

# ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

**Δρ. Εμμανουήλ Α. Μαρκάκης**  
**Ερευνητής Μυκητολογίας**  
**Ινστιτούτο Ελιάς, Υποτροπικών Φυτών & Αμπέλου**  
**ΕΛΓΟ – ΔΗΜΗΤΡΑ**

 : 2810-302302,  : [markakis@elgo.gr](mailto:markakis@elgo.gr)



# **Εργαστήριο**

# ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

## Τρόπος εκτέλεση βιοδοκιμών ασηπτικά σε πάγκο αναστρεφόμενης νηματικής ροής (laminar flow cabinet)

Διαδικασία προετοιμασίας θαλάμου και ασηπτικών συνθηκών:

### Α. Για εργασία υπό ασηπτικές συνθήκες σε laminar flow:

1. Αφαιρώ ρολόγια/δαχτυλίδια και απολυμαίνω χέρια με αιθανόλη.
2. Ανάβω τον αέρα του θαλάμου.
3. Απολυμαίνω των πάγκο του θαλάμου με αιθανόλη και χαρτί.
4. Ανάβω το φλόγιστρο/καμινέτο/γκαζάκι/φλόγα με αναπτήρα.
5. Αποστειρώνω νυστέρι και βακτηριολογικό κρίκο με εμβάπτιση σε αιθανόλη και πέρασμα από τη φλόγα (τα κρατάω με κλίση προς τα κάτω για να μην καώ).
6. Δροσίζω το νυστέρι και το βακτηριολογικό κρίκο με ελαφρά βύθιση εντός του υλικού, στην άκρη του τρυβλίου.
7. Φροντίζω το νυστέρι και ο βακτηριολογικός κρίκος να μην ακουμπήσουν πουθενά και χάσουν την αποστείρωσή τους έως ότου τα χρησιμοποιήσω για την εκτέλεση των δοκιμών.
8. Μετά τη χρήση του νυστεριού ή του βακτηριολογικού κρίκου για μεταφορά μυκήτων ή βακτηρίων αποστειρώνω και δροσίζω ξανά ώστε να μην έχω επιμολύνσεις του ενός μικροβίου με το άλλο.
9. Εργάζομαι πάντα όσο πιο κοντά γίνεται στη φλόγα.
10. Μετά την ολοκλήρωση της εργασίας μου αποστειρώνω εκ νέου το νυστέρι και το βακτηριολογικό κρίκο, σβήνω τη φλόγα και απολυμαίνω τον πάγκο.
11. Προσέχω μην καώ ή κοπώ καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας μου.



# ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

## Τρόπος εκτέλεσης δοκιμών αντιπαραβολής (confrontation test – dual culture assay)

### Διαδικασία εκτέλεσης πειράματος:

#### A. Για την επέμβαση του μάρτυρα (CONTROL):

1. Σε τρυβλίο διαμέτρου 90 mm με υλικό PDA ορίζουμε μια νοητή ευθεία που διέρχεται από το κέντρο του τρυβλίου.
2. Στην κάτω πλευρά του τρυβλίου, εξωτερικά, πάνω στη νοητή ευθεία, σημειώνουμε με ανεξίτηλο μαρκαδόρο σημείο που να απέχει 30 mm από την περιφέρεια στην αριστερή πλευρά και άλλο ένα σημείο που να απέχει 30 mm από την περιφέρεια στη δεξιά πλευρά.
3. Αναστρέφω το τρυβλίο και ασηπτικά (σε laminar flow cabinet) τοποθετούμε στην αριστερή θέση, πάνω στο υλικό, ροδέλα διαμέτρου 5 mm από νεαρή καλλιέργεια του φυτοπαθογόνου μύκητα ανεπτυγμένη σε PDA, έτσι ώστε το μυκήλιο να εφάπτεται με το υλικό του τρυβλίου (η ροδέλα ανάποδα).
4. Στη δεξιά θέση, πάνω στο υλικό, τοποθετώ ροδέλα διαμέτρου 5 mm από αποστειρωμένο PDA.
5. Κλείνω το τρυβλίο με μεμβράνη.
6. Αναγράφω στο καπάκι, στην πάνω μεριά με ανεξίτηλο μαρκαδόρο το παθογόνο (π.χ. *Botrytis*), την επέμβαση (μάρτυρας) και την επανάληψη (π.χ. 1<sup>η</sup>), στη μέση το ονοματεπώνυμο των φοιτητών που εκτελούν τη βιοδοκιμή και στο κάτω μέρος την ημερομηνία.
7. Τοποθετώ το τρυβλίο για επώαση στους 24°C, σε συνθήκες σκότους (ή κλείσιμο με αλουμινόχαρτο και σε Θ δωματίου).



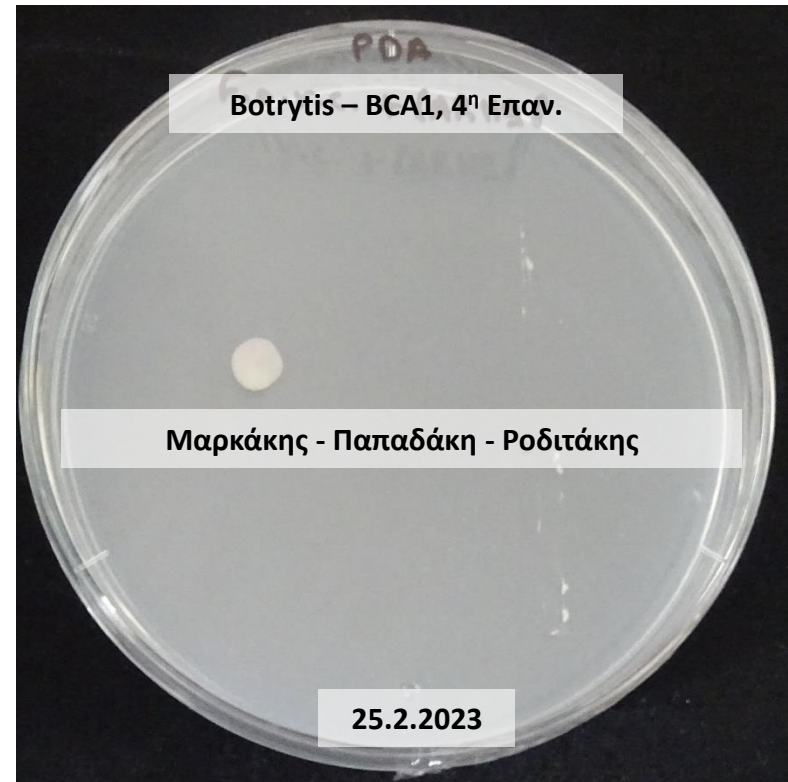
# ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

## Τρόπος εκτέλεσης δοκιμών αντιπαραβολής (confrontation test – dual culture assay)

### Διαδικασία εκτέλεσης πειράματος:

#### Β. Για την επέμβαση με τον υπό αξιολόγηση βιολογικό παράγοντα (TREATMENT):

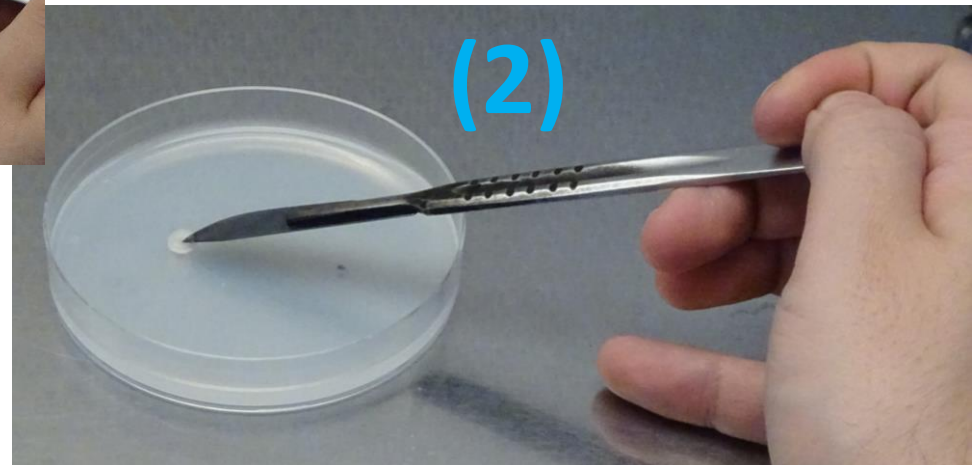
1. Σε τρυβλίο διαμέτρου 90 mm με υλικό PDA ορίζουμε μια νοητή ευθεία που διέρχεται από το κέντρο του τρυβλίου.
2. Στην κάτω πλευρά του τρυβλίου, εξωτερικά, πάνω στη νοητή ευθεία, σημειώνουμε με ανεξίτηλο μαρκαδόρο σημείο που να απέχει 30 mm από την περιφέρεια στην αριστερή πλευρά και άλλο ένα σημείο που να απέχει 30 mm από την περιφέρεια στη δεξιά πλευρά.
3. Αναστρέφω το τρυβλίο και ασηπτικά (σε laminar flow cabinet) τοποθετούμε στην αριστερή θέση, πάνω στο υλικό, ροδέλα διαμέτρου 5 mm από νεαρή καλλιέργεια του φυτοπαθογόνου μύκητα ανεπτυγμένη σε PDA έτσι ώστε το μυκήλιο να εφάπτεται με το υλικό του τρυβλίου (η ροδέλα ανάποδα).
4. Στη δεξιά θέση, πάνω στο υλικό, εάν ο βιολογικός παράγοντας που θέλω να αξιολογήσω είναι μύκητας, τοποθετώ ροδέλα διαμέτρου 5 mm από νεαρή καλλιέργεια του ανταγωνιστή μύκητα (η ροδέλα ανάποδα). Εάν ο β.π. είναι βακτήριο, με βακτηριολογικό κρίκο αποσπάω τμήμα βακτηριακών κυττάρων ασηπτικά από τμήμα νεαρής καλλιέργειας του βακτηρίου και επιστρώνω γραμμικά με κάθετη γραμμή η οποία να διέρχεται από το σημείο που έχω ορίσει.
5. Κλείνω το τρυβλίο με μεμβράνη.
6. Αναγράφω στο καπάκι, στην πάνω μεριά με ανεξίτηλο μαρκαδόρο το παθογόνο (π.χ. *Botrytis cinerea*), την επέμβαση (π.χ. BCA1) και την επανάληψη (π.χ. 4<sup>η</sup>), στη μέση το ονοματεπώνυμο των φοιτητών που εκτελούν τη βιοδοκιμή, και στο κάτω μέρος την ημερομηνία.
7. Τοποθετώ το τρυβλίο για επώαση στους 24°C, σε συνθήκες σκότους (ή κλείσιμο με αλουμινόχαρτο και σε Θ δωματίου).



# ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

## Τρόπος εκτέλεσης δοκιμών αντιπαραβολής (confrontation test – dual culture assay)

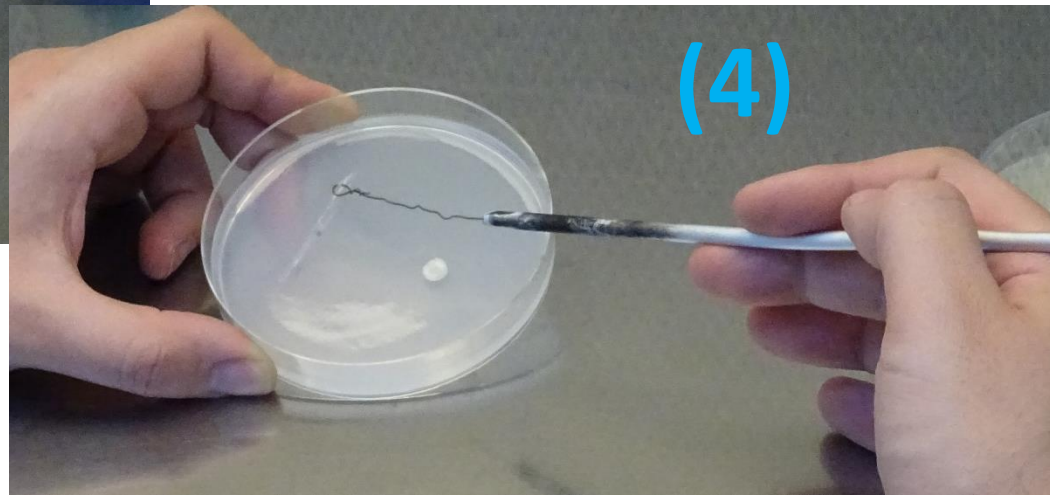
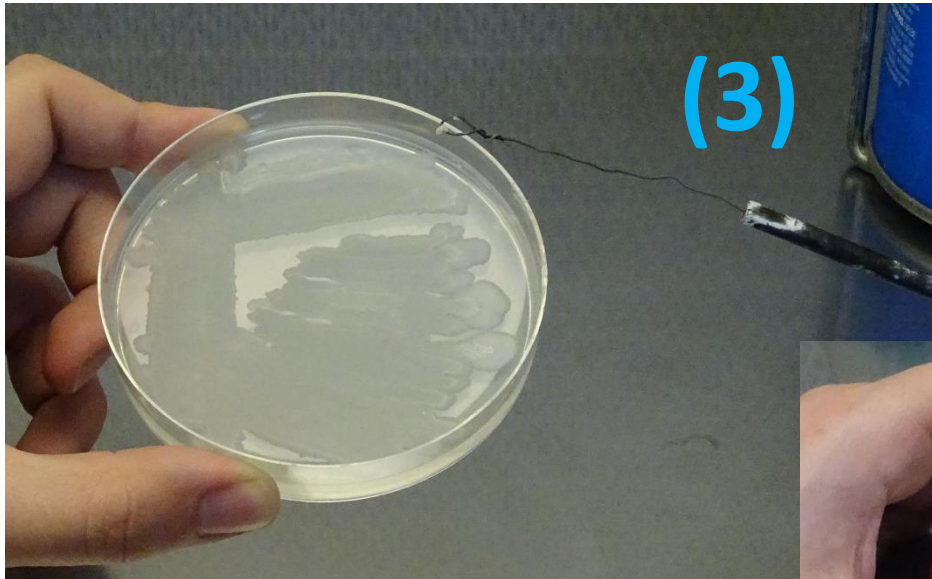
Διαδικασία εκτέλεσης πειράματος:



# ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

Τρόπος εκτέλεσης δοκιμών αντιπαραβολής (confrontation test – dual culture assay)

Διαδικασία εκτέλεσης πειράματος:



# ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

## Τρόπος εκτέλεσης δοκιμών αντιπαραβολής (confrontation test – dual culture assay)

### Αξιολόγηση πειράματος:

#### Μετρήσεις

1. Ακτίνα ανάπτυξης ανά τακτά χρονικά διαστήματα (ημερησίως για 7 ημέρες)
  - απόλυτη τιμή ακτίνας ανά ημέρα (mm)
  - ρυθμός ανάπτυξης (mm/ημέρα)
  - παρεμπόδιση (%)
2. Αριθμός κονιδίων ανά επιφάνεια καλλιέργειας (επίδραση στην κονιδιοποίηση)
3. Διαστάσεις κονιδίων
4. Βλαστικότητα κονιδίων
5. Πάχος υφών
6. Δημιουργία καρποφοριών & κατασκευών (μικροσκληρώτια)



$$\text{Παρεμπόδιση (\%)} = \frac{[(\text{Αμ}-\text{Αε})/\text{Αμ}] \times 100\%}{}$$

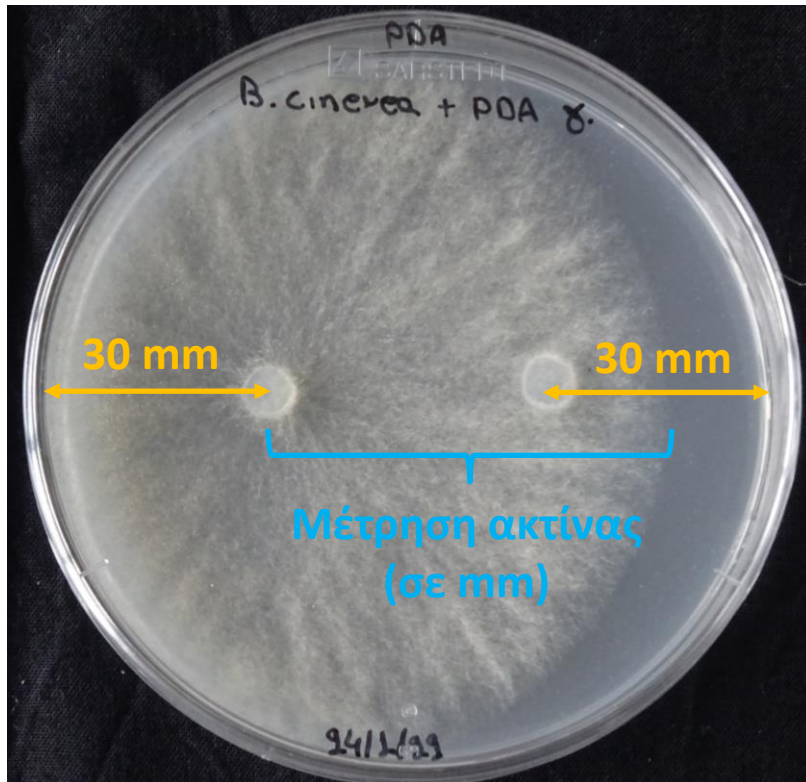
**Αμ:** η ακτίνα ανάπτυξης της αποικίας του μάρτυρα στο τέλος του πειράματος (7 ημέρες)

**Αε:** η ακτίνα ανάπτυξης της αποικίας της επέμβασης στο τέλος του πειράματος (7 ημέρες)

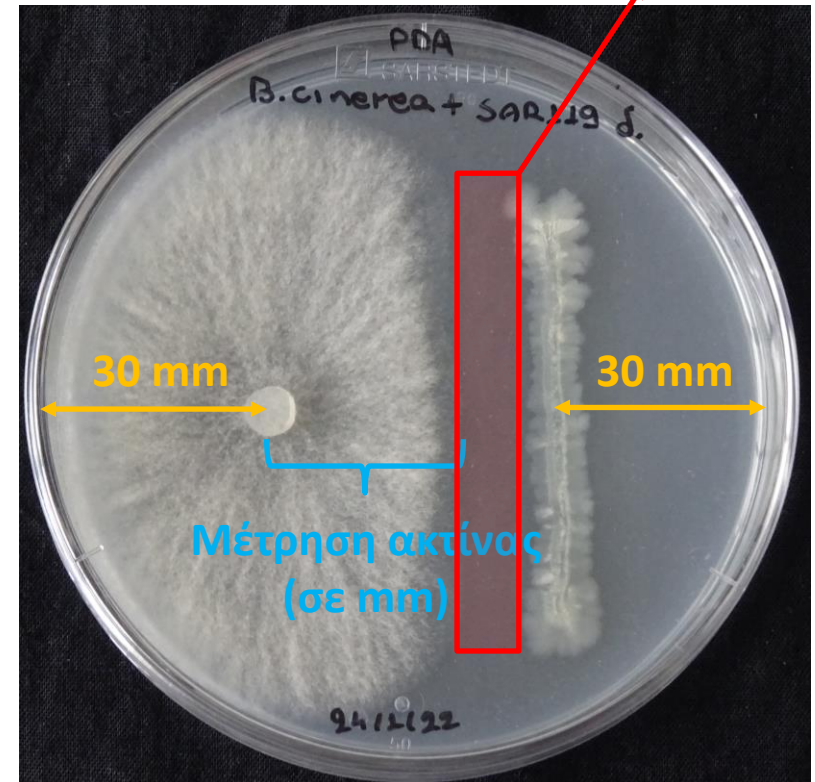
# ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

Δοκιμές αντιπαραβολής (confrontation test – dual culture assay):

Παθογόνο: μύκητας / Ανταγωνιστής: βακτήριο



*Botrytis cinerea* - Μάρτυρας

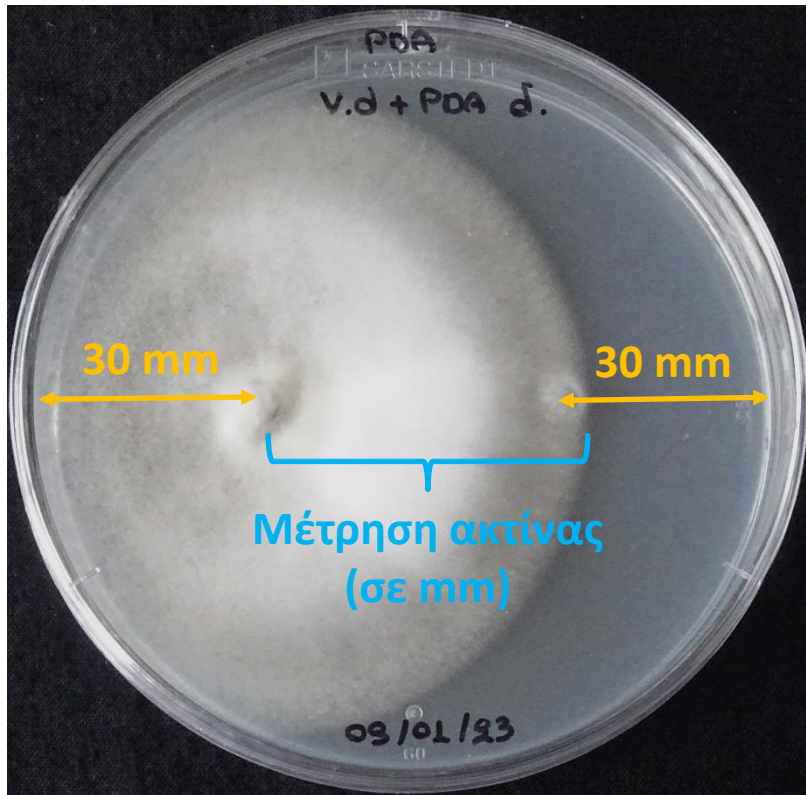


*Botrytis cinerea* + SAR119

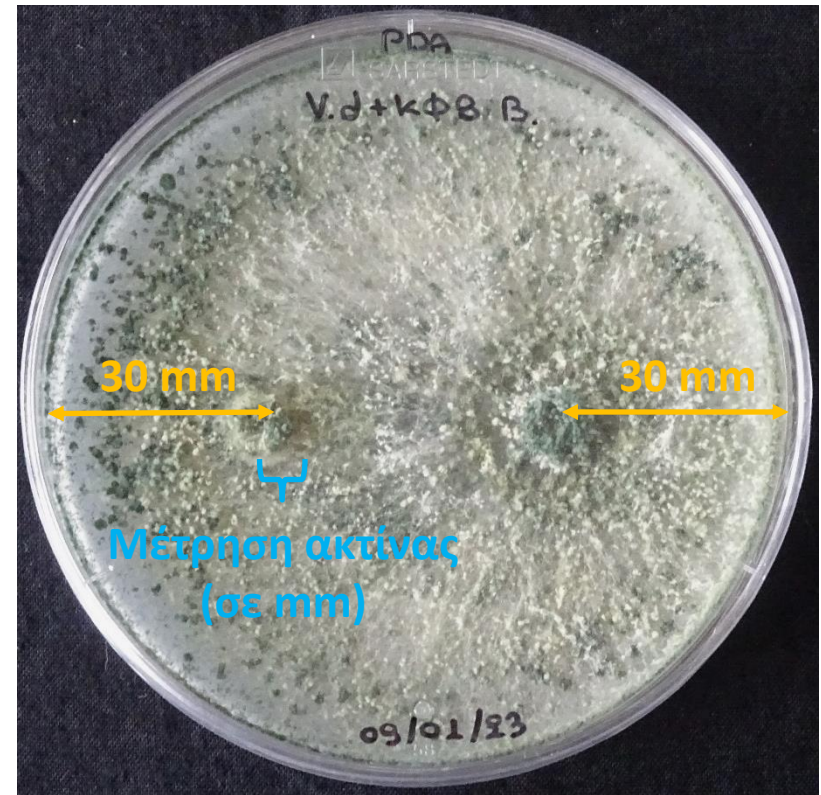
# ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

Δοκιμές αντιπαραβολής (confrontation test – dual culture assay):

Παθογόνο: μύκητας / Ανταγωνιστής: μύκητας



*Verticillium dahliae* - Μάρτυρας



*Verticillium dahliae* + *Trichoderma*

# ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

## Τρόπος εκτέλεσης δοκιμών αντιπαραβολής (confrontation test – dual culture assay)

### Αποτύπωση αποτελεσμάτων πειράματος:

#### Μετρήσεις

1. Ακτίνα ανάπτυξης του μύκητα ημερησίως για 7 ημέρες
  - απόλυτη τιμή ακτίνας ανά ημέρα (mm)
  - ρυθμός ανάπτυξης (mm/ημέρα)
  - παρεμπόδιση (%)

Συγγραφή και παράδοση μιας σύντομης έκθεσης (report) 2-3 σελίδων:

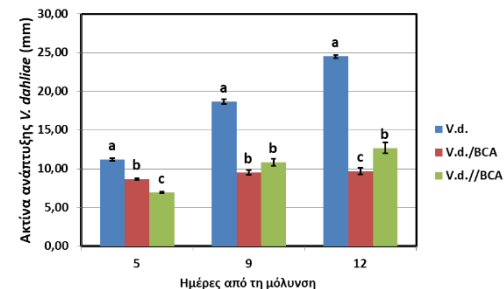
- Σύντομος σχολιασμός αποτελεσμάτων
- Φωτογραφίες των επιμέρους επεμβάσεων
- Γραφήματα των παραπάνω παραμέτρων
- Αξιολόγηση των μηχανισμών δράσης ανά περίπτωση

Παρεμπόδιση (%) =  $[(A_{\mu}-A_{\epsilon})/A_{\mu}] \times 100\%$

**A<sub>μ</sub>**: η ακτίνα ανάπτυξης της αποικίας του μάρτυρα στο τέλος του πειράματος (7 ημέρες)

**A<sub>ε</sub>**: η ακτίνα ανάπτυξης της αποικίας της επέμβασης στο τέλος του πειράματος (7 ημέρες)

Παράδειγμα:



**Τέλος ...**