plant nematology (Ferraz & Brown eds). σελ: 40-51. Pensoft publishers, Sofia, Bulgaria
- **JAFFEE, B.A., FERRIS, H., SCOW, K.M. (1998).** *Nematode-trapping fungi in organic and conventional cropping systems.* Phytopathology **88**: 344-350
- **HAARD, K. (1968).** *Taxonomic studies on the genus Arthrobotrys corda.* Mycologia **68**: 1142-1146
- **HAY, F.S. (1995).** *Unusual germination of spores of Arthrobotrys oligospora and A. cladodes.* Mycological Research **8**: 981-982
- **HEINTZ, C.V. (1978).** Assessing the predacity of nematode-trapping fungi in vitro. Mycologia **70**: 1086-1100
- **HIGGINS, M.L., PRAMER, D. (1967).** *Fungal morphogenesis: Ring formation and closure by Arthrobotrys dactyloides.* Science **155**: 345-346
- **ΗΛΙΟΠΟΥΛΟΣ, Α.Γ. (1996).** Φυτοπροστασία Ι, Στοιχεία φυτοπαθολογίας. Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα (ΤΕΙ) Καλαμάτας. σελ: 23-43
- **ΗΛΙΟΠΟΥΛΟΣ, Α.Γ. (1996).** Φυτοπροστασία ΙΙ, Γεωργική εντομολογία ζωολογία & στοιχεία ζιζανολογίας. Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα (ΤΕΙ) Καλαμάτας. σελ: 130-144
- **KAPLAN, D.T. AND DAVIS, E.L. (1990).** *Improved nematode extraction from carrot disk culture<sup>1</sup>.* Journal of Nematology **22**: 399-406

- **ΚΟΛΙΟΠΛΑΝΟΣ, Κ.Ν. (1999).** *Φυτοпараσιτικοί νηματώδεις σκώληκες. Βιολογία-Φυσιολογία-Γενετική ταξινόμηση και παθογένεση επί φυτών-Τρόποι αντιμετώπισης.* Εργαστήριο Γεωργικής Ζωολογίας & Εντομολογίας Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- **ΛΑΣΚΑΡΗΣ, Δ. (19 ).** *Studies on germination of spores of M. bolleyi. Death of the cortex of roots in relation to invasion by fungul parasites.* σελ: 265-268. PhD Thesis. Edinburgh University
- **MANKAU, R. (1980).** *Biological control of nematode pests by natural enemies.* Ann. Rev. Phytopathology 18: 415-431
- **NEWMAN, E.I. (1966).** *A method of estimating the total length of root in a sample.* Journal of Applied Ecology 31-39
- **NORDBRÆNG-HERTZ<sup>1</sup>, B., NEUMEISTER<sup>2</sup>, H., SJOLLEMA<sup>3</sup>, K. AND VEENHUIS<sup>3</sup>, M. (1995).** *A conidia trap-forming mutant of Arthrobotrys oligospora.* Mycological Research 11: 1395-1398
- **ΠΑΝΤΙΔΟΥ, Ε.Μ. (1976).** *Βασικές γνώσεις μυκητολογίας.*
- **SCHENCK, S. & PRAMER, D. (1976).** *Nematodes as nutrients for soil fungi.* Nematologica 22: 312-318
- **SINGH, R.P. & SINGH S.U. (1995).** *Dual culture: Nematodes. Molecular methods in plant pathology* (Singh & Singh eds). σελ: 301-311. Lewis publishers, Boca Raton, London, Tokio
- **STIRLING, G.R., SMITH, L.J., LICASTRO, K.A. and EDEN, L.M. (1998).** *Control of root-knot nematodes with formulations of the nematode trapping fungus Arthrobotrys dactyloides.* Biological. Control 11: 224-230
- **ZACKERMAN, B.M., WILLIAM, F.M., LORIN, R.K. (1990).** *Monoxenic culturing of plant parasitic nematodes using carrot discs, callus tissues, and root-explants.* Plant



*nematology laboratory manual* (Zuckerman, William, Krusberg eds). σελ: 163-172.  
Published by the university of Massachusetts agricultural experiment station, Amhest,  
Massachusetts

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ: ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

### 1. ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΩΝ ΣΠΟΡΙΩΝ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΗΛΙΚΙΑ

#### ΑΝΟΒΑ

	Άθροισμα τετραγώνων	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσα τετράγωνα	F	Σημαντικότητα
Μεταξύ επεμβάσεων	4,32E+10	4	1,08E+10	11,713	.000
Πειραματικό λάθος	3,68E+10	40	9,21E+10		
Σύνολο	8,00E+10	44			

#### ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΠΟΡΙΩΝ

Ηλικία σε ώρες	N	Αριθμός σπορίων
24h	15	4,2x10 <sup>4</sup> (α)*
48h	15	9,1x10 <sup>4</sup> (β)
72h	15	13,5x10 <sup>4</sup> (γ)
96h	15	8,2x10 <sup>4</sup> (β)
120h	15	6,5x10 <sup>4</sup> (αβ)

\*Σύμφωνα με την δοκιμή κατά Duncan, αριθμοί που συνοδεύονται με όμοιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (P= 0.05)

2. ΤΑΧΥΤΗΤΑ ΓΡΑΜΜΙΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΜΥΚΗΛΙΟΥ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ (ΡΔΑ, ΜΑ, CZAREK, CZAREK-PY) ΜΕΤΑ ΑΠΟ 3 ΗΜΕΡΕΣ ΕΠΩΑΣΗΣ

ΑΝΟΝΑ

	Άθροισμα τετραγώνων	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσα τετράγωνα	F	Σημαντικότητα
Μεταξύ επεμβάσεων	843,179	5	168,636	6,125	,000
Πειραματικό λάθος	2477,833	90	27,531		
Σύνολο	3321,012	95			

Απομόνωση	N	Γραμμική αύξηση
Αο12	16	4,65 (α)*
Αο13	16	4,59 (α)
Αο14	16	7,87 (α)
Αd16	16	,1250 (β)
Αd18	16	,1625 (β)
Αd22	16	,2875 (β)

\*Σύμφωνα με την δοκιμή κατά Duncan, αριθμοί που συνοδεύονται με όμοιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (P= 0.05)

**3. ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ ΜΕ ΘΗΡΕΥΤΙΚΟΥΣ ΜΥΚΗΤΕΣ ΣΕ ΦΥΣΙΚΑ ΜΟΛΥΣΜΕΝΟ ΧΩΜΑ ΟΠΟΥ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΝΤΑΝ ΦΥΤΑ ΤΟΜΑΤΑΣ**

**ANOVA**

		Άθροισμα τετραγώνων	Βαθμοί ελευθερ.	Μέσα τετράγωνα	F	Σημαντικ.
<b>Νωπό βάρος</b>	Μεταξύ επεμβάσεων	6,168	5	1,234	1,919	,100
	Πειραματικό λάθος	54,006	84	,643		
	Σύνολο	60,175	89			
<b>Συνολικό μήκος ρίζας</b>	Μεταξύ επεμβάσεων	1127083,1	5	225416,62	2,144	,068
	Πειραματικό λάθος	8832545,2	84	1015149		
	Σύνολο	9959628,3	89			

Επέμβαση	N	Νωπό Βάρος	Συνολικό Μήκος Ρίζας
<b>M</b>	15	2,62 (α)*	642,9 (αβ)
<b>C</b>	15	2,67 (α)	689,4 (αβ)
<b>Ao14</b>	15	2,63 (α)	497,4 (α)
<b>Ao14x3</b>	15	2,71 (α)	782,4 (β)
<b>Ad22</b>	15	2,70 (α)	844,5 (β)
<b>Ad22x3</b>	15	3,36 (β)	755,6 (β)

\*Σύμφωνα με την δοκιμή κατά Duncan, αριθμοί που συνοδεύονται με όμοιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (P= 0.05)

**ANOVA**

		Άθροισμα τετραγώνων	Βαθμοί ελευθερ.	Μέσα τετράγωνα	F	Σημαντικ.
<b>Σαπροφυτικοί νηματώδεις</b>	Μεταξύ επεμβάσεων	10105052	5	2021010,3	9,572	,00
	Πειραματικό λάθος	17735561	84	211137,63		
	Σύνολο	27840612	89			
<b>Παρασιτικοί Νηματώδεις</b>	Μεταξύ ομάδων	31165,122	5	6233,024	20,569	,00
	Εντός ομάδων	25454,533	84	303,030		
	Σύνολο	56619,656	89			

Επέμβαση	N	Σαπροφυτικοί νηματώδεις/φυτό	Φυτοпараσιτικοί νηματώδεις/φυτό
M	15	473 (β)*	58 (δ)
C	15	1107 (γ)	0 (α)
Ao14	15	392 (αβ)	41 (γ)
Ao14x3	15	258 (αβ)	28 (β)
Ad22	15	158 (αβ)	18 (β)
Ad22x3	15	98 (α)	16 (β)

\*Σύμφωνα με την δοκιμή κατά Duncan, αριθμοί που συνοδεύονται με όμοιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (P= 0.05)

#### ANOVA

		Άθροισμα τετραγώνων	Βαθμοί ελευθερ.	Μέσα τετράγωνα	F	Σημαντικ.
Φυμάτια <2cm	Μεταξύ επεμβάσεων	11760,456	5	2352,091	6,995	,000
	Πειραματικό λάθος	28246,533	84	336,368		
	Σύνολο	40006,989	89			
Φυμάτια >2cm	Μεταξύ επεμβάσεων	14,056	5	2,811	2,536	,167
	Πειραματικό λάθος	153,733	84	1,830		
	Σύνολο	167,789	89			

Επέμβαση	N	Φυμάτια<2cm	Φυμάτια>2cm
M	15	28 (βγ)*	1,1 (β)
C	15	0 (α)	0 (α)
Ao14	15	23 (βγ)	0,3 (αβ)
Ao14x3	15	37 (γ)	0,8 (αβ)
Ad22	15	19 (β)	0,8 (αβ)
Ad22x3	15	16 (β)	0,3 (αβ)

\*Σύμφωνα με την δοκιμή κατά Duncan, αριθμοί που συνοδεύονται με όμοιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (P= 0.05)