



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**“ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ
ΜΥΚΗΤΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ
TRICHODERMA”**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΚΑΡΑΤΖΙΟΥ ΖΑΧΑΡΟΥΛΑ (ΑΜ: 3019105)**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΑΝΑΣΤΑΣΟΠΟΥΛΟΣ
ΗΛΙΑΣ**

ΛΑΡΙΣΑ 2023

II. Περίληψη.

Η πτυχιακή εργασία αφορά την συλλογή του μύκητα *T. harzianum* από το περιβάλλον, εργαστηριακά πειράματα καλλιέργειάς του και μακροσκοπικών και μικροσκοπικών παρατηρήσεων. Επίσης προτείνεται τρόπος μαζικής αναπαραγωγής του.

Ευχαριστίες

Η παρακάτω πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Περιβάλλοντος στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Αναστασόπουλο Ηλία, για τη βοήθεια που μου παρείχε.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους γονείς μου, τις γιαγιάδες και τον παππού μου για τη στήριξη και βοήθεια που μου παρείχαν, όπως και το αγόρι μου και τους φίλους μου που ήταν στο πλευρό μου τα χρόνια της φοίτησης μου.

Καράτζιου Ζαχαρούλα
31/9/2023

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	7
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	9
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ	11
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΜΥΚΗΤΩΝ	13
2.1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ <i>TRICHODERMA SPP</i>	14
2.2. ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΤΟΥ <i>TRICHODERMA SPP</i>	15
2.2.1. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ <i>T. HARZIANUM</i>	15
2.3. ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΟΥ <i>TRICHODERMA SPP</i>	20
3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΟΥ <i>TRICHODERMA SPP</i>	22
3.1. ΜΥΚΟΠΑΡΑΣΙΤΙΣΜΟΣ	24
3.2. ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΜΟΣ	26
3.3. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ	26
3.4. ΕΠΑΓΩΓΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΤΟΠΙΚΗΣ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ	27
3.5. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΥΤΩΝ	29
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	30
4.1. ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ	30

4.2. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ	40
4.2.1. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ PDA	40
4.2.2. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ <i>T. HARZIANUM</i>	41
4.2.3. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΜΑΖΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ <i>T. HARZIANUM</i> ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΖΥΜΩΣΗΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ	42
4.2.4. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΧΡΗΣΗΣ ΑΙΜΑΤΟΚΥΤΟΜΕΤΡΟΥ	42
4.3. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ	43
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	48
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	49
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	51

Περιεχόμενα εικόνων.

Εικόνα 1	14
Εικόνα 2	16
Εικόνα 3	17
Εικόνα 4	18
Εικόνα 5	20
Εικόνα 6	22
Εικόνα 7	30
Εικόνα 8	31
Εικόνα 9	32
Εικόνα 10	33
Εικόνα 11	34
Εικόνα 12	35
Εικόνα 13	36
Εικόνα 14	37
Εικόνα 15	38
Εικόνα 16	39

Εικόνα 17	39
Εικόνα 18	44
Εικόνα 19	44
Εικόνα 20	45
Εικόνα 21	45
Εικόνα 22	46
Εικόνα 23	46

1. Εισαγωγή.

Οι μύκητες αποτελούν ένα από τα πέντε βασίλεια των έμβιων όντων. Υπολογίζεται πως στη Γη υπάρχουν 1,5 εκατομμύρια είδη μυκήτων, όμως έχουν μελετηθεί περίπου 144.000 είδη (Ahmadjian, Vernon , Alexopoulos, Constantine John and Moore, David, 2023, <https://www.britannica.com/science/fungus>). Οι μύκητες χαρακτηρίζονται από τη γρήγορη προσαρμοστικότητά τους στο περιβάλλον, ενώ αναπτύσσουν μηχανισμούς για την επιβίωσή τους, συνήθως εις βάρος του ξενιστή τους, ζώντας παρασιτικά και σαπροφυτικά. Όμως κάποιοι μύκητες είναι φυτοπροστατευτικοί, καθιστώντας τους πολύ σημαντικούς στη προστασία του περιβάλλοντος, αλλά και για τη γεωργία. Η ταξινόμηση των μυκήτων γίνεται ανάλογα της μορφολογίας τους, του τρόπου πολλαπλασιασμού και των γενετικών χαρακτηριστικών. Στη συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία θα ασχοληθούμε με τη ταξινόμηση ανάλογα τη μορφολογία του μύκητα *T. harzianum*.

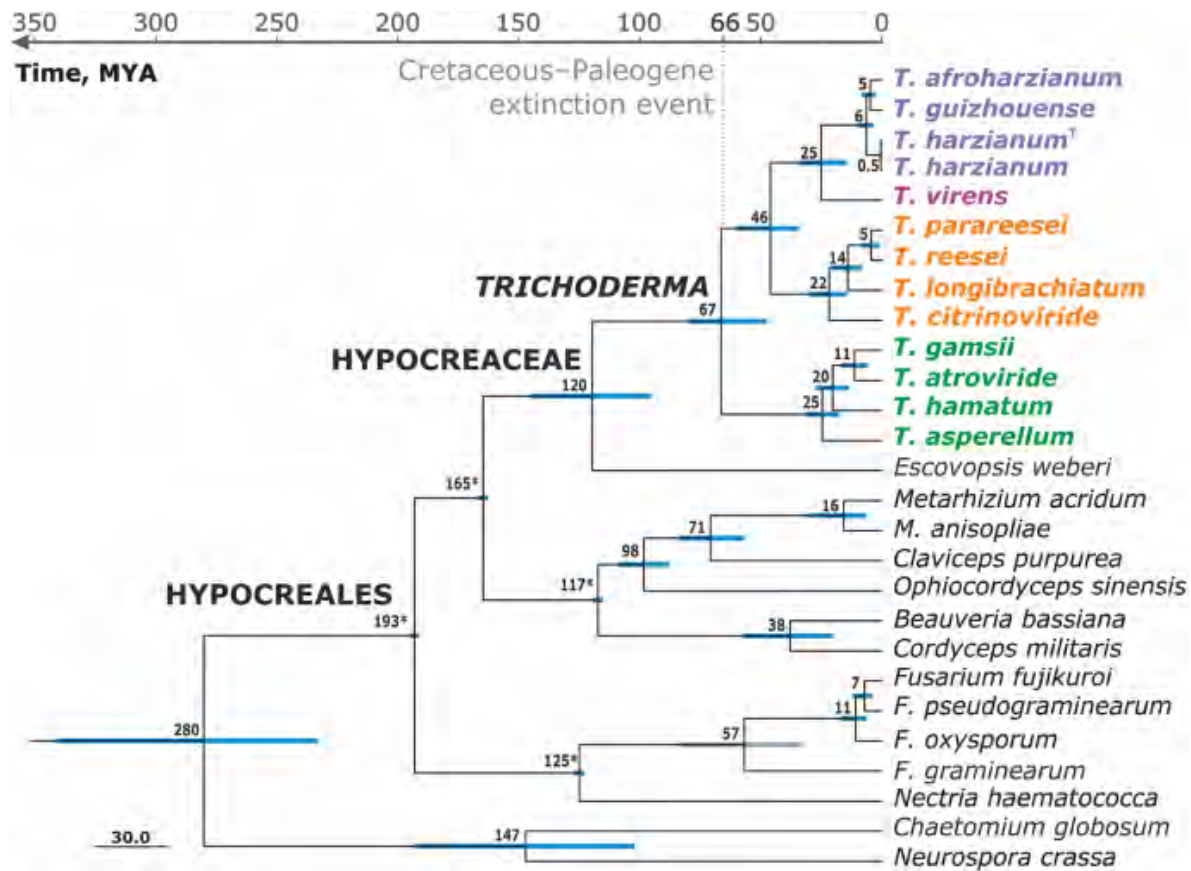
2. Ταξινόμηση μυκήτων.

Οι μύκητες χωρίζονται σε μακρομύκητες (μανιτάρια) και μικρομύκητες (μυκηλιακοί ή υφομύκητες, ζύμες ή βλαστομύκητες και δίμορφοι μύκητες)(Δημήτρης Μ. Δήμου, 2015). Το *Trichoderma spp* ανήκει στους υφομύκητες. Οι υφομύκητες αποτελούνται από το μυκήλιο (πλέγμα υφών) και τον θαλλό (σύνολο μυκηλίων) και η αναπαραγωγή τους διακρίνεται σε βλαστικό/θαλλικό, όταν γίνεται βλαστική ανάπτυξη και εναέριο/αναπαραγωγικό, όταν διαφοροποιείται για τη παραγωγή καρποφορίων με σπόρια ή μονοσπορίων(Δημήτρης Μ. Δήμου, 2015). Ο

μύκητας *Trichoderma spp* αποτελεί έναν σαπροφυτικό και ενδοφυτικό μύκητα που υπάρχει παγκοσμίως σε υγρά και μέτριας θερμοκρασίας περιβάλλοντα (20-35°C) με υψηλές συγκεντρώσεις σε οργανικές ουσίες. Η ύπαρξή του στη ριζόσφαιρα των φυτών, βοηθάει το φυτό στη προστασία του έναντι φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών μέσω διάφορων μηχανισμών όπως ο μυκοπαρασιτισμός, η παραγωγή αντιβιοτικών, η επαγωγή συστηματικής και τοπικής προστασίας και ο ανταγωνισμός για θρεπτικά συστατικά.

2.1. Ταξινόμηση του *Trichoderma spp*.

Το γένος *Trichoderma spp* βρέθηκε πρώτη φορά από τον Γερμανό ερευνητή Christiaan Hendrik Persoon το 1794 και ανήκει στο βασίλειο των μυκήτων, στη διαίρεση των ασκομυκήτων, στη τάξη των σπορδιομυκήτων, στη σειρά υποκρεάλες και στην οικογένεια των μυκήτων Hypocreaceae, η οποία ανακαλύφθηκε το 1865 από τον Γάλλο ερευνητή Edmond Tulasne, που ανακάλυψε τον σεξουαλικό τρόπο πολλαπλασιασμού του μύκητα. Το 1932 βρέθηκαν οι παρασιτικές δράσεις των *Trichoderma spp* ενάντια στο *Rhizoctonia solani* από τον ερευνητή Weindling (Druzhinina, I., & Kubicek, C. P., 2005). Το *Trichoderma spp* υπάρχει φυσικά σε όλα τα εδάφη πλούσια σε υγρασία και οργανική ύλη και ζεί ενδοφυτικά στις ρίζες των φυτών αλλά και σαπροφυτικά των κορμών των δέντρων. Συνολικά έχουν βρεθεί 200 είδη *Trichoderma spp* και υπολογίζεται πως υπάρχουν πολλά στελέχη ακόμα, αλλά η ταξινόμηση του είδους είναι μέχρι και σήμερα ελλειμματική (Cai, F., Druzhinina, I.S., 2021).

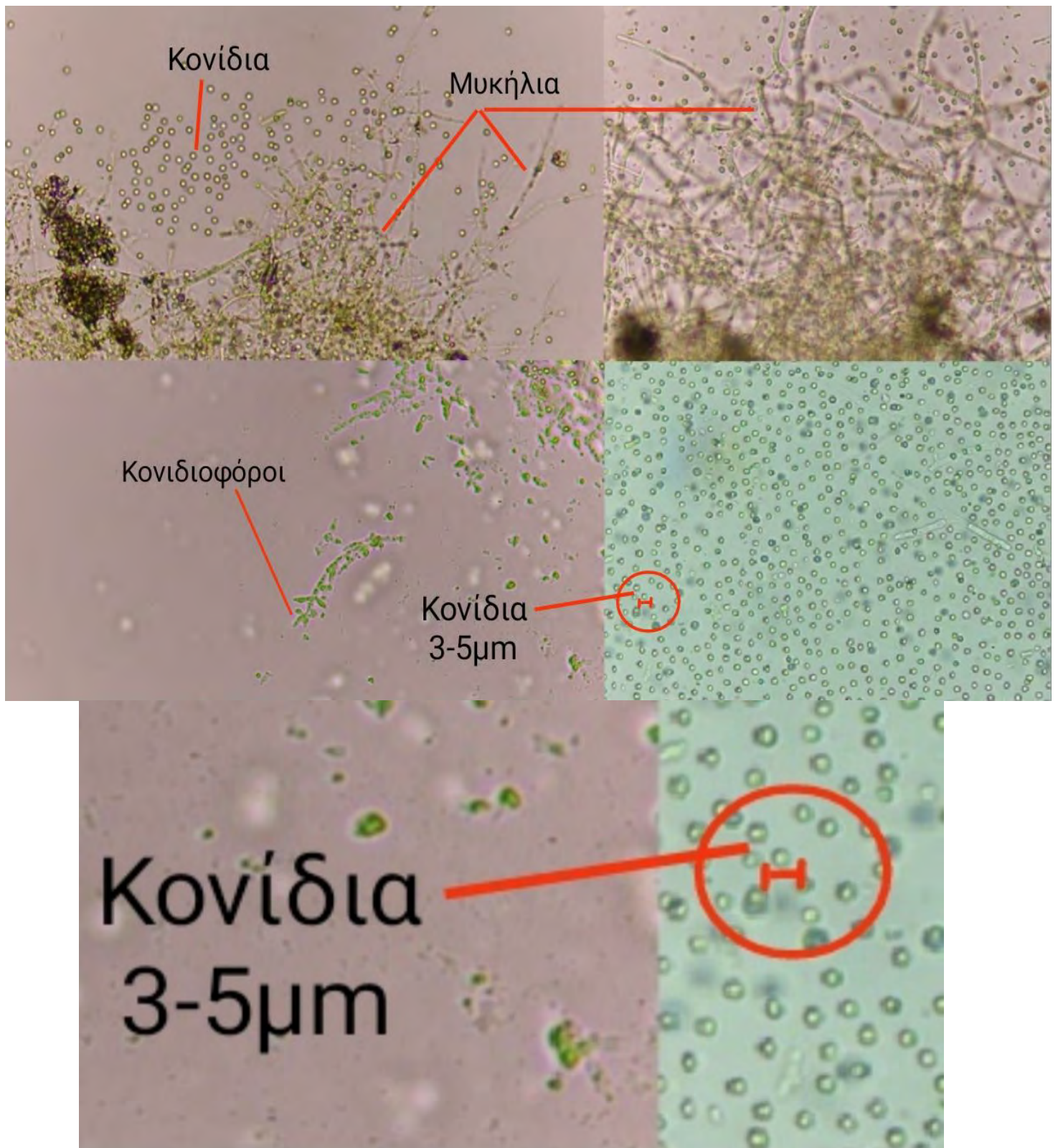


Εικόνα 1. Φυλογενετικό δέντρο του *Trichoderma spp* από 350εκ. χρόνια πριν. (Kubicek, C.P., Steindorff, A.S., Chenthamara, K. Et al., 2019. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5680-7>)

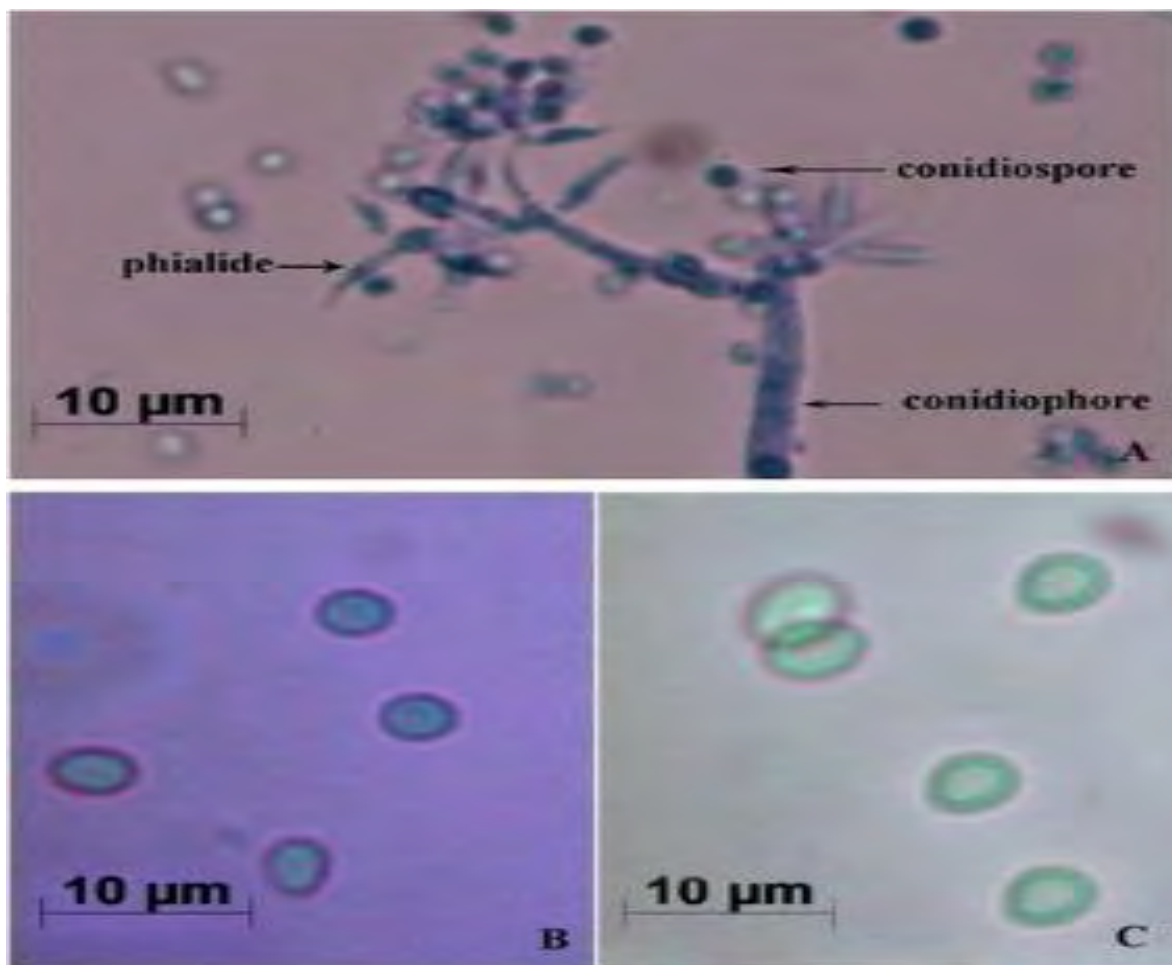
2.2. Αναγνώριση του *Trichoderma spp.*

2.2.1. Μορφολογικά χαρακτηριστικά του *T. harzianum*.

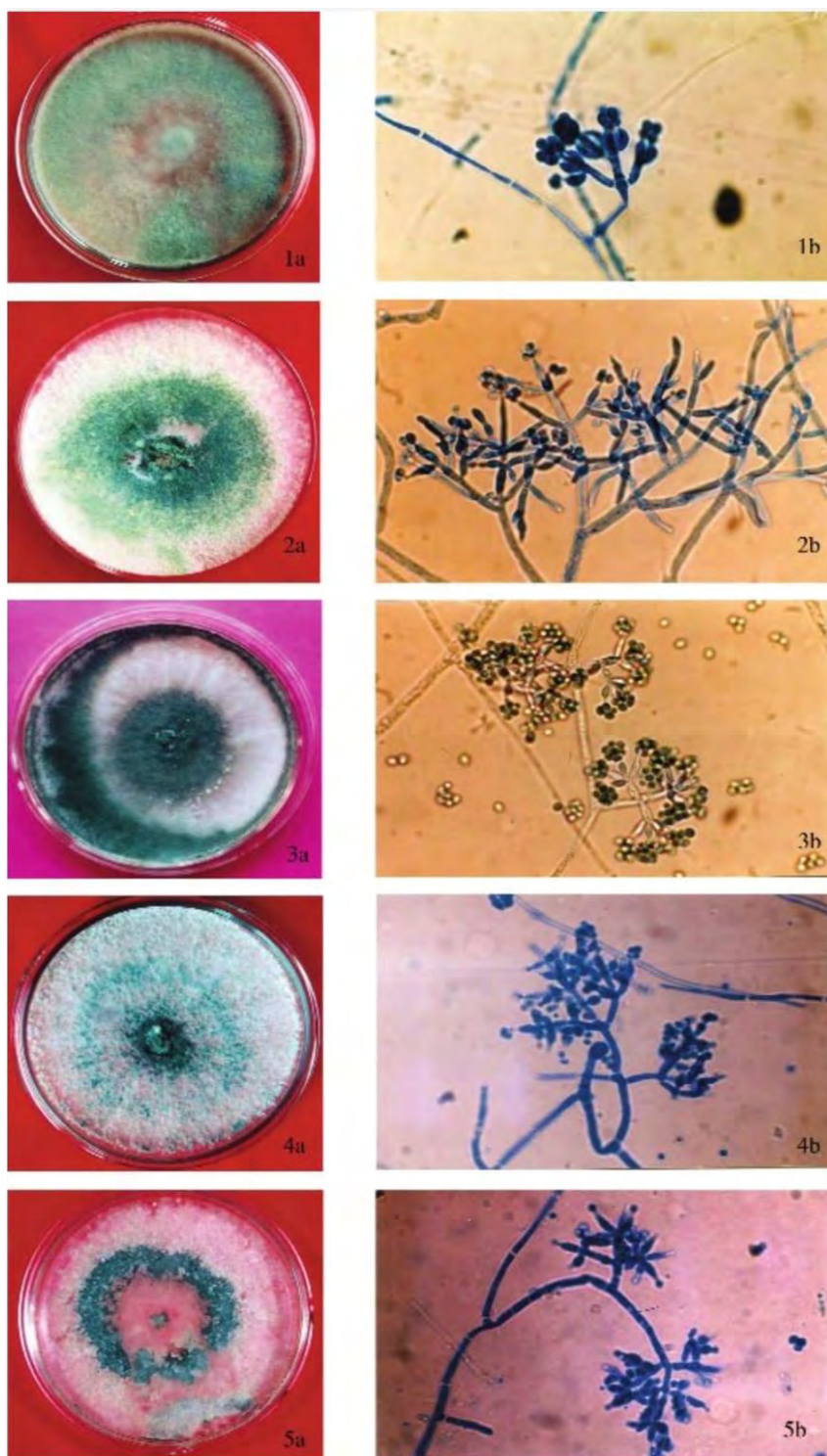
Μορφολογικά σε μακροσκοπικό επίπεδο στη φύση εμφανίζεται ως μούχλα με μπλε-πράσινο χρώμα εξωτερικά των κορμών των δέντρων. Σε καλλιέργεια στο εργαστήριο εμφανίζεται με διάφορα σχήματα όπως δακτυλίους με σκούρο πράσινο και λευκό χρώμα, όπως για παράδειγμα το *T. harzianum*. Άλλα μοτίβα και χρώματα που εμφανίζουν οι εργαστηριακές καλλιέργειες είναι σκούροι πράσινοι και ανοιχτοί κίτρινοι δακτύλιοι, χαρακτηριστικό του *T. viride* σε καλλιέργεια PDA (Potato Dextrose Agar), ανοιχτοί πράσινοι και λευκοί δακτύλιοι όπου εμφανίζει το *T. reesei* και λοιπά. Μακροσκοπικά και στη φύση, αλλά και σε εργαστηριακές καλλιέργειες, τα είδη του *T. harzianum* και *T. reesei* μπορεί να έχουν πολλές ομοιότητες που τα καθιστούν δύσκολα να αναγνωριστούν, όμως μικροσκοπικά οι διαφορές τους είναι πολύ χαρακτηριστικές. Σε μικροσκοπικό επίπεδο, τα μυκήλια του *T. harzianum* χαρακτηρίζονται από τους ενωμένους θαλλούς. Το μέγεθος του μυκηλίου μετριέται δύσκολα εξαιτίας των διακλαδώσεων των κονιδιοφόρων κατά μήκος των θαλλών, όπως και των σπορίων καθώς εμφανίζονται σε διάφορα μεγέθη αλλά και σχήματα. Για παράδειγμα το *T. harzianum*, φέρει στρογγυλά πράσινα σπόρια, τα οποία έχουν μέγεθος 3-5μm, ενώ το *T. citrinoviride*, φέρει σπόρια τα οποία έχουν οβάλ σχήμα με πράσινο χρώμα και είναι μικρότερα των 10μm (G. E. Harman, 2000).



Εικόνα 2. Μικροσκοπικές παρατηρήσεις *T. harzianum* όπου φαίνονται τα μυκήλια, οι κονιδιοφόροι και τα κονίδια. (Καράτζιου Ζαχαρούλα)



Εικόνα 3. Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά του *T. viride* από έρευνα των K. Neethu et.al., 2012. (https://file.scirp.org/Html/11-7300418_25831.htm)



Εικόνα 4. Η φωτογραφία δείχνει αποικίες στελεχών *Trichoderma* σε θρεπτικόPDA (ραχιαία όψη) και κονιδιοφόρο με κονίδια. 1α & 1β. *T. virens* (IMI-392430), 2α & 2β. *T. pseudokoningii* (IMI-392431), 3α & 3β. *T. harzianum* (IMI-392432), 4α & 4β. *T. harzianum* (IMI392433) και 5α

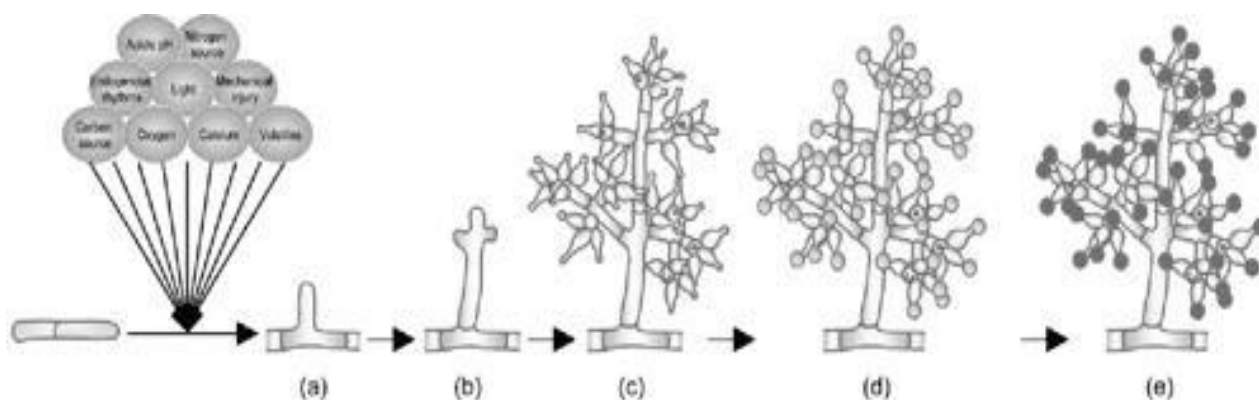
& 5b.*T. harzianum* (IMI-392434). (RAHMAN, AHSANUR; BEGUM, MOST. FERDOUSI; RAHMAN, MATIUR; BARI, M. A.; ILLIAS, G.N.M.; and ALAM, M. FIROZ (2011). <https://doi.org/10.3906/biy-0905-8>)

2.3. Κύκλος ζωής του *Trichoderma spp.*

Τα περισσότερα είδη *Trichoderma spp* αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες 20° – 30° C. Ζούνε ενδοφυτικά στις ρίζες των φυτών και βρίσκονται σε χώμα με υψηλή οργανική ύλη και υγρασία. Το *Trichoderma spp* έχει όριο ζωής 28 ημερών στη φύση, όπου πολλαπλασιάζεται συνεχώς. Υπάρχουν δύο τρόποι πολλαπλασιασμού του *Trichoderma spp*, ο πολλαπλασιασμός μέσω αγενής φάσης, όπου ένα άτομο παράγει ένα γενετικό αντίγραφο του προγόνου του, χωρίς τη συνεισφορά άλλου ατόμου. Εκτός αυτού υπάρχει και ο αγενής τρόπος πολλαπλασιασμού της εκβλάστησης, όπου μια εκβλάστηση αναπτύσσεται στην επιφάνεια της υφής, με το κυτταρόπλασμα να είναι συνεχές με το μητρικό. Ο πυρήνας του μητρικού κυττάρου διαιρείται και ένας από τους θυγατρικούς πυρήνες μεταφέρεται στην εκβλάστηση και ο άλλος πυρήνας παραμένει στο μητρικό κύτταρο. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να παραχθεί μια αλυσίδα κυττάρων. Τελικά, οι επιμέρους εκβλαστήσεις αποκόπτονται από το μητρικό κύτταρο και μετατρέπονται σε μεμονωμένα κύτταρα. Οι εκβλαστήσεις που αποσπώνται από μια υφή ενός νηματοειδούς μύκητα συμπεριφέρονται ως σπόρια, δηλαδή βλαστάνουν, δημιουργώντας ο καθένας μια δομή που ονομάζεται βλαστικός σωλήνας, ο οποίος αναπτύσσεται σε μια νέα υφή.

Ο δεύτερος τύπος πολλαπλασιασμού του *Trichoderma spp* γίνεται με σεξουαλική αναπαραγωγή, όπου γίνεται σε τρεις διαδοχικές φάσεις. Αρχικά λαμβάνει χώρα η πλασμογαμία, όπου το πρωτόπλασμα δύο γονικών κυττάρων συγχωνεύεται, χωρίς τη συγχώνευση των πυρήνων, φέροντας δύο απλοειδείς πυρήνες κοντά στο ίδιο κύτταρο. Έπειτα ακολουθεί η καρυογαμία κατά την οποία οι δύο απλοειδείς πυρήνες ενώνονται και δημιουργούν έναν διπλοειδή πυρήνα, το ζυγωτό.

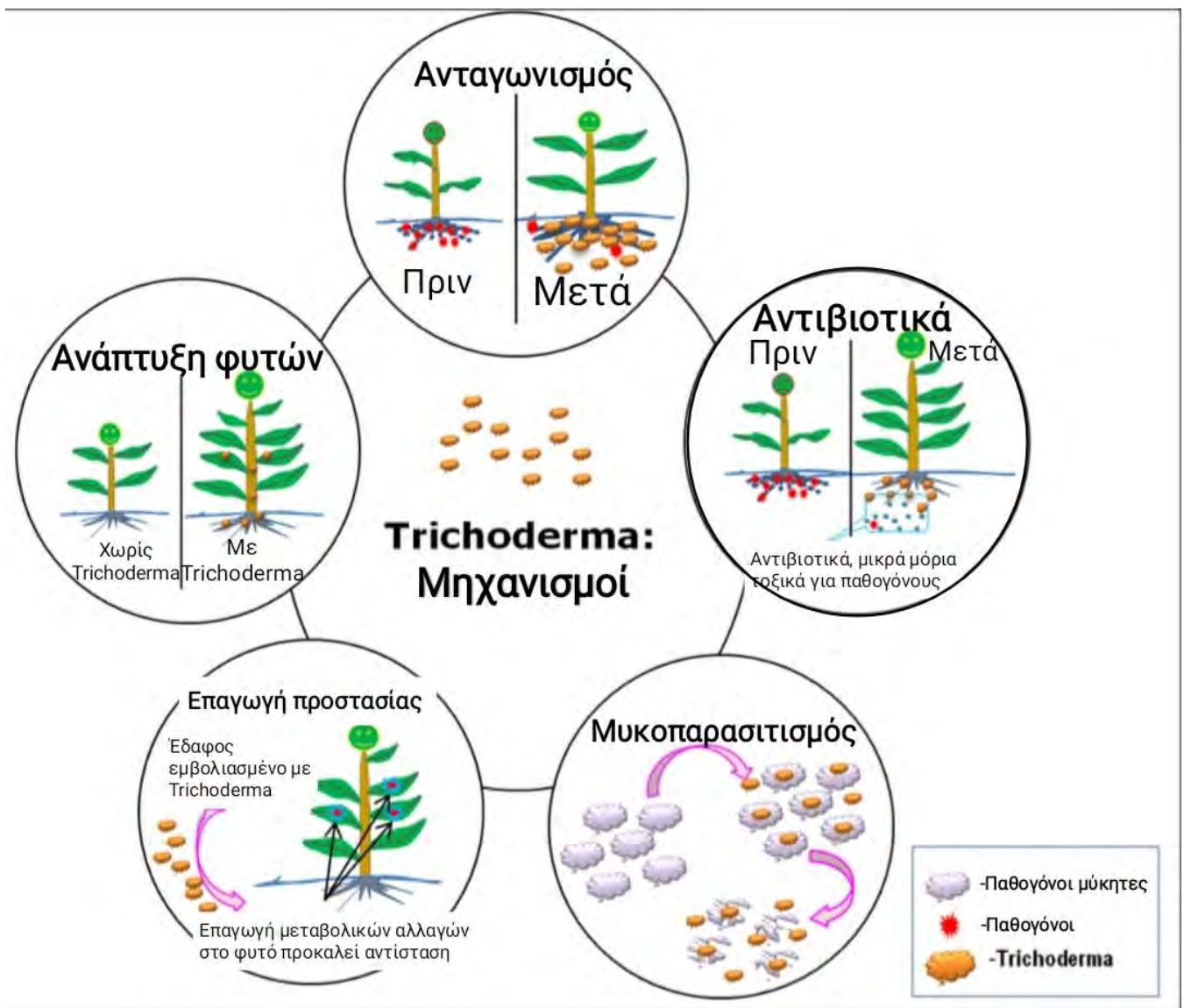
Ο πολλαπλασιασμός του γίνεται μέσω αγενής μονοκύτταρης σποροποίησης πράσινων κονιδίων (3-5 μm) στους κονιδιοφόρους και απελευθερώνονται σε μεγάλους αριθμούς. Επίσης σχηματίζονται μεσοκλασματικά χλαμυδιοσπόρια τα οποία είναι επίσης μονοκύτταρα, αν και δύο ή περισσότερα χλαμυδιοσπόρια μπορούν να ενωθούν μεταξύ τους.



Εικόνα 5. Κονιδιογένεση στο *Trichoderma* μετά από απόκριση σε διαφορετικά περιβαλλοντικά ερεθίσματα όπως όξινο pH, πηγή αζώτου N και άνθρακα C, ενδογενείς ρυθμοί, φως, τραυματισμοί, οξυγόνο O, ασβέστιο Ca και πτητικά. (a) Εμφάνιση κατακόρυφων υφών, (b) Διακλάδωση υφών, (c) Ανάπτυξη φιαλιδίων, (d) Εμφάνιση υαλικών κονιδίων, (e) Ωρίμανση μελανόχρωμων κονιδίων. (Steyaert, J. M., Weld, R. J., Mendoza-Mendoza, A., & Stewart, A. (2010). <https://doi.org/10.1099/mic.0.041715-0>)

3. Μηχανισμοί δράσης του *Trichoderma spp.*

Το *Trichoderma spp* ζει συμβιωτικά με τον ξενιστή του, συμβάλλοντας στην ανάπτυξή του, ποικιλοτρόπως. Συγκεκριμένα, ανταγωνίζεται άλλους μύκητες, που είναι παθογόνοι και στερούν το φυτό από θρεπτικές ουσίες. Οι μηχανισμοί δράσης του *Tirchoderma spp* είναι ο ανταγωνισμός για θρεπτικά με άλλους μικροοργανισμούς, συστηματική προστασία φυτού, μυκοπαρασιτισμός, παραγωγή αντιβιοτικών και προώθηση ανάπτυξης. Κάποια είδη *Trichoderma*, όπως το *T. Harzianum* και *T. Viride*, έχουν την ικανότητα να δρουν και με τους πέντε (5) μηχανισμούς, με αποτέλεσμα να είναι οι πλέον διαδεδομένοι παράγοντες βιολέγχου παγκοσμίως.



Εικόνα 6. Μηχανισμοί προστασίας και ανάπτυξης των φυτών μέσω του *Trichoderma spp.*

3.1. Μυκοπαρασιτισμός.

Κατά τον παρασιτισμό άλλων μυκήτων, το *Trichoderma* εκκρίνει αντιβιοτικούς δευτερογενείς μεταβολήτες, όπως πεπταΐμπόλες (βιολογικά ενεργά πεπτίδια που περιέχουν 7-20 υπολείμματα αμινοξέων), γλοιβιρίνη, μία αντι-μυκητιστατική ένωση, και γλοιιοτοξίνη, μία μυκοτοξική ένωση που περιέχει θείο, οι οποίες ενώσεις μπορούν να προσβάλλουν πολλά είδη μυκήτων. “Αυτοί οι δευτερογενείς μεταβολίτες ανήκουν στις ομάδες των πυρονίων, των τερπενοειδών, των στεροειδών και των πολυκετιδίων που είναι μη πολικές ενώσεις με χαμηλή μοριακή μάζα. Παράγει επίσης μη ριβοσωμικά πεπτίδια όπως οι επιπολυθειοδιοξοπιπεραζίνες (ETPs) όπου τα περισσότερα έχουν αντιμικροβιακή δράση.” (B. Sarma et. al., 2014). Κατά τον μυκοπαρασιτισμό, το *Trichoderma spp* διεισδύει στο κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή αποικοδομώντας το και έπειτα χρησιμοποιεί το εσωτερικό του. Αυτό επιτυγχάνεται με τη βοήθεια ορισμένων λυτικών ενζύμων, όπως χιτινάσες, γλυκανάσες και πρωτεάσες, τα οποία επάγονται στο *Trichoderma* πριν έρθουν σε άμεση επαφή με τον ξενιστή.

Στην έρευνα των B. Sarma et. al. 2014, βρέθηκε πως όταν το *Trichoderma* αλληλεπέδρασε με τον μύκητα *R. solani*, εντοπίστηκε ένας διαχυτικός παράγοντας που παράχθηκε από τον ξενιστή και είναι υπεύθυνος για την επαγόμενη μεταγραφή του γονιδίου ech42 (ενδοχιτινάση 42 που κωδικοποιεί) στο *Trichoderma* πριν από οποιαδήποτε φυσική επαφή. Στην άμεση επαφή μεταξύ του *Trichoderma* και του ξενιστή του, η περιέλιξη των μυκηλίων του *Trichoderma* γύρω από τις υφές του ξενιστή συμβαίνει από τις λεκτίνες που υπάρχουν στο κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή. “Η παραγωγή λυτικών ενζύμων και ο σχηματισμός της δομής μόλυνσης προκαλούνται από χημικά συστατικά του μύκητα ξενιστή που μπορεί να είναι είτε δομικά είτε εξωκυτταρικά και κατηγοριοποιούνται ως επαγόμενη απόκριση”. Στην έρευνα των J. Inbar and I. Chet για τον μυκοπαρασιτισμό του *T. harzianum* βρέθηκαν

ίδια αποτελέσματα, όπου ο μυκοπαρασιτισμός του *T. harzianum* στον φυτοπαθογόνο μύκητα *Sclerotium rolsii* έγινε μέσω της χρήσης ισοθιοκυανικής φλουορεσκεΐνης (FITC) συνδεδεμένης με λεκτίνες ή Calcofluor White M2R.

Οι ερευνητές Edna Sharon et. al., 2007 , συμπέραναν πως το gm επέτρεψε την προσκόλληση του μύκητα και ενίσχυσε την παρασιτική δράση του *Trichoderma*, εκτός του *T. harzianum*, και ενεργοποιεί την παραγωγή πρωτεολυτικών και χιτινολυτικών ενζύμων του *Trichoderma*. “Το *T. asperellum* GH-11 παρουσίασε χαμηλότερες παρασιτικές ικανότητες που μπορεί να σχετίζονται με ανεπαρκή πρωτεολυτική δραστηριότητα αυτής της απομόνωσης, ενώ το *T. atroviride* παρουσίασε τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα για τον παρασιτισμό των J2s (νεαρά άτομα δευτέρου σταδίου νηματώδη), πιθανώς λόγω των υψηλών πρωτεολυτικών δραστηριοτήτων του.” Εξαιτίας του gm, ακινητοποιήθηκαν τα J2 που παρήχθησαν από τις απομονώσεις των γονιδίων 203 και 44 των *T. atroviride* και *T. asperellum*, πιθανότατα εξαιτίας ενζύμων και μεταβολιτών, όπως οι πεπταΐβόλες, όπου οι δραστηριότητές τους μπορεί να συνεργάζονται. Έχει αναφερθεί πως στο *Trichoderma* λαμβάνει χώρα παράλληλος σχηματισμός και συνεργισμός υδρολυτικών ενζύμων και αντιβιοτικής δράσης πεπταϊμόλης κατά των φυτοπαθογόνων μυκήτων.

Τέλος, παρατηρήθηκε η περιτύλιξη των υφών, διακλάδωση, διεύρυνση των άκρων των υφών και εξειδικευμένα κύτταρα, χαρακτηριστικό πολλών μυκητιακών φυτοπαθογόνων που χρησιμοποιείται για τη μόλυνση των φυτών ξενιστών, κατά τη διάρκεια του παρασιτισμού σε νηματώδεις, που μοιάζει με τη μυκοπαρασιτική συμπεριφορά του *Trichoderma*.

3.2. Ανταγωνισμός

Οι ανταγωνιστικοί μύκητες, παράγουν επίσης δευτερογενείς μεταβολήτες οι οποίοι έχουν την ικανότητα να μειώνουν την ανάπτυξη και δραστηριότητα των παθογόνων μυκήτων. Στο περιβάλλον, το *Trichoderma spp* έχει την ικανότητα να μετατρέπει την οξειδωμένη μορφή του Fe^{3+} σε άλλες μορφές, καθώς ο οξειδωμένος σίδηρος (III) δεν είναι προσβάσιμος στα μικρόβια σε σχέση με το οξυδροξείδιο του σιδήρου ή το οξείδιο του σιδήρου, με αποτέλεσμα το *Trichoderma spp* να είναι ικανό να προσφέρει ιχνοστοιχεία, όπως σίδηρο και μαγγάνιο, στο φυτό με το οποίο συμβιώνει αλλά και στον εαυτό του, με αποτέλεσμα οι φυτοπαθογόνοι μικροοργανισμοί να στερηθούν και να μην έχουν τη δυνατότητα να προσβάλλουν το φυτό, καθώς έχει ενισχυμένο ανοσοποιητικό σύστημα. Η μετατροπή του οξειδωμένου σιδήρου (III) σε χρήσιμες μορφές γίνεται μέσω της παραγωγής οργανικών ενώσεων όπως κιτρικό οξύ, γλυκονικό οξύ και φουμαρικό οξύ, τα οποία μειώνουν το pH του εδάφους και αυξάνουν τη διαλυτοποίηση των φωσφορικών και ιχνοστοιχείων. Το *Trichoderma harzianum* έχει τη μεγαλύτερη παραγωγή σιδεροφόρων ενώσεων αλλά οι ενώσεις αυτές δεν είναι “μοναδικές”, όπως οι σιδεροφόρες ενώσεις που παράγει το *Trichoderma reesei* το οποίο μπορεί να βιοσυνθέτει cis-fusarinine.

3.3. Παραγωγή αντιβιοτικών.

Τα είδη του *Trichoderma* παράγουν ένα μεγάλο εύρος δευτερογενών μεταβολιτών, οι οποίοι χρησιμοποιούνται εναντίον φυτικών ασθενειών που προκαλούνται από φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς. Τα είδη του *Trichoderma* παράγουν αντιβιοτικά και ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους για την αναστολή της ανάπτυξης φυτοπαθογόνων μυκήτων, όταν το φυτό ξενιστής βρεθεί σε επαφή με τον εκάστοτε μύκητα. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τους πτητικούς (χρήσιμες και τοξικές ενώσεις πολυκετιδικών συνθέσεων) και μη πτητικούς δευτερογενείς μεταβολίτες (μη ριβοσωμικές πεπτιδικές συνθέσεις), όπου ο ρόλος τους είναι η αποτροπή του αποικισμού σε φυτοπαθογόνους μύκητες, στο φυτό. Από αυτούς τους δευτερογενείς μεταβολίτες γίνεται η σύνθεση των πεπταϊβόλων και αποτελούνται από 2-αμινο-ισοβουτυρικό οξύ και άλλα μη πρωτεϊνογενή αμινοξέα, που παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες με αντιβιοτικές δράσεις έναντι παθογόνων μυκήτων και βακτηρίων.

Σε έρευνα που έχει διεξαχθεί σχετικά με το *Trichoderma pseudokoningii*, έχει βρεθεί πως οι πεπταϊβόλες που παράγει προκαλούν προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο στους φυτοπαθογόνους μύκητες, προκαλώντας αποπτωτικό θάνατο. Οι περιβαλλοντικές συνθήκες και η διαθεσιμότητα εξωγενών θρεπτικών συστατικών (εκκρίματα ριζών, επαφή θρεπτικών συστατικών στην επιφάνεια των φύλλων, διαθεσιμότητα οργανικών συστατικών στο έδαφος), επηρεάζουν τη παραγωγή αντιβιοτικών από τα είδη *Trichoderma*. Οι πεπταϊβόλες έχουν την ικανότητα, επίσης, να σχηματίζουν πόρους σε λιπιδικές μεμβράνες διπλής στιβάδας, όπως και έχουν αντιμυκητιακές, αντιβακτηριακές και σπάνια αντιϊικές δράσεις.

3.4. Επαγωγή συστηματικής και τοπικής προστασίας.

Η συστηματική και τοπική προστασία του φυτού από το *Trichoderma*, συμβαίνει μέσω πολύπλοκων αντιδράσεων μεταξύ εκλυτικών παραγόντων που παράγονται από τα μικρόβια και τους φυτικούς υποδοχείς, με αποτέλεσμα τα φυτικά κύτταρα να δέχονται φυσικές και βιοχημικές αλλαγές. Όμως, για την εκκίνηση αυτών των πολύπλοκων διαδικασιών, είναι αναγκαία η παραγωγή του σαλικυλικού οξέος (salicylic acid-SA), το οποίο μόριο παράγεται εξαιτίας της συστηματικής επίκτητης αντίστασης (Systematic Acquired Resistance-SAR), που προκαλεί αντίσταση σε ολόκληρο το φύλλωμα. Εκτός αυτού, τα είδη *Trichoderma* έχουν την ικανότητα να επάγουν τη σύνθεση ρυθμιστικών πρωτεϊνών στα φυτά, κυρίως όταν επικρατούν συνθήκες στρες από φυτικές ασθένειες. Ο ρόλος των ρυθμιστικών πρωτεϊνών που έχουν παραχθεί, είναι η ανίχνευση μοριακών τελεστών που παράγονται από τα μικρόβια και η ενεργοποίηση των συστημάτων άμυνας. Εξαιτίας της συστηματικής επίκτητης αντίστασης, έχει βρεθεί πως ακόμη και πολλά χρόνια μετά τον εμβολιασμό ενός φυτού με κάποιο είδος *Trichoderma*, το φυτό εμφανίζει μια γονιδιακή ρύθμιση η οποία ενεργοποιεί έναν μηχανισμό προσαρμογής στο φυτό σχετικά με την άμυνα του φυτού. Κατά τον πολλαπλασιασμό ενός είδους *Trichoderma* που έχει χρησιμοποιηθεί για εμβολιασμό σε ρίζες ενός φυτού, το *Trichoderma spp* εξουδετερώνει το αμυντικό σύστημα του φυτού μέσω της παραγωγής αντιμικροβιακών ενώσεων, όπως η φυτοαλεξίνη. Εάν η αλληλεπίδραση αυτή πραγματοποιηθεί κατά τα πρώιμα στάδια του αποικισμού της ρίζας, οι μηχανισμοί προστασίας του φυτού και της αποτοξίνωσης των κυττάρων του, υφίστανται διεγερμένη ενεργοποίηση. Ο αποικισμός του *Trichoderma spp* μπορεί να προσφέρει συστηματική και τοπική προστασία τόσο σε μονοκοτυλήδονα, όσο και σε δικοτυλήδονα φυτά. Σημαντική λεπτομέρεια σχετικά με την επαγωγή συστηματικής και τοπικής προστασίας στα φυτά, είναι πως η επιτυχία της εξαρτάται από τις

περιβαλλοντικές συνθήκες και παράγοντες, τις σχέσης συμβιωτών στη ριζόσφαιρα και τους παθογόνους που προσβάλλουν το φυτό.

3.5. Ανάπτυξη φυτών.

Όπως έχει προαναφερθεί, η συμβιωτική σχέση μεταξύ φυτού και *Trichoderma spp.*, συμβαίνει ενδοφυτικά, δηλαδή στη ριζόσφαιρα του φυτού, και η ύπαρξή του βελτιώνει τη θρέψη του φυτού και ταυτόχρονα συμβάλλει στην αντιμετώπιση του βιοτικού και αβιοτικού στρες. Λόγω της καλύτερης θρέψης, που συμβαίνει μέσω της πρόσληψης ιχνοστοιχείων και αδιάλυτων μορφών ενώσεων, το φυτό έχει τη δυνατότητα να αναπτύσσεται ταχύτερα αλλά και περισσότερο. Για παράδειγμα, σε μία έρευνα με βάση το *Trichoderma harzianum* και τη συνεισφορά του στα φυτά, και συγκεκριμένα σε σπορόφυτα (φυτά που προέρχονται από σπόρους) ντομάτας και αγγουριού, βρέθηκε πως αύξησε τη συγκέντρωση ιχνοστοιχείων και βασικών στοιχείων όπως Fe, Zn, Cu, Mn, Mg, Ca, N, P, K και Na τόσο στους βλαστούς όσο και στις ρίζες, μέσω της ικανότητάς του να παράγει φυτοορμόνες, σιδηροφόρα και ένζυμα διαλυτοποίησης φωσφορικών. Οι φυτοορμόνες αποτελούν ρυθμιστικούς παράγοντες των κυτταρικών λειτουργιών, της μορφοποίησης του φυτού, της οργανογένεσης και καθορισμό του φύλλου, της αναπαραγωγής και την απόκριση σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Στις φυτοορμόνες περιλαμβάνονται οι κυτοκίνες, το ινδολο-3-οξικό οξύ, το αιθυλένιο, το σαλικυλικό οξύ και οι γιββερελλίνες, ενώ η αρζιανοπυριδόνη, η 6PP, το trichocereus A-D, οι κονινγκινίνες, η κυκλοτεροδιόλη, η αρζιανολίδη και το αρζιανικό οξύ (HA) είναι απομονωμένες ενώσεις που προσφέρουν ανάπτυξη στα φυτά ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους. Στο *T. harzianum* βρέθηκαν τα HA και

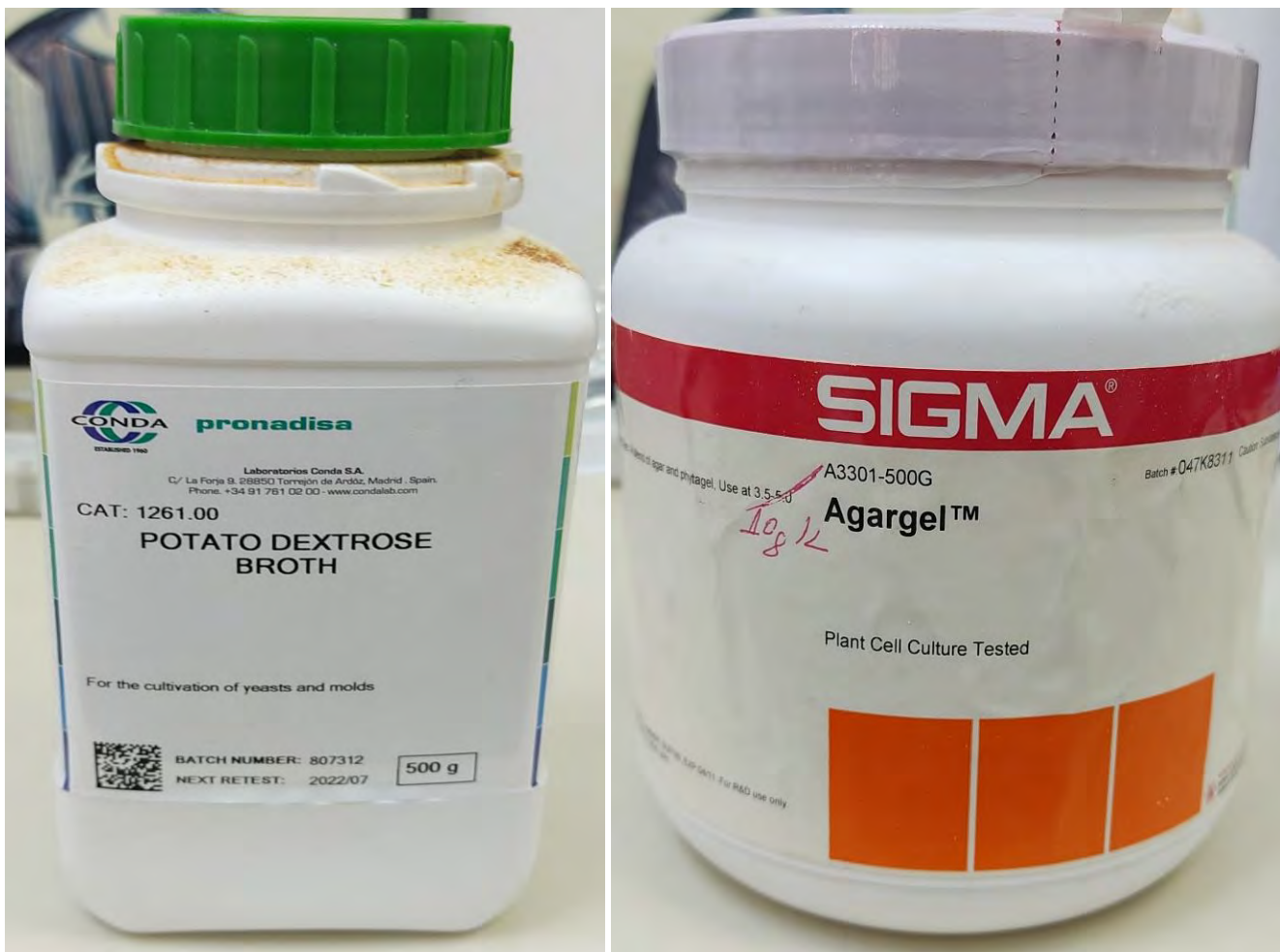
ισο-χαρζιανικό οξύ στους μεταβολίτες του, τα οποία προάγουν την ανάπτυξη των φυτών μέσω της ισχυρής δέσμευσης του σιδήρου.

Εκτός αυτού, τα είδη *Trichoderma virens* και *Trichoderma atroviride* μπορούν να παράγουν ορισμένους τύπους ινδόλων, που σχετίζονται με το ινδολο-3-οξικό οξύ (ινδόλες που σχετίζονται με το IAA). Μέσω του εμβολιασμού του *Trichoderma* στο φυτό *Arabidopsis*, παρατηρήθηκε πως η παραγωγή ινδόλων από το *Trichoderma* που σχετίζονται με το IAA, θα μπορούσε να θεωρηθεί μηχανισμός του *Trichoderma* έτσι ώστε να προάγει την ανάπτυξη του φυτού και στην αύξηση του αριθμού των δευτερογενών ριζών, οδηγώντας σε υψηλότερη βιομάζα. Τα είδη *Trichoderma* που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα του μαγγρόβιου *Avicennia marina*, αποδείχθηκε πως διαλύουν τον φώσφορο P από το αδιάλυτο φωσφορικό ασβέστιο $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, όπου η διαλυτοποίηση του P συσχετίζεται με την αύξηση της εξωκυτταρικής δραστηριότητας της φυτάσης (μια όξινη φωσφατάση- ένζυμο κατάλυσης διαλυτοποίησης φωσφορικών εστέρων), όπου η εξωκυτταρική δραστηριότητα της φυτάσης λαμβάνει χώρα μόνο με παρουσία $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

4. Υλικά και μέθοδοι.

4.1. Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν.

- Για τη παραγωγή PDA:



Εικόνα 7. Potato Dextrose Broth και Agargel.

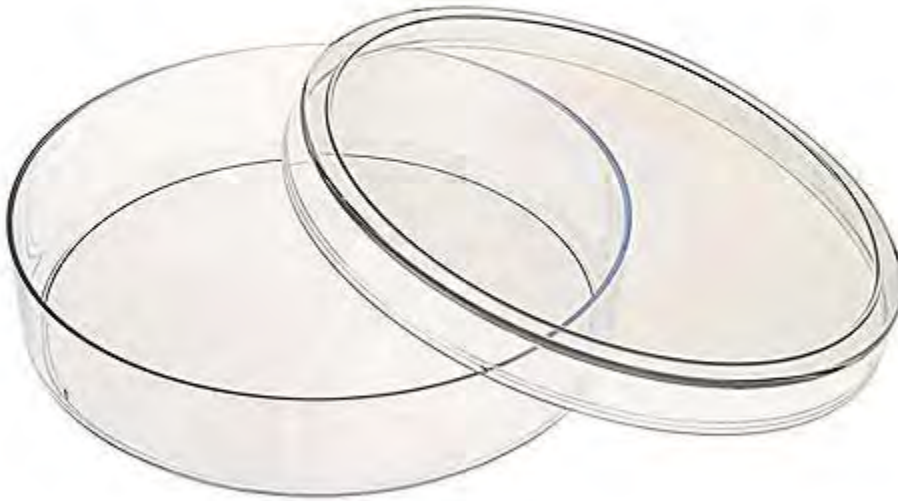


Εικόνα 8. (Αριστερή εικόνα) Μαγνητικός αναδευτήρας. (Δεξιά εικόνα) Μπουκαλάκι 500ml με πλαστικό πόμα.



Εικόνα 9. Αυτόκαυστος κλίβανος για αποστείρωση θρεπτικών και θανάτωση αποικιών.

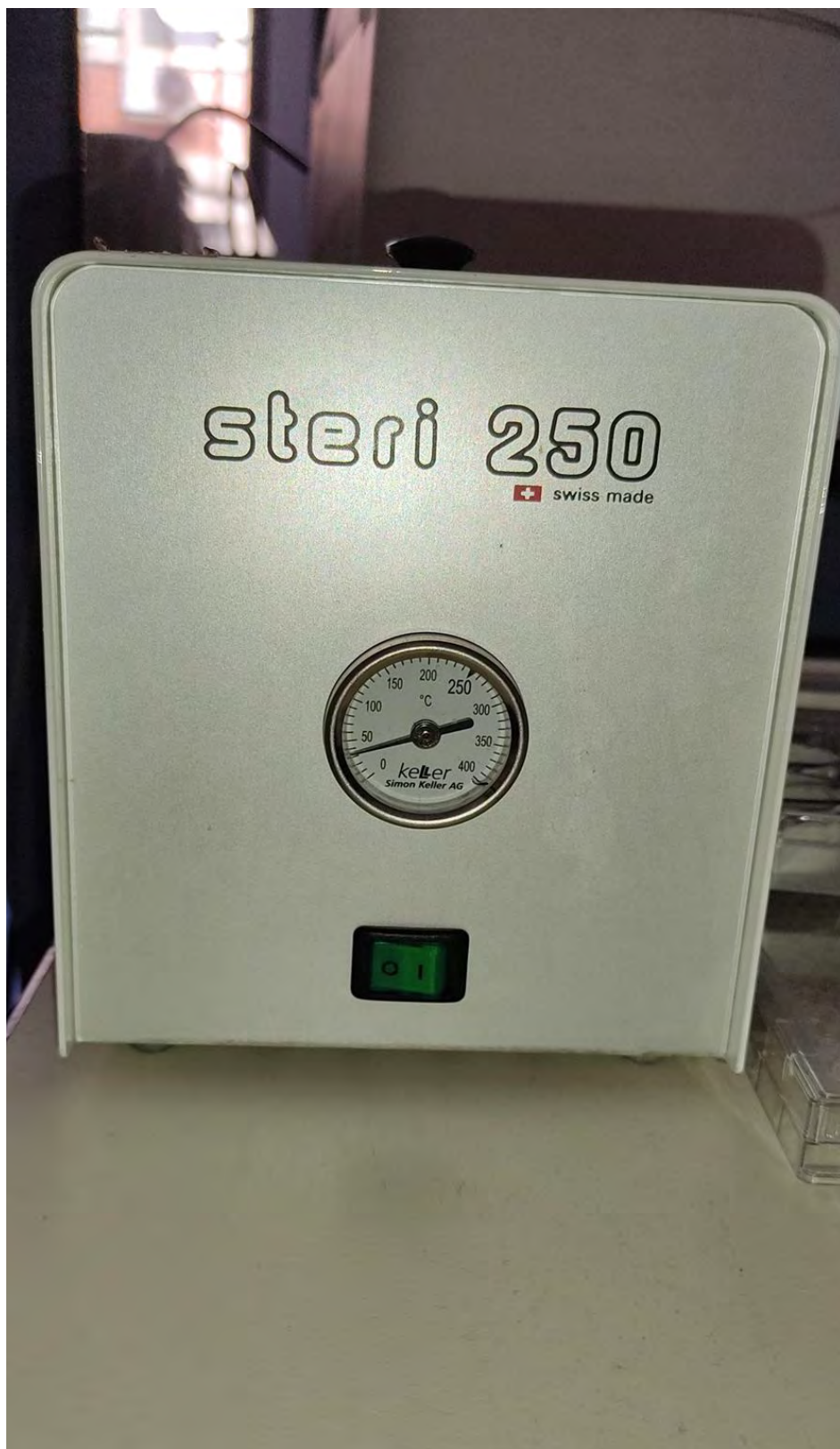
- Για τη παραγωγή καλλιιεργειών:



Εικόνα 10. Τρυβλίο πετρί 9mm.



Εικόνα 11. Μεταλλική τσιμπίδα με πλαστική λαβή.



Εικόνα 12. Μηχάνημα αποστείρωσης για τσιμπίδες/λαβίδες.

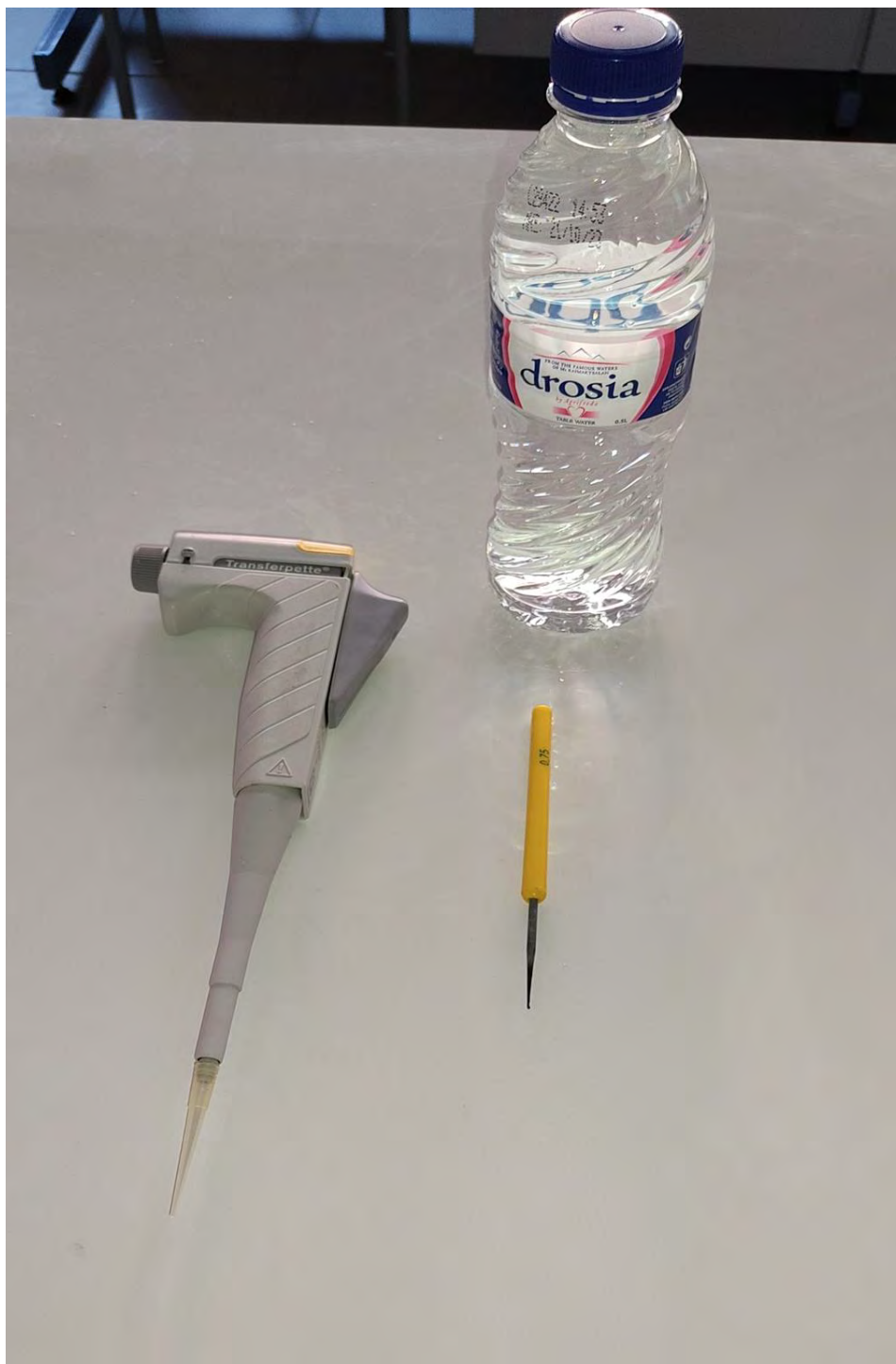


Εικόνα 13. Θρεπτικό PDA (Potato Dextrose Agar).

- Για δημιουργία δειγμάτων για μικροσκοπικές παρατηρήσεις:



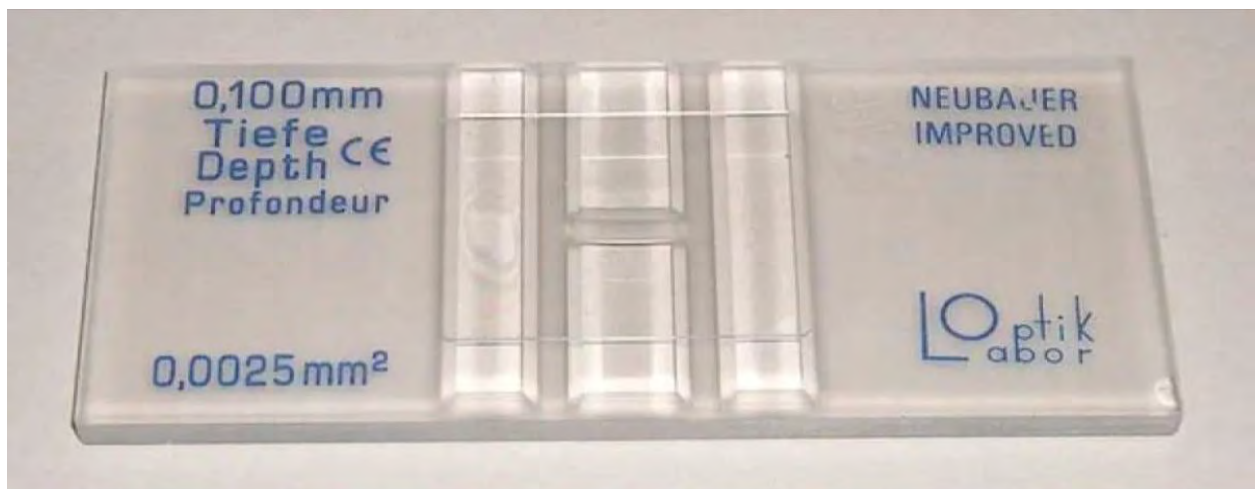
Εικόνα 14. (Αριστερή εικόνα) Γυάλινες διαφάνειες μικροσκοπίου.
(Δεξιά εικόνα) Γυάλινες διαφάνειες προστασίας.



Εικόνα 15. Εμφιαλωμένο νερό, αποστειρωμένη τσιμπίδα και μικροπιπέτα (10μL).



Εικόνα 16. Καλλιέργεια απο *T. harzianum*.



Εικόνα 17. Hematocytometer 0,100mm, Tiefe Depth Profondeur CE, 0,0025mm², NEUBAUER IMPROVED, L. Optik

4.2. Πρωτόκολλα.

4.2.1. Πρωτόκολλο παρασκευής PDA.

Για την παρασκευή 500ml Potato Dextrose Agar (PDA):

- ❖ 13,25gr Potato Dextrose Broth.
- ❖ 5gr Agargel σε 500ml νερό (για 1L νερό χρησιμοποιούμε 26,5gr PDB και 10g Agargel).
- ❖ Τοποθετούμε αποστειρωμένο μαγνήτη στο μπουκάλι.
- ❖ Τοποθετούμε το μπουκάλι με το μείγμα σε μαγνητικό αναδευτήρα έως να ομογενοποιηθεί.
- ❖ Όταν τελειώσει η διαδικασία της ομογενοποίησης του θρεπτικού, το τοποθετούμε στο αυτόκαυστο για αποστείρωση στους 121,5° C για 20 λεπτά. Το καπάκι δε πρέπει να είναι σφιχτό στο πώμα καθώς τα αέρια που παράγονται εγκλοβίζονται στο μπουκάλι, αλλά δε πρέπει να είναι χαλαρό καθώς το μείγμα θα αφυδατωθεί και θα καταστραφεί.
- ❖ Όταν η αποστείρωση ολοκληρωθεί και ο δείκτης ατμοσφαιρικής πίεσης δείχνει 0 και η θερμοκρασία είναι χαμηλότερη των 80° C ανοίγουμε το αυτόκαυστο και βάζουμε το θρεπτικό σε τρυβλία πετρί, χωρίς να ακουμπάμε το πώμα του μπουκαλιού.
- ❖ Εάν περισσέψει θρεπτικό στο μπουκάλι που χρησιμοποιήσαμε το τοποθετούμε στο ψυγείο. Τα υπόλοιπα θρεπτικά στα μπουκάλια τα αφήνουμε κλειστά ώστε να στερεοποιηθούν.
- ❖ Για την επόμενη χρήση των θρεπτικών τα τοποθετούμε στον θερμικό αναδευτήρα για να λιώσει και στον μαγνητικό αναδευτήρα

για να ομογενοποιηθεί ξανά το μείγμα, ώστε να μην υπάρχουν στερεά κομμάτια, διαφορετικά το μείγμα αχρηστεύει.

4.2.2. Πρωτόκολλο εργαστηριακής καλλιέργειας *T. harzianum*.

- ❖ Το δείγμα εμφανισιακά είχε μπλε-πράσινο χρώμα.
- ❖ Αποστείρωση τσιμπίδας που θα χρησιμοποιηθεί.
- ❖ Χρήση μάσκας μιας χρήσης ώστε να μην εισπνέονται τα κονίδια του δείγματος.
- ❖ Τοποθέτηση δείγματος με αποστειρωμένη τσιμπίδα σε θρεπτικό PDA σε τρυβλίο πετρί.
- ❖ Επώαση στους 25° C για 7 ημέρες.
- ❖ Έπειτα από 7 ημέρες εμφάνιση έντονων πράσινων και λευκών δακτυλίων στο τρυβλίο.
- ❖ Το δείγμα για την αποθήκευσή του έως την επόμενη χρήση και για να μη μολυνθεί το ασφαλίζουμε με ταινία Parafilm και το τοποθετούμε στο ψυγείο στους 4°C.
- ❖ Με αυτόν τον τρόπο η καλλιέργεια μπορεί να επιβιώσει έως και 6 μήνες, όμως χρειάζονται τακτικές υπο- καλλιέργειες για τη διατήρηση του απομονωμένου δείγματος.

4.2.3. Πρωτόκολλο μαζικής παραγωγής *T. harzianum* με τη μέθοδο ζύμωσης στερεάς κατάστασης.

- ❖ Καλλιέργεια *Trichoderma harzianum* σε στερεό μέσο PDA για 5 ημέρες σε 30° C.
- ❖ Διατήρηση σε 4° C (διαρκεί το πολύ έως 6 μήνες) και τακτική υποκαλλιέργεια ανά 2 εβδομάδες.
- ❖ Προετοιμασία εμβολίου:
- ❖ Αποστείρωση 1,100γρ ιπποφαές και 500 ml νερό βρύσης.
- ❖ Συλλογή κονιδίων από την επιφάνεια 30 καλλιεργείων με χρήση 150ml αποστειρωμένου νερού και αραίωση του νερού που περιέχει κονίδια 1:1 με 150ml αποστειρωμένο νερό.
- ❖ Ρύθμιση συγκέντρωσης κονιδίων με αιματοκυτόμετρο σε $77,6 \cdot 10^5$ κονίδια/ml.
- ❖ Έγχυση δείγματος 300 ml σε 1,100γρ ιπποφαές και επώαση για 14 μέρες σε 25° C σε ξηρό σημείο στο σκοτάδι.

4.2.4. Πρωτόκολλο χρήσης αιματοκυτόμετρου.

- ❖ Hematocytometer 0,100mm, Tiefe Depth Profondeur CE, 0,0025mm², NEUBAUER IMPROVED, L. Optik.
- ❖ Αποτελείται από τη γυάλινη βάση που περιέχει 3 θαλάμους, όπου ο κεντρικός περιέχει δύο τετράγωνα καταμέτρησης κυττάρων/κονιδίων, 4 κατακόρυφες εσοχές και μία οριζόντια διαχωριστική εσοχή στον μεσαίο θάλαμο.

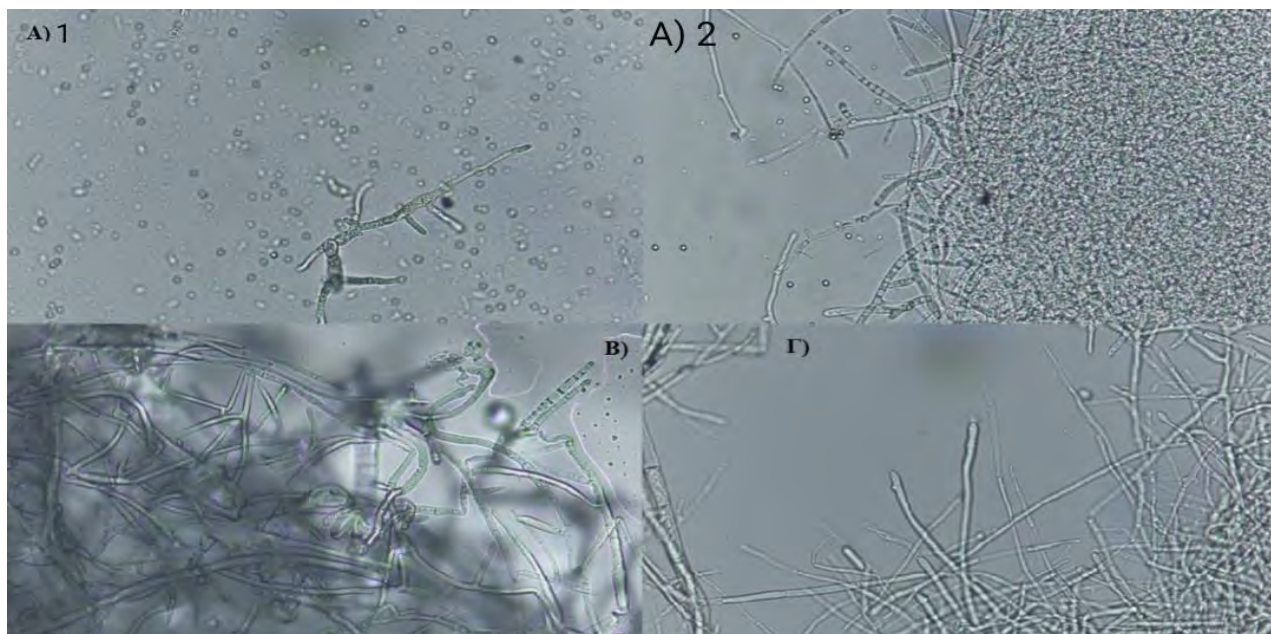
- ❖ Τοποθέτηση καλυπτρίδας στον θάλαμο καταμέτρησης, με τέτοιον τρόπο ώστε να καλύπτεται πλήρως ο μεσαίος θάλαμος που υπάρχουν τα τετράγωνα καταμέτρησης, και να στηρίζεται στους δύο διπλανούς θαλάμους.
- ❖ Λήψη 10μl από το δείγμα κονιδίων με πιπέτα.
- ❖ Διάχυση δείγματος κονιδίων με τη πιπέτα στην επιφάνεια του θαλάμου καταμέτρησης δίπλα από τη καλυπτρίδα.
- ❖ Το κενό που υπάρχει ανάμεσα από τον θάλαμο και τη καλυπτρίδα θα ρουφήξει το δείγμα μέσω τριχοειδής δύναμης και θα μείνει σταθερό λόγω της πίεσης που ασκείται.
- ❖ Τοποθέτηση του αιματοκυτόμετρου στο μικροσκόπιο και ρύθμιση μεγέθυνσης ώστε να φαίνονται τα τετράγωνα και πόσα σπόρια υπάρχουν μέσα.
- ❖ Μέτρηση σπορίων στα 4 ακριανά τετράγωνα και στο κεντρικό.
- ❖ $1 \text{ τετράγωνο} = 1 \text{ mm}^2$,
- ❖ Συνολικά κονίδια = $X + X + X + X + X = Y$
- ❖ Μέσος όρος κονιδίων = $Y/5 \text{ τετράγωνα} = Z$
- ❖ Συγκέντρωση κονιδίων/ml = $(Z/5 \text{ τετράγωνα όπου έγινε καταμέτρηση}) * 10^4 = X * 10^4 \text{ κονίδια/ml}$

4.3. Εργαστηριακά πειράματα.

Για να επιβεβαιώσουμε τον μηχανισμό μυκοπαρσιτισμού του *T. Harzianum*, κάναμε διπλή μόλυνση σε τρυβλία πετρί 9mm με θρεπτικό

μέσο PDA (Potato Dextrose Agar), όπου στη μια πλευρά εμβολιάσαμε *T. Harzianum* και στην αντίθετη εμβολιάσαμε μυκήλια μανιταριών. Χρησιμοποιήσαμε τέσσερα είδη μανιταριών, *Mycena acrangeliiana*, *Ischioderma reminosum*, *Schizophyllum commune* και *Fomes fomentarius* (Λαρισα 39.6312420, 22.3821652). Μετά από επώαση για 7 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου 25ο C, σε όλες τις καλλιέργειες υπερίσχυσε το *T. Harzianum*, καταβάλλοντας τα δύο τρίτα (2/3) του πετρί, εμποδίζοντας την ανάπτυξη των μανιταριών σχεδόν ολοκληρωτικά. Παρατηρείται επίσης και ο μηχανισμός του ανταγωνισμού για θρεπτικά, καθώς τα μυκήλια του *Trichoderma harzianum* έχουν καλύψει τα 2/3 του χώρου στο τρυβλίο, καθώς τα θρεπτικά συστατικά που υπάρχουν είναι περιορισμένα, με αποτέλεσμα τα μανιτάρια που χρησιμοποιήθηκαν να πεινάσουν και να μην έχουν πηγή ενέργειας για ανάπτυξη.

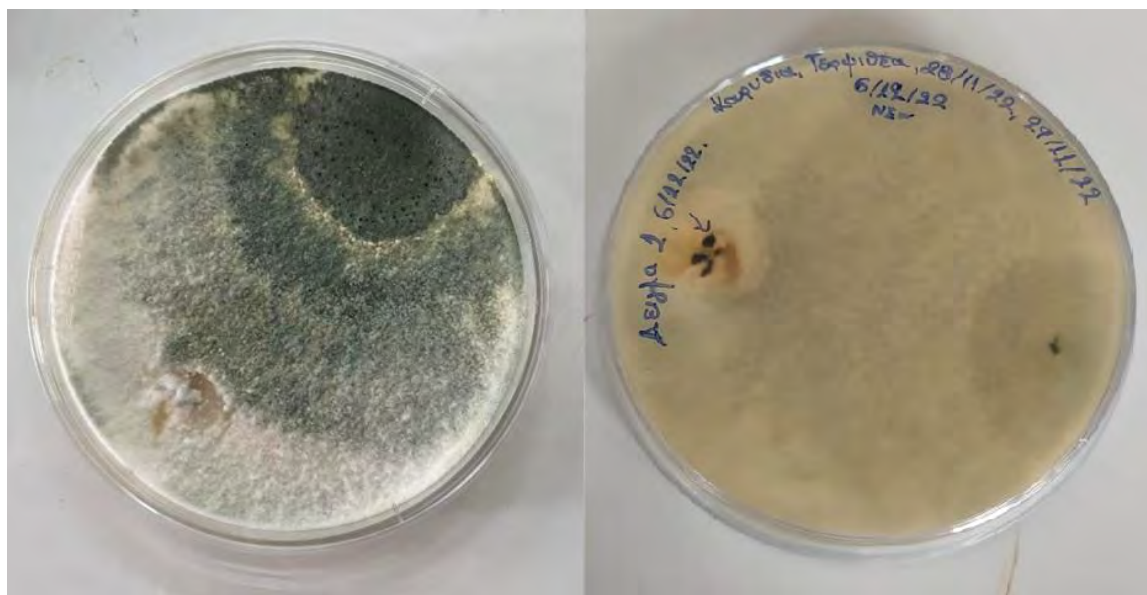
Οι ανταγωνιστικοί μύκητες, στη συγκεκριμένη περίπτωση το *Trichoderma harzianum*, παράγουν επίσης δευτερογενείς μεταβολήτες οι οποίοι έχουν την ικανότητα να μειώνουν την ανάπτυξη και δραστηριότητα των παθογόνων μυκήτων, στη συγκεκριμένη περίπτωση τα μανιτάρια, *Mycena acrangeliiana*, *Ischioderma reminosum*, *Schizophyllum commune* και *Fomes fomentarius*. Με αυτόν τον τρόπο το *Trichoderma harzianum* υπερίσχυσε των εκάστοτε μανιταριών.



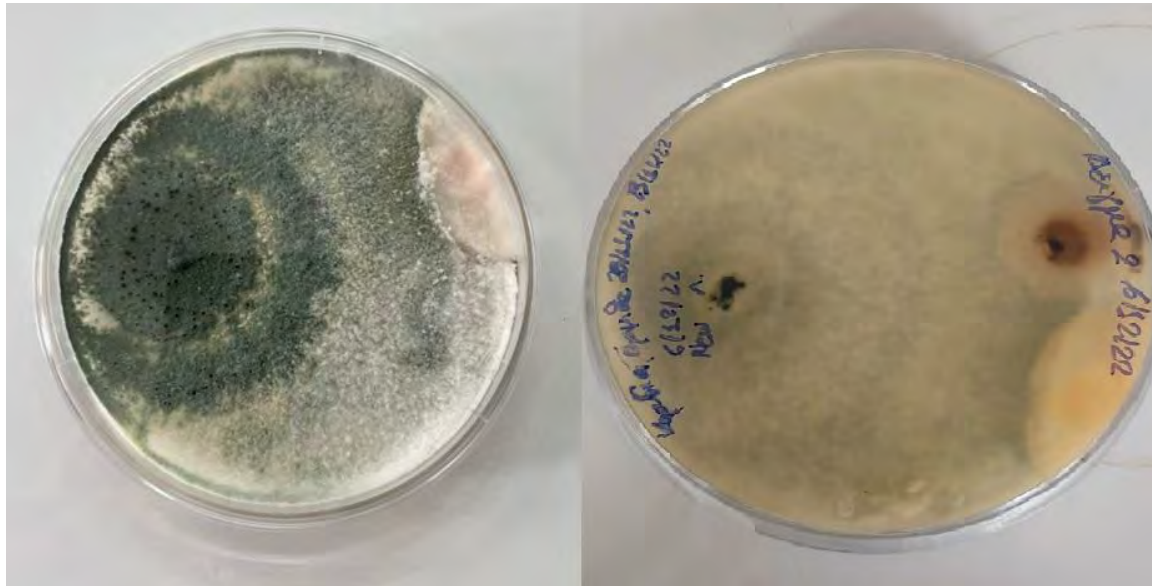
Εικόνα 18. A)1 και A)2 Νηματοειδείς υφές του μανιταριού *Mycena acrangeliiana*.

B)Νηματοειδείς υφές του μανιταριού *Ischioderma reminosum*.

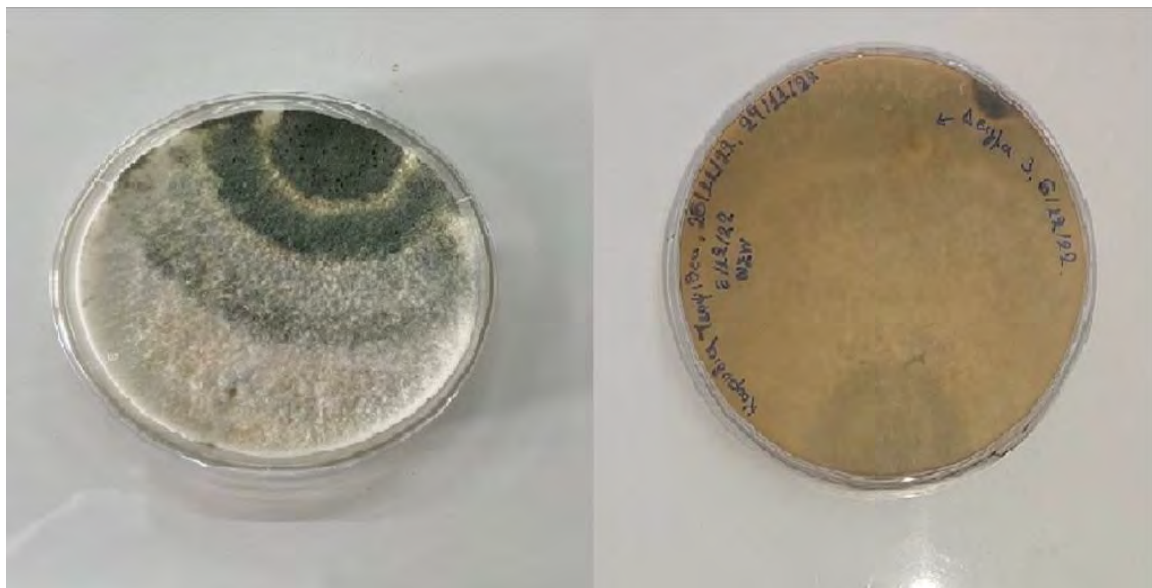
Γ)Νηματοειδείς υφές του μανιταριού *Schizophyllum commune*.



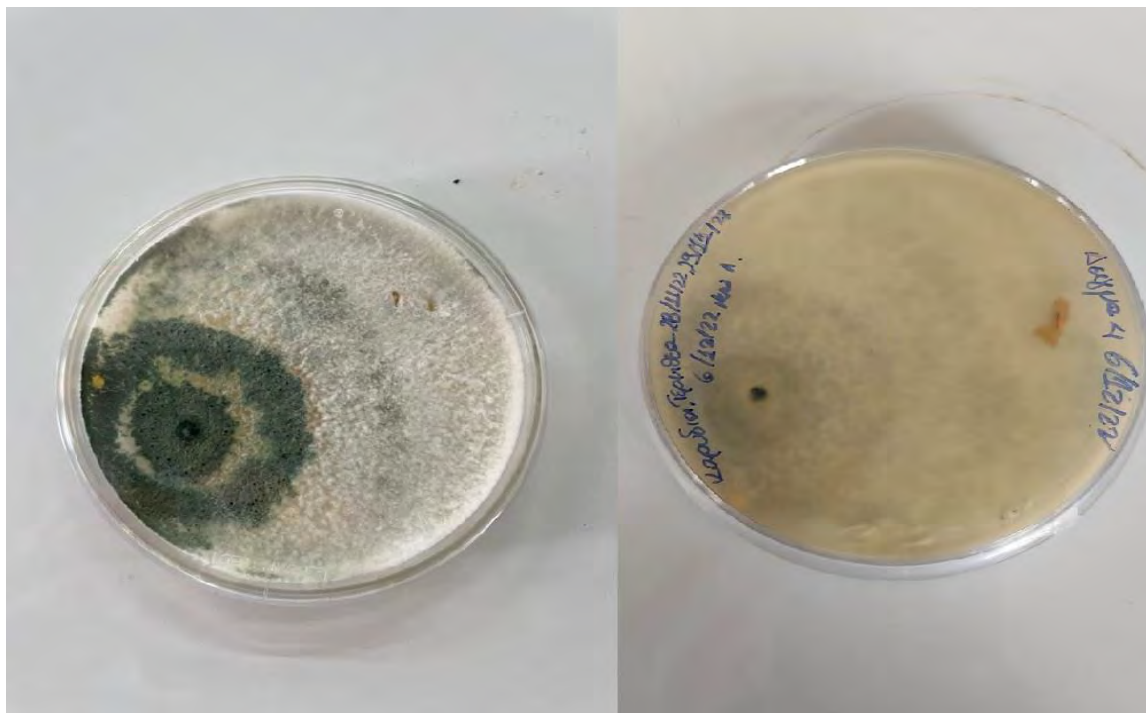
Εικόνα 19. *T. Harzianum* ενάντια *Schizophyllum commune* (δείγμα 1) (6.12.2022)



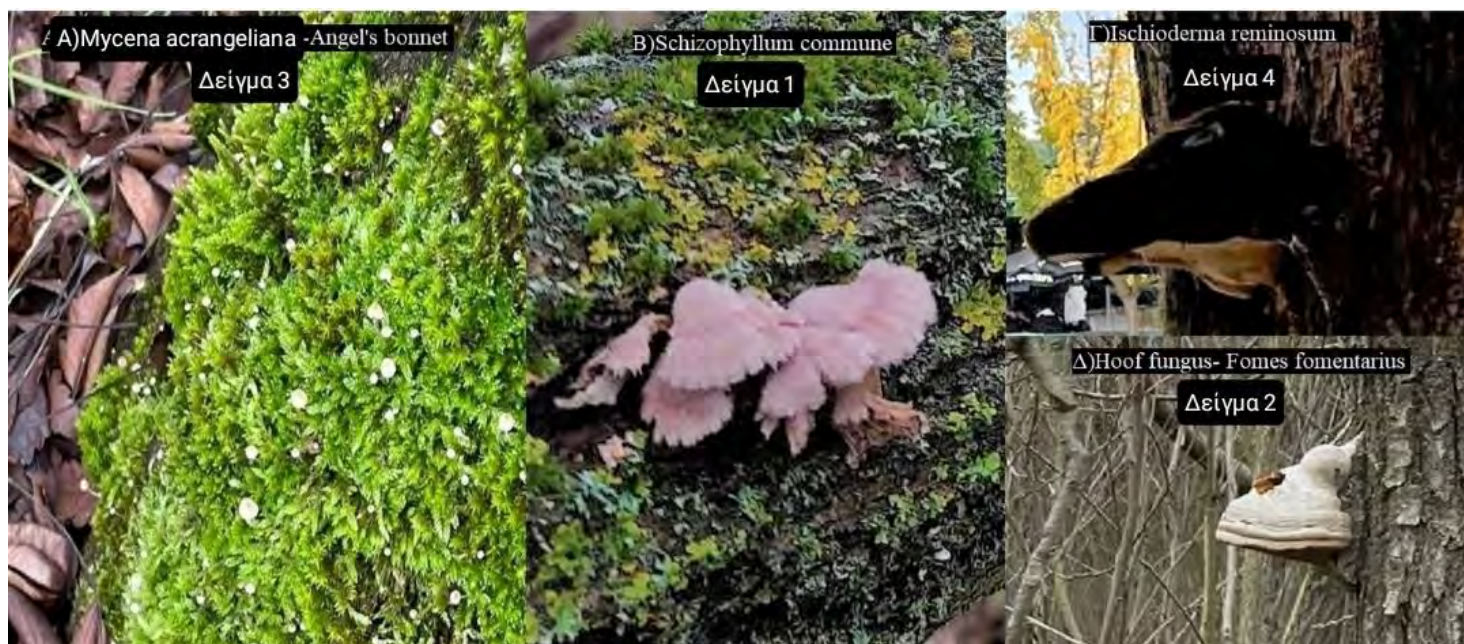
Εικόνα 20. *T. Harzianum* ενάντια *Fomes fomentarius* (δείγμα 2)
(6.12.2022)



Εικόνα 21. *T. Harzianum* ενάντια *Mycena acrangelliana* (δείγμα 3)
(6.12.2022)



Εικόνα 22. *T. Harzianum* ενάντια *Ischioderma reminosum* (δείγμα 4) (6.12.2022).



Εικόνα 23. Δείγματα μανιταριών:

α *Mycena acrangiana*

- b *Ischioderma reminosum*
- c *Schizophyllum commune*
- d *Fomes fomentarius*.

Στο πείραμα ζύμωσης στερεάς κατάστασης χρησιμοποιήθηκαν 1,1 κιλό στερεό θρεπτικό μέσο ιπποφαές και 500mL νερό βρύσης. Το θρεπτικό μέσο υπέστη αποστείρωση στους 121°C για 20 λεπτά σε ξηρή μορφή. Με 150mL νερό γίνεται η συλλογή κονιδίων από την επιφάνεια 30 καλλιεργειών οι οποίες διατηρούνταν στους 4o C στη συντήρηση. Τα 150mL νερό που περιέχουν κονίδια, αραιώνονται με άλλα 150mL νερό ώστε να υπάρχει 1:1 αραιώση. Από τα 300mL αραιωμένου δείγματος που θα χρησιμοποιηθεί, είναι αναγκαία η ρύθμιση των κονιδίων, η όποια πραγματοποιείται μέσω της χρήσης του αιματοκυτόμετρου. Στο αιματοκυτόμετρο χρησιμοποιούνται 10μL αραιωμένου δείγματος και έπειτα γίνεται καταμέτρηση στο μικροσκόπιο. Στο πείραμα βρέθηκαν $77,6 \cdot 10^5$ κονίδια/ml. Μετά από 14 ημέρες επώασης σε θερμοκρασία δωματίου 25o C- 30o C στο σκοτάδι, η σακούλα με θρεπτικό μέσο το ιπποφαές έδειξε μεγάλη ανάπτυξη του μύκητα *Trichoderma harzianum*, καθώς όλα τα στάδια κατά τη μαζική παραγωγή ήταν μετρημένα με πολύ συγκεκριμένες ποσότητες, με αποτέλεσμα το πείραμα μαζικής παραγωγής να ήταν επιτυχές.

5. Αποτελέσματα.

Στο εργαστήριο χρησιμοποιήσαμε το είδος *Trichoderma harzianum*, το οποίο βρήκε σε βρεγμένο σωρό ξύλων καρυδιάς στην περιοχή της Τερψιθέας (39.62493292976335, 22.347289702161856), Λάρισα, ο Καθ. Αναστασόπουλος. Το συγκεκριμένο είδος μύκητα είναι το πιο συχνό είδος που υπάρχει ενδοφυτικά στη ριζόσφαιρα των φυτών αλλά και σαπροφυτικά, όπως στη συγκεκριμένη περίπτωση στο ξύλο καρυδιάς. Το *T. harzianum* μακροσκοπικά στο ξύλο είχε μπλε εμφάνιση ενώ σε καλλιέργεια PDA εμφάνισε λευκούς και πράσινους δακτύλιους. Μικροσκοπικά, εμφανίζεται με υφές στις οποίες διακλαδίζονται οι κονιδιοφόροι, από τους οποίους παράγονται τα κονίδια σε πολύ μεγάλες ποσότητες, από τα οποία γίνεται η αγενής αναπαραγωγή του μύκητα.

Οι τακτικές ανακαλλιέργειες του μύκητα έδειξαν πως σε 7 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου 25° – 30° C έχει καλύψει πλήρως ένα τριβλίο και πως το όριο ζωής του στη συντήρηση στους 4° C διαρκεί έως 6 μήνες. Τα πειράματα δοκιμών των μηχανισμών του *Trichoderma harzianum*, έδειξαν πως ο μύκητας αποτελεί ένα παράγοντα βιοέλεγχου. Τέλος τα δύο πειράματα για μέθοδο μαζικής παραγωγής του *Trichoderma harzianum*, έδειξαν πως μπορούν να χρησιμοποιηθούν απλά υλικά εργαστηρίου. Στη μέθοδο ζύμωσης στερεάς κατάστασης χρησιμοποιήσαμε αιματοκυτόμετρο, με σκοπό να μετρήσουμε τα κονίδια που υπήρχαν στο διάλυμα νερού. Στο πείραμα μετρήσαμε $77,6 \cdot 10^5$ κονίδια/ml, το οποίο ήταν πολύ ικανοποιητικός αριθμός συγκριτικά με το βάρος του θρεπτικού που χρησιμοποιήσαμε. Από αυτό μπορεί να βγει το συμπέρασμα πως εάν είχαμε μεγαλύτερο αριθμό κονιδίων θα είχαμε και περισσότερη βιομάζα του μύκητα και πώς ο αριθμός των κονιδίων στο δείγμα είναι σημαντικός σε σχέση με το βάρος του θρεπτικού που θα χρησιμοποιηθεί, καθώς εάν το δείγμα ήταν πολύ αραιό, θα υπήρχε λιγότερος αριθμός κονιδίων με αποτέλεσμα η ανάπτυξη του μύκητα στο θρεπτικό να είναι μικρή.

Το είδος *Trichoderma* αναγνωρίστηκε ως *T. harzianum* διότι μακροσκοπικά σε εργαστηριακή καλλιέργεια εμφάνισε χαρακτηριστικούς πράσινους με λευκούς δακτυλίους και μικροσκοπικά σε σύγκριση με άλλες έρευνες είχαν τα ίδια χαρακτηριστικά στις υφές, κονιδιοφόρους και κονίδια. Το *T. harzianum* σε καλλιέργεια με θρεπτικό PDA εμφάνισε αποικία από την 7^η ημέρα και τις επόμενες μέρες παρήγαγε κονίδια ώστε να γίνει αγενής αναπαραγωγή. Το συμπέρασμα αυτό προήλθε από μικροσκοπικές παρατηρήσεις καθώς έως την 7^η ημέρα τα δείγματα εμφάνιζαν ελάχιστο αριθμό κονιδίων, ενώ καλλιέργειες που είχαν μεγαλύτερη ηλικία εμφάνισαν πολύ μεγάλο αριθμό κονιδίων. Αυτή η παρατήρηση βοήθησε στη παραγωγή καλύτερων καλλιεργειών αλλά και στο πείραμα μαζικής παραγωγής του *T. harzianum* με τη μέθοδο ζύμωσης στερεάς κατάστασης. Ο αριθμός των κονιδίων ήταν πολύ σημαντικός σε αυτό το πείραμα διότι αποδείχθηκε πως ήταν καθοριστικός παράγοντας για τη ταχεία και ογκώδη ανάπτυξη του στο θρεπτικό. Για τη καταμέτρηση των κονιδίων χρησιμοποιήθηκε το αιματοκυτόμετρο, το οποίο χρησιμοποιείται για τη καταμέτρηση κυττάρων, αιμοπεταλίων όπως και κονιδίων και γύρης. Η καταμέτρηση έγινε σε μικροσκόπιο με τη βοήθεια του προγράμματος Image A Focus στον υπολογιστή για καλύτερα αποτελέσματα.

6. Συζήτηση.

Τα πειράματα του εργαστηρίου αφορούσαν την καλλιέργεια του μύκητα για τη διατήρησή του στο εργαστήριο, καθώς το όριο ζωής του είναι 1 μήνας, πειράματα για την δοκιμή των μηχανισμών του *Trichoderma*, που περιείχαν τον μυκοπαρασιτισμό και τον ανταγωνισμό

για θρεπτικά και τέλος πείραμα για την εύρεση της απλούστερης μεθόδου μαζικής παραγωγής του *Trichoderma harzianum*, με σκοπό τον εμβολιασμό του σε φυτά. Μιας και το *Trichoderma spp* αποτελεί εξαιρετικό βιοκοντρόλ, η χρησιμοποίησή του παγκοσμίως σε καλλιέργειες θα βοηθούσε σε πολύ μεγάλο βαθμό την αύξηση της ποιότητας των σπαρτών, τη μείωση χρήσης εντομοκτόνων, φυτοφαρμάκων και λιπασμάτων. Αυτό θα είχε ως αποτέλεσμα να μειωθεί η άμεση ρύπανση του εδάφους και των υδάτινων πόρων, αλλά και τη δραστική μείωση των θανάτων των φυτοφάγων ζώων και των ψαριών από χημικές δηλητηριάσεις. Η εύρεση ειδών *Trichoderma* ήταν δύσκολη καθώς οι συνθήκες ζωής του *Trichoderma spp* στη φύση εξαρτώνται από τη θερμοκρασία, υγρασία εδάφους, pH εδάφους, τις συγκεντρώσεις οργανικών και ιχνοστοιχείων και το φυτό το οποίο θα αποικήσει.

6. Βιβλιογραφία.

- ❖ Ahmadjian, Vernon , Alexopoulos, Constantine John and Moore, David. “fungus”. Encyclopedia Britannica, 10 Sep. 2023
[<https://www.britannica.com/science/fungus>]
- ❖ Anuradha Singh, Mohammad Shahid, Mukesh Srivastava, Sonika Pandey, Antima Sharma and Vipul Kumar, “Optimal physical parameters for growth of Trichoderma Species at varying pH, temperature and agitation”, 2014.
- ❖ Birinchi Sarma, Jai Singh Patel, Sudheer Kumar Yadav and Harikesh Bahadur Singh, “Molecular Mechanisms of Interactions of Trichoderma with other Fungal Species”, 2014
[https://www.researchgate.net/publication/264266140_Molecular_Mechanisms_of_Interactions_of_Trichoderma_with_other_Fungal_Species]
- ❖ Boregowda Nandini, Hariprasad Puttaswamy, Ramesh Kumar Saini, Harischandra Sripathy Prakash & Nagaraja Geetha “Trichovariability in rhizosphere soil samples and their biocontrol potential against downy mildew pathogen in pearl millet”, 2021.
[<https://www.nature.com/articles/s41598-021-89061-2>]
- ❖ Cai, F., Druzhinina, I.S., “In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of Trichoderma”, Fungal Diversity 107, 1–69, 2021.
[<https://doi.org/10.1007/s13225-020-00464-4>]

- ❖ Druzhinina, I., & Kubicek, C. P. (2005). “Species concepts and biodiversity in Trichoderma and Hypocrea: from aggregate species to species clusters?.” Journal of Zhejiang University. Science. B, 6(2), 100–112.
[<https://doi.org/10.1631/jzus.2005.B0100>]
- ❖ Edna Sharon, Ilan Chet, Ada Viterbo, Meira Bar-Eyal, Harel Nagan, Gary J. Samuels, Yitzhak Spiegel, “Parasitism of Trichoderma on Meloidogyne javanica and role of the gelatinous matrix”, 2007.
[<https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-007-9140-x>]
- ❖ Faramak Almassi, Emilio L. Ghisalberti, Melissa J. Narbey & Krishnapillai Sivasithamparam, “New antibiotics from strains of Trichoderma harzianum”, 1991.
[<https://doi.org/10.1021/np50074a008>]
- ❖ Francisco Daniel Hernández-Castillo, Francisco Castillo-Reyes, Marco Antonio Tucuch-Pérez and Roberto Arredondo-Valdes, “Biological Efficacy of Trichoderma spp. And Bacillus spp. In the Management of Plant Diseases”, 2020.
[<https://www.intechopen.com/chapters/71029>]
- ❖ G. E. Harman, Cornell University, Geneva, NY 14456, “Trichoderma spp., including T. Harzianum, T. Viride, T. Koningii, T. Hamatum and other spp. Deuteromycetes, Moniliales (asexual classification system)”, 2000.
[<https://biocontrol.entomology.cornell.edu/pathogens/trichoderma.php>]
- ❖ Iqbal, S., Ashfaq, M., Malik, A.M., Inam-ulhaq, Khan, K.S. and Mathews, P., “Isolation, preservation and revival of Trichoderma viride in culture media”, 2017.

[<http://www.entomoljournal.com/archives/2017/vol5issue3/PartW/5-3-119-171.pdf>]

- ❖ J. Lnbar and I. Chet, “The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*”, 1995.

[<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8535510/>]

- ❖ Kannan Neethu, M. Rubeena, S. Sajith, S. Sreedevi, Prakasan Priji, K. N. Unni, M. K. Sarath Josh, V. N. Jisha, S. Pradeep, Sailas Benjamin, “A novel strain of *Trichoderma viride* shows complete lignocellulolytic activities”, 2012.

[https://file.scirp.org/Html/11-7300418_25831.htm]

- ❖ Kubicek, C.P., Steindorff, A.S., Chenthamara, K. Et al. “Evolution and comparative genomics of the most common *Trichoderma* species”. BMC Genomics 20, 485 2019.

[<https://doi.org/10.1186/s12864-019-5680-7>]

- ❖ Larissa Castro de Rezende André Luiz de Andrade Carvalho, Lúcio Bertoldo Costa, Bernardo de Almeida Halfeld-Vieira, Lucas Guedes Silva, Zayame Vegette Pinto, Marcelo Augusto Boechat Morandi, Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros, Gabriel Moura Mascarin and Wagner Bettiol, “Optimizing mass production of *Trichoderma asperelloides* by submerged liquid fermentation and its antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*”, 2020.

[<https://doi.org/10.1007/11274-020-02882-7>]

- ❖ M. S. Leelavathi, L. Vani and Pascal Reena, “Antimicrobial activity of *Trichoderma harzianum* against bacteria and fungi”, 2014.

[<https://www.ijcmas.com/vol-3-1/M.S.Leelavathi,%20et%20al.pdf>]

- ❖ Nagesh B., “*Trichoderma* ppt”, 2019.

[<https://www.slideshare.net/NageshB8/Trichoderma-ppt>]

- ❖ Pradnyarani Nidagundi, “Trichoderma application on roots and mass production”, 2013.

❖ [<https://www.slideshare.net/pradnyarani/trichoderma-march-14th>]

- ❖ RAHMAN, AHSANUR; BEGUM, MOST. FERDOUSI; RAHMAN, MATIUR; BARI, M. A.; ILLIAS, G.N.M.; and ALAM, M. FIROZ (2011) “Isolation and identification of Trichoderma species from different habitats and their use for bioconversion of solid waste,” Turkish Journal of Biology: Vol. 35: No. 2, Article 8.

[<https://doi.org/10.3906/biy-0905-8>]

- ❖ Rajesh Waghunde, Rahul Mahadev Shelake, Ambalal N. Sabalpara, “Trichoderma: A significant fungus for agriculture and environment”, 2016.

[https://www.researchgate.net/publication/303703234_Trichoderma_A_significant_fungus_for_agriculture_and_environment]

- ❖ Ramírez-Valdespino CA, Casas-Flores S and Olmedo-Monfil V “Trichoderma as a Model to Study Effector-Like Molecules”, 2019.

[<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01030>]

- ❖ Safeena Majeed, “Trichoderma spp. Life cycle.”, 2019

[<https://www.slideshare.net/SafeenaMajeed1/trichoderma-178096319>]

- ❖ Sahar Leylaie Doustmorad Zafari, “Antiproliferative and Antimicrobial Activities of Secondary Metabolites and Phylogenetic Study of Endophytic Trichoderma Species From Vinca Plants”, 2018.

[<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01484>]

- ❖ Said A. El-Hassan, Simon R. Gowen, Barbara Pembroke, “USE OF TRICHODERMA HAMATUM FOR BIOCONTROL OF LENTIL VASCULAR WILT DISEASE: EFFICACY, MECHANISMS OF INTERACTION AND FUTURE PROSPECTS”, 2012.
[<https://doi.org/10.2478/jppr-2013-0002>]
- ❖ Srivastava, Mukesh & SHAHID, Dr. MOHAMMAD & Pandey, Sonika & Vipul, Kuma & Singh, Anuradha & Shubha, Trived & Srivastava, Y & Shivram, “ Trichoderma: A scientific approach against soil borne pathogens”. African Journal of Microbiology Research. 9, (2015).
[https://www.researchgate.net/publication/291205709_Trichoderma_A_scientific_approach_against_soil_borne_pathogens]
- ❖ Steyaert, J. M., Weld, R. J., Mendoza-Mendoza, A., & Stewart, A. (2010). “Reproduction without sex: conidiation in the filamentous fungus Trichoderma”. Microbiology (Reading, England), 156(Pt 10), 2887–2900.
[<https://doi.org/10.1099/mic.0.041715-0>]
- ❖ Syed Ali Nusaibah and Habu Musa, “A Review Repor on the Mechanism of Trichoderma spp. As Biological Control Agent of the Basal Stem Rot (BSR) Disease of Elaeis guineensis”, 2019.
[<https://www.intechopen.com/chapters/65709>]
- ❖ Wright J. M., “The production of antibiotics in soil, I. The production of gliotoxin by Trichoderma viride”, 1954.
[<https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1954.tb01121.x>]
- ❖ Zhang, Jan-Long, Tang, Wen-Li, Huang, Qing-Rong, Li, You-Zhi, Wei, Mao-Lian, Jiang, Lin-Lin, Liu, Chong, Yu, Xin, Zhu, Hong-Wei, Chen, Guo-Zhong and Zhang, Xing-Xiao, “Trichoderma: A

Treasure House of Structurally Diverse Secondary Metabolites With Medicinal Importance”, 2021.

[<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.723828>]

- ❖ Δημήτρης Μ. Δήμου, Γεωπόνος, Μυκητολόγος, “ΜΥΚΗΤΕΣ-MANITARIA. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΜΥΚΗΤΩΝ”

[https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://docplayer.gr/2475303-Mykites-manitaria-eisagogi-sti-viologia-ton-makromykiton.html&ved=2ahUKEwibgveO5dKBAxXjRPEDHS9TDT0QFnoECA0QAQ&usg=AOvVaw1_aIVvET9ffJWSeELsZgd]

- ❖ Μύκητες”, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

[<https://eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/MED736/%CE%91%CE%A3%CE%9A%CE%97%CE%A3%CE%95%CE%99%CE%A3%20%CE%95%CE%A1%CE%93%CE%91%CE%A3%CE%A4%CE%97%CE%A1%CE%99%CE%A9%CE%9D/%CE%92%CE%A1%CE%A5%CE%A9%CE%9D%CE%97%20%CE%93./%CE%9C%CF%8D%CE%BA%CE%B7%CF%84%CE%B5%CF%82%CE%95%CE%A1%CE%93%CE%91%CE%A3%CE%A4%CE%97%CE%A1%CE%99%CE%9F.pdf>]

- ❖ “Φυτοορμόνες”, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2019..

- ❖ [<http://archive.eclass.uth.gr/eclass/modules/document/file.php/MH XD162/%CE%91%CE%A5%CE%9E%CE%99%CE%9D%CE%95%CE%A3-%CE%9A%CE%A5%CE%A4%CE%9F%CE%9A%CE%99%CE%9D%CE%99%CE%9D%CE%95%CE%A3-%CE%93%CE%99%CE%92%CE%95%CE%A1%CE%A1%CE%95%CE%9B%CE%99%CE%9D%CE%95%CE%A3->]

[%CE%A3%CE%A4%CE%A1%CE%99%CE%93%CE%93%CE%9F%CE%9B%CE%91%CE%9A%CE%A4%CE%9F%CE%9D%CE%95%CE%A3-%CE%92%CE%A1%CE%91%CE%A3%CE%A3%CE%99%CE%9D%CE%9F%CE%A3%CE%A4%CE%95%CE%A1%CE%9F%CE%95%CE%99%CE%94%CE%97.pdf](#)]

