

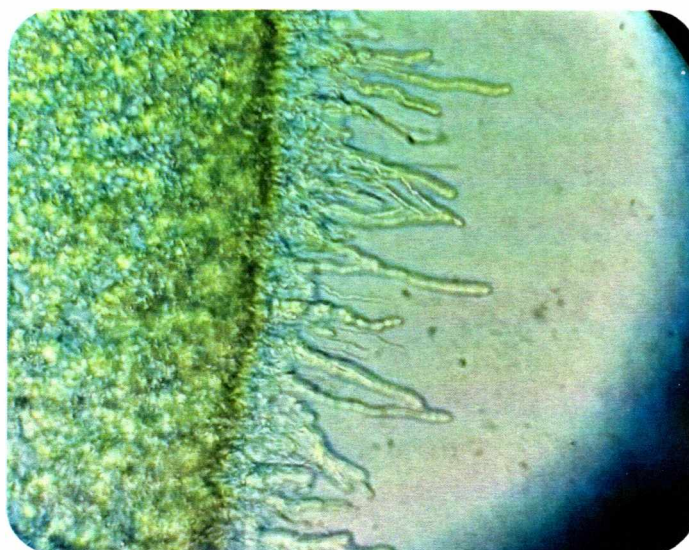
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Σχολή Γεωπονικών Επιστημών

**Τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού
Περιβάλλοντος**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Βλάστηση σπορίων και μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα *Trichoderma harzianum* Rifai σε εναλλακτικά θρεπτικά υποστρώματα



Αρετή Βλαχοδήμου

Επιβλέπων καθηγητής: Ευάγγελος Βέλλιος

Βόλος, 2017



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ & ΚΕΝΤΡΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 16502/1
Ημερ. Εισ.: 29/06/2017
Δωρεά: Συγγραφέα
Ταξίθετικός ΠΤ-ΦΠΑΠ
Κωδικός:
2017
ΒΛΑ

Βλαστικότητα σπορίων και μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα *Trichoderma harzianum*
Rifai σε εναλλακτικά θρεπτικά υποστρώματα

Αρετή Βλαχοδήμου

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Δρ. Ε. Κ. Βέλλιος,

Επίκουρος Καθηγητής Φυτοπαθολογίας και Σύγχρονων Μεθόδων Διαγνωστικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δρ. Π. Κ. Γιαννούλη,

Επίκουρη Καθηγήτρια Τεχνολογίας και Ποιοτικού Ελέγχου Τροφίμων Φυτικής
Προέλευσης, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δρ. Α. Χ. Καρκάνης,

Επίκουρος Καθηγητής Ζιζανιολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Έχοντας φθάσει στο τέλος της πτυχιακής μου εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Βέλλιο, καθώς και τη βοηθό του εργαστηρίου κα Λιολιοπούλου, για την πολύτιμη βοήθειά τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής μου. Νιώθω ευγνώμων που συνεργάστηκα μαζί τους, καθώς οι συμβουλές τους ήταν εποικοδομητικές, παρέχοντάς μου τα απαραίτητα εφόδια για τυχόν μελλοντική ενασχόληση με τον τομέα της φυτοπαθολογίας. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Μ. Χατζηδημόπουλο για τις πολύτιμες υποδείξεις του, καθώς και τους φοιτητές του εργαστηρίου, που με βοήθησαν όποτε κρινόταν αναγκαίο. Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή βιομετρίας κ. Νάκα, για τις καίριες υποδείξεις του όσον αφορά τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής κ. Καρκάνη και κα Γιαννούλη, για τις οδηγίες τους περί βελτίωσης της συγγραφής.

Πολλές ευχαριστίες οφείλω στην οικογένειά μου, που με υποστήριξε, είτε ψυχολογικά, είτε έμπρακτα και ιδιαίτερα στην αδερφή μου, που με την παρουσία της με βοηθούσε κάθε στιγμή και με ενθάρρυνε σε κάθε μου προσπάθεια. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ τους φίλους μου, που με υποστήριζαν ψυχολογικά και με ωθούσαν στο να συνεχίσω την προσπάθεια εκπόνησης της διατριβής μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μεταπτυχιακό φοιτητή Γιώργο Κυριακή, που μου παρείχε το βιολογικό σκεύασμα Triatum-P και τις ρίζες ζαχαρότευτλου, καθώς και την εταιρία τυροκομικών-γαλακτοκομικών προϊόντων «Φλέγγα», που μου διέθεσε δωρεάν το δευτερογενές πρόβειο τυρόγαλα.

Περιεχόμενα

Περίληψη	iv
1. Εισαγωγή	1
1.1. Βιολογικοί παράγοντες αντιμετώπισης ασθενειών των φυτών – Μύκητες του γένους <i>Trichoderma</i>	1
1.1.1. Γενικά χαρακτηριστικά του γένους <i>Trichoderma</i>	1
1.1.2. Είδος <i>Trichoderma harzianum</i>	1
1.1.3. Μορφολογικά χαρακτηριστικά του μύκητα <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	2
1.1.4. Υλικά κατάλληλα για την ανάπτυξη του μύκητα <i>Trichoderma harzianum</i>	3
1.1.5. <i>Trichoderma harzianum</i> ως παράγοντας βιολογικής καταπολέμησης	3
1.2. Παραπροϊόντα-Αγροτικά προϊόντα βιομηχανίας τροφίμων ως θρεπτικά υποστρώματα μικροοργανισμών	5
2. Υλικά & Μέθοδοι	7
2.1. Καλλιέργεια μύκητα <i>Trichoderma harzianum</i> T-22	7
2.2. Μέτρηση μορφολογικών χαρακτηριστικών	7
2.2.1. Μορφολογικά χαρακτηριστικά κονιδίων	7
2.2.2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά φιαλιδίων	8
2.3. Θρεπτικά υποστρώματα	8
2.3.1. PGA	8
2.3.2. Ζαχαρότευτλο-άγαρ	8
2.3.3. Υπολείμματα χυμού μήλου	8
2.3.4. Δευτερογενές τυρόγαλα-άγαρ	9
2.4. Χαρακτηριστικά αποικιών στα διάφορα υποστρώματα	10
2.4.1. Διάμετρος αποικίας	10
2.5. Βλάστηση σπορίων	11
2.5.1. Βλαστικότητα σπορίων	11
2.5.2. Ανάπτυξη βλαστικού σωλήνα	12
3. Αποτελέσματα	14
4. Συζήτηση	26
5. Συμπεράσματα	28
Βιβλιογραφία	29

Περίληψη

Ο μύκητας *Trichoderma harzianum* T-22 ανήκει στην κατηγορία των σαπροφυτικών μυκήτων και συμβάλλει στην προώθηση της ανάπτυξης των φυτών, καθώς και στην καταπολέμηση φυτοπαθογόνων μυκήτων. Μπορεί να αναπτυχθεί σε πληθώρα θρεπτικών μέσων, λαμβάνοντας ενέργεια κυρίως από πηγές αζώτου και άνθρακα. Ως εκ τούτου, έγινε μελέτη της ανάπτυξής του σε διάφορα παραπροϊόντα, που προκαλούν περιβαλλοντική επιβάρυνση, καθώς και σε αγροτικά προϊόντα για να διαπιστωθεί εάν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτικές πηγές ενέργειας και να αξιοποιηθούν μαζί με τον μύκητα για την ολοκληρωμένη διαχείριση καλλιεργειών.

Σε τέσσερα θρεπτικά υποστρώματα φυτικής και ζωικής προέλευσης και για διάστημα 72 ωρών, ελέγχθηκε η ανάπτυξη του μύκητα *T. harzianum* και καταγράφηκαν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της αποικίας. Την 5^η ημέρα, δημιουργήθηκαν αιωρήματα από τις διάφορες αποικίες και μεταφέρθηκαν σε τρυβλία με τον μάρτυρα. Έπειτα από 11-13 ώρες επώασης, διερευνήθηκε η βλαστικότητα των σπορίων του μύκητα και τέλος, η ικανότητα ανάπτυξης βλαστικού σωλήνα από καλλιέργεια ηλικίας 7 ημερών.

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι η περιεκτικότητα σακχάρων ενός θρεπτικού υποστρώματος, δεν αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την εξάπλωση του αναπτυσσόμενου μυκηλίου. Απεναντίας, η περιεκτικότητα σε άζωτο παρουσίασε συσχέτιση με τον ρυθμό ανάπτυξης της αποικίας του μύκητα. Επιπροσθέτως, η βλαστικότητα των σπορίων έπειτα από 13 ώρες επώασης στους 22,5 °C, σημειώθηκε σε ποσοστό 82-89% και διαπιστώθηκε ότι τα σπόρια του μύκητα, μπορούν να βλαστήσουν επαρκώς και στα τέσσερα θρεπτικά υποστρώματα. Ωστόσο, το μήκος του βλαστικού σωλήνα ήταν μικρότερο στα τρυβλία με τον μάρτυρα και μεγαλύτερο στα δείγματα με ζαχαρότευτλο και τριτογενές τυρόγαλα, τα οποία είχαν παρουσιάσει μικρότερη ανάπτυξη αποικίας. Κατά συνέπεια, όσο μικρότερο ήταν το μήκος του βλαστικού σωλήνα, τόσο μεγαλύτερη και ταχύτερη ήταν η ανάπτυξη της αποικίας του μύκητα.

1. Εισαγωγή

1.1. Βιολογικοί παράγοντες αντιμετώπισης ασθενειών των φυτών – Μύκητες του γένους *Trichoderma*

1.1.1. Γενικά χαρακτηριστικά του γένους *Trichoderma*

Το γένος *Trichoderma* ανήκει στην κατηγορία των σαπροφυτικών μυκήτων και τα διάφορα είδη που το αποτελούν, μπορούν να αναπτυχθούν, είτε πάνω σε βιοτικούς οργανισμούς, είτε στο έδαφος. Τα είδη *Trichoderma* ανιχνεύονται σε ένα μεγάλο εύρος διαφορετικών οικοτόπων καταλαμβάνοντας το μεγαλύτερο ποσοστό της εδαφικής μικροχλωρίδας. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην ανταγωνιστική τους φύση, καθώς και στη διαφοροποίηση που παρουσιάζει η μεταβολική τους ικανότητα. Μολονότι σπάνια υπάρχει αναφορά σε είδη *Trichoderma* που προξενούν ασθένειες σε φυτά, ορισμένα μπορούν να προκαλέσουν μία σημαντική ασθένεια σε εδάδιμα μανιτάρια, συμπεριλαμβανομένου του λευκού μανιταριού *Agaricus bisporus* (Gams & Bissett, 2002; Kredics *et al.*, 2010; Beyer *et al.*, 2017).

Για τα περισσότερα στελέχη των ειδών *Trichoderma*, πιστεύεται πως προέρχονται από κλώνους και μιτωτικές διαιρέσεις, εφόσον δεν έχει παρατηρηθεί εγγενής πολλαπλασιασμός. Γενικότερα, η ταξινόμηση του γένους *Trichoderma* δεν έχει ακόμη ολοκληρωθεί και η διάκριση μεταξύ των διαφόρων ειδών παραμένει αμφίβολη. Μία από τις πρώτες σημαντικές προσπάθειες ήταν εκείνη του Rifai (1969), ο οποίος ανέφερε πως τα 9 taxa που κατέγραψε, δεν προέρχονται μόνο από ένα είδος εγγενούς αναπαραγωγής (Gams & Bissett, 2002).

Τα είδη του γένους *Trichoderma* εμφανίζονται σε όλες τις κλιματικές ζώνες, με αναφορές σε δασικά, καλλιεργούμενα, ερημικά εδάφη, εδάφη λειμώνων και σε αλμυρούς βάλτους. Κυρίως όμως εντοπίζονται σε όξινα εδάφη και παρουσιάζουν μέγιστη ανάπτυξη σε θερμοκρασίες 25-30 °C. Έχουν χαρακτηριστική μυρωδιά που μοιάζει με άρωμα καρύδας, η οποία οφείλεται στην πτητική ουσία 6-pentyl-a-pyrone και μπορεί κανείς να τα ανιχνεύσει εύκολα στα εδάφη όπου εξελίσσεται η ανάπτυξή τους (Klein & Eveleigh, 2002).

1.1.2. Είδος *Trichoderma harzianum*

Το είδος *Trichoderma harzianum* παρουσιάζει ετερογένεια ως προς τη μορφολογία και την ταξινόμησή του, ενώ αποτελεί το πιο κοινό είδος του γένους *Trichoderma*.

Παρουσιάζει σε μεγάλο βαθμό ομοιότητα με τους μύκητες *T. viride*, *T. aureoviride*, *T. atroviride* και *T. koningii*, γεγονός που δικαιολογεί τη δύσκολη διάκρισή τους πριν τη χρήση μοριακών μεθόδων (Lieckfeldt *et al.*, 2002). Ο μύκητας *Hypocrea lixii* αποτελεί την εγγενή μορφή του είδους *T. harzianum*, ενώ ταυτόχρονα, δε μπορεί να αναπτυχθεί με καλλιέργεια σε συνθήκες εργαστηρίου (Samuels, 2006).

Ορισμένα στελέχη του μύκητα *T. harzianum* επιβραδύνουν την απόδοση εδώδιμων μανιταριών, ενώ άλλα στελέχη χρησιμοποιούνται για τη βιολογική καταπολέμηση φυτοπαθογόνων μυκήτων (Lieckfeldt *et al.*, 2002). Για παράδειγμα, έχει διαπιστωθεί ότι ο μύκητας *T. harzianum*, θα μπορούσε να αποτελέσει εναλλακτικό τρόπο καταπολέμησης των ασθενειών των παθογόνων μυκήτων *S. rolfsii* και *R. solani*, είτε σε συνθήκες αγρού, είτε θερμοκηπίου (Elad *et al.*, 1980).

Η μεγάλη ετερογένεια του είδους *T. harzianum*, συνδέεται συχνά με διαφορές που παρατηρούνται κατά την ανταγωνιστική ή αντιβιοτική του δράση (Lieckfeldt *et al.*, 2002). Σύμφωνα με τον Morrell (1990), η αντιβιοτική δράση του μύκητα, οφείλεται στην έκκριση πτητικών αντιβιοτικών ουσιών που αποτρέπουν τη δημιουργία σήψεων ξύλου. Επιπλέον, διαπίστωσε ότι μπορεί να παρεμποδίσει τη δράση άλλων φυτοπαθογόνων μυκήτων σε ποσοστό έως και 60% (Lieckfeldt *et al.*, 2002; Tataranni *et al.*, 2012).

Ο μύκητας *T. harzianum* ευδοκίμει κυρίως σε θερμό κλίμα (Danielson & Davey, 1973) με τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης να κυμαίνεται στους 30 °C, ενώ το μέγιστο να παρατηρείται κοντά στους 36 °C. Παρόλα αυτά, μπορεί να παρατηρηθεί βλάστηση στους 5 °C όπως και στους 37 °C, χωρίς όμως να παρουσιάσει περαιτέρω ανάπτυξη (Pitt & Hocking, 2009).

1.1.3. Μορφολογικά χαρακτηριστικά του μύκητα *Trichoderma harzianum* Rifai

Το μυκήλιο του *T. harzianum* έχει λευκό έως κίτρινο χρώμα, που επεκτείνεται, είτε δημιουργώντας ανομοιόμορφο περίγραμμα, είτε με τη μορφή απομονωμένων ευδιάκριτων αποικιών. Παράλληλα, οι κονιδιοφόροι του χαρακτηρίζονται για τις διακλαδιζόμενες δομές τους. Η υφή του μύκητα που διακλαδίζεται, φέρει ξανά διακλαδώσεις, πάνω στις οποίες σχηματίζονται -σε ακανόνιστη μορφή- τα *φιαλίδια* (Pitt & Hocking, 2009). Τα φιαλίδια εξαπλώνονται ακανόνιστα στο χώρο, συνήθως 3-4 σε μορφή σπείρας και πιο σπάνια σε ζεύγη (Gams & Bissett, 2002). Έχουν τη μορφή αμπούλας με διαστάσεις 5-7 × 3,0-3,5 μm, ενώ εκείνα που βρίσκονται στην κορυφή των κονιδιοφόρων παρουσιάζουν μεγαλύτερο μέγεθος. Τα φιαλιδόσπορια

(κονίδια) που φέρει το κάθε φιαλίδιο είναι μονήρη και όχι σε μορφή αλυσίδας. Έχουν λεία τοιχώματα και το σχήμα τους είναι υποσφαιροειδές, σφαιροειδές ή ελλειψοειδές, με διάμετρο 2,5-3,2(-4,0) μm (Pitt & Hocking, 2009). Τέλος, το χρώμα τους είναι υαλώδες έως ανοικτό πράσινο (Gams & Bissett, 2002).

Σε αντίθεση με τα παραπάνω, υπάρχουν ορισμένες απομονώσεις όπου μπορεί να παρατηρηθούν και μεμονωμένα αλευροσπόρια (aleurioconidia) με σφαιροειδές έως ελλειψοειδές σχήμα και διάμετρο μήκους 6-8 μm. Καθώς αναπτύσσονται οι υφές των αλευροσπορίων, παράγονται κονιδιοφόροι σε μορφή «πυραμίδας», με τη βάση αυτών να είναι πολυ-διακλαδιζόμενη και την κορυφή τους να φέρει συνήθως ένα μεμονωμένο φιαλίδιο (Pitt & Hocking, 2009).

1.1.4. Υλικά κατάλληλα για την ανάπτυξη του μύκητα *Trichoderma harzianum*

Το γένος *Trichoderma*, μπορεί να αναπτυχθεί σε ποικίλα θρεπτικά υποστρώματα διαφορετικής σύστασης. Σε αυτά κατατάσσονται πηγές αζώτου και άνθρακα, όπως είναι το αμμώνιο και η κυτταρίνη αντίστοιχα. Παρόλα αυτά, σε δασικά εδάφη έχει μειωμένη ικανότητα αποδόμησης ξύλου και κατά συνέπεια κατατάσσεται ως μύκητας μαλακής σήψης (Klein & Eveleigh, 2002).

Η απομόνωση και η παρατήρηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών του γένους *Trichoderma*, γίνεται σε διάφορα θρεπτικά μέσα, όπως είναι το malt extract agar (MEA) και το potato dextrose agar (PDA) (Hoyos-Carvajal & Bissett, 2011), με το τελευταίο να θεωρείται το καλύτερο υπόστρωμα για την ταυτοποίηση των ειδών *Trichoderma* ύστερα από 3-4 ημέρες ανάπτυξης. Αντίθετα, το θρεπτικό υπόστρωμα G25N (25% glycerol nitrate agar) δεν ενδείκνυται για εφαρμογή στο είδος *Trichoderma harzianum*, καθώς έχει παρατηρηθεί μειωμένη ανάπτυξη του μύκητα (Pitt & Hocking, 2009).

1.1.5. *Trichoderma harzianum* ως παράγοντας βιολογικής καταπολέμησης

Διάφορα είδη του γένους *Trichoderma* διαθέτουν κάποιες χαρακτηριστικές ιδιότητες, οι οποίες τα καθιστούν ιδανικά για εφαρμογή στα προγράμματα βιολογικής αντιμετώπισης κατά των παθογόνων των φυτών. Σε αυτές κατατάσσονται η απελευθέρωση εξωκυτταρικών υδρολυτικών ενζύμων, ο ανταγωνισμός για θρεπτικά στοιχεία και η παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών που -σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις- είναι τοξικοί σε ορισμένους φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς (Mathivanan *et al.*, 2008). Επιπλέον, μεταξύ και άλλων μυκήτων, τα είδη

Trichoderma είναι υπεύθυνα και για την επαγωγή των μηχανισμών άμυνας από τα φυτά-ξενιστές (van Loon, 1998; Mathivanan *et al.*, 2008). Ειδικότερα, το είδος *Trichoderma harzianum*, παράγει έναν αριθμό από αντιβιοτικά πεπτίδια που παρεμποδίζουν την ανάπτυξη φυτοπαθογόνων μυκήτων, όταν αλληλεπιδρούν με τις κυτταρικές τους μεμβράνες (Tataranni *et al.*, 2012).

Εν τούτοις, ορισμένα στελέχη του *T. harzianum*, παρόλο που παρεμποδίζουν την ανάπτυξη ασθενειών, δεν μπορούν να προσαρμοστούν εύκολα σε ορισμένα είδη παθογόνων και φυτών. Με αφορμή τα παραπάνω δεδομένα, ερευνητές του Πανεπιστημίου Κορνέλ, δημιούργησαν το υβριδικό στέλεχος T-22, το οποίο προσαρμόζεται σε μεγαλύτερο εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών και έχει ενισχυμένη ευρωστία. Το στέλεχος T-22, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη ενάντια σε προσβολές του ριζικού συστήματος από παθογόνους μύκητες των γενών *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Fusarium* και *Thielaviopsis* (Tataranni *et al.*, 2012). Για παράδειγμα, έχει διαπιστωθεί ότι μπορεί να μειώσει κατά 42% τη δράση του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* που προκαλεί αδρομύκωση σε φυτά τομάτας (Yigit & Dikilitas, 2007).

Οι κύριες εφαρμογές του T-22, είναι η προστασία δια του ανταγωνισμού του ριζικού συστήματος ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς. Ο μύκητας, αναπτύσσεται στη ριζόσφαιρα του φυτού-ξενιστή και έτσι, καταλαμβάνοντας εκείνη την οικοθέση, προστατεύει το φυτό. Καθώς το φυτό αναπτύσσεται, ο μύκητας τρέφεται από τα παραγόμενα προϊόντα καταβολισμού και λαμβάνοντας ενέργεια, συνεχίζει να εξαπλώνεται στις ρίζες του φυτού-ξενιστή. Συγχρόνως, απορροφά τα θρεπτικά στοιχεία, τα οποία σε διαφορετική περίπτωση θα ήταν διαθέσιμα στους παθογόνους μύκητες (Tataranni *et al.*, 2012). Στην περίπτωση όμως, που η εφαρμογή του βιολογικού σκευάσματος T-22 γίνει αφότου οι φυτικοί ιστοί έχουν προσβληθεί από κάποιον μικροοργανισμό, τότε το φυτό δε θα μπορέσει να αφομοιώσει όλες τις ευεργετικές ιδιότητες του *T. harzianum* (Harman, 2000).

Πιο συγκεκριμένα, το στέλεχος T-22 απελευθερώνει το υδρολυτικό ένζυμο χιτινάση (Harman, 2004) το οποίο είναι υπεύθυνο για την αποδιοργάνωση της χιτίνης στα κυτταρικά τοιχώματα των ξενιστών. Με αυτό τον τρόπο, μπορούν να αποικοδομηθούν οι παθογόνοι μύκητες που προκαλούν σήψεις ριζών και στη συνέχεια να αποτελέσουν τροφή άλλων οργανισμών του εδάφους. Παράλληλα, τα είδη *Trichoderma* μπορούν άμεσα να προσβάλλουν και να παρασιτήσουν σε άλλους μύκητες. Ως επακόλουθο, το ριζικό σύστημα γίνεται πιο αποτελεσματικό, καθώς έχει

εξαπλωθεί περισσότερο στο έδαφος και μπορεί να χρησιμοποιήσει τα θρεπτικά στοιχεία και το νερό με πιο αποδοτικό τρόπο (Tataranni *et al.*, 2012).

Γενικότερα, οι ευεργετικές ιδιότητες του στελέχους T-22 δεν σχετίζονται μόνο με τον έλεγχο των ασθενειών, αλλά και με το ίδιο το φυτό, καθώς μπορεί να ενισχύσει την ανάπτυξή του και την αύξηση του μεγέθους της ρίζας (Harman, 2000). Συγκεκριμένα, η εφαρμογή του είναι δυνατό να οδηγήσει στην παραγωγή μεγαλύτερων μίσχων και φύλλων και στη γρηγορότερη ανάπτυξη του ριζικού συστήματος (Sofa *et al.*, 2011). Κατά συνέπεια, μειώνεται η ανάγκη για εφαρμογές μυκητοκτόνων, λίπανσης, καθώς και ο χρόνος παραμονής του φυτού στο φυτώριο (Tataranni *et al.*, 2012).

1.2. Παραπροϊόντα-Αγροτικά προϊόντα βιομηχανίας τροφίμων ως θρεπτικά υποστρώματα μικροοργανισμών

Τα διάφορα αγροτικά παραπροϊόντα που είναι απόρροια της βιομηχανίας τροφίμων, προκαλούν περιβαλλοντική επιβάρυνση στις περιοχές όπου εναποτίθενται, δημιουργώντας με αυτό τον τρόπο αρνητικές επιδράσεις στο οικοσύστημα (Koutinas *et al.*, 2009; Shalini & Gupta, 2009). Παράλληλα όμως, μπορούν να αποτελέσουν φθηνή πηγή υδατανθράκων για τις ζυμώσεις μυκήτων και την αξιοποίησή τους για ποικίλες εφαρμογές (Cohen & Hadar, 2001). Για παράδειγμα, το τυρόγαλα που προκύπτει από παρασκευή γιαουρτιού, μπορεί να ωφελήσει στη μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα *Hericium erinaceum*, ως εναλλακτική πηγή αζώτου (Asada *et al.*, 2012). Ακόμη, η σκόνη τυρογάλακτος είναι δυνατό να επιταχύνει το ρυθμό μικροβιακών ζυμώσεων· εφόσον διαθέτει τα απαραίτητα συστατικά για τη μικροβιακή τους ανάπτυξη (Akpinar-Bayizit *et al.*, 2016).

Τα παραπροϊόντα φυτικής προέλευσης έχουν επίσης ένα μεγάλο εύρος προοπτικών και εφαρμογών. Αναφορικά, το εκχύλισμα υπολειμμάτων χυμού μήλου, που περιέχει αναγωγικά σάκχαρα, μπορεί να αποτελέσει εναλλακτικό θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη διαφόρων μικροοργανισμών (Streit *et al.*, 2009). Πιο συγκεκριμένα, για τον μύκητα *Trichoderma harzianum*, σε έρευνα που έχει γίνει για το χρόνο διαβίωσης (στέλεχος NBPI 1055), καθώς και για την πυκνότητα του πληθυσμού του σε διαφορετικά γεωργικά απόβλητα, αποδείχθηκε πως όλα τα υποστρώματα μπορούσαν να οδηγήσουν σε επαρκή αύξηση του μύκητα. Τα γεωργικά απόβλητα περιελάμβαναν προϊόντα κομποστοποίησης, περιβλήματα ρυζιού, άλευρο αραβόσιτου,

χρησιμοποιημένα φύλλα τσαγιού, ψευδοβλαστούς μπανάνας, υπολείμματα από στάχυ αραβόσιτου, πριονίδι, πίτουρο σίτου, κόκκους σόργου και πίτουρο-πριονίδι σίτου. Έπειτα από 30 ημέρες επώασης, παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα με φύλλα τσαγιού παρουσίασαν τα καλύτερα αποτελέσματα (8×10^8 cfu*/g), ενώ ο μύκητας είχε αναπτυχθεί λιγότερο στο υπόστρωμα από πριονίδι ($4,4 \times 10^6$ cfu/g) (Singh *et al.*, 2007).

Σκοπός της τρέχουσας πτυχιακής εργασίας, ήταν η αναγκαιότητα για περαιτέρω έρευνα της ανάπτυξης του εδαφογενούς μύκητα *Trichoderma harzianum* T-22, σε διάφορα παραπροϊόντα που προκαλούν περιβαλλοντική ρύπανση, καθώς και σε αγροτικά προϊόντα. Η συμβίωση του μύκητα σε ανάλογες πηγές ενέργειας, θα μπορούσε να αποτελέσει εναλλακτικό τρόπο για την ολοκληρωμένη διαχείριση διαφόρων καλλιεργειών.

*cfu (colony forming unit): μονάδα σχηματισμού αποικιών.

2. Υλικά & Μέθοδοι

2.1. Καλλιέργεια μύκητα *Trichoderma harzianum* T-22

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό σκεύασμα Trianum-P (KOPPERT Biological Systems), το οποίο περιέχει σπόρια του στελέχους T-22 του μύκητα *T. harzianum*.

Αρχικά, έγινε καλλιέργεια του μύκητα και χρησιμοποιήθηκαν, 2 g σκευάσματος Trianum-P και 1 mL αποστειρωμένου νερού ανά g σκευάσματος. Από το αιώρημα που δημιουργήθηκε, μεταφέρθηκε 0,5 mL σε συνολικά 2 τρυβλία Petri (90x15 mm) με PGA. Σε ένα άλλο φιαλίδιο, προστέθηκαν 10 mL απιονισμένου-αποστειρωμένου νερού και 1 g σκευάσματος. Έπειτα από ανάδευση του αιωρήματος, έγινε μεταφορά 1 mL στο κέντρο 3 τρυβλίων και ακολούθησε διασπορά τους με λυγισμένη, σε γωνία 90 μοιρών, υάλινη ράβδο. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκε 1 mL αιωρήματος σε γυάλινο φιαλίδιο με 9 mL απιονισμένου-αποστειρωμένου νερού. Η διαδικασία επαναλήφθηκε έως ότου η τελική συγκέντρωση να είναι ίση με 10^{-4} g σκευάσματος/mL. Για τις συγκεντρώσεις 10^{-1} έως 10^{-4} g/mL έγιναν 3 επαναλήψεις. Τέλος, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης (στους 20 °C).

2.2. Μέτρηση μορφολογικών χαρακτηριστικών

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που παρατηρήθηκαν και καταγράφηκαν, αφορούσαν τα κονίδια και τα φιαλίδια του μύκητα.

2.2.1. Μορφολογικά χαρακτηριστικά κονιδίων

Για τη μέτρηση των διαστάσεων των σπορίων του μύκητα *T. harzianum* T-22, έγινε παρασκεύασμα από καλλιέργεια ηλικίας 6 ημερών, που διατηρούνταν σε PGA (potato glucose agar) και σε συνθήκες σκότους στους 20 °C. Για την παρατήρηση των σπορίων και τη λήψη φωτογραφιών, χρησιμοποιήθηκε το οπτικό μικροσκόπιο Nikon Japan (Labophot-2) με ενσωματωμένη κάμερα Moticam 10.0 MP. Παράλληλα, έγινε λήψη φωτογραφιών και από αντικειμενοφόρο πλάκα βαθμονόμησης Motiic (calibration slide), έτσι ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση και ακριβής μέτρηση των διαστάσεων. Συνολικά, μετρήθηκε η διάμετρος 30 σπορίων που επιλέχθηκαν κατά τυχαίο τρόπο και για κάθε κονίδιο πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις. Οι παραπάνω

μετρήσεις και η επεξεργασία των εικόνων έγιναν μέσω του προγράμματος Motic Images Plus 2.0.

2.2.2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά φιαλιδίων

Για τη μέτρηση των διαστάσεων των φιαλιδίων του στελέχους T-22, έγιναν διάφορα παρασκευάσματα από καλλιέργεια ηλικίας 5 ημερών, που διατηρούνταν σε PGA και σε συνθήκες σκότους στους 20 °C. Συνολικά, μετρήθηκε το μήκος και το πλάτος 30 φιαλιδίων. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν όμοια με εκείνη στις μετρήσεις των κονιδίων.

2.3. Θρεπτικά υποστρώματα

Τα θρεπτικά υποστρώματα που επιλέχθηκαν για την ανάπτυξη του μύκητα *T. harzianum* T-22 ήταν συνολικά τέσσερα. Συγκεκριμένα, το ένα από αυτά ήταν το PGA (potato glucose agar), που αποτέλεσε το πρότυπο θρεπτικό υπόστρωμα και βάσει του οποίου έγινε η σύγκριση. Τα υπόλοιπα θρεπτικά υποστρώματα ήταν είτε φυτικής είτε ζωικής προέλευσης.

2.3.1. PGA

Για την παρασκευή 100 mL PGA, χρησιμοποιήθηκαν 20 g πατάτας, 1,5 g άγαρ, 1,65 g ένυδρης γλυκόζης (MERCK) και 100 mL απιονισμένου νερού.

2.3.2. Ζαχαρότευτλο-άγαρ

Το θρεπτικό υπόστρωμα από ρίζες ζαχαρότευτλου, μεταχειρίστηκε όπως και το PGA, παραλείποντας όμως την προσθήκη γλυκόζης. Έγινε πλύσιμο των ζαχαρότευτλων και κοπή σε μικρά κομμάτια (περίπου 1x1 cm). Για την παρασκευή 100 mL θρεπτικού υποστρώματος, χρησιμοποιήθηκαν 20 g ζαχαρότευτλου, 1,5 g άγαρ και 100 mL απιονισμένου νερού. Έπειτα από την παραγωγή της επιθυμητής ποσότητας, έγινε αποστείρωση και τέλος προσθήκη περίπου 10 mL σε κάθε τρυβλίο.

2.3.3. Υπολείμματα χυμού μήλου

Για την παρασκευή υπολειμμάτων χυμού μήλου, χρησιμοποιήθηκαν μήλα ποικιλίας στάρκιν. Τα φρούτα πλύθηκαν με νερό βρύσης για την αφαίρεση ξένων

υλικών και αξιοποιήθηκε μόνο το βρώσιμο μέρος, έχοντας αφαιρεθεί το ενδοκάρπιο με τους σπόρους και το στέλεχος. Για την παραγωγή χυμού και τη λήψη του θρεπτικού υποστρώματος, χρησιμοποιήθηκε οικιακός αποχυμωτής, από τον οποίο τα υπολείμματα συλλέχθηκαν σε πλαστικές σακούλες τροφίμων. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη στους $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, έως ότου χρησιμοποιηθούν και γίνει απόψυξη του υλικού.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε, βασίστηκε σε έρευνα των Singh *et al.* (2007) για τα θρεπτικά υποστρώματα. Αρχικά, ζυγίστηκαν 18 g θρεπτικού υποστρώματος και μεταφέρθηκαν σε Petri τρυβλία (90x15 mm). Η επίστρωση έγινε με τη χρήση γλωσσοπίεστρας (Εικόνα 2.1) και ακολούθησε αποστείρωση σε χύτρα ταχύτητας για 40 λεπτά. Προτού γίνει εμβολιασμός με τον μύκητα, τα τρυβλία με το θρεπτικό υπόστρωμα αφέθηκαν να κρυσώσουν σε θερμοκρασία δωματίου.



Εικόνα 2.1. Θρεπτικό υπόστρωμα από υπολείμματα χυμού μήλου προτού γίνει αποστείρωση.

2.3.4. Δευτερογενές τυρόγαλα-άγαρ

Για την παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος τυρογάλακτος-άγαρ, χρησιμοποιήθηκε πρόβειο (κατά 90%) δευτερογενές τυρόγαλα, το οποίο διατέθηκε από τοπικό κατάστημα τυροκομικών-γαλακτοκομικών προϊόντων. Το δευτερογενές τυρόγαλα τοποθετήθηκε σε κατάψυξη στους $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, έως ότου χρησιμοποιηθεί.

Για τη δημιουργία 100 mL, απαιτήθηκαν συνολικά 150 mL δευτερογενούς τυρογάλακτος που μετατράπηκε σε τριτογενές, 50 mL απιονισμένου νερού και 1,5 g άγαρ. Αρχικά, το τυρόγαλα μεταφέρθηκε σε μία κωνική φιάλη, ενώ σε μία άλλη προστέθηκαν το άγαρ με το απιονισμένο νερό. Τα δύο διαλύματα αποστειρώθηκαν

για 40 λεπτά σε χύτρα ταχύτητας και στη συνέχεια, έγινε διαχωρισμός υγρής-στερεής φάσης του τυρογάλακτος με μουσελίνα και ογκομετρήθηκε ποσότητα 50 mL (τριτογενές τυρόγαλα). Επομένως, η τελική αναλογία τυρογάλακτος και διαλύματος άγαρ (1,5% w/v) ήταν 1:1. Στη συνέχεια, η επιθυμητή ποσότητα τυρογάλακτος αναμείχθηκε με το διάλυμα νερού-άγαρ και τέλος, έγινε επίστρωση περίπου 10 mL σε γυάλινα τρυβλία Petri.

Την ίδια ημέρα χρησιμοποιήθηκαν 3 τρυβλία και τα υπόλοιπα τοποθετήθηκαν στη συντήρηση (4 °C) για τις επόμενες επαναλήψεις.

2.4. Χαρακτηριστικά αποικιών στα διάφορα υποστρώματα

Τα κύρια χαρακτηριστικά του μύκητα *T. harzianum* που αξιολογήθηκαν, περιελάμβαναν την ανάπτυξη διαμέτρου αποικίας, τη βλαστικότητα των παραγόμενων σπορίων, καθώς και την ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα.

2.4.1. Διάμετρος αποικίας

Για τον έλεγχο της ανάπτυξης του *T. harzianum* T-22 σε κάθε θρεπτικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε καλλιέργεια ηλικίας 2 ημερών που αναπτυσσόταν στους 20 °C. Σύμφωνα με σχετικό πρωτόκολλο (Aneja, 2005), έγινε μεταφορά μυκηλιακού δίσκου διαμέτρου 5 mm από την περιφέρεια της αναπτυσσόμενης αποικίας, με χρήση φελλοτρυπητήρα. Οι μυκηλιακοί δίσκοι τοποθετήθηκαν στην άκρη των τρυβλίων.

Για κάθε θρεπτικό υπόστρωμα πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις του πειράματος. Σε κάθε πείραμα έγιναν 2 μεταχειρίσεις, με τη μία να αποτελεί τον μάρτυρα με 3 επαναλήψεις και την άλλη το θρεπτικό υποστρώματα που θα γινόταν η σύγκριση. Όλα τα τρυβλία με τους μυκηλιακούς δίσκους σφραγίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 25,5 °C. Στη συνέχεια και έπειτα από 24, 48 και 72 ώρες, έγινε η μέτρηση του ποσοστού ανάπτυξης μυκηλίου (mm/ημέρα) με μιλιμετρέ χαρτί. Για κάθε τρυβλίο, μετρήθηκε η έκταση 3 τυχαίων ακτινών και υπολογίστηκε ο μέσος όρος για κάθε αποικία. Στα δείγματα με υπολείμματα χυμού μήλου, χρησιμοποιήθηκε στερεοσκόπιο Nikon (SMZ-U), καθώς ήταν δύσκολη η διάκριση του περιγράμματος των αποικιών. Τέλος, σημειώθηκε και ο χρόνος

σχηματισμού πράσινης καρποφορίας, για τα θρεπτικά υποστρώματα όπου ήταν εμφανής.

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη μέθοδο του γενικού γραμμικού υποδείγματος, μέσω του προγράμματος SPSS (IBM SPSS Inc, Armonk, NY).

2.5. Βλάστηση σπορίων

2.5.1. Βλαστικότητα σπορίων

Η βλαστικότητα των σπορίων του *T. harzianum* T-22' ελέγχθηκε και για τα τέσσερα θρεπτικά υποστρώματα, έπειτα από τη λήξη των πειραμάτων ανάπτυξης αποικίας. Για κάθε επανάληψη του πειράματος, χρησιμοποιήθηκαν 2 τρυβλία με αποικία ηλικίας 4 ημερών, που διατηρούνταν σε PGA και σε κάποιο άλλο θρεπτικό υπόστρωμα στους 25,5 °C. Αρχικά, δημιουργήθηκε εναιώρημα σπορίων, για κάθε ένα από τα 2 τρυβλία με την αναπτυσσόμενη αποικία. Μετέπειτα, έγινε μέτρηση των σπορίων σε αιματοκυτταρόμετρο (Neubauer improved bright-line), καθώς και οι κατάλληλες αραιώσεις ώστε να μην υπάρχει μεγάλη απόκλιση μεταξύ της συγκέντρωσης σπορίων των δύο εναιωρημάτων. Η ελάχιστη και μέγιστη συγκέντρωση σπορίων για όλες τις επαναλήψεις, ήταν αντίστοιχα $1,17 \times 10^6$ σπόρια/mL και $4,66 \times 10^6$ σπόρια/mL. Οι μετρήσεις έγιναν με οπτικό μικροσκόπιο Meiji Techno (MX4200H) σε μεγέθυνση 100X.

Σε 1 τρυβλίο με PGA μεταφέρθηκαν 3 σταγόνες (50 μl) του εναιωρήματος από καλλιέργεια μύκητα σε PGA και σε άλλο 1 τρυβλίο μεταφέρθηκαν σταγόνες εναιωρήματος από ανάπτυξη στο εξεταζόμενο θρεπτικό μέσο. Για κάθε μεταχείριση πραγματοποιήθηκαν συνολικά 3 επαναλήψεις του πειράματος. Τα τρυβλία μεταφέρθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 25,5 °C και έπειτα από 7 έως 13 ώρες έγινε λήψη φωτογραφιών για τη συλλογή των απαιτούμενων παρατηρήσεων. Η λήψη φωτογραφιών πραγματοποιήθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο Nikon (Laborhot-2) με ενσωματωμένη κάμερα Moticam 10.0 MP και σε μεγέθυνση 200X ή 400X. Από κάθε τρυβλίο, μετρήθηκαν κατά τυχαίο τρόπο τουλάχιστον 100 σπόρια και υπολογίστηκε το ποσοστό εκείνων που έχουν βλαστήσει από κάθε επανάληψη. Η βλάστηση ενός σπορίου λαμβάνεται υπόψη από τη στιγμή που ο βλαστικός σωλήνας έχει μήκος ίσο ή και μεγαλύτερο της μεγαλύτερης διαμέτρου του (Χατζηδημόπουλος, 2014).

Όπως και με την ανάπτυξη αποικίας, η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη μέθοδο του γενικού γραμμικού υποδείγματος, μέσω του προγράμματος SPSS (IBM SPSS Inc, Armonk, NY).

2.5.2. Ανάπτυξη βλαστικού σωλήνα

Τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για να παρατηρηθεί η ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα, ήταν το PGA, το ζαχαρότευτλο-άγαρ και το τυρόγαλα-άγαρ. Στο θρεπτικό υπόστρωμα από υπολείμματα χυμού μήλου, δεν ήταν δυνατό να γίνει το συγκεκριμένο πείραμα, καθώς το σκουρόχρωμο υπόστρωμα δεν επέτρεπε τη διέλευση του φωτός για τις απαιτούμενες παρατηρήσεις.

Χρησιμοποιήθηκε καλλιέργεια *T. harzianum* T-22 ηλικίας 7 ημερών που διατηρούταν σε θάλαμο επώασης (20 °C), σε συνθήκες σκότους και αναπτυσσόταν σε θρεπτικό υπόστρωμα PGA. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε προέκυψε από συνδυασμό διαφόρων πρωτοκόλλων. Αρχικά, στο τρυβλίο με την αποικία του μύκητα, έγινε προσθήκη 10 mL απιονισμένου νερού με ογκομετρικό κύλινδρο, (Χατζηδημόπουλος, 2014) και με απαλό ξύσιμο με μικροβιολογικό κρίκο, συλλέχθηκαν σπόρια από την επιφάνεια της καρποφορίας (Wibowo, 1999). Η διαδικασία επαναλήφθηκε ακόμη μία φορά. Στη συνέχεια, με χρήση αποστειρωμένης διπλής μουσελίνας έγινε διαχωρισμός των σπορίων από το μυκήλιο και το PGA και το εναιώρημα μεταφέρθηκε σε ποτήρι ζέσεως 50 mL (Fungal Bioinformatics and Genetics Research, 2008). Από το εναιώρημα των σπορίων, λήφθηκαν δύο σταγόνες που τοποθετήθηκαν σε αιματοκυτταρόμετρο (Neubauer improved bright-line) και στη συνέχεια έγιναν οι μετρήσεις σε οπτικό μικροσκόπιο Meiji Techno (MX4200H) με μεγέθυνση 100X. Η τελική συγκέντρωση ήταν 1×10^6 σπόρια/mL.

Αφού δημιουργήθηκε το εναιώρημα με την επιθυμητή συγκέντρωση σπορίων χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή στα 4 τρυβλία. Στην άκρη κάθε τρυβλίου, τοποθετήθηκαν 3 σταγόνες (50 μ L) και το τρυβλίο ανασηκώθηκε δημιουργώντας κεκλιμένο επίπεδο, ώστε η σταγόνα να κυλήσει σε όλο το μήκος του και να σχηματιστούν 3 παράλληλες ζώνες (Χατζηδημόπουλος, 2014). Τέλος, τα τρυβλία μεταφέρθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 25,5 °C.

Η εξέταση των σπορίων και της ανάπτυξης του βλαστικού σωλήνα, γινόταν ανά 1 ώρα για τις πρώτες 7-14 ώρες, σε οπτικό μικροσκόπιο Nikon (Labophot-2) με ενσωματωμένη κάμερα Moticam 10.0 MP. Η μέτρηση του βλαστικού σωλήνα γινόταν προτού γίνει διακλάδωση της υφής. Για τη σύγκριση και ακριβή μέτρηση των

διαστάσεων των βλαστικών σωλήνων, έγινε λήψη φωτογραφιών και από αντικειμενοφόρο πλάκα βαθμονόμησης Motic (calibration slide). Συνολικά μετρήθηκε το μήκος και πλάτος 300 βλαστικών σωλήνων (50 βλαστικοί σωλήνες/τροβλίο). Για κάθε βλαστικό σωλήνα πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις του πλάτους του και μία για τη μέτρηση του μήκους του. Οι παραπάνω μετρήσεις έγιναν με τη βοήθεια του λογισμικού Motic Images Plus 2.0., ενώ για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSS και συγκεκριμένα οι μέθοδοι t-test και το γενικό γραμμικό υπόδειγμα (GLM).

3. Αποτελέσματα

3.1. Καλλιέργεια μύκητα *Trichoderma harzianum* T-22

Στον παρακάτω πίνακα, παρατίθενται οι παρατηρήσεις που λήφθηκαν μακροσκοπικά από την 4^η έως και την 8^η ημέρα επώασης στους 20 °C. Αρχικά, εμφανίζεται ανάπτυξη λευκού μυκηλίου στα τρυβλία με συγκεντρώσεις 1 g σκευάσματος/mL, 10⁻¹ g/mL και 10⁻³ g/mL και σταδιακός μεταχρωματισμός του θρεπτικού υποστρώματος από υποκίτρινο σε πορτοκαλί χρώμα.

Πίνακας 3.1. Χαρακτηριστικά του μύκητα *T. harzianum* T-22 σε PGA με διαφορετικές συγκεντρώσεις σκευάσματος έπειτα από 3 έως 7 ημέρες επώασης (20 °C).

Συγκέντρωση σκευάσματος Ημέρα	1 g/mL	10 ⁻¹ g/mL	10 ⁻² g/mL	10 ⁻³ g/mL
4 ^η	Ανάπτυξη λευκού μυκηλίου		-	Ανάπτυξη λευκού μυκηλίου
	Μεταχρωματισμός θρεπτικού υποστρώματος			
5 ^η	-	Εμφάνιση πράσινης καρποφορίας	Ανάπτυξη λευκού μυκηλίου	-
			Μεταχρωματισμός θρεπτικού υποστρώματος	
6 ^η	Εμφάνιση πράσινης καρποφορίας		Εμφάνιση πράσινης καρποφορίας	
7 ^η				
8 ^η	Ανάπτυξη νέου λευκού μυκηλίου			

Στην εικόνα 3.1. φαίνεται ο μεταχρωματισμός του θρεπτικού υποστρώματος και η ανάπτυξη του μύκητα σε τρυβλίο με συγκέντρωση 1 g σκευάσματος/mL κατά τη 10^η ημέρα.

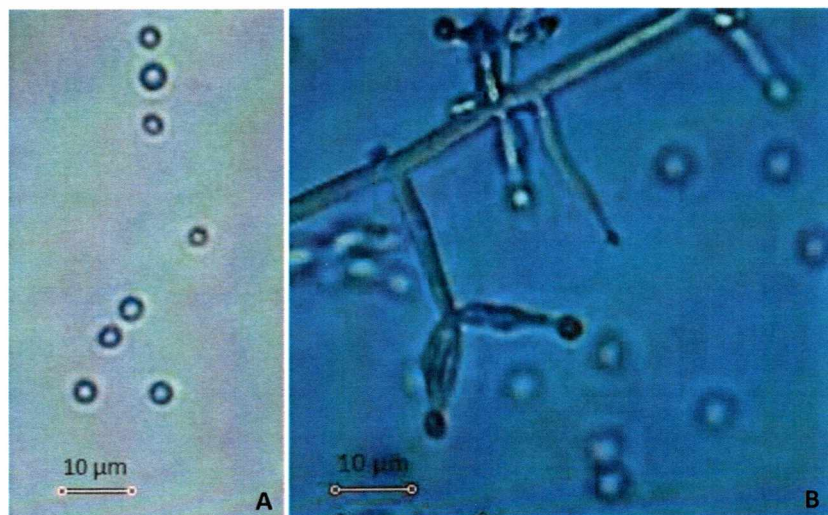


Εικόνα 3.1. Ανάπτυξη του μύκητα *T. harzianum* σε PGA τη 10^η ημέρα έπειτα από επώαση στους 20 °C και σε συνθήκες σκότους.

3.2. Μετρήσεις Μορφολογικών Χαρακτηριστικών

3.2.1. Διαστάσεις κονιδίων και φιαλιδίων

Τα κονίδια που μετρήθηκαν, είχαν κατά μέσο όρο διάμετρο 3,7 μm (2,8-4,9 μm), όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.2. Ακόμη, τα φιαλίδια είχαν κατά μέσο όρο μήκος και πλάτος 2,2 × 11,7 μm. Η ελάχιστη και μέγιστη τιμή του μήκους των φιαλιδίων ήταν 6,6-34,8 μm, ενώ το εύρος του πλάτους των φιαλιδίων ήταν 1,4-3,3 μm (Εικόνα 3.2.B).

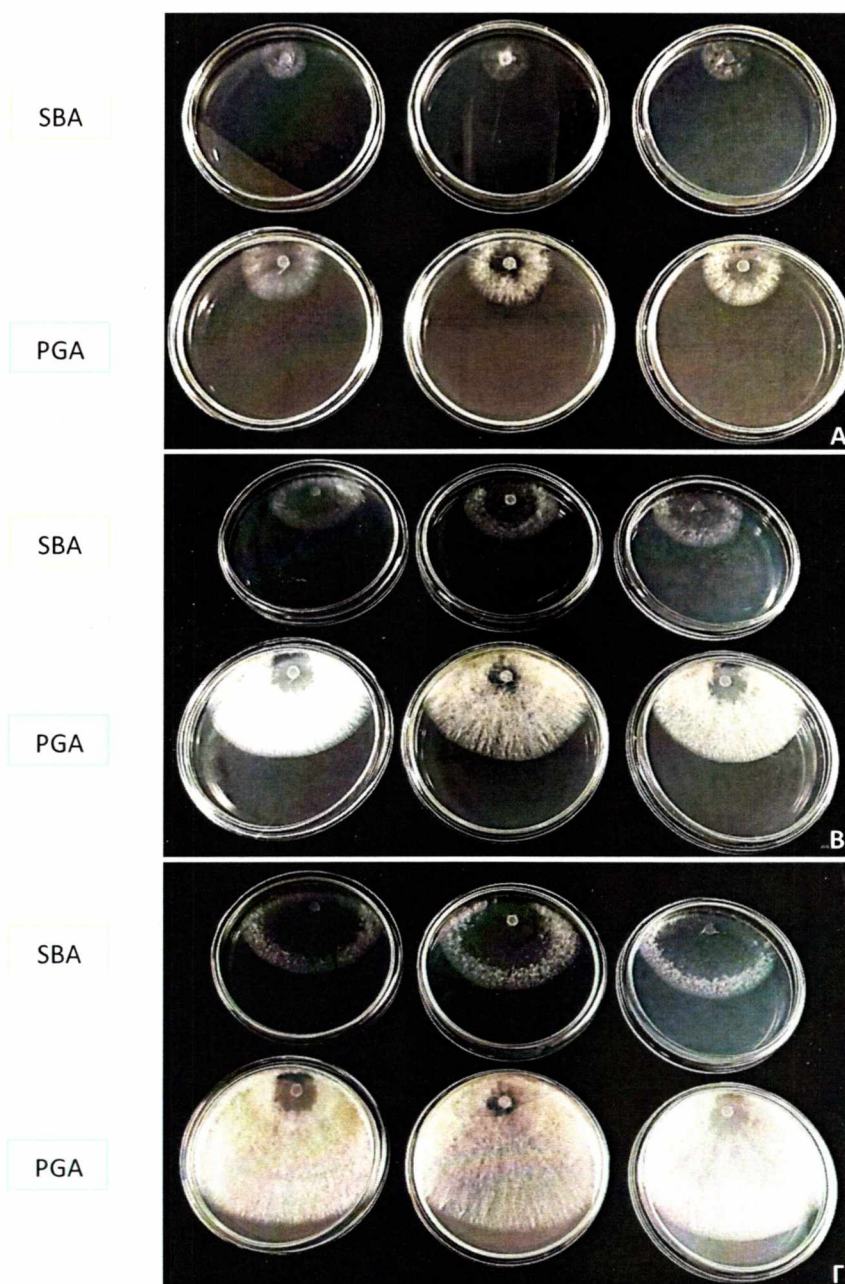


Εικόνα 3.2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά του μύκητα *T. harzianum* T-22. (A) Υαλώδη, ωσειδή μονοκύτταρα κονίδια. (B) Μυκήλιο που φέρει υαλώδεις κονιδιοφόρους με φιαλίδια και κονίδια (Οπτικό μικροσκόπιο: Nikon Labophot-2, ενσωματωμένο με κάμερα Moticam 10.0 MP, Μεγέθυνση: 400X, Κλίμακα: 10μm).

3.3. Χαρακτηριστικά αποικιών στα διάφορα υποστρώματα

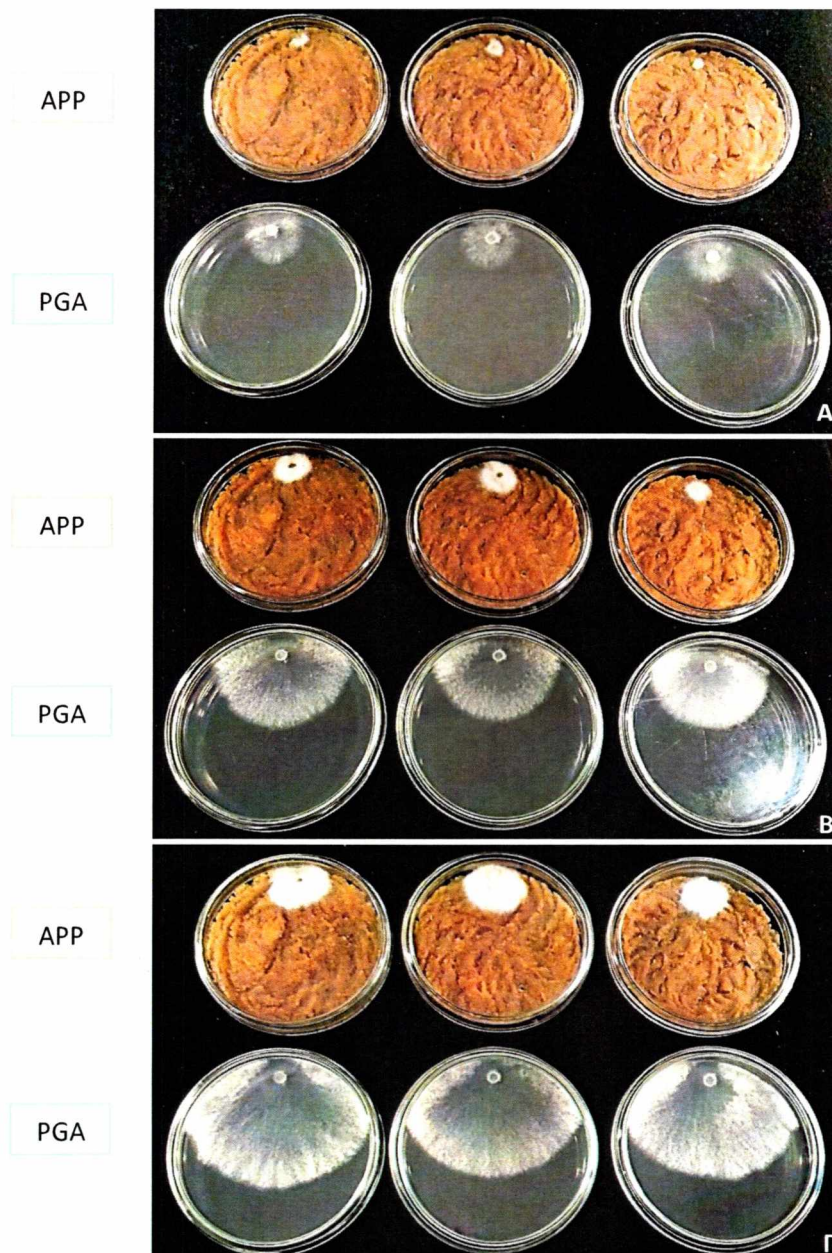
3.3.1. Διάμετρος αποικίας

Η μυκηλιακή ανάπτυξη του *T. harzianum* T-22 στα θρεπτικά μέσα ζαχαρότευτλο-άγαρ (SBA) και PGA, φαίνεται στις παρακάτω εικόνες. Πιο συγκεκριμένα, διακρίνεται η έλλειψη μεταχρωματισμού της καρποφορίας, με εξαίρεση 1 τρυβλίο με PGA (Εικόνα 3.3.Γ).



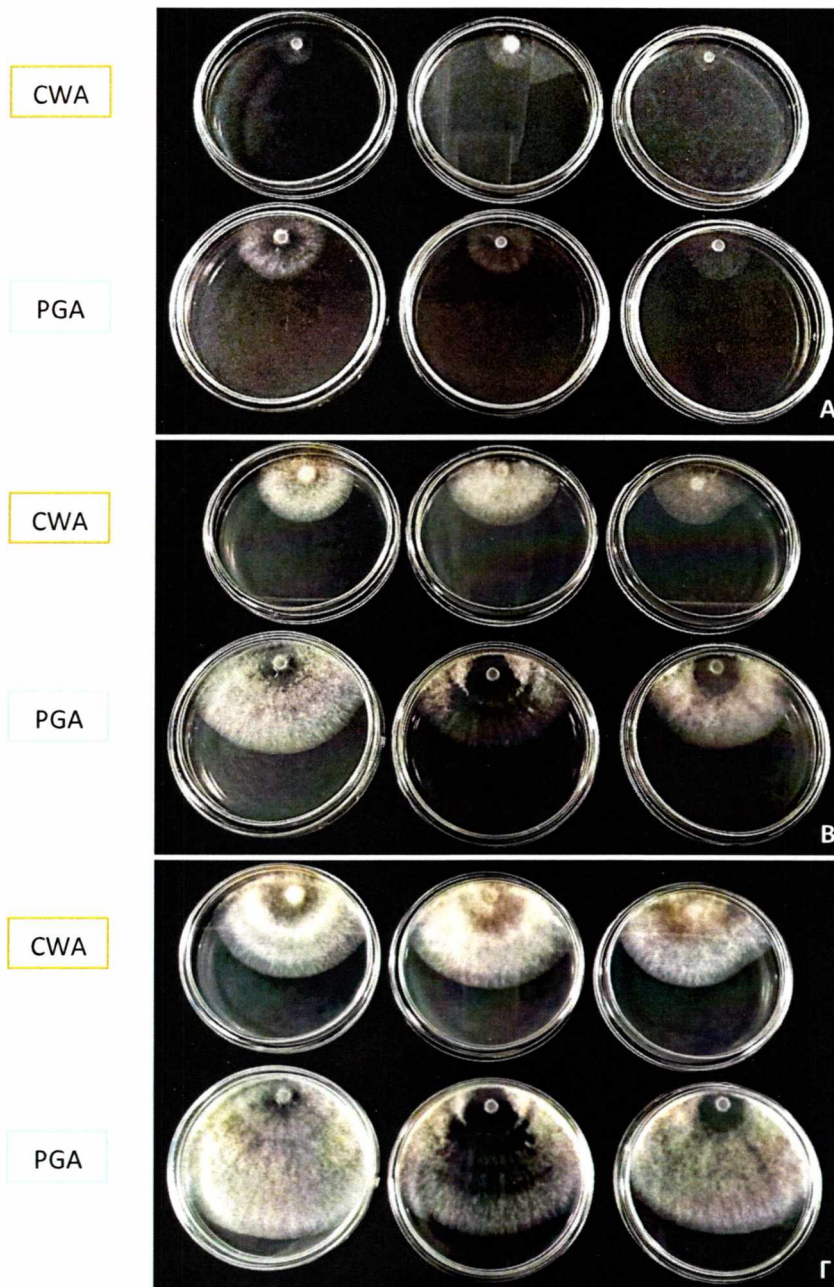
Εικόνα 3.3. Μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα *T. harzianum* σε PGA και SBA έπειτα από 24 (Α), 48 (Β) και 72 ώρες (Γ) επώασης στους 25,5 °C.

Στη συνέχεια, φαίνεται η μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα σε υπολείμματα χυμού μήλου (APP), καθώς και σε PGA (Εικόνα 3.4). Έπειτα από 72 ώρες επώασης στους 25,5 °C, δεν έχει γίνει μεταχρωματισμός της καρποφορίας σε κανένα εκ των δύο θρεπτικών υποστρωμάτων. Παρόλα αυτά, στην 3^η επανάληψη του πειράματος και έπειτα από 72 ώρες επώασης, παρατηρήθηκε μεταχρωματισμός σε 1/3 τρυβλία με APP και στα 2/3 τρυβλία με PGA.



Εικόνα 3.4. Μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα *T. harzianum* σε PGA και APP έπειτα από 24 (Α), 48 (Β) και 72 ώρες (Γ) επώασης στους 25,5 °C.

Τέλος, η μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα σε τυρόγαλα-άγαρ (CWA) και PGA (Εικόνα 3.5), έχει προκαλέσει κίτρινο μεταχρωματισμό σε 2 τρυβλία με CWA, έπειτα από 48 ώρες επώασης. Απεναντίας, έχει προωθήσει τον πράσινο μεταχρωματισμό της καρποφορίας σε 2 τρυβλία με PGA, έπειτα από 72 ώρες επώασης.



Εικόνα 3.5. Μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα *T. harzianum* σε PGA και CWA έπειτα από 24 (Α), 48 (Β) και 72 ώρες (Γ) επώασης στους 25,5 °C.

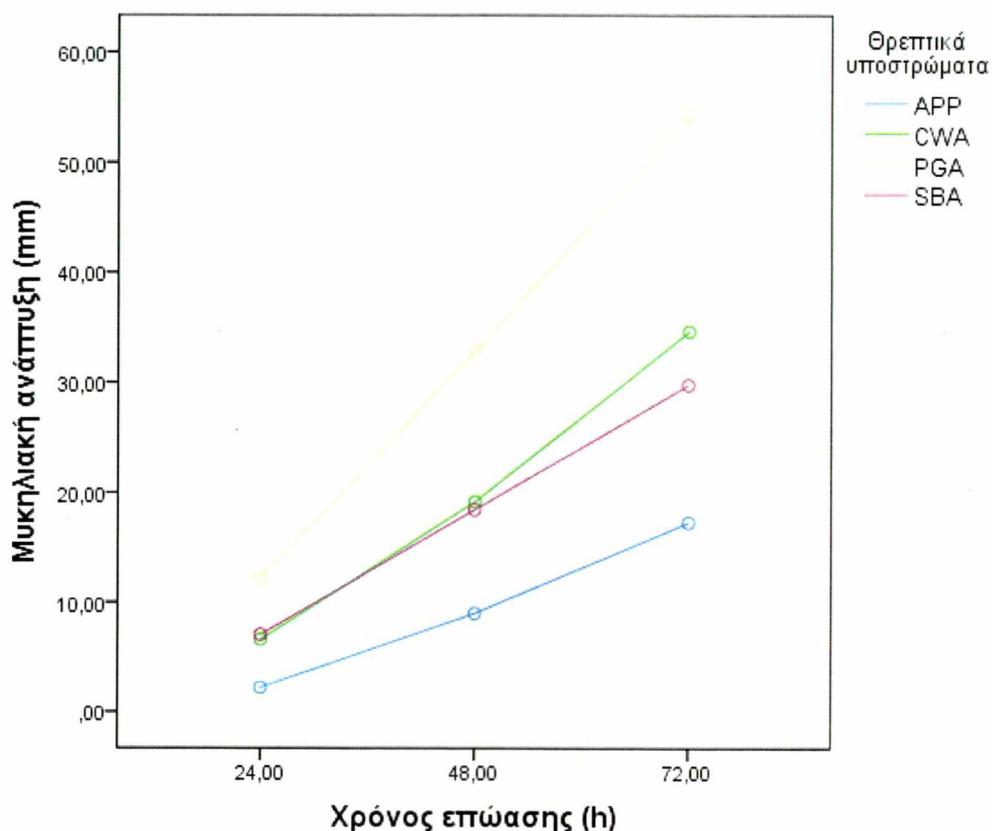
Με βάση τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της ανάπτυξης του μυκηλίου μεταξύ των τρυβλίων με το ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα. Απεναντίας, η μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα διαφέρει σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών θρεπτικών υποστρωμάτων, με εξαίρεση το CWA και το SBA που έχουν συγκλίνουσες τιμές (Πίνακας 3.2).

Πίνακας 3.2. Συγκρίσεις της μυκηλιακής ανάπτυξης του μύκητα *T. harzianum* T-22 μεταξύ των διαφορετικών θρεπτικών υποστρωμάτων. APP: υπολείμματα χυμού μήλου, CWA: τυρόγαλα-άγαρ, SBA: ζαχαρότευτλο-άγαρ, PGA: potato-dextrose-agar.

Multiple Comparisons						
Dependent Variable: Μυκηλιακή ανάπτυξη						
LSD						
(I) Θρεπτικό υπόστρωμα	(J) Θρεπτικό υπόστρωμα	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
APP	CWA	-10,6370*	3,19739	,001	-16,9646	-4,3095
	PGA	-23,5790*	2,61066	,000	-28,7454	-18,4126
	SBA	-8,9259*	3,19739	,006	-15,2535	-2,5984
CWA	APP	10,6370*	3,19739	,001	4,3095	16,9646
	PGA	-12,9420*	2,61066	,000	-18,1084	-7,7756
	SBA	1,7111	3,19739	,593	-4,6164	8,0387
PGA	APP	23,5790*	2,61066	,000	18,4126	28,7454
	CWA	12,9420*	2,61066	,000	7,7756	18,1084
	SBA	14,6531*	2,61066	,000	9,4867	19,8195

Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = 138,015.
*. The mean difference is significant at the 0,05 level.

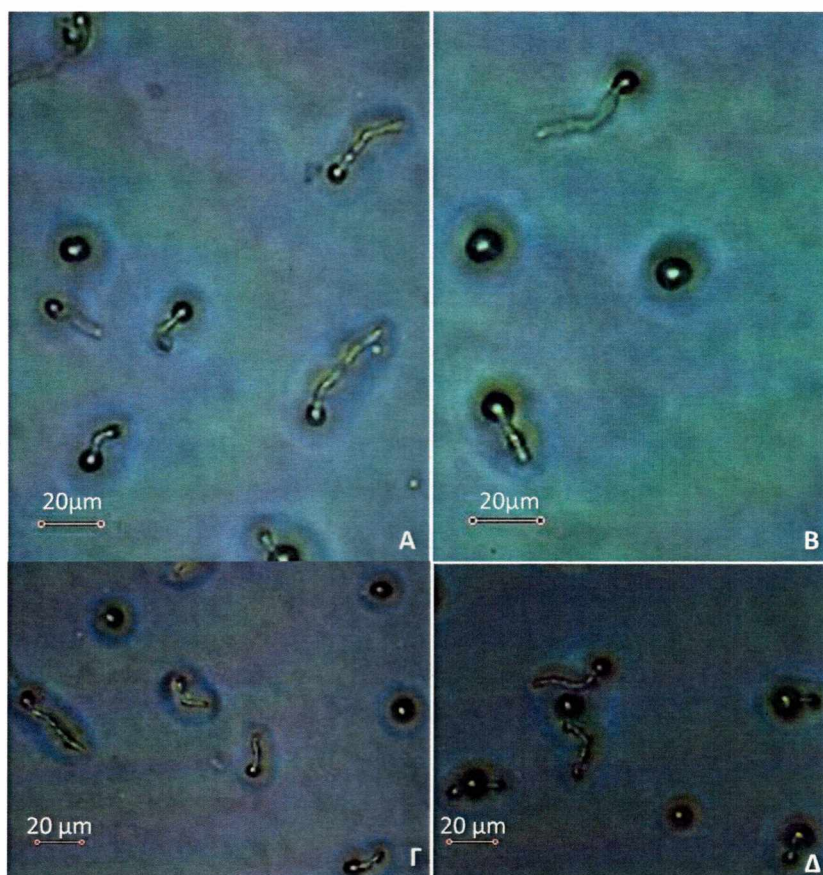
Πιο συγκεκριμένα, τα τρυβλία με τον μάρτυρα (PGA) παρουσίασαν τη μέγιστη ανάπτυξη του *T. harzianum* T-22 με μήκος ακτίνας 54,3 mm (Διάγραμμα 3.1), ενώ η ελάχιστη ανάπτυξη παρατηρήθηκε στο θρεπτικό υπόστρωμα από υπολείμματα χυμού μήλου με 17,3 mm, έπειτα από 72 ώρες επώασης στους 25,5 °C. Τέλος και για το συγκεκριμένο χρόνο, στο CWA και SBA παρουσιάστηκε μυκηλιακή ανάπτυξη 34,6 mm και 29,8 mm αντίστοιχα.



Διάγραμμα 3.1. Εξέλιξη της μυκηλιακής ανάπτυξης του *Trichoderma harzianum* T-22 σε τέσσερα θρεπτικά υποστρώματα, έπειτα από 24, 48 και 72 ώρες επώασης στους 25,5 °C.

3.3.2. Βλαστικότητα σπορίων

Η βλάστηση των σπορίων του *T. harzianum* T-22, παρατηρήθηκε στο PGA και αφορούσε κονίδια που είχαν ήδη αναπτυχθεί και στα τέσσερα θρεπτικά μέσα για διάστημα 4 ημερών. Η πρώτη βλάστηση στο PGA και σε υπολείμματα χυμού μήλου, παρατηρήθηκε 7 ώρες μετά από επώαση στους 25,5 °C, ενώ στο τυρόγαλα-άγαρ και ζαχαρότευτλο-άγαρ, έπειτα από 8 και 9 ώρες αντίστοιχα. Στην εικόνα 3.6, φαίνεται πως έχει εξελιχθεί η βλάστηση των σπορίων έπειτα από 12 ώρες στο θάλαμο επώασης, όπου γινόταν συλλογή δεδομένων.



Εικόνα 3.6. Βλαστικότητα κονιδίων που προέρχονται από διάφορα θρεπτικά υποστρώματα έπειτα από 12 ώρες επώασης σε PGA σε θερμοκρασία 25,5 °C. Από: (Α) υπολείμματα χυμού μήλου (APP), (Β) τριτογενές τυρόγαλα-άγαρ (CWA), (Γ) ζαχαρότευτλο-άγαρ (SBA) και (Δ) PGA. (Οπτικό μικροσκόπιο: Nikon Labophot-2, Μεγέθυνση: 200X, Κλίμακα: 20μm).

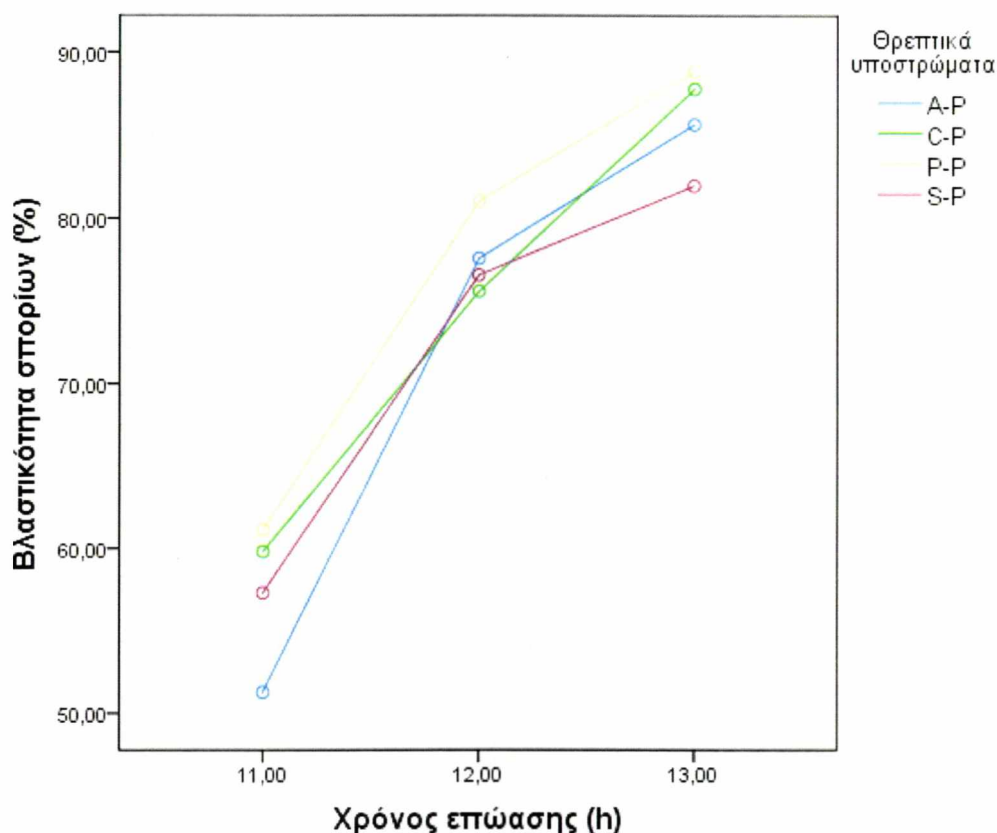
Σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση, η βλαστικότητα των κονιδίων από τα τέσσερα θρεπτικά υποστρώματα, δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά (Πίνακας 3.3).

Πίνακας 3.3. Μονοπαραγοντική ανάλυση της κατανομής της βλαστικότητας του *T. harzianum* T-22 και προσδιορισμός σημαντικότητας για τα διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα και τις ώρες επώασης.

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Germination					
Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	8105,661 ^a	11	736,878	15,658	,000
Intercept	234684,385	1	234684,385	4986,744	,000
Θρεπτικό υπόστρωμα	302,872	3	100,957	2,145	,109
Χρόνος επώασης	6262,986	2	3131,493	66,540	,000
Θρ. υπόστρωμα * Ωρες	133,657	6	22,276	,473	,824
Error	1976,589	42	47,062		
Total	312226,378	54			
Corrected Total	10082,249	53			

a. R Squared = ,804 (Adjusted R Squared = ,753)

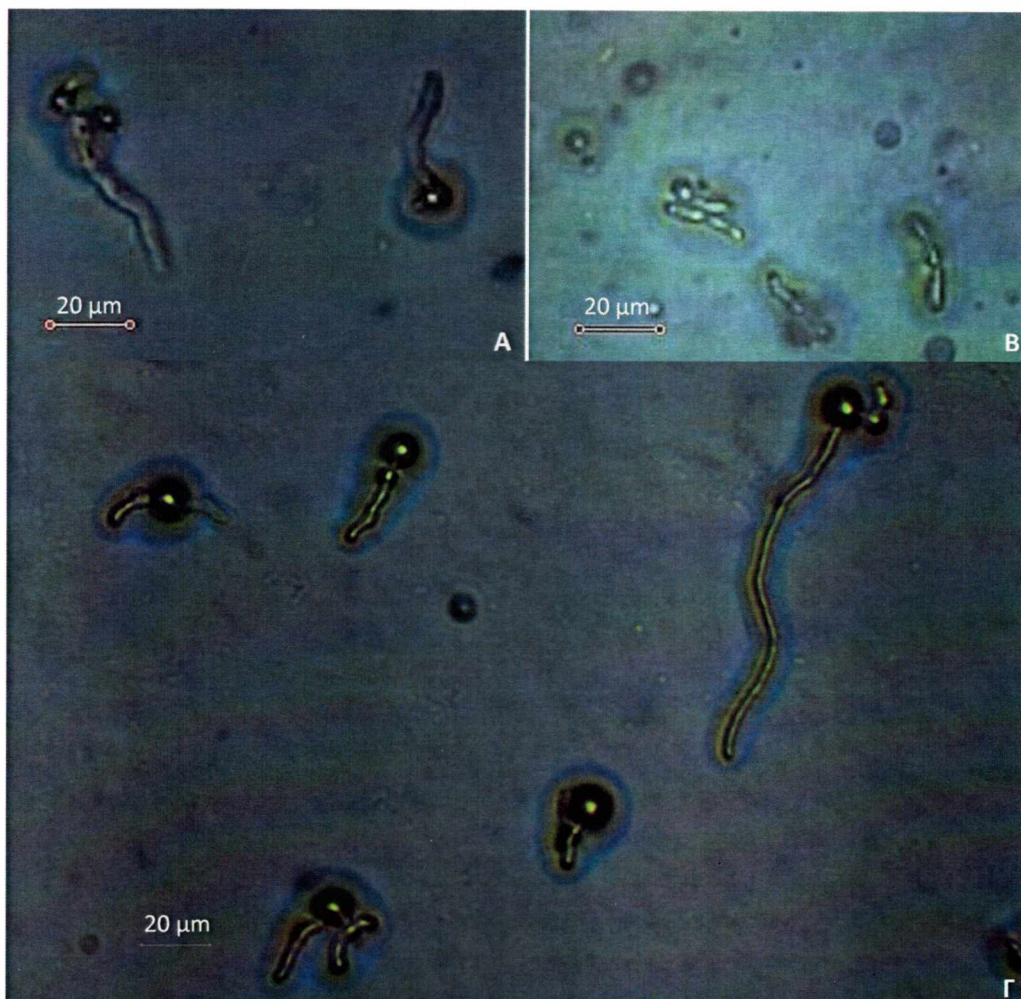
Ακόμη, τα κονίδια που είχαν αναπτυχθεί από τις πρώτες ημέρες σε PGA, παρουσίασαν το μέγιστο ρυθμό βλαστικότητας με ποσοστό 88,8%. Ακολούθησαν τα κονίδια από CWA με ποσοστό 87,8% και τέλος εκείνα από APP και SBA με βλαστικότητα 85,6 και 82% αντίστοιχα.



Διάγραμμα 3.2. Αύξηση βλαστικότητας κονιδίων του *T. harzianum* T-22, που προέρχονται από τέσσερα διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα, υπό συνθήκες σκότους και επώασης στους 25,5 °C. (A-P: κονίδια που μεταφέρθηκαν από APP σε PGA, C-P: από CWA σε PGA, P-P: από PGA σε PGA και S-P: από SBA σε PGA έπειτα από 4 ημέρες επώασης στους 25,5 °C).

3.3.3. Ανάπτυξη βλαστικού σωλήνα

Η ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα, εξελίσσεται διαφορετικά για τα 3 θρεπτικά μέσα όπου πραγματοποιήθηκε το πείραμα. Η 1^η διακλάδωση της υφής παρατηρήθηκε έπειτα από 10 ώρες στο ζαχαρότευτλο-άγαρ (SBA), 12 ώρες στο PGA και τις πρώτες 20 ώρες στο τυρόγαλα-άγαρ (CWA). Ακόμη, ορισμένα κονίδια ήταν πολυπύρνα, εκφύοντας 2 -και πιο σπάνια 3- βλαστικούς σωλήνες (Εικόνα 3.7Α,Γ). Στην παρακάτω εικόνα, φαίνεται το μέγεθος του βλαστικού σωλήνα έπειτα από 13 ώρες επώασης στους 25,5 °C.



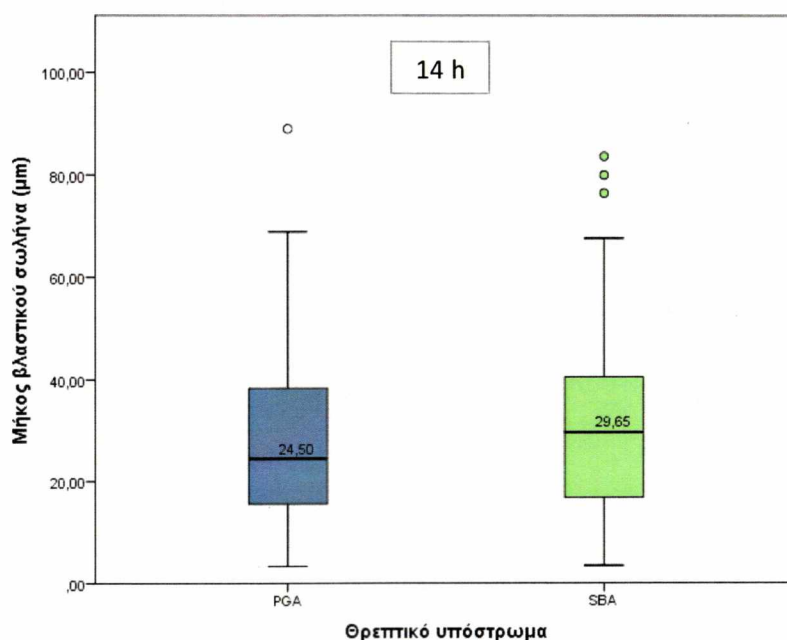
Εικόνα 3.7. Ανάπτυξη βλαστικού σωλήνα *T. harzianum* σε ζαχαρότευτλο-άγαρ (Α), τυρόγαλα-άγαρ (Β) και PGA (Γ), έπειτα από 13 ώρες επώασης στους 25,5 °C. (Οπτικό μικροσκόπιο: Nikon Laborphot-2, Μεγέθυνση: 200X, Κλίμακα: 20μm).

Όσον αφορά τα θρεπτικά υποστρώματα PGA και SBA, ο μέσος όρος του βλαστικού σωλήνα έπειτα από 14 ώρες επώασης ήταν 28,2 μm και 30,7 μm αντίστοιχα (Πίνακας 3.4), ενώ η διάμετρος ήταν κατά μέσο όρο 2,3 μm στο PGA και 2,4 μm στο SBA. Ακόμη, να σημειωθεί ότι, τα κονίδια των οποίων υπολογίστηκε ο βλαστικός σωλήνας ήταν κατά 69% διπύρνα στο PGA και κατά 40% στο SBA.

Πίνακας 3.4. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση μήκους και διαμέτρου βλαστικού σωλήνα *T. harzianum* T-22 σε PGA και SBA, έπειτα από 14 ώρες επώασης στους 25,5 °C.

Group Statistics					
	Θρεπτικό υπόστρωμα	N	Mean	Std Deviation	Std. Error Mean
Μήκος βλαστικού σωλήνα (μm)	PGA	100	28,2230	17,01656	1,70166
	SBA	100	30,7260	17,53445	1,75345
Διάμετρος (μm)	PGA	100	2,3410	,35248	,03525
	SBA	100	2,3717	,58322	,05832

Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα 3.3, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της ανάπτυξης του βλαστικού σωλήνα μεταξύ των δύο θρεπτικών υποστρωμάτων και η διάμεσος για το PGA είναι 24,5 μm, ενώ για το SBA είναι



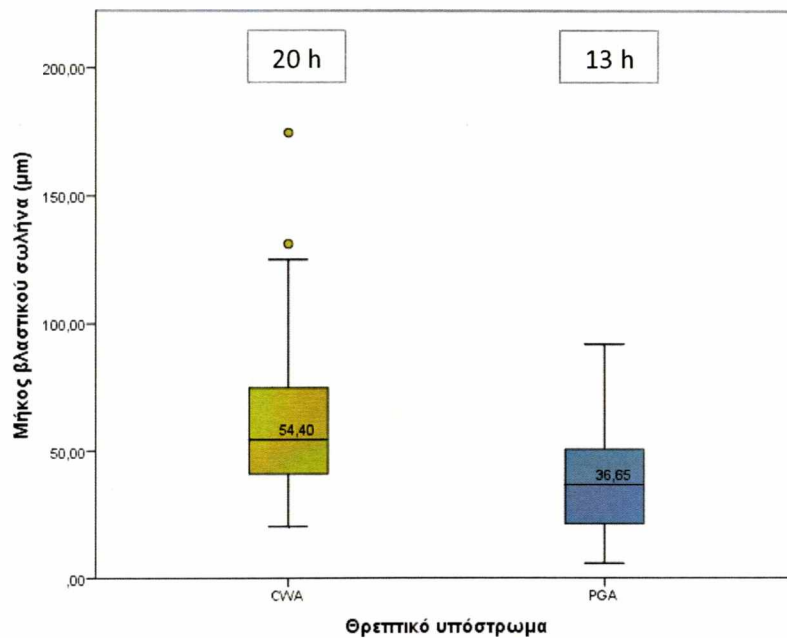
Διάγραμμα 3.3. Ικανότητα ανάπτυξης βλαστικού σωλήνα *Trichoderma harzianum* T-22 σε PGA και ζαχαρότευτλο-άγαρ (SBA), πριν γίνει διακλάδωση της υψής και έπειτα από 14 ώρες επώασης στους 25,5 °C.

29,7 μm. Αντιθέτως, στα θρεπτικά υποστρώματα PGA και CWA παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική διαφορά του μήκους του βλαστικού σωλήνα, με σχεδόν διπλάσια ανάπτυξη στο CWA (62,8 μm) έπειτα από 20 ώρες επώασης στους 25,5 °C (Πίνακας 3.5). Το μήκος του βλαστικού σωλήνα στα τρυβλία με τον μάρτυρα (PGA), φθάνει κατά μέσο όρο τα 36,9 μm πριν γίνει διακλάδωση και έπειτα από 13 ώρες επώασης. Ακόμη, η διάμετρος του βλαστικού σωλήνα για τα δύο θρεπτικά υποστρώματα, είναι 3,1 μm στο PGA και 4,1 μm στο CWA. Τέλος το ποσοστό των διπύρηνων κονιδίων ήταν 55% για το PGA και 25% για το CWA.

Πίνακας 3.5. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση μήκους και διαμέτρου βλαστικού σωλήνα *Trichoderma harzianum* T-22 σε PGA και CWA, έπειτα από 13 και 20 ώρες επώασης στους 25,5 °C.

Group Statistics					
	Θρεπτικό υπόστρωμα	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Μήκος βλαστικού σωλήνα (μm)	PGA	50	36,8860	19,50979	2,75910
	CWA	50	62,8200	33,09769	4,68072
Διάμετρος (μm)	PGA	50	3,1267	,72581	,10265
	CWA	50	4,1493	,85360	,12072

Στο παρακάτω διάγραμμα, φαίνεται η κατανομή του μήκους και παρατίθεται η διάμεσος του βλαστικού σωλήνα, που παρουσιάζει τιμές 54,4 μm για το CWA και 36,7 μm για το PGA.



Διάγραμμα 3.4. Ικανότητα ανάπτυξης βλαστικού σωλήνα *Trichoderma harzianum* T-22 σε PGA και CWA, πριν γίνει διακλάδωση της υφής και έπειτα από 13 και 20 ώρες επώασης στους 25,5 °C.

4. Συζήτηση

Στο πρωταρχικό στάδιο της παρούσας διατριβής, έγινε παρατήρηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών του μύκητα *T. harzianum* και παρατηρήθηκε ότι, η εμφάνιση των διαφόρων χαρακτηριστικών του μύκητα, δε συνδέεται απαραίτητα με τη συγκέντρωση των σπορίων στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, τις πρώτες 5 ημέρες είχε γίνει εμφάνιση λευκού μυκηλίου και μεταχρωματισμός του θρεπτικού υποστρώματος σε όλες τις διαφορετικές συγκεντρώσεις (1 g σκευάσματος/mL, 10^{-1} g/mL, 10^{-2} g/mL, 10^{-3} g/mL και 10^{-4} g/mL). Επιπλέον, την 6^η ημέρα είχε γίνει εμφάνιση πράσινης καρποφορίας και από την 8^η ημέρα ξεκίνησε η ανάπτυξη νέου λευκού μυκηλίου.

Τα κονίδια του υβριδικού στελέχους T-22 του *T. harzianum*, ήταν ελαφρώς μεγαλύτερα σε μέγεθος από άλλα στελέχη, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην ευρωστία του μύκητα. Από την άλλη, τα φιαλίδια του στελέχους T-22 είχαν μεγαλύτερο μήκος, αλλά μικρότερο πλάτος από εκείνα της περιγραφής του Rifai.

Η μυκηλιακή ανάπτυξη των αποικιών του εδαφογενούς μύκητα, ήταν μικρότερη στα τρυβλία με υπολείμματα χυμού μήλου (APP), συγκριτικά με όλα τα υπόλοιπα θρεπτικά υποστρώματα. Με βάση βιβλιογραφικές πηγές, το APP περιέχει ποσοστό αναγωγικών σακχάρων 10,8-15% w/w, ενώ ο χυμός ζαχαρότευτλου περιέχει 7,8% w/v. Συνεπώς, στην προκειμένη περίπτωση, η περιεκτικότητα σακχάρων δεν αποτέλεσε καθοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη του μυκηλίου. Ωστόσο, η περιεκτικότητα σε άζωτο, θα μπορούσε να είναι εκείνη που προάγει ή όχι την δραστηριότητα του μύκητα. Αναφορικά, το ποσοστό ολικού N στο APP είναι 0,68% w/w, ενώ στο χυμό ζαχαρότευτλου από διαφορετικές ποικιλίες, έχει βρεθεί νιτρικό άλας σε τιμές 0,01-2,4% w/v (Dhillon *et al.*, 2012; Wruss *et al.*, 2015). Όσον αφορά το τυρόγαλα-άγαρ (CWA), το στέλεχος T-22 παρουσίασε λίγο πιο ανοδική πορεία από το SBA και αποκλειστική χρήση τυρογάλακτος ως θρεπτικό υπόστρωμα, χωρίς ανάμειξη με νερό, θα μπορούσε να οδηγήσει σε ταχύτερη ανάπτυξη του μύκητα, πλησιάζοντας περισσότερο τις τιμές του μάρτυρα, όπου παρουσιάστηκε και η μέγιστη ανάπτυξη.

Σχετικά με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της αποικίας του *T. harzianum*, στα μισά τρυβλία με τον μάρτυρα εμφανίστηκε πράσινος μεταχρωματισμός έπειτα από 72 ώρες στους 25,5 °C. Στο SBA δεν παρουσιάστηκε μεταχρωματισμός σε καμία επανάληψη, ενώ στο APP και CWA μόνο σε 1/9 τρυβλία. Ακόμη, στο CWA

παρουσιάστηκε κίτρινος μεταχρωματισμός του θρεπτικού υποστρώματος έπειτα από 48 ώρες επώασης. Καταλήγοντας, η αύξηση της διαμέτρου του μυκηλίου, δε συνδέεται με την εμφάνιση πράσινης καρποφορίας ή μεταχρωματισμού του θρεπτικού υποστρώματος.

Η βλαστικότητα των σπορίων που λήφθηκαν από ανεπτυγμένες αποικίες 4 ημερών από τα διάφορα θρεπτικά υποστρώματα, δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά έπειτα από 13 ώρες επώασης σε PGA στους 25,5 °C. Αρχικά, τα κονίδια από APP είχαν ελάχιστο ποσοστό βλαστικότητας στις 11 ώρες (51,3%), ενώ στο τέλος παρουσίασαν μεγαλύτερη βλαστικότητα από το ζαχαρότευτλο-άγαρ, με ποσοστό 85,6%. Ακολούθησε το τυρόγαλα-άγαρ και τέλος ο μάρτυρας με 88,8%. Επομένως, η βλαστικότητα των σπορίων του *Trichoderma harzianum* T-22, δεν επηρεάστηκε από το αρχικό θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης.

Τέλος, όσον αφορά την ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα, οι τιμές μεταξύ PGA και SBA, έπειτα από 13 ώρες επώασης, ήταν παραπλήσιες με ελάχιστη διαφορά. Ωστόσο, το ποσοστό των διπύρηνων σπορίων ήταν κατά 73% μεγαλύτερο στο PGA. Μεταξύ του PGA και του CWA, ο βλαστικός σωλήνας ξεκίνησε να διακλαδίζεται σε διαφορετικές χρονικές στιγμές, με καθυστέρηση 7 ωρών στο τυρόγαλα-άγαρ. Για το λόγο αυτό, το μήκος του βλαστικού σωλήνα στο CWA είναι κατά 70% μεγαλύτερο από εκείνο του μάρτυρα (PGA). Απεναντίας, το ποσοστό διπύρηνων σπορίων βρέθηκε κατά 120% αυξημένο στο PGA συγκριτικά με το CWA. Συνεπώς, η αναλογία διπύρηνων σπορίων και μήκους βλαστικού σωλήνα ήταν αντιστρόφως ανάλογη. Συγκεφαλαιώνοντας, διαφαίνεται ότι, όσο μεγαλύτερη είναι η ανάπτυξη του μύκητα σε ένα θρεπτικό υπόστρωμα, τόσο πιο μικρό είναι το μήκος του βλαστικού σωλήνα, προτού γίνει διακλάδωση.

5. Συμπεράσματα

Η ανάπτυξη της αποικίας του *Trichoderma harzianum* T-22, δεν επηρεάζεται τόσο από την περιεκτικότητα του θρεπτικού υποστρώματος σε σάκχαρα, όσο από το ποσοστό αζώτου και πιθανόν από άλλους παράγοντες. Συνεπώς, το τυρόγαλα που αποτελεί σημαντική πηγή αζώτου (Asada *et al.*, 2012) και είναι παραπροϊόν της γαλακτοβιομηχανίας, θα μπορούσε να αποτελέσει εναλλακτική πηγή θρεπτικού υποστρώματος για τον εδαφογενή μύκητα, προσφέροντας τη δυνατότητα για ολοκληρωμένη διαχείριση διαφόρων καλλιεργειών. Ακόμη, η βλαστικότητα των σπορίων δεν επηρεάζεται από το θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης, με εύρος 82-89% έπειτα από 13 ώρες επώασης στους 25,5 °C. Συνεπώς, τόσο τα υπολείμματα χυμού μήλου, όσο και οι ρίζες ζαχαρότευτλου, θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν ως υποστρώματα ανάπτυξης του μύκητα. Τέλος, η ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα καθυστερεί στο θρεπτικό υπόστρωμα από τυρόγαλα-άγαρ, αλλά παράγει βλαστικούς σωλήνες μεγαλύτερου μήκους, που τελικά οδηγούν σε επιβράδυνση της εξάπλωσης του μυκηλίου.

Βιβλιογραφία

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

- Akpinar-Bayizit, A., Basoglu, F., Ozcan, T. and Yilmaz-Ersan, L. (2016). A research on whey as a renewable substrate for single cell oil production by *Saprolegnia diclina*. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 7:56-61.
- Aneja, K.R. (2005). Measurement of growth of microorganism and factors influencing growth. *Experiments in Microbiology, Plant Pathology and Biotechnology*. New Delhi: New Age International, pp. 212-244.
- Asada, C., Nakamura, Y., Okumura, R. and Sasaki, C. (2012). Acceleration of *Hericium erinaceum* mycelial growth in submerged culture using yogurt whey as an alternative nitrogen source. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3:828-832.
- Beyer, D.M., Anderson, M.G. and Wuest, P.J. (2017). Green mold of mushrooms. *The Pennsylvania State University, United States*. Available at: <<http://extension.psu.edu/plants/>> Access date: 19/2/2017
- Cohen, R. and Hadar, Y. (2001). The roles of fungi in agricultural waste conversion. In: Gadd, G.M. (ed.), *Fungi in Bioremediation*. pp. 305-334. Cambridge University Press, United Kingdom.
- Danielson, R.M. and Davey, C.B. (1973). Non nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. *Soil Biol. Biochem.*, 5:485-494.
- Dhillon, G.S., Brar, S.K., Kaur, S. and Verma, M. (2012). Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation. *Industrial Crops and Products*, 38:6-13.
- Elad, Y., Chet, I. and Katan, J. (1980). *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 70:119-121.
- FAO. (2009). *Sugar Beet, White Sugar*, Agribusiness Handbook, Italy. Available at: <http://www.eastagri.org/publications/pub_docs/4_sugar_web.pdf> Access date: 13/1/2017

- Fungal Bioinformatics and Genetics Research. (2008). Available at: <http://bioinformatica.vil.usal.es/spore-germination-assay/> Last updated: 10/6/2008
- Gams, W. and Bissett, J. (2002). Morphology and Identification of *Trichoderma*. In: Kubicek, C.P. and Harman, G.E. (ed.), *Trichoderma & Gliocladium*. Vol. 1: Basic Biology, Taxonomy and Genetics, pp. 3-34. Taylor & Francis Ltd, London.
- Harman, G.E. (2000). Myths and Dogmas of Biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *The American Phytopathological Society*, 84:377-393.
- Harman, G.E., Lorito, M. and Lynch, J.M. (2004). Uses of *Trichoderma* spp. to alleviate or remediate soil and water pollution. In: Laskin, A., Bennett, J. and Gadd, G. (eds.), *Advances in Applied Microbiology*. Vol. 56, pp. 313-330. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Hoyos-Carvajal, L. and Bissett, J. (2011). Biodiversity of *Trichoderma* in Neotropics. In: Grillo, O. and Venora, G. (ed.), *The Dynamical Processes of Biodiversity – Case Studies of Evolution and Spatial Distribution*, InTech Publisher, pp. 303-320. Available at: <http://www.intechopen.com/books/>
- Klein, D. and Eveleigh, D.E. (2002). Ecology of *Trichoderma*. In: Kubicek, C.P. and Harman, G.E. (ed.), *Trichoderma & Gliocladium*. Vol. 1: Basic Biology, Taxonomy and Genetics, pp. 57-74. Taylor & Francis Ltd, London.
- Koutinas, A.A., Bekatorou, A., Bosnea, L.A., Dimitrellou, D., Katechaki, E., Kopsahelis, N. and Papapostolou, H. (2009). Whey valorisation: a complete and novel technology development for dairy industry starter culture production. *Bioresource Technology*, 100:3373-3739.
- Kredics, L., Czifra, D., Hatvani, L., Jimenez, L.G., Manczinger, L., Naeimi, S., Urban, P. and Vágvölgy, C. (2010). A challenge to mushroom growers: the green mould disease of cultivated champignons. In: Mendez-Vilas, A. (ed.), *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, Formatex Research Center, pp. 295-305.
- Lieckfeldt, E., Kuhls, K. and Muthumeenakshi S. (2002). Molecular taxonomy of *Trichoderma* and *Gliocladium* and their teleomorphs. In: Kubicek, C.P. and Harman, G.E. (ed.), *Trichoderma & Gliocladium*. Vol. 1: Basic Biology, Taxonomy and Genetics, pp. 35-56. Taylor & Francis Ltd, London.

- Mathivanan, N., Prabavathy, V.R. and Vijayanandraj, V.R. (2008). The effect of fungal secondary metabolites on bacterial and fungal pathogens. In: Karlovsky P. (ed.), *Secondary Metabolites in Soil Ecology. Soil Biology*, Vol. 14, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg 2009, pp. 129-140.
- Pitt, J.I. and Hocking, A.D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. Springer Science & Business Media publisher, New York.
- Samuels, G.J. (2006). *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*, 96:195-206.
- Shalini, R. and Gupta, D.K. (2009). Utilization of pomace from apple processing industries: a review. *J Food Sci Technol*, 47: 365-371.
- Singh, A., Srivastava, S. and Singh, H.B. (2007). Effect of substrates on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum* and its use in biocontrol of diseases. *Bioresource Technology*, 98:407-473.
- Sofo, A., Fiori, R.F., Manfra, M., Nisco, M.D., Novellino, E., Scopa, A., Tenore, G. and Troisi, J. (2011). *Trichoderma harzianum* strain T-22 induces changes in phytohormone levels in cherry rootstocks (*Prunus cerasus* × *P. canescens*). *Plant Growth Regul*, 65:421-425.
- Streit, F., Koch, F., Laranjeira, M.C.M. and Ninow, J.L. (2009). Production of fungal chitosan in liquid cultivation using apple pomace as substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40:20-25.
- Tataranni, G., Dichio, B. and Xiloyannis, C. (2012). Soil Fungi-Plant Interaction. In: Montanaro G. (ed.), *Advances in Selected Plant Physiology Aspects*, InTech Publisher, pp. 161-188. Available at: <<http://www.intechopen.com/books/>>
- van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. and Pieterse, M.J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 36:453-483.
- Wibowo, A. (1999). The effect of environmental factors on conidial germination, sporulation and growth of *Trichoderma harzianum* in vitro. *Jurnal Perlindungan Indonesia*, 5:108-113.
- Wruss, J., Höglinger, O., Huemer, S., Lanzerstorfer, P., Müller, U., Uygun, P., Waldenberger, G. and Weghuber, J. (2015). Compositional characteristics of commercial beetroot products and beetroot juice prepared from seven beetroot varieties grown in Upper Austria. *Journal of Food Composition and Analysis*, 42:46-55.

Yigit, F. and Dikilitas, M. (2007). Control of Fusarium wilt of tomato by combination of fluorescent *Pseudomonas*, non-pathogen *Fusarium* and *Trichoderma harzianum* T-22 in greenhouse conditions. *Plant Pathology Journal*, 6:159-163.

Ελληνική Βιβλιογραφία

Χατζηδημόπουλος Μ., 2014. Έλεγχος Αποτελεσματικότητας Μυκητοκτόνων *In Vitro*. *Επιδημιολογία και Αντιμετώπιση του Βοτρώτη σε Υδροπονική Καλλιέργεια Μαρουλιού* (Διδακτορική διατριβή). Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Ν. Ιωνία Μαγνησίας.



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



004000136787