

Ανάπτυξη αειφορικών προστατευτικών
ουσιών ενάντια στην
προσβολή από τον μύκητα *Botrytis
elliptica* πάνω σε φύλλα *Lilium vivaldy*

Μαρία Καλοβάκη

Επιβλέποντες καθηγητές:
Dr. Βασίλειος Δημόπουλος
Dr. L.H. Stevens
Geert Stoopen

Plant Research International
Wageningen 2005

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	2
2. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
3. ΤΟ ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.....	4
4. ΤΟ ΠΑΘΟΓΟΝΟ.....	5
5. ΟΙ ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ.....	6
6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ.....	7
6.1.Καλλιέργεια Τον Μύκητα.....	8
6.2. Η Προετοιμασία Τον Φυτικού Υλικού.....	10
6.3. Η Ετοιμασία Των Φύλλων.....	11
6.4.Παρασκευή Και Εφαρμογή Των Φυτοπροστατευτικών Ουσιών.....	14
6.5. Η Συγκέντρωση Των Κονιδίων Τον Μύκητα.....	15
6.6.Εμβολιασμός Των Φύλλων Με Τον Μύκητα.....	15
7.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	18
7.1.Γενικά.....	19
7.2.Επίδραση των συνδυασμών των ουσιών M1, AS3 και OA2.....	20
7.3. Επίδραση των συνδυασμών των ουσιώνM1, P3 και OA2.....	21
7.4.Επίδραση της ουσίας SP.....	22
7.5.Επίδραση της ουσίας SP2.....	23
7.6.Συγκεντρωτικά αποτελέσματα.....	24
8.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	27
9. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	30
10. ΠΗΓΕΣ.....	32

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο τομέας της γεωργίας παρουσιάζει δραματικές αλλαγές τις τελευταίες δεκαετίες. Η παγκόσμια πληθυσμιακή αύξηση καθώς και η συνεχής μείωση της καλλιεργήσιμης γης αποτελούν μια πρόκληση για την κάλυψη των ολοένα και μεγαλύτερων αναγκών. Εξαιτίας λοιπόν της επιτακτικής αυτής ανάγκης για μεγαλύτερη ποσότητα παραγωγής και της επιβολής της παραγωγής ποιοτικών προϊόντων η γεωργία έχει στραφεί στη βοήθεια της επιστήμης.

Για τον έλεγχο και την πρόληψη ασθενειών και κάθε είδους προσβολών γίνεται εντατική χρήση χημικών φυτοπροστατευτικών ουσιών. Ο στόχος έχει επιτευχθεί εν μέρει με την χρήση αυτών των ουσιών όχι όμως χωρίς προβλήματα.

Τα προβλήματα αυτά αφορούν την προστασία του περιβάλλοντος και τις συνέπειες που είτε άμεσα είτε έμμεσα έρχεται να αντιμετωπίσει σήμερα ο άνθρωπος. Τέτοια προβλήματα δημιουργούνται κυρίως από τα υπολείμματα της περίσσειας των φυτοπροστατευτικών ουσιών που παραμένουν στο έδαφος και καταλήγουν στους υδροφόρους ορίζοντες. Ακόμα και στην άμεση επαφή τους με τον άνθρωπο και με τα εκτρεφόμενα ζώα οι φυτοπροστατευτικές ουσίες έχουν επιβλαβείς συνέπειες. Για τους παραπάνω λόγους πολλά ερευνητικά ινστιτούτα που ασχολούνται με την γεωργία έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους στην δημιουργία νέων συνθέσεων με μικρότερες ή καθόλου επιβλαβείς συνέπειες για τον άνθρωπο και το περιβάλλον.

Ένα τέτοιο κέντρο έρευνας αποτελεί το Plant Research International στο Wageningen της Ολλανδίας. Το ινστιτούτο αυτό αναλαμβάνει την πειραματική δοκιμή ουσιών που προέρχονται από μεγάλες εταιρείες χημικών παγκοσμίως και ζητείτε να βγάλει κάποια συμπεράσματα κατά πόσο οι ουσίες αυτές έχουν εμπορικό ενδιαφέρον έπειτα από τα πειράματα που διενεργεί. Πολλές από αυτές τις ουσίες προέρχονται από καθημερινά σκευάσματα που χρησιμοποιεί ο άνθρωπος, όπως π.χ. είναι οι οδοντόκρεμες, κάποια συντηρητικά τροφίμων καθώς και άλλες συνθέσεις με τις οποίες ερχόμαστε καθημερινά σε επαφή και κυκλοφορούν ελεύθερα στο εμπόριο.

Σε αυτό το πλαίσιο κινείται και η εργασία που πραγματοποιήθηκε στο παραπάνω ινστιτούτο την περίοδο 08/09/2004 έως 28/02/2005 και είχε σαν σκοπό την ανάπτυξη αειφορικών προστατευτικών ουσιών ενάντια στην προσβολή από τον μύκητα *Botrytis elliptica* πάνω σε φύλλα *Lilium vivaldy*.

2. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μία από τις σημαντικότερες ασθένειες των οπωροκηπευτικών και των ανθοκομικών φυτών αποτελεί η προσβολή από τον μύκητα του γένους *Botrytis*. Πολλά είναι τα φυτά που πλήττονται από τον μύκητα και σε κάποια από αυτά οι οικονομικές συνέπειες είναι πολύ μεγάλες καθώς μεγάλες ποσότητες σοδειάς καταστρέφονται. Ένα από τα φυτά που αντιμετωπίζει τέτοιες προσβολές είναι το Λίλιουμ. Για αυτό το λόγο πολλές είναι οι έρευνες που γίνονται ετησίως ώστε να βρεθούν τρόποι αντιμετώπισης των προσβολών. Μία τέτοια έρευνα διενεργεί το Plant Research International μέσω ενός πειράματος για την δημιουργία αιειφορικών φυτοπροστατευτικών ουσιών. Ο σκοπός του πειράματος αυτού είναι η εξεύρεση αιειφορικών (sustainable) φυτοπροστατευτικών ουσιών ενάντια στο μύκητα *Botrytis elliptica* που προσβάλλει τα φυτά Λίλιουμ. Για την επίτευξη του στόχου αυτού πραγματοποιήθηκε ένα μικρής κλίμακας πείραμα κατά το οποίο πάνω σε κομμένα φύλλα φυτών *Lilium vivaldy* δοκιμάστηκαν διαφορετικοί συνδυασμοί ουσιών και έπειτα εμβολιάστηκαν με μόλυσμα από in vitro καλλιέργειες του μύκητα. Έπειτα από επώαση για διάστημα δύο έως τριών ημερών παίρνονταν μετρήσεις του επιπέδου των προσβολών και έτσι αξιολογούνταν κατά πόσο οι συνδυασμοί των υπό μελέτη ουσιών είχαν θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα. Για όσες ουσίες προέκυπταν θετικά συμπεράσματα ακολουθούσε παραπέρα μελέτη τους και είτε δοκιμάζονταν ξανά ή συνδυάζονταν ξανά με άλλες ουσίες.

Τα αποτελέσματα από την πορεία των πειραμάτων έδειξαν ότι πολλές από τις ουσίες που δοκιμάστηκαν, είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές ενάντια στην προσβολή του μύκητα και πιθανά έχουν εμπορικό ενδιαφέρον για αυτό τον λόγο πρέπει να μελετηθούν περισσότερο σε πειράματα μεγαλύτερης κλίμακας ώστε να κατοχυρωθεί η αποτελεσματικότητά τους σε μεγαλύτερη κλίμακα.

3. ΤΟ ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα αυτό ήταν φυτά Λίλιουμ. Τα φυτά του είδους αυτού επιλέχθηκαν γιατί παρουσιάζουν μεγάλο εμπορικό ενδιαφέρον παγκοσμίως καθώς επίσης αποτελούν ένα από τα πλέον ευπαθή ανθοκομικά φυτά στην προσβολή του μύκητα *Botrytis elliptica*. Για την πρόληψη και την καταπολέμηση της ασθένειας αυτής μεγάλες ποσότητες φυτοπροστατευτικών ουσιών καταναλώνονται παγκοσμίως με ένα μέσο όρο ετησίως 1.5-4.0 κιλά /στρέμμα το χρόνο. Για αυτό το λόγο είναι σημαντική η ανάπτυξη νέων φυτοπροστατευτικών ουσιών με φιλικότερη ως προς το περιβάλλον συμπεριφορά .

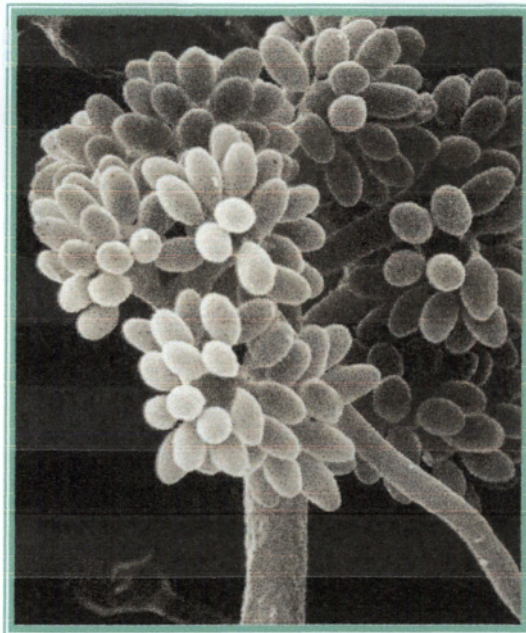


Εικόνα 1.Ανθη του φυτού *Lilium vivaldy* που χρησιμοποιήθηκε στα πείραμα.

4. ΤΟ ΠΑΘΟΓΟΝΟ

Ο μύκητας του γένους *Botrytis spp.* αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές οικονομικά ασθένειες σε μεγάλο αριθμό φυτών. Στην περίπτωση του Λίλιουμ υπεύθυνο είδος του μύκητα είναι το *Botrytis elliptica* που προκαλεί την ασθένεια γνωστή ως 'κάψιμο των Λίλιουμ (lily fire)', με αποτέλεσμα την απώλεια μεγάλου μέρους της παραγωγής κάθε χρόνο.

Τα συμπτώματα που παρουσιάζουν τα προσβεβλημένα φυτά είναι ελλειψοειδείς κηλίδες με καφέ χρωματισμό στην πάνω επιφάνεια των φύλλων. Τα άνθη και οι βολβοί μπορεί να παρουσιάσουν καστανού χρώματος στίγματα και αν δεν ελεγχθεί έγκαιρα η προσβολή μπορεί να καταστραφεί ολόκληρο το φυτό. Η ασθένεια ονομάζεται και 'κάψιμο των Λίλιουμ (lily fire)' καθώς το φυτό μαυρίζει σταδιακά και παίρνει την μορφή φυτού που έχει καεί. Τελική κατάληξη των προσβολών είναι η υγρή σήψη των φυτικών ιστών που συχνά καλύπτονται από μία γκριζα εξάνθιση. Οι συνθήκες που ευνοούν την εξάπλωση του παθογόνου είναι η υψηλή υγρασία και οι υψηλές θερμοκρασίες (16-21° C). Όταν τα πρώτα συμπτώματα εμφανιστούν, δεν είναι δυνατό πλέον να εξαφανιστούν, για αυτό καλύτερη αντιμετώπιση αποτελεί η πρόληψη της ασθένειας.



Εικόνα 2. Κονιδιοφόρος του μύκητα *Botrytis elliptica* όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο

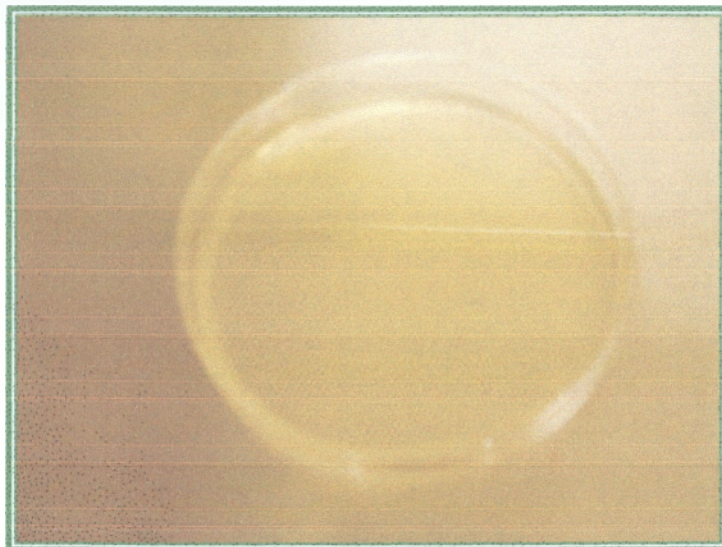
5. ΟΙ ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Οι ουσίες που εξετάζονται στο πείραμα αυτό αποτελούν συστατικά προϊόντων που χρησιμοποιούνται καθημερινά και είναι φιλικά ως προς το περιβάλλον και τον άνθρωπο. Είναι συντηρητικά τροφίμων, συστατικά καθημερινών χρηστικών ουσιών όπως οι οδοντόκρεμες καθώς και άλλων προϊόντων με τα οποία έρχεται καθημερινά σε επαφή ο άνθρωπος. Οι ουσίες αυτές έχει βρεθεί πειραματικά πως αποτελούν ήπιας μορφής φυτοπροστατευτικές ουσίες. Από μόνες τους δεν αποτελούν σημαντικής αξίας φυτοπροστατευτικά προϊόντα αλλά σε συνδυασμό με άλλες ουσίες μπορεί να έχουν καλύτερα αποτελέσματα. Η λογική της χρήσης αυτών των ουσιών και ο συνδυασμός τους στηρίζεται στη θεωρία 'Hurdle' (Θεωρία των εμποδίων) που εφαρμόζεται στη επιστήμη της τεχνολογίας των τροφίμων. Η θεωρία Hurdle στηρίζεται στο συνδυασμό όχι τόσο δραστικών τεχνολογιών και προσφέρει τη δυνατότητα εξάλειψης των περιορισμών των μεμονωμένων τεχνικών καθώς προσφέρει το πλεονέκτημα της συνεργασίας διαφορετικών μεθόδων. Από την βιομηχανία των τροφίμων είναι γνωστό ότι ο συνδυασμός δύο διαφορετικών ήπιων τεχνικών είναι πιο αποτελεσματικός από το άθροισμα μεμονωμένων μεθόδων συντήρησης. Με την παραπάνω λογική χρησιμοποιούνται συστατικά ήπιας δράσης τα οποία δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά από μόνα τους αλλά όταν συνδυάζονται μεταξύ τους η συνολική αποτελεσματικότητα αυξάνεται σημαντικά .

6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

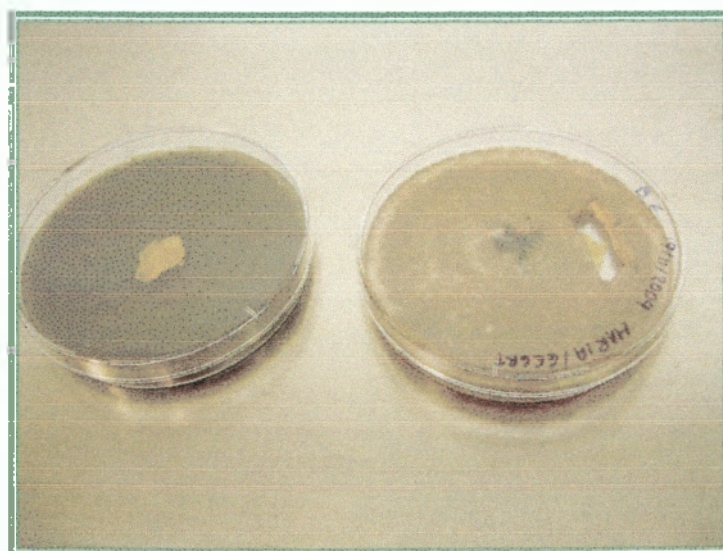
6.1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ

Σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες του *Botrytis elliptica* οι οποίες είχαν επωαστεί για δύο εβδομάδες πριν από το πείραμα και χρησιμοποιήθηκαν σαν το βασικό βιολογικό υλικό. Ο μύκητας καλλιεργήθηκε σε δύο διαφορετικά θρεπτικά συστατικά, το malt extract άγαρ (εικόνα 3) και σε άγαρ με εκχύλισμα από φύλλα Λίλιουμ.



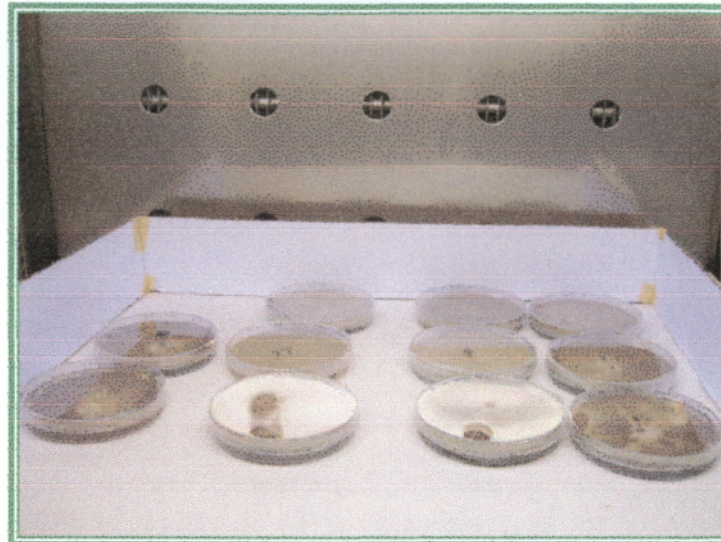
Εικόνα 3. Τριβλίο με θρεπτικό υλικό malt extract άγαρ

Για τον εμβολιασμό νέων καλλιεργειών του μύκητα χρησιμοποιούνταν μικρά τετράγωνα κομμάτια από θρεπτικό υλικό τα οποία προέρχονταν από καλλιέργεια *Botrytis elliptica* που είχε εμβολιαστεί δύο εβδομάδες νωρίτερα και είχαν αναπτυχθεί οι καρποφορίες του (κονιδιοφόροι).



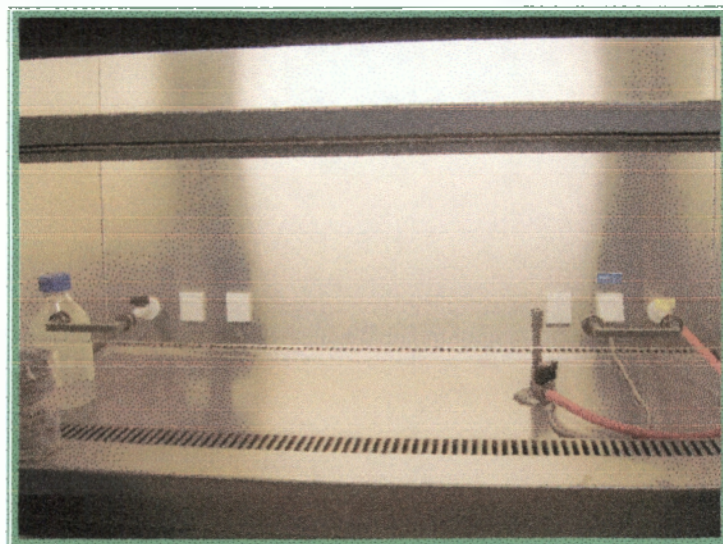
Εικόνα 4. Μεταφορά του μύκητα σε νέα τριβλία

Τα τριβλία με την νέα καλλιέργεια του μύκητα τοποθετούνταν σε επωαστικό θάλαμο (εικόνα 5) σε σταθερή θερμοκρασία 20°C κάτω από συνεχή κανονικό φωτισμό, σε συνδυασμό με λάμπες υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) η οποία προάγει την παραγωγή των κονιδίων του μύκητα .



Εικόνα 5. Οι καλλιέργειες του μύκητα μέσα στο θάλαμο επώασης κάτω από τις ειδικές λάμπες υπεριώδους ακτινοβολίας

Είναι σημαντικό η μεταφορά του μύκητα στα νέα τριβλία με θρεπτικό υλικό να γίνει σε ασηπτικό περιβάλλον. Ο λόγος για αυτό είναι να αποφευχθεί οποιαδήποτε βακτηριακή ή μυκητολογική μόλυνση. Για αυτό το λόγο όλες οι διαδικασίες της μεταφοράς του μύκητα γίνονταν στο θάλαμο στρωτής ροής του αέρα (εικόνα 6).



Εικόνα 6. Ο θάλαμος στρωτής ροής του αέρα.

6.2. Η ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΦΥΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Η αποτελεσματικότητα των νέων αειφορικών φυτοπροστατευτικών ουσιών δοκιμάστηκε σε φύλλα φυτών *Lilium vivaldy* (εικόνα 7).

Βολβοί από την παραπάνω Ασιατική ποικιλία τοποθετήθηκαν σε εδαφικό μείγμα με pH 5.8 σε θερμοκήπιο όπου οι κλιματικές συνθήκες δεν ρυθμιζονταν.



Εικόνα 7. Φυτά *Lilium vivaldy* στο θερμοκήπιο.

Όταν τα φυτά είχαν φτάσει στο στάδιο πριν την ανθοφορία (6 με 8 εβδομάδες από την ημέρα φύτευσης), αφαιρούνταν τα φύλλα και πάνω σε αυτά ψεκάζονταν οι διάφορες ουσίες που θέλαμε να εξετάσουμε. Αυτό το στάδιο του φυτού επιλέχθηκε γιατί θεωρείται πως είναι το πιο ευαίσθητο σε προσβολή από τον *Botrytis elliptica*. Η αποτελεσματικότητα του κάθε συστατικού αξιολογήθηκε με βάση το μέγεθος και τον αριθμό κηλίδων που εμφανίζονταν μετά από τεχνητή μόλυνση των φύλλων με το μύκητα *B. elliptica*.

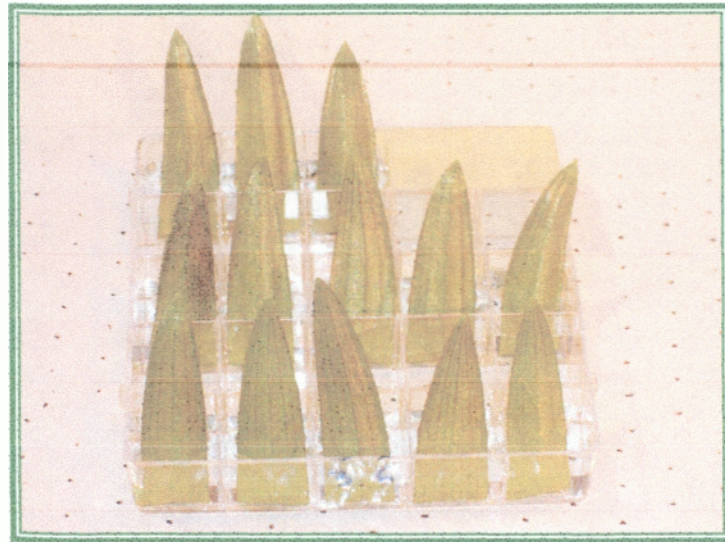
6.3. Η ΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ

Το πείραμα διεξήχθη σε ειδικά πλαστικά δισκία που διαιρούνται σε 25 τετράγωνα 2 x 2 cm, από τα οποία χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα 15.



Εικόνα 8. Πλαστικά δισκία καλυμμένα με ταινία στις θέσεις των δεικτών

Αρχικά, 13 από τα τετράγωνα γεμίστηκαν με νερό βρύσης (περίπου 3ml) και δύο από αυτά καλύφθηκαν με ταινία γιατί αργότερα θα τοποθετούνταν σε αυτά οι δείκτες όπως δείχνει η φωτογραφία (εικόνα 8). Έπειτα τοποθετούνταν τα φύλλα από τα Λίλιουμ μήκους περίπου 5 cm το καθένα μέσα στις θέσεις του δισκίου. Κάθε δισκίο περιλάμβανε τυχαία επιλογή από φύλλα που προέρχονταν από το κάτω, το μέσο και το πάνω μέρος του φυτού. Η πάνω σειρά στο δισκίο περιείχε φύλλα από το πάνω μέρος, η μέση σειρά από το μέσο και η τελευταία από το κάτω μέρος των φυτών.

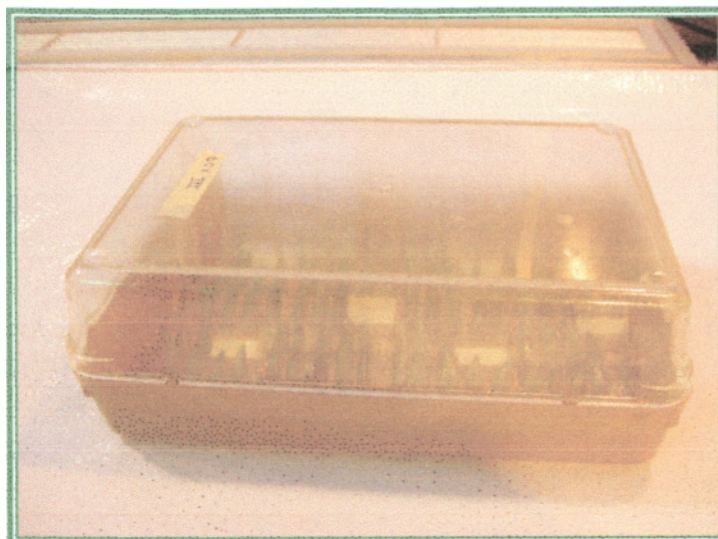


Εικόνα 9. Τα πλαστικά δισκία με τα τοποθετημένα φύλλα



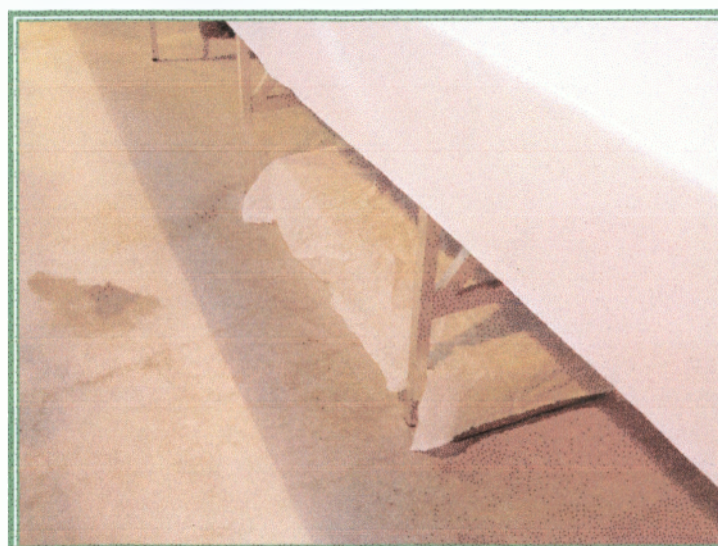
Εικόνα 10. Το κουτί με τα δισκία πριν τοποθετηθούν οι δείκτες σε αυτά.

Για να προαχθεί η προσβολή και η ανάπτυξη του μύκητα είναι απαραίτητα υψηλά επίπεδα υγρασίας, για αυτό τα δισκία τοποθετούνταν μέσα σε πλαστικά κουτιά των οποίων ο πυθμένας καλύπτοντα με φύλλα απορροφητικού χαρτιού τα οποία διαβρέχονταν με νερό για να διατηρούν την υγρασία σε υψηλά επίπεδα.



Εικόνα 11. Το κουτί με τα δισκία κλειστό.

Το κάλυμμα των πλαστικών κουτιών είναι διάφανο για να μπορεί να περνάει το φως και έτσι να επιτυγχάνονται υψηλές θερμοκρασίες στο εσωτερικό του. Κάθε κουτί περιέχει 8 δισκία. Τα πλαστικά κουτιά τοποθετήθηκαν εντός του θερμοκηπίου με θερμοκρασία 20°C την ημέρα και 18°C την νύχτα. Επιπρόσθετα για την αποφυγή της απευθείας ακτινοβολίας στα φύλλα ,τα κουτιά τοποθετούνταν στη σκιά και καλύπτονται με ένα είδος από ημιδιάφανο ύφασμα .



Εικόνα 12. Τα κουτιά καλυμμένα με το ύφασμα στη σκιά εντός του θερμοκηπίου

Καθώς σε κάθε κουτί οι συνθήκες που επικρατούν διαφέρουν παίρνουμε το κάθε κουτί σαν διαφορετική πειραματική μονάδα.

6.4. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Διαφορετικά συστατικά και οι συνδυασμοί τους εξετάστηκαν ως προς την αποτελεσματικότητά τους στην προστασία από την ανάπτυξη του μύκητα *Botrytis elliptica*. Όσα από τα παραπάνω διακρίθηκαν για την αποτελεσματικότητά τους, επανεξετάστηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και συνδυασμούς.

Τα διαλύματα των συστατικών που δοκιμάστηκαν παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο με απιονισμένο νερό σε τελικό όγκο 20 ml. Έπειτα ψεκάστηκαν στην επάνω επιφάνεια των φύλλων.

Ως προς τον ψεκασμό των φύλλων, εφαρμόστηκε η εξής τεχνική (εικόνα 13): Τα διαλύματα εφαρμόστηκαν τρεις φορές σε κάθε σειρά του δισκίου στο πάνω μέρος των φύλλων ξεκινώντας από την πίσω πλευρά και καταλήγοντας στην πρώτη σειρά. Στόχος ήταν η εναπόθεση τις ίδιας ποσότητας από το διάλυμα σε όλα τα φύλλα δημιουργώντας ένα ομοιογενές φιλμ κάλυψης. Τα φύλλα που χρησιμοποιήθηκαν σαν δείκτες ψεκάστηκαν με απιονισμένο νερό. Ο τελικός όγκος των διαλυμάτων που εφαρμόστηκε είναι περίπου 5 ml ανά δισκίο.

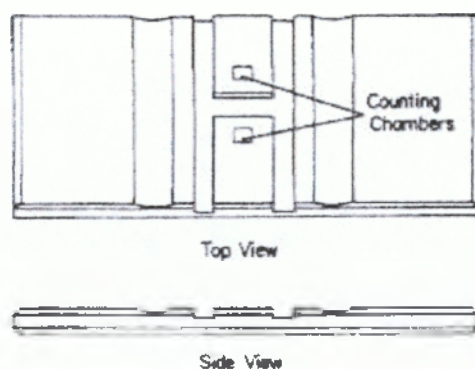
Τελειώνοντας, όλα τα φύλλα αφέθηκαν να στεγνώσουν για 30-40 min. περίπου και έπειτα τοποθετήθηκαν μέσα στα κουτιά. Σε αυτό το στάδιο του πειράματος η υψηλή υγρασία δεν ήταν απαραίτητη για αυτό τα απορροφητικά χαρτιά με το νερό αφαιρέθηκαν και ανατοποθετήθηκαν μετά τον εμβολιασμό των φύλλων με τον μύκητα.



Εικόνα 13. Κινήσεις που ακολουθήθηκαν κατά των ψεκασμό

6.4. Η ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΩΝ ΚΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ

Για την παρασκευή του μολύσματος του *Botrytis elliptica* χρειάζεται μια καλλιέργεια δύο εβδομάδων. Για την δημιουργία του αιωρήματος, μια μικρή ποσότητα νερού περίπου 10 ml, προστέθηκε στην καλλιέργεια και στην συνέχεια ξύστηκε με μία μικρή γυάλινη ράβδο. Με την διαδικασία αυτή τα κονίδια του μύκητα μαζί με μια ποσότητα μυκηλίου ελευθερώθηκαν από την καλλιέργεια. Το αιώρημα αυτό στη συνέχεια διηθήθηκε για την απομάκρυνση των συσσωματωμάτων μυκηλίου και θρεπτικού υλικού και φυγοκεντρήθηκε, ώστε να παραληφθεί το ίζημα με τα κονίδια του μύκητα. Τα κονίδια επαναιωρούνται σε απιονισμένο νερό, γνωστού όγκου και η συγκέντρωσή τους υπολογίζονταν με τη χρήση του αιματοκυττόμετρου.



Εικόνα 14. Αιματοκυττόμετρο

6.5. ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΜΕ ΤΟΝ ΜΥΚΗΤΑ

Έχοντας μια συγκέντρωση αιωρήματος περίπου 200×10^6 κονιδίων/ml ξεκινάμε τον εμβολιασμό των φύλλων με σταγόνες των 2μl, οι οποίες περιέχουν περίπου 400 κονίδια η κάθε μία. Η σταγόνα τοποθετήθηκε σε κάθε φύλλο στο πάνω δεξιό μέρος του. Επειδή τα κονίδια έχουν την τάση να καθιζάνουν στο διάλυμα, πρέπει αυτό να ανακινείται κάθε φορά πριν την χρήση του για να διασφαλιστεί η ομοιογένειά του. Πριν τοποθετηθούν τα δισκία μέσα στα κουτιά βάζουμε φύλλα απορροφητικού χαρτιού στο πυθμένα των κουτιών και τα διαβρέχουμε έτσι ώστε να

μυκητα.

Τα κουτιά με τα εμβολιασμένα φύλλα σφραγίζονται με ταινία και στη συνέχεια τοποθετούνται εντός του θερμοκηπίου στη σκιά και καλύπτονται με το ειδικό ημιδιάφανο ύφασμα. Έπειτα από διάστημα περίπου 3 ημερών πάρθηκαν οι πρώτες μετρήσεις.



Εικόνα 15. Τα φύλλα Λίλιουμ τρεις ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Είναι εμφανή τα συμπτώματα προσβολής από το μύκητα.

7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7.1. ΓΕΝΙΚΑ

Εξαιτίας του απόρρητου που διέπει τα πειράματα του Ινστιτούτου δεν είναι δυνατή η πρόσβαση σε πληροφορίες που αφορούν την ταυτότητα και την σύνθεση αυτών των ουσιών και για αυτό σε όλη την εργασία οι ουσίες αναφέρονται με κωδικούς.

Οι ουσίες που εξετάστηκαν ανήκουν στις παρακάτω ομάδες:

- ❖ Πολυφαινόλες (P1 ,P2 ,P3)
- ❖ Παράγοντες μορφοποίησης σκευασμάτων (FA1 ,FA2 ,FA3 ,FA4)
- ❖ Οργανικά οξέα (OA1 ,OA2 ,OA3)
- ❖ Ανόργανα άλατα (AS1 ,AS2 ,AS3)
- ❖ Διάφορα (M1 ,M2)
- ❖ Συνθετικά συντηρητικά (SP1 ,SP2)

Η φυτοτοξικότητα αναφέρεται στο φαινόμενο της τοξικότητας των ουσιών πάνω στα φύλλα κατά την εφαρμογή τους.

Τα κατάλοιπα αναφέρονται στα ορατά υπόλοιπα που μπορεί να αφήνουν οι διάφορες ουσίες κατά την εφαρμογή τους στα φύλλα.

Στις γραφικές παραστάσεις που ακολουθούν απεικονίζονται ενδεικτικά οι μετρήσεις των αποτελεσμάτων της προσβολής στα φύλλα Λίλιουμ έπειτα από την εφαρμογή των διαφόρων φυτοπροστατευτικών ουσιών σε αυτά.

Κάθε γραφική παράσταση αναφέρεται σε μία διαφορετική μονάδα πειράματος (ένα κουτί) στην οποία περιλαμβάνονται 8 περίπου διαφορετικές μικρότερες μονάδες πειράματος (τα δισκία) στις οποίες γίνεται η εφαρμογή των διαφορετικών φυτοπροστατευτικών ουσιών. Κάθε δισκίο περιλαμβάνει 15 φύλλα από τα οποία τα 2 είναι δείκτες και μόνο στα υπόλοιπα 13 γίνεται η εφαρμογή των σκευασμάτων.

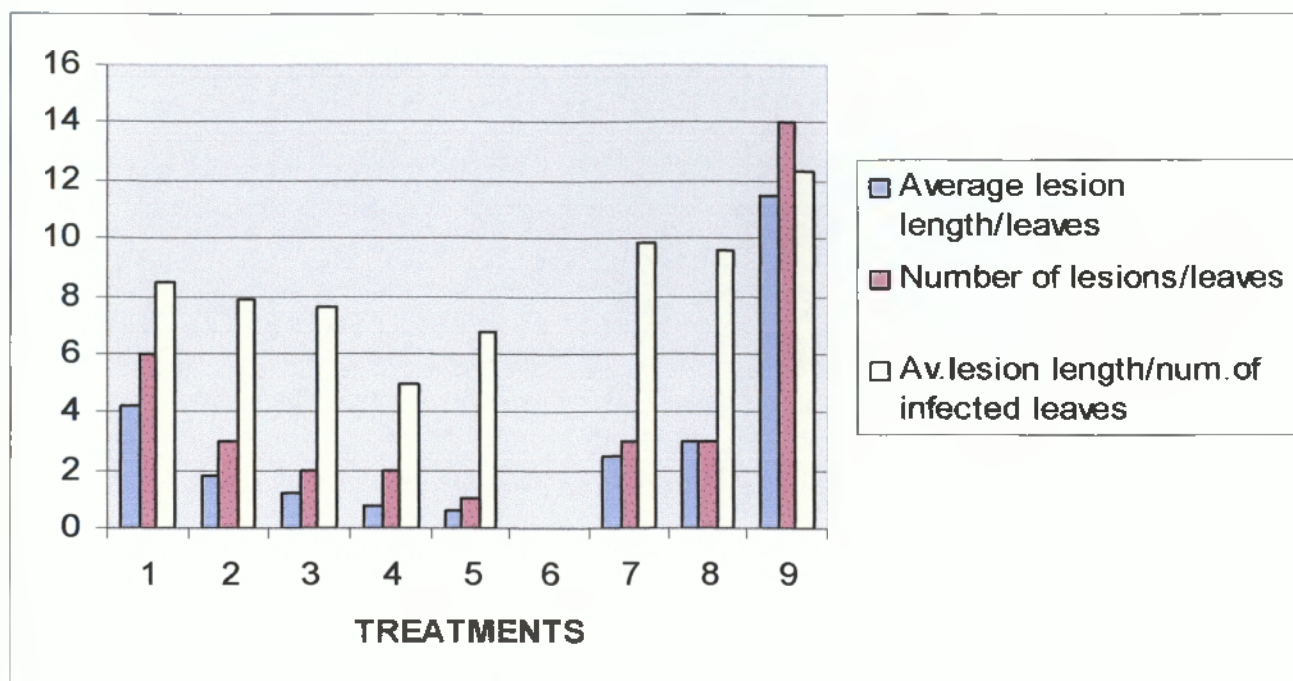
Αυτό που παρουσιάζεται στις γραφικές παραστάσεις είναι το μέγεθος της ανάπτυξης του μύκητα στα φύλλα. Οι μετρήσεις αφορούσαν την κατακόρυφη διάμετρο της κηλίδας που εμφανίζονταν στα φύλλα.

Τα αποτελέσματα, όπως εμφανίζονται στις γραφικές παραστάσεις που ακολουθούν, αφορούν τις παρακάτω παραμέτρους που μετρήθηκαν :

- Average lesion length / leaves: Μέσο μέγεθος των κηλίδων στο σύνολο των φύλλων κάθε επέμβασης.
- Number of lesions / leaves: Ο αριθμός των κηλίδων στο σύνολο των φύλλων κάθε επέμβασης.
- Average lesion length / num. of infected leaves: Μέσο μέγεθος κηλίδων στο σύνολο των μολυσμένων φύλλων κάθε επέμβασης.

Σε κάθε δισκίο γινόταν εφαρμογή ενός ή περισσότερων ουσιών (ts).
Το μήκος των κηλίδων μετριέται σε mm.

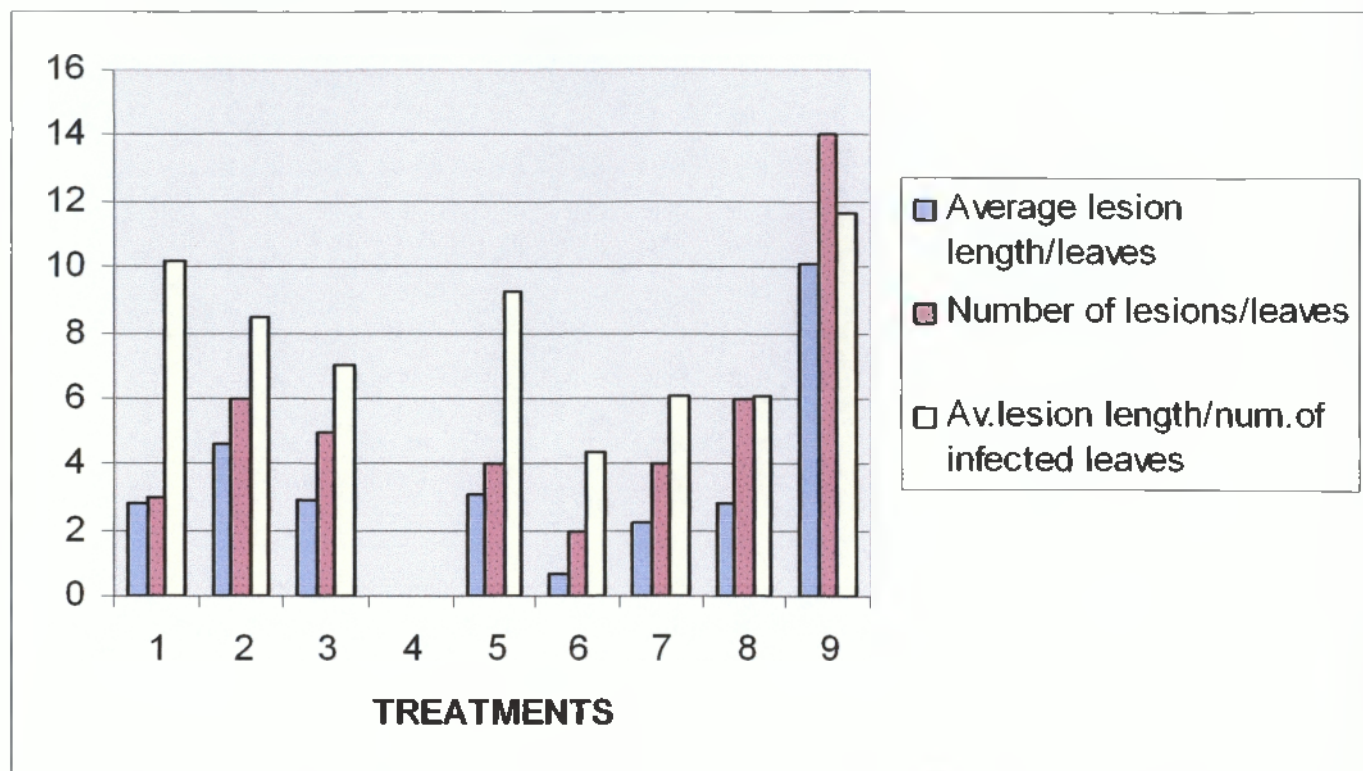
7.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΤΩΝ ΟΥΣΙΩΝ M1, AS3 ΚΑΙ OA2



Tray	Treatments		
1	M 1 (0.2ml/l)	AS 3 (2mM)	OA 2 (0.2mM)
2	M 1 (1ml/l)	AS 3 (2mM)	OA 2 (0.2mM)
3	M 1 (1ml/l)	AS 3 (10mM)	OA 2 (0.2mM)
4	M 1 (1ml/l)	AS 3 (10mM)	OA 2 (1 mM)
5	M 1 (0.2ml/l)	AS 3 (10mM)	OA 2 (0.2mM)
6	M 1 (0.2ml/l)	AS 3 (10mM)	OA 2 (1 mM)
7	M 1 (0.2ml/l)	AS 3 (2mM)	OA 2 (1 mM)
8	M 1 (1ml/l)	AS 3 (2mM)	OA 2 (1 mM)
9	CONTROL		

Το παραπάνω γράφημα δείχνει ότι οι συνδυασμοί είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικοί ως προς την παρεμπόδιση ανάπτυξης του βοτρυτή. Ειδικά ο συνδυασμός των ουσιών που εμπεριέχονται στο διάλυμα που εφαρμόστηκε στο 6^ο δισκίο δείχνει ότι οι ουσίες AS 3 και OA 2 σε μεγάλες συγκεντρώσεις, είναι πολύ αποτελεσματικές εφόσον δεν προέκυψαν καθόλου προσβολές από τον μύκητα. Ένα άλλο συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι η ουσία M1 σε αυξημένη συγκέντρωση (1ml/l) σε συνδυασμό με τις ουσίες OA2 στην συγκέντρωση (1mM) και την ουσία AS 3 στη συγκέντρωση (10 mM) επιδρά αρνητικά καθώς παρουσιάζεται προσβολή από τον μύκητα (δισκίο 4).

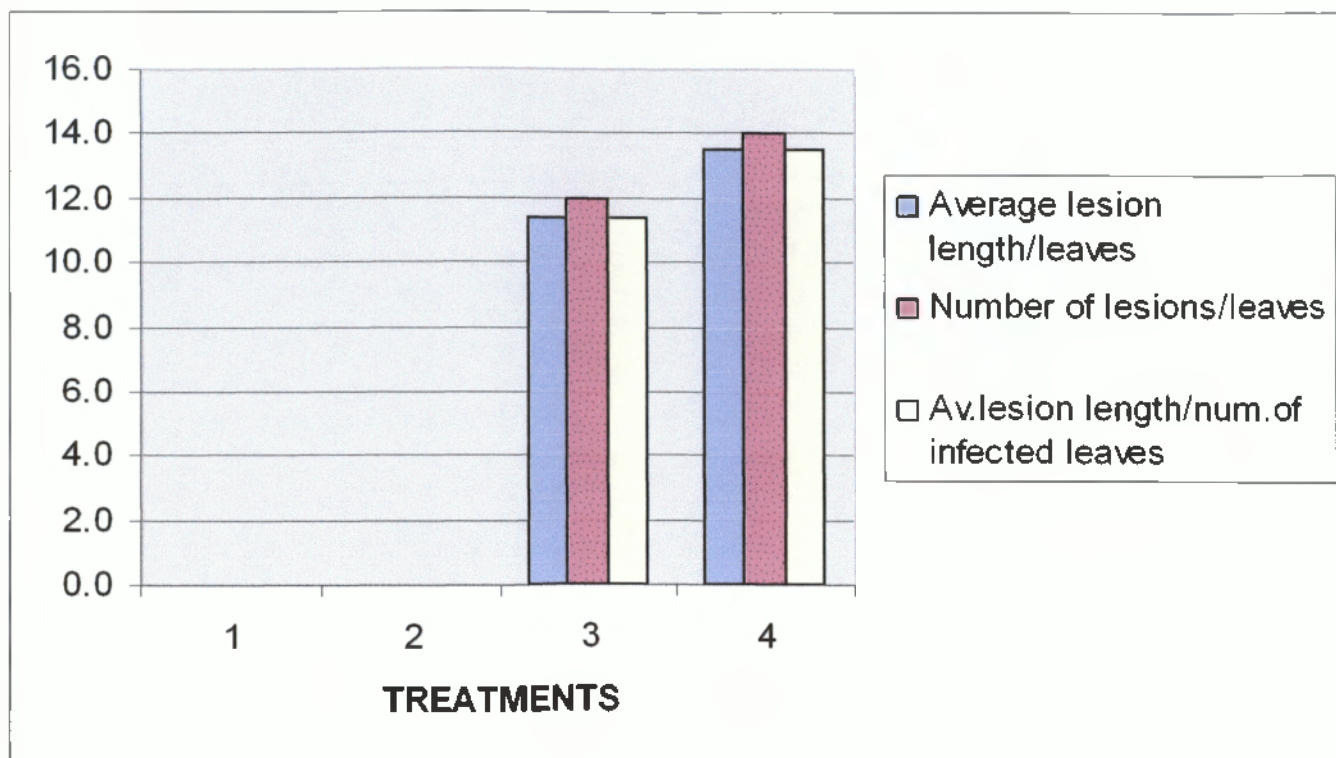
7.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΤΩΝ ΟΥΣΙΩΝ Μ1, Ρ3 ΚΑΙ ΟΑ2



Tray	Treatments		
1	M 1 (0.2ml/l)	P 3 (0.1g/l)	OA 2 (0.2mM)
2	M 1 (1ml/l)	P 3 (0.1g/l)	OA 2 (0.2mM)
3	M 1 (1ml/l)	P 3 (0.5g/l)	OA 2 (0.2mM)
4	M 1 (1ml/l)	P 3 (0.5g/l)	OA 2 (1 mM)
5	M 1 (0.2ml/l)	P 3 (0.5g/l)	OA 2 (0.2mM)
6	M 1 (0.2ml/l)	P 3 (0.5g/l)	OA 2 (1 mM)
7	M 1 (0.2ml/l)	P 3 (0.1g/l)	OA 2 (1 mM)
8	M 1 (1ml/l)	P 3 (0.1g/l)	OA 2 (1 mM)
9	CONTROL		

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι οι ουσίες, Μ 1, Ρ 3, ΟΑ 2 είναι πολύ αποτελεσματικές σε υψηλές συγκεντρώσεις.

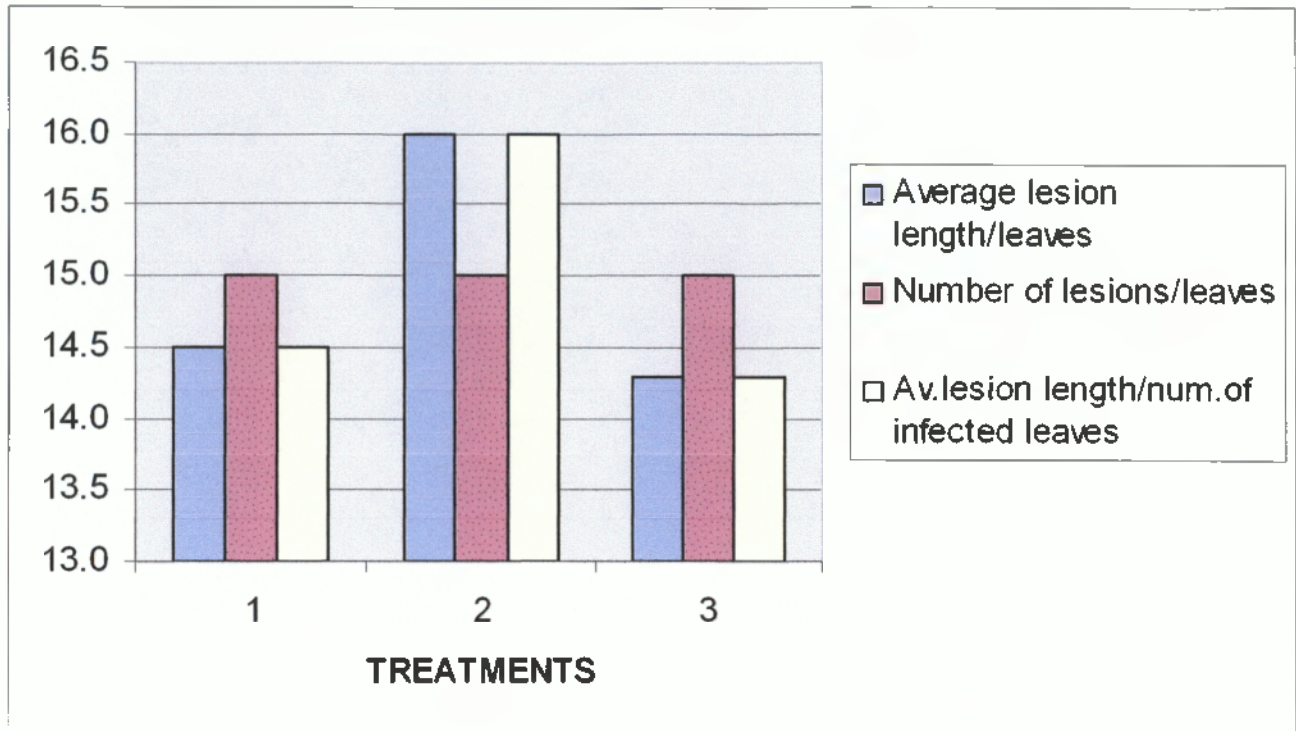
7.4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΟΥΣΙΑΣ SP1.



Tray	Treatments
1	SP 1 (0.5%)
2	SP 1 (0.1%)
3	SP 1 (0.02%)
4	Untreated

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι οι ουσία SP 1 είναι πολύ αποτελεσματική στις συγκεντρώσεις των 0.5% και 0.1% ενώ στη μικρότερη συγκέντρωση η παρεμπόδιση της ανάπτυξης της ασθένειας δεν είναι σημαντική.

7.5. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΟΥΣΙΑΣ SP2.



Tray	Treatment
1	SP 2 50μ/l
2	SP 2 10μ/l
3	Untreated

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η ουσία SP2 όχι μόνο δεν παρεμποδίζει την ανάπτυξη της ασθένειας αλλά μάλλον προάγει την ανάπτυξη του μύκητα.

7.6. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα συνολικά αποτελέσματα του πειράματος που αφορούν την δράση των ουσιών, την φυτοτοξικότητα και την παρουσία κατάλοιπων των ουσιών πάνω στα φύλλα φαίνονται στον Πίνακα 1 που ακολουθεί.

Πίνακας 1.

<i>*Polyphenols (P)</i>				
Σημειώσεις				
	Συγκεντρώσεις	*Δράση (+,/-)	Φυτοτοξικότητα	Κατάλοιπα
P1	500 mg/L	+	Όχι	Όχι
P 2	1000 mg/L	-	Όχι	Ναι
	5000 mg/L	-	Όχι	Ναι
	2500 mg/L	-	Όχι	Όχι
	500 mg/L	-	Όχι	Όχι
P 3	500 mg/L	++	Όχι	Ναι
	250 mg/L	+	Όχι	Ναι
	100 mg/L	+	Όχι	Όχι
Formulation agents (FA)				
Σημειώσεις				
	Συγκεντρώσεις	Δράση (+,/-)	Φυτοτοξικότητα	Κατάλοιπα
FA 1	0,2 mg/L	+	Όχι	Όχι
FA 2	0,2 mg/L	-	Ναι	Όχι
FA 3	0,2 mg/L	-	Όχι	Όχι
FA 4	0,2 mg/L	-	Όχι	Όχι
<i>Organic acids (OA)</i>				
Σημειώσεις				
	Συγκεντρώσεις	Δράση (+,/-)	Φυτοτοξικότητα	Κατάλοιπα
OA 1	16000 mg/L	++	Ναι	Όχι
	4000 mg/L	++	Ναι	Όχι
	2500 mg/L	+	Όχι	Όχι
	1000 mg/L	/	Όχι	Όχι

OA 2	1 mM	++	Όχι	Όχι
	0,2 mM	/	Όχι	Όχι
OA 3	5000 mg/L	/	Όχι	Όχι
<i>Anorganic salts (AS)</i>				
			Σημειώσεις	
	Συγκεντρώσεις	Δράση (+,/-)	Φυτοτοξικότητα	Κατάλοιπα
AS 1	4Mm	++	Όχι	Όχι
	1Mm	++	Όχι	Όχι
	0,25Mm	+	Όχι	Όχι
AS 2	1Mm	++	Όχι	Όχι
	0,25Mm	++	Όχι	Όχι
AS 3	10000 mg/L	++	Όχι	Όχι
	2000 mg/L	+	Όχι	Όχι
<i>Miscellaneous (M)</i>				
			Σημειώσεις	
	Συγκεντρώσεις	Δράση (+,/-)	Φυτοτοξικότητα	Κατάλοιπα
M 1	1000 mg/L	+	Όχι	Όχι
	2500 mg/L	-	Όχι	Όχι
	2000 mg/L	-	Όχι	Όχι
M 2	500 x diluted	++	Όχι	Όχι
	2000 x diluted	+	Όχι	Όχι
	8000 x diluted	+	Όχι	Όχι
<i>Synthetic preservatives (SP)</i>				
			Σημειώσεις	
	Συγκεντρώσεις	Δράση (+,/-)	Φυτοτοξικότητα	Κατάλοιπα
SP 1	5000 mg/L	++	Όχι	Όχι
	1000 mg/L	++	Όχι	Όχι
	400 mg/L	+	Όχι	Όχι
	300 mg/L	+	Όχι	Όχι
	200 mg/L	+	Όχι	Όχι
SP 2	0,05 mg/L	-	Όχι	Όχι
	0,01 mg/L	-	Όχι	Όχι

*Ερμηνεία συμβόλων:

++ σημαίνει πολύ δραστικό ενάντια στον μύκητα *Botrytis elliptica*

+ σημαίνει δραστικό ενάντια στον μύκητα *Botrytis elliptica*

-
- σημαίνει πως η ουσία έχει ευεργετική δράση για την ανάπτυξη του μύκητα *Botrytis elliptica*
-

8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αν προσπαθήσουμε να συγκρίνουμε μεταξύ τους τις διάφορες ομάδες ουσιών που μελετήθηκαν, πάντα με πολλές επιφυλάξεις, μπορούμε να πούμε ότι οι FA2 , FA3 και FA4, σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις δρουν ευεργετικά στην ανάπτυξη του μύκητα δεν μπορούμε όμως να ξέρουμε τι θα γίνει όταν οι συγκεντρώσεις τους αυξηθούν. Ως προς τις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν φαίνεται, ότι από τα συνθετικά συντηρητικά το SP1 είναι αποτελεσματικό, όπως και η πολυφαινόλη P3 .

Η ουσία FA2 εμφανίζει φυτοτοξικότητα ακόμα και στη χαμηλή συγκέντρωση των 0,2 mg/L. Μια ακόμη ένωση που εμφανίζει φυτοτοξικότητα είναι η OA1 στις συγκεντρώσεις των 4000 και 16000 mg/L. Σε αυτή την περίπτωση η εφαρμογή της ουσίας στην πράξη καθίσταται αδύνατη σε υψηλές συγκεντρώσεις. Η φυτοτοξικότητα που εμφανίζουν δεν αποκλείει την αποτελεσματικότητα τους σε μικρότερες συγκεντρώσεις και σε συνδυασμό με άλλες ουσίες σύμφωνα με την μέθοδο Hurdle.

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η ομάδα των ανόργανων αλάτων εμφανίζεται δραστική έναντι του *Botrytis sp.*, εφόσον δεν αφήνει κατάλοιπα και δεν είναι φυτοτοξική.

Από την ομάδα των πολυφαινολών, οι ουσίες P1 και P3 φαίνεται να παρεμποδίζουν την προσβολή από τον μύκητα σε αντίθεση με την ουσία P2 που φαίνεται να έχει ευεργετική δράση στην ανάπτυξη του μύκητα. Οι πολυφαινόλες δεν δείχνουν φυτοτοξικότητα ενώ κάποια κατάλοιπα φαίνεται να παρουσιάζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις των P2 και P3.

Από τους παράγοντες μορφοποίησης σκευασμάτων (FA) οι ουσίες FA2, FA3 και FA4 έχουν ευεργετική δράση στην ανάπτυξη του μύκητα εκτός από την FA1 που δρα ανασταλτικά στην προσβολή από τον μύκητα. Καμία όμως ουσία από αυτή την ομάδα δεν αφήνει κατάλοιπα ενώ φυτοτοξικότητα δείχνει να επιδεικνύει μόνο η FA2 .

Τα οργανικά οξέα φαίνεται να επιδεικνύουν όλα τοξικότητα στον μύκητα, που αυξάνεται αναλογικά με την συγκέντρωση και κανένα δεν αφήνει κατάλοιπα στα φύλλα. Φυτοτοξικότητα φαίνεται να εμφανίζει η ουσία με κωδικό OA1 αλλά μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις .

Από την ομάδα των 'Διαφόρων', η ουσία M2 εμφανίζεται να εμποδίζει την ανάπτυξη της ασθένειας αναλογικά με την συγκέντρωση ενώ περιέργως η ουσία M1 σε χαμηλές συγκεντρώσεις εμφανίζεται τοξική έναντι του μύκητα αλλά σε υψηλές εμφανίζεται να έχει ευεργετική επίδραση. Καμία από τις ουσίες αυτές δεν εμφανίζει φυτοτοξικότητα η κατάλοιπα.

Από τα συνθετικά συντηρητικά, η SP1 εμφανίζει τοξικότητα αναλογικά με την συγκέντρωση της ενώ αντίθετα η SP2 φαίνεται να έχει ευεργετική δράση όμως και οι δύο ουσίες δεν εμφανίζουν κατάλοιπα ή φυτοτοξικότητα.

Ένα θέμα που πρέπει να προσεχθεί, είναι ότι τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν ως προς την αποτελεσματικότητα των ουσιών μόνο στα φύλλα του φυτού κάτι που δεν εξασφαλίζει τα ίδια αποτελέσματα ισχύουν όταν η εφαρμογή γίνει σε ολόκληρο το φυτό. Για την περαιτέρω αξιολόγηση των ευρημάτων απαιτείται η εφαρμογή των ουσιών τόσο σε συνθήκες εργαστηρίου όσο και σε συνθήκες αγρού. Επιπλέον η φυτοτοξικότητα μετρήθηκε μόνο στα φύλλα κάτι το οποίο δεν εξασφαλίζει ότι το ίδιο ισχύει όταν η εφαρμογή γίνει σε ολόκληρο το φυτό .

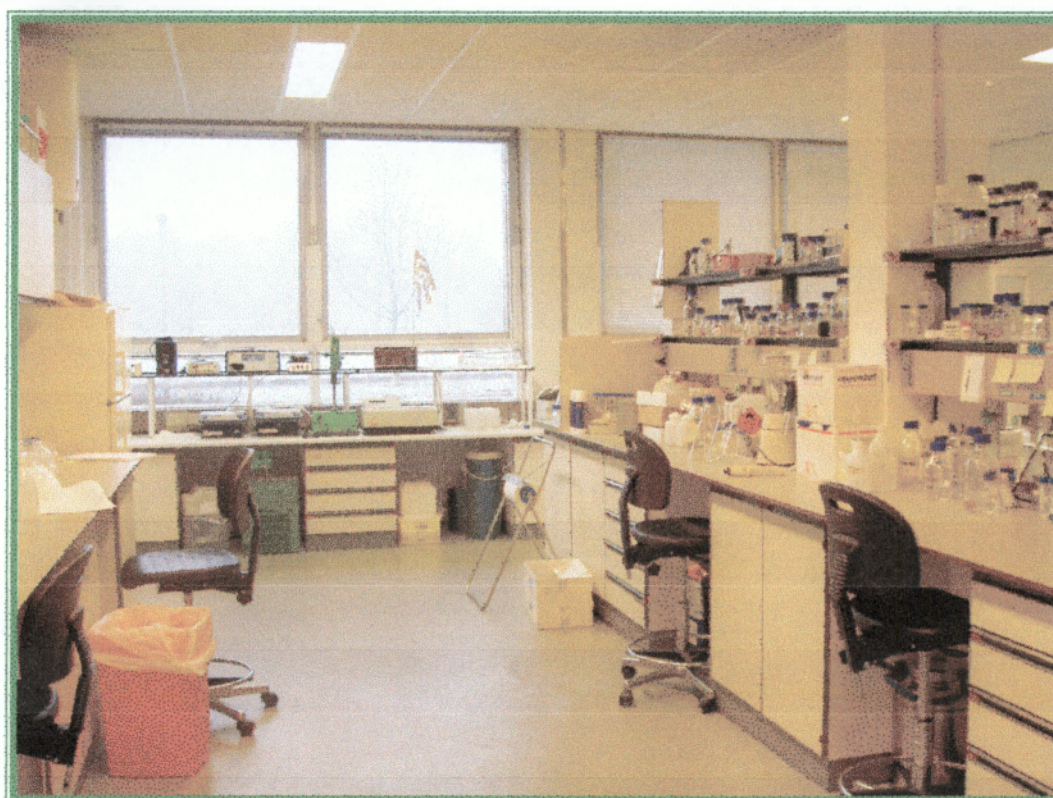
Σύμφωνα με προηγούμενα πειράματα, ουσίες όπως η OA2 που έδωσε πολύ καλά αποτελέσματα όταν εφαρμόστηκε στα φύλλα, κατά την εξέτασή της με εφαρμογή σε ολόκληρα φυτά, η δράση της ήταν επιβλαβής. Το γεγονός αυτό δηλώνει ότι τα διαφορετικά μέρη του φυτού παρουσιάζουν διαφορετικό βαθμό ευαισθησίας στα διάφορα σκευάσματα . Επιπλέον είναι απαραίτητη η εξέταση των ουσιών, όχι μόνο ως προς τα μέρη του φυτού, αλλά και ως προς τις διάφορες συνθήκες που μπορεί να επικρατούν κατά την διάρκεια της εφαρμογής τους πριν ολοκληρωθεί η μελέτη, για την δραστηριότητά τους και την δυνατότητα να τύχουν εμπορικής αξιοποιήσεις.

Ωστόσο τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος είναι ελπιδοφόρα για την δημιουργία μιας σειράς νέων φυτοπροστατευτικών ουσιών οι οποίες θα έχουν φιλικότερη δράση ως προς το περιβάλλον και την υγεία του ανθρώπου. Για αυτό το λόγο τα πειράματα πρέπει να συνεχιστούν και τα αποτελέσματα τους να αναλυθούν και να εξεταστούν περαιτέρω.

9. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



Το θερμοκήπιο του PRI



Το εργαστήριο του PRI

10. ΠΗΓΕΣ

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Broglie K, Chet I, Holliday M, Cressman R, Biddle P, Kowlton S, Mauvais C, Broglie R. 1991. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* **254**: 1194–1197.

Datta KN, Datta SK. 1999. Expression and function of PR-protein genes in transgenic plants. In: Datta S, Muthukrishnan S, eds. *Pathogenesis-related proteins in plants*. Boca Raton: CRC Press, 261–277.

Greenberg JT, Silverman FP, Liang H. 2000. Uncoupling salicylic acid-dependent cell death and defense-related responses from disease resistance in the *Arabidopsis* mutant *acd5*. *Genetics* **156**: 341–350.

Hammerschmidt R. 1999b. Phytoalexins: what have we learned after 60 years? *Annual Review of Phytopathology* **37**: 285–306.

Heines Royal . 1994. *Commercial Potted Plant Production*, Michigan State University Department of Horticulture.

Jackson AO, Taylor CB. 1996. Plant–microbe interactions: life and death at the interface. *The Plant Cell* **8**: 1651–1668.

Kombrink E, Schmelzer E. 2001. The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. *European Journal of Plant Pathology* **107**: 69–78.

Kuc J. 1995. Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology* **33**: 275–297.

Lamb C, Dixon RA. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 251–275.

Legrand M, Kauffmann S, Pierrette G, Fritig B. 1987. Biological function of pathogenesis-related proteins: Four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **84**: 6750–6754.

Lynette Morgan. 2001. *'Fresh Culinary Herb Production - a technical guide to the hydroponic and organic production of commercial fresh gourmet herb crops'*. Published by Suntec NZ Ltd, New Zealand.

McDonald Elvin. 2003. *The 400 Best Garden Plants*. Quantum Books.

Neuhaus JM. 1999. Plant chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11). In: Datta SK, Muthukrishnan S, eds. *Pathogenesis-related proteins in plants*. Boca Raton: CRC Press, 77–105.

Niki T, Mitsuhashi I, Seo S, Ohtsubo N, Ohashi Y. 1998. Antagonistic effects of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. *Plant Cell Physiology* **39**: 500–507.

Sahai AS, Manocha MS. 1993. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host–parasite interaction. *FEMS Microbiology Reviews* **11**: 317–338.

Schlumbaum A, Mauch F, Vögeli U, Boller T. 1986. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* **324**: 365–367.

Schneider M, Schweizer P, Meuwly P, Métraux JP. 1996. Systemic acquired resistance in plants. In: Jeon KW, ed. *International review of cytology, vol. 168*. San Diego: Academic Press, 303–340.

Sticher L, Mauch-Mani B, Métraux J-P. 1997. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* **35**: 235–270.

Thomma BPHJ, Nelissen I, Eggermont K, Broekaert WF. 1999. Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *The Plant Journal* **19**: 163–171.

Pereira Anita. 1995. *The ward lock encyclopedia of Practical Gardening*. Ward Lock.

Rabbinge, R. 1999. *Biological control of Botrytis elliptica in lily by antagonists suppressing colonization and sporulation, a systems analytical approach*. Plant research international.

van Loon LC. 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology* **103**: 753–765.

van Loon LC. 1999. Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. In: Datta SK, Muthukrishnan S, eds. *Pathogenesis-related proteins in plants*. Boca Raton: CRC Press, 1–19.

van Loon LC, van Kammen A. 1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. ‘Samsun’ and ‘Samsun NN’ II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* **40**: 199–211.

van Loon LC, van Strien EA. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**: 85–97.

Weigle Bill . 2001. *Lily Botrytis Blight*. Department of Biological Sciences Humboldt State University.

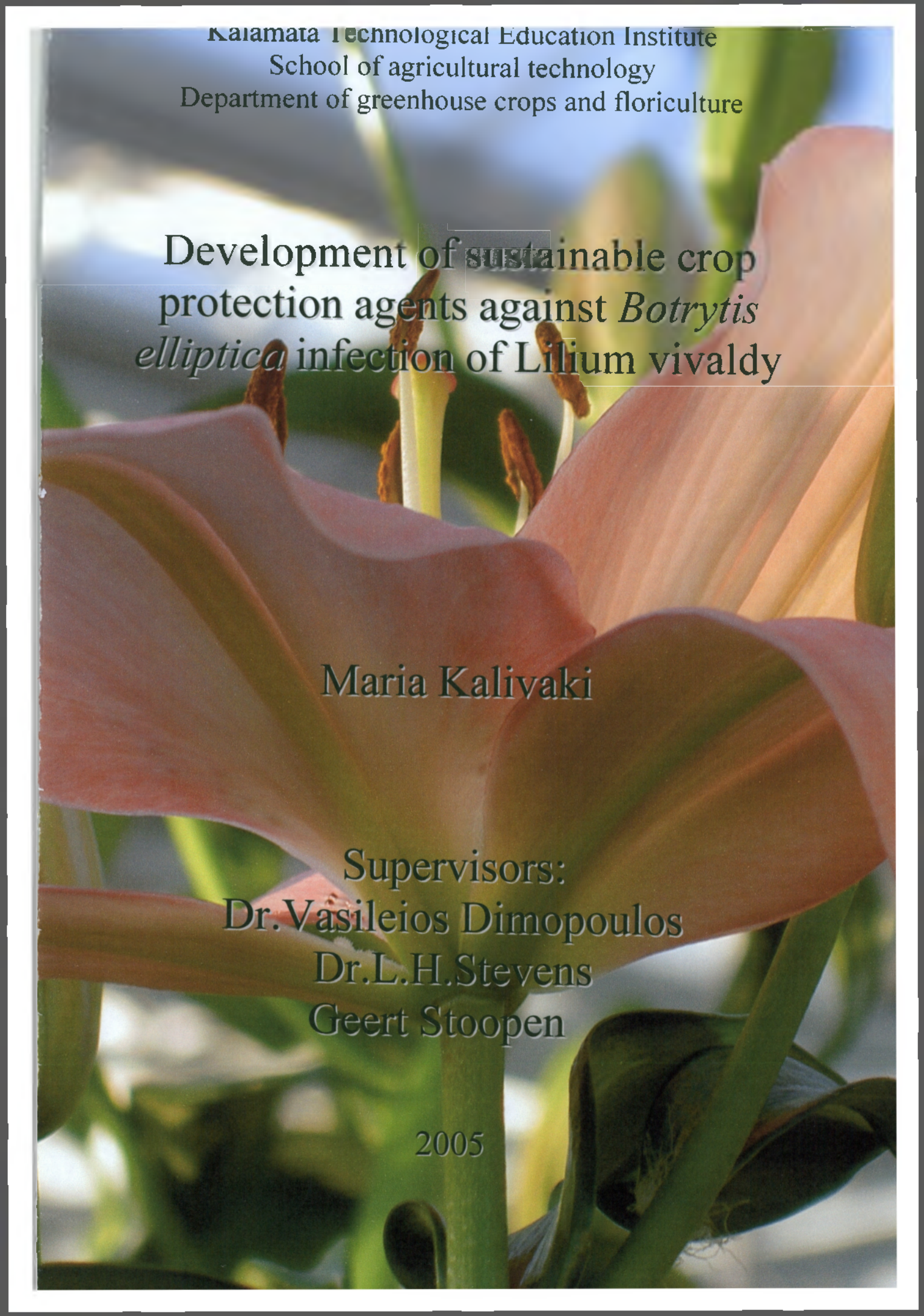
Ιστοσελίδες

<http://www.tactri.gov.tw/htdocs/mllee/Botrytis.html>

http://www.ua.es/secretaria.gral/es/memoria/1998_99/ix_12_42.htm

http://byebyemold.com/mold_images/images/botrytis/botrytis_c.html

<http://water.usgs.gov/pubs/circ/circ1225/html/sources.html>



Kalamata Technological Education Institute
School of agricultural technology
Department of greenhouse crops and floriculture

Development of sustainable crop
protection agents against *Botrytis
elliptica* infection of *Lilium vivaldy*

Maria Kalivaki

Supervisors:

Dr. Vasileios Dimopoulos

Dr. L.H. Stevens

Geert Stoopen

2005



To my parents

Contents

Summary.....	4
Introduction.....	6
• Pesticides.....	7
• The use of pesticides.....	7
• The mechanisms of the plants against pests.....	9
• Botrytis blight or Gray mould.....	12
• Fungal life cycle.....	13
• Disease management.....	15
The Lilium assay.....	18
Materials and methods.....	22
• <i>Botrytis elliptica</i> culture.....	23
• Plant material.....	25
• Leaf top system.....	26
• Preparing and applying the crop protectant compounds.....	29
• Isolation of <i>Botrytis elliptica</i>	31
• Inoculation of the leaf issue with <i>Botrytis elliptica</i>	33
Protocols.....	34
• Lily leaves agar.....	35
• Malt extract agar.....	37
• Sterile technique before the agar plates poured.....	38
• Setting the leaf-top system.....	39
• Preparing the crop protectant solutions.....	41

- **Isolating, counting and inoculating the conidia.....**43
- **Results-lesions counting.....**.....45

- Results.....**.....46

- Conclusion-Discussion.....**..... .60

- Appendix.....**..... ..64

- Sources.....**..... .66

SUMMARY

The genus *Botrytis* contains necrotrophic plant pathogens that have a wide host range (*B. cinerea*) or are specialized on a single host species, e.g. *B. elliptica* on lily. Botrytis lily blight, caused by *Botrytis elliptica*, is one of the limiting factors of lily production. The objective of this project was to develop sustainable crop protectants against *Botrytis elliptica*. Using a small-scale, different crop protectants have been tested on cut lily leaves. Treatments were applied as a spray and after that the leaves were inoculated with the fungi. After some days the lesions were measured and data was kept about a residue or a phytotoxicity that may occur. Analysis of the data showed that some of the treatments have a salutary result against *Botrytis* sporulation. These results suggest that sustainable crop protection agents may offer potential for disease control and increased yield in lilies production.

INTRODUCTION

Pesticides

Pesticides (or farm chemicals, agro chemicals or agvet chemicals) are those substances which are used to control, destroy, repel or attract pests in order to minimize their detrimental effects.

The use of pesticides

What is the goal of agriculture? Mainly, it is to produce healthy food, affordable for consumers to purchase, while ensuring that farmers are able to earn a decent income. Recently, with greater environmental awareness in society in general, it is also now very important to protect the agricultural environment. This is a big challenge for farmers as they must still obtain reasonable yields and produce quality products in order to meet the demands of the market. Both these can be severely affected by harmful organisms, commonly referred to as pests (weeds, disease, etc.) that compete against, infect or damage the cultivated crop in a detrimental manner. The most economic and effective way to handle these has been to employ pesticides, many of which are now composed of synthetic chemicals, and it is these substances - very beneficial from the economic and production aspects of farming - which can pose risks to human health and the environment if not properly used.

Pest problems are not new, in fact, they have been around as long as agriculture itself. But the pest pressure faced by farmers is now as great as it ever was: the world's fast-growing human population needs to be fed from an always shrinking base of agricultural land, and the substantial damage that can be inflicted by pests (e.g. insects, diseases, weeds, rodents, birds) on crops is the margin between a good harvest and a bad one. Pests can reduce the quality of a harvest as well as its quantity. Since the quality of food is increasingly important to consumers, a pest could reduce the value of a crop or make it unsaleable. But it is important to keep in mind that pests are not the only cause of yield reduction and of lower quality produce: factors such as soil fertility and availability of water may have a greater influence in a particular situation.

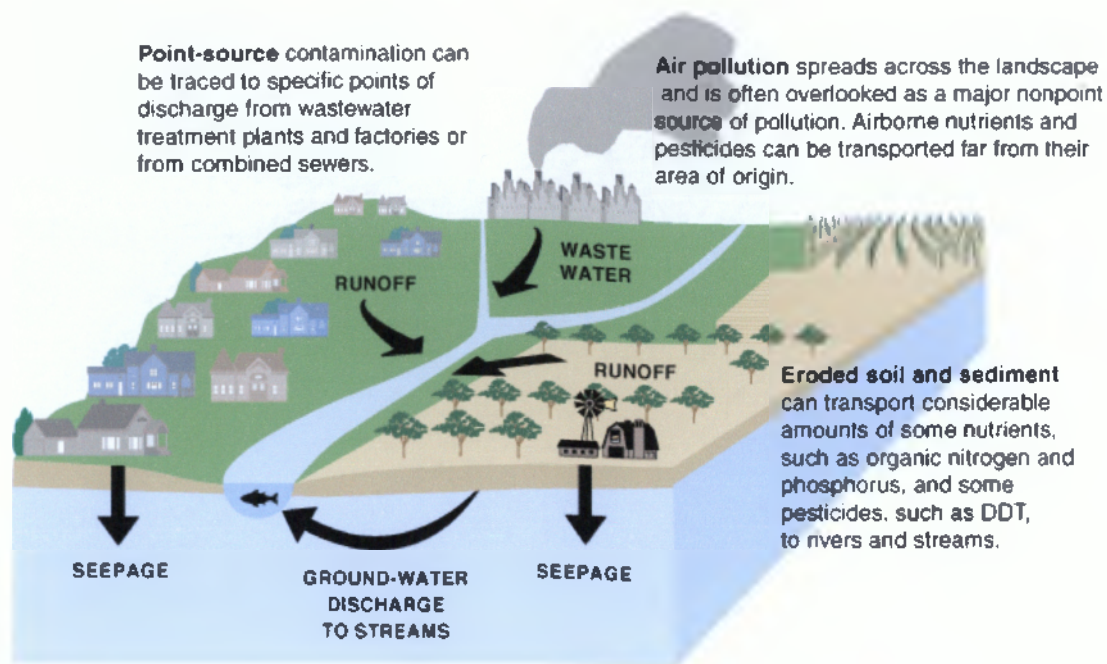


Figure 1 The pesticides environmental pollution

Hence, crop protection has always been an important component of agriculture, leading to the development and employment of measures that can limit damage, such as synthetic chemicals. Easily stored for long periods in a compact form, easily applied at very short notice (provided the machinery is available and the weather conditions are suitable), they are fast-acting and efficient. They can also be toxic, and the farmer must use pesticides wisely to make sure that they will not harm the applicator, the farm family and the surrounding environment.

With rapid emergence of resistance in pests to commercially available pesticides, there is a need for the development of management strategies that are less dependent on chemical pesticides and/or less conducive to the development of resistance to present chemical control measures. Another complicating factor with pesticides treatment is that errant applications of pesticide persist in soils and pollute ground water, streams and river. Methods are needed which are effective at disrupting the behaviour and physiology of these pests while still preserving the balance and cleanliness of the agro ecosystems. Biodiversity is of immense importance having wide range of bio molecules, thus offering great opportunity for searching more environment friendly bio molecules for pest control.

The mechanisms of the plants against pests

Many plants respond to local attack by herbivores or pathogens with a *de novo* production of compounds reducing or inhibiting further attack by, or performance of, their enemies. Responses occur both in the plant organ originally attacked (local response) and in distant, yet unaffected, parts (systemic response). One of these responses is induced systemic resistance (ISR; or systemic acquired resistance, SAR) of plants against pathogens.

Induced systemic resistance (ISR) of plants against pathogens is a widespread phenomenon that has been intensively investigated with respect to the underlying signalling pathways as well as to its potential use in plant protection. Elicited by a local infection, plants respond with a salicylic-dependent signalling cascade that leads to the systemic expression of a broad spectrum and long-lasting disease resistance that is efficient against fungi, bacteria and viruses. Changes in cell wall composition, *de novo* production of pathogenesis-related-proteins such as chitinases and glucanases, and synthesis of phytoalexins are associated with resistance, although further defensive compounds are likely to exist but remain to be identified.

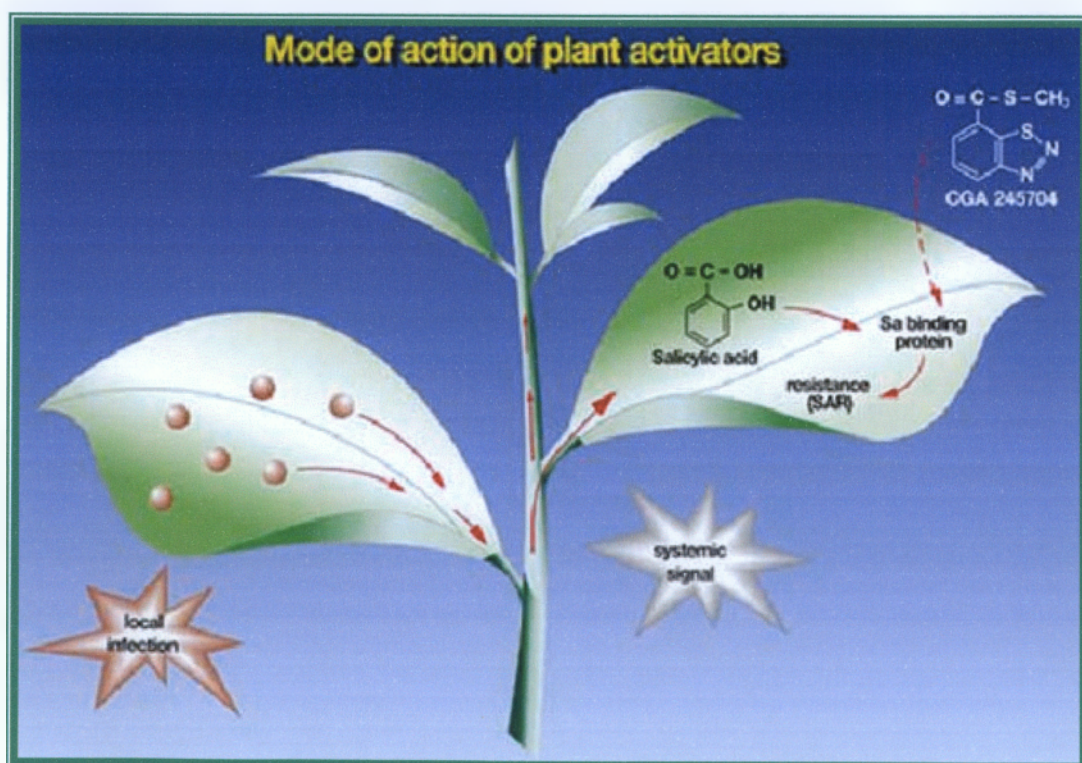


Figure 2 Mode of action of plant activators

Interactions between plants and pathogens can lead either to a successful infection (compatible response) or resistance (incompatible response). In incompatible interactions, infection by viruses, bacteria or fungi will elicit a set of localized responses in and around the infected host cells. These responses include an oxidative burst (Lamb and Dixon, 1997), which can lead to cell death (Kombrink and Schmelzer, 2001). Thus, the pathogen may be 'trapped' in dead cells and appears to be prevented from spreading from the site of initial infection. Further local responses in the surrounding cells include changes in cell wall composition that can inhibit penetration by the pathogen, and *de novo* synthesis of antimicrobial compounds such as phytoalexins (Kuc, 1995; Hammerschmidt, 1999b) and pathogenesis-related (PR) proteins.

Caused by—or at least regularly following—these local responses, a signal spreads through the plant and induces subtle changes in gene expression in yet uninfected plant parts. The systemic response involves the *de novo* production, in some cases, of phytoalexins and of PR proteins (van Loon, 1997; Neuhaus, 1999; van Loon and van Strien, 1999). While phytoalexins are mainly characteristic of the local response, PR proteins occur both locally and systemically. The functional role of both groups of compounds in resistance is a matter of continuing discussion.

Originally, PR proteins were detected and defined as being absent in healthy plants but accumulating in large amounts after infection (van Loon and van Kammen, 1970); they have now been found in more than 40 species belonging to at least 13 families (van Loon, 1999). Two groups of PR proteins can be distinguished. Acidic PR proteins are predominantly located in the intercellular spaces. Basic PR proteins are functionally similar but have different molecular weights and amino acid sequences and are mainly located intracellularly in the vacuole (Legrand *et al.*, 1987; Niki *et al.*, 1998; van Loon, 1999).

Some PR proteins have chitinase (Legrand *et al.*, 1987) or β -1,3-glucanase activity. Chitinases are a functionally and structurally diverse group of enzymes that can hydrolyse chitin, and several are believed to contribute to the defence of plants against certain fungal pathogens (Sahai and Manocha, 1993; Jackson and Taylor, 1996). Chitinases exhibit pronounced antifungal activity (Schlumbaum *et al.*, 1986), and plants over-expressing chitinase show decreased susceptibility to infection by

fungi with chitin-containing cell walls (Broglie *et al.*, 1991; Datta and Datta, 1999). In contrast, the function of other PR proteins is still unknown (van Loon and van Strien, 1999) and many of them may be functionally active only when combined. Some PR proteins, most prominently the basic ones, are also expressed constitutively in a tissue-specific and developmentally controlled manner (e.g. during leaf senescence; van Loon, 1999; and pers. comm. from L. C. van Loon) and thus the functional significance of PR proteins with respect to plant defence is unresolved. Recent studies have demonstrated that the expression of typical 'defence-related' genes such as *PR-1* and *β -glucanase 2* (which are often used as ISR markers) can be uncoupled from phenotypic pathogen resistance (Greenberg *et al.*, 2000), indicating that these compounds are not absolutely necessary for an effective resistance phenotype.

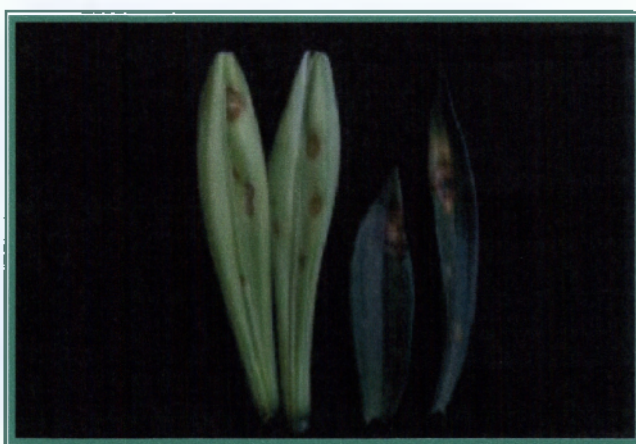
PR proteins are generally used as ISR markers, but no antiviral or antibacterial activity has yet been reported for any PR protein. A similar situation exists for phytoalexins, for which, in general, only *in vitro* antibacterial or antifungal effects have been established: assumptions concerning their role in phenotypic plant resistance are mainly based on correlative evidence. (Thomma *et al.* 1999) reported a phytoalexin (camalexin) deficient arabidopsis mutant to be more susceptible to infection by a necrotrophic fungus, but the same mutant showed no altered susceptibility to a bacterium and two biotrophic fungi.

Phenotypically, systemic resistance is manifested as a protection of the plant not only against the attacking pathogen, but also against other types of pathogens. Although some specificity has recently been described, the resistance seems to be rather non-specific and long-lasting. Most research has been conducted on a restricted number of model species (20; Schneider *et al.*, 1996; Sticher *et al.*, 1997), and differences in the biochemistry and efficacy exist among various resistance forms and remain to be investigated in detail. Yet, ISR is generally regarded as a widespread and conserved trait, since the phenomenon is known from species belonging to both Monocotyledonae and Dicotyledonae. The mechanisms underlying the resistance to viruses still remain to be determined, but ISR in general is regarded as being effective against pathogens from all three major groups (viruses, bacteria and fungi).

BOTRYTIS BLIGHT or GRAY MOULD

Botrytis spp. cause economically important diseases in numerous protected and field crops. *Botrytis elliptica*, the causal agent of 'lily fire' is responsible for economically significant losses in lily production. *Botrytis cinerea* causes leaf rot in cyclamen and is considered to be one of the major pathogens in this crop. At present, the control of *Botrytis* diseases is based on the frequent use of fungicides. However, *Botrytis* spp. have shown a great potential to develop resistance to fungicides. In addition, an increasing concern about the effects of pesticide residues on environment and human health leads to an increasing number of restrictions on the use of pesticides. Biological control offers an environmentally friendly supplement or alternative to chemical control.

Botrytis blight in lilies starts as oval shaped, reddish brown to tan spots on the leaves. The spots often have purple margins. Flowers and flower buds can be covered with unsightly small brown freckles. If uncontrolled the entire plants are destroyed as the spots grow together. This disease is commonly called fire because the plants can become black and shrivelled as burnt



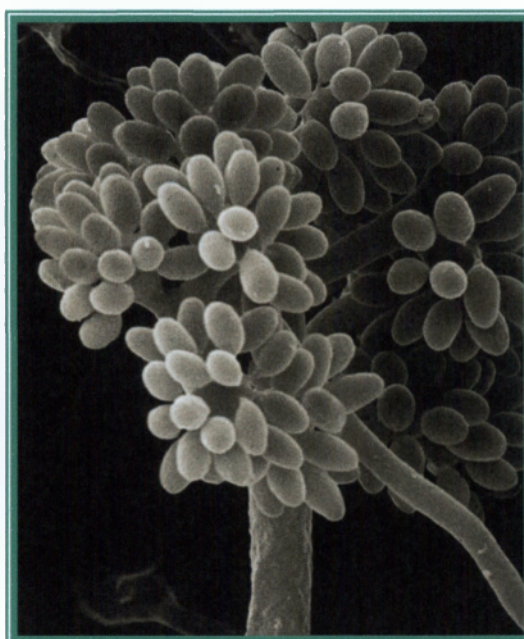
Picture 1 Lily leaves infected by *Botrytis elliptica*

by a fire. The soft tissues of flowers and damaged or decaying plant material are often covered in grey fuzzy fungal spore masses. The causal agents are the fungi *Botrytis cinerea* and *Botrytis elliptica*. It is difficult to tell these two fungi apart but their prevention and control are identical. Botrytis spores require about 6 hours of water sitting on the plants to germinate. Cool weather of around 16 C. is the optimum temperature for germination of the spores. Once the disease has started it progresses fastest at temperatures of 21 C. With periods of sufficient moisture the life cycle of this fungus can be repeated every 3 days. It is essential to take preventive measures against Botrytis Blight because once you have the ugly spots they cannot be removed.

The vigour of the plant will be reduced because of lost photosynthetic area. The strength and size of the bulb will be reduced for the following season.

Botrytis blight is caused by a fungus (*Botrytis cinerea*) that attacks many succulent plants. In most years it causes considerable damage in a few operations to seedlings in plant beds and producing tomatoes in greenhouses. This disease usually affects plants at the tip of the younger leaves, causing a water-soaked area. The infected areas of the leaves enlarge and the fungus appears to grow down the leaf petiole into the main stem. The diseased area becomes covered with a fluffy, brownish-gray mould. On producing tomatoes it causes foliar blight, stem rot, and fruit spotting and rot.

Botrytis blight is associated with excessive moisture and high humidity as a result of poor ventilation in covered plant beds and greenhouses. Growers are urged to take every precaution to provide adequate and continuous ventilation, especially during periods of cool, cloudy and wet weather. Most growers are able to avoid serious Botrytis blight problems without the use of fungicides by keeping humidity low in the structure. Specific steps include: (1) wider plant spacing, (2) continuous introduction of some cold air when house is closed, (3) continuous forced air movement Conidiophores with fans when house is closed, (4) use of "speeding trays" in racks above ground or placed on rocks or plastic ground sheets on the ground, (5) good soil drainage, (6) covering ground with plastic sheets, and (7) not using sprinkler irrigation.



Picture 2 Conidiophores of *Botrytis Cinerea*

Fungal life cycle

Botrytis is commonly a disease associated with humid conditions, which are required for successful spore germination and temperatures around 15 - 23C, although

it can thrive in cooler conditions. Crops grown towards late winter and early spring are most susceptible to disease although it can be prevalent throughout the year in grow rooms. Spores germinate faster as the relative humidity approaches 100% and germination is most rapid where free water is present on the plant foliage such as that produced by condensation. Once spores germinate on the plant they enter the host tissue and form mycelium which invades the intercellular spaces within the plant tissue. This mycelium then forms conidiophores which emerge through the infected tissue and release conidia into the air. If infected stems and foliage are not removed from the growing area, they become a source of conidia which develop on lesions and rapidly infect healthy crops when conditions are suitable. High temperature and dry conditions eliminate the survival spores from one crop to the next.

Spores are released from infected crops when the crop is disturbed as in pruning or harvesting and these spores readily infect more plants through open cuts on

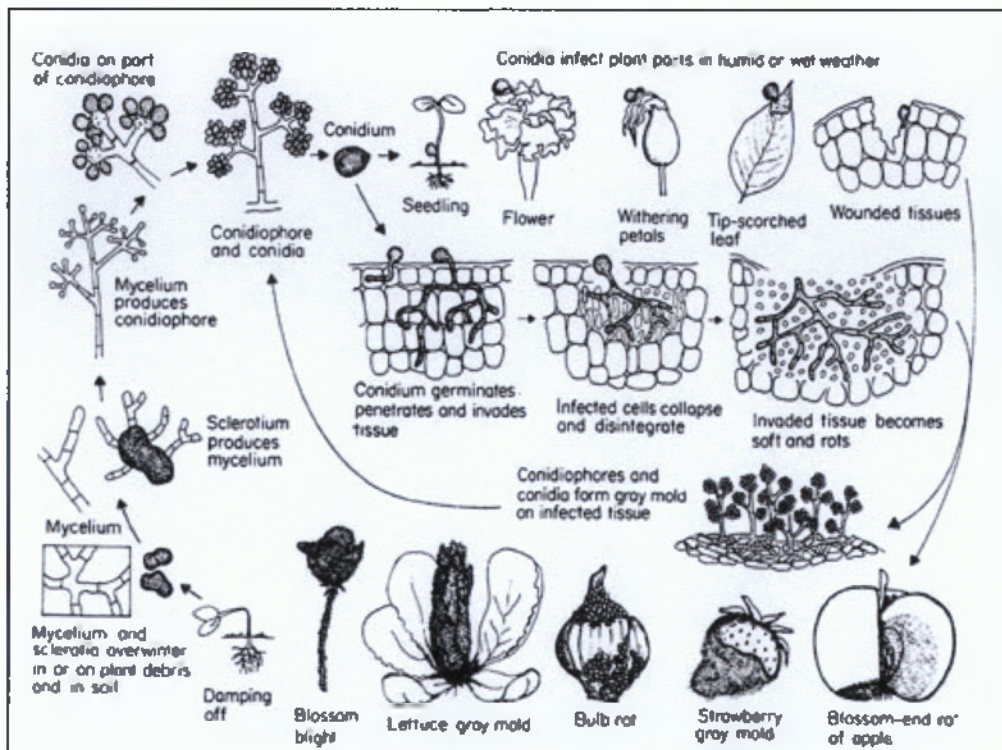


Figure 3 Development of *Botrytis* gray mould diseases

the stems. Spores are not only produced in large numbers on lesions on the plant, but also on plant debris left in the growing area and in piles of discard plant material outside of the plants environment These can provide a source of re-infection and so

diseased plant material needs to be disposed of carefully to prevent further outbreaks. Spores are easily spread in air currents and by splashing of water, and infection can occur rapidly in an area where both these methods of transfer can occur. Plant stress which results in overly vigorous or spindly plants causes the crop to become more susceptible to *Botrytis* infection. This stress may be in the form of over or under watering, heat, light or tissue damage. There are other factors which also influence the development of this disease, maximum sporulation takes place at wavelengths less than 345nm - and excess nitrogen fertilization can make plants more susceptible to the fungi by changing the size and wall structure of the plants. Calcium and silica enrichment of the plant tissue has been shown to reduce the susceptibility of many plant species to *Botrytis* infection by strengthening the cell walls against initial attack by the fungus.

Botrytis diseases in high-value crops may cause large financial loss. Therefore growers often adopt a strongly risk-averse management strategy, with frequent calendar-based fungicide applications. Environmental pollution and development of fungicide resistance have prompted the search for more sustainable strategies in *Botrytis* management.

Disease Management

Refrigeration at temperatures near 0°C will retard but not completely stop the development of grey mould and when infected tissue is warmed, decay can proceed rapidly.

Moisture often is more of a limiting factor than temperature. Free moisture is necessary for germination of *Botrytis* spores. Moisture is also necessary for growth within plant tissues, and low humidity may result in arrested growth of the fungus. However, growth can resume when moisture again becomes available.

Gray mold is most severe during times of the year when the humidity is high. The worst time for disease development is from September to December because there is an abundant amount of herbaceous vegetative material (crop refuse and dying summer plants) available for fungal colonization and, as a consequence, many spores are present in the air and on plant parts.

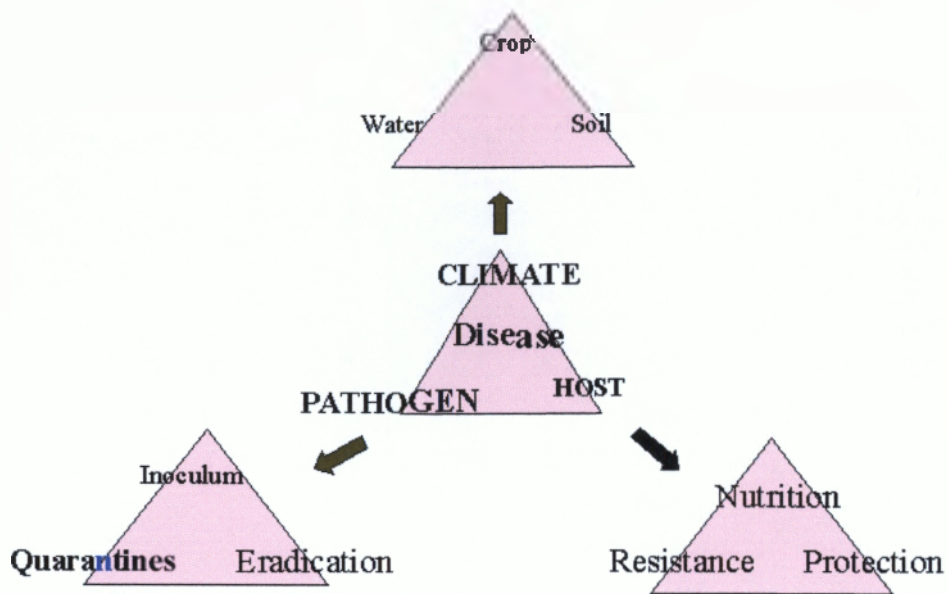


Figure 4

Cultural Control

Botrytis cinerea produces innumerable asexual spores (conidia) that are moved about by air currents. Because spores may originate in decaying vegetation and old flowers, elimination or reduction of sources of the spores is an important part of any control program. Also, removing old flowers before they become infected and function as spore sources can be important and sometimes essential to control. The fungus can develop and sporulate at low temperatures, so do not overlook old flowers and foliage in refrigerators.

Because free moisture is necessary for germination and infection, great emphasis is placed on avoiding condensation of water on susceptible plant parts. Avoid overhead watering during blooming. If this is the only method of irrigation available, then do it early in the day so that the foliage can dry as rapidly as possible. Also, extend the period between irrigations to the maximum consistent with good growth. Wider plant spacing to increase ventilation and minimize leaf wetness can also help reduce disease incidence.

Chemical Control

Numerous fungicides are effective against *Botrytis cinerea* but not all of them can be used on all crops. With some, this is because of damage to the plants or some plant parts. To avoid damage and the development of fungal strains that are resistant to fungicides, some growers alternate different fungicides. The fungicides are preventatives and must be applied before infection. In some crops, such as chrysanthemum, the lower foliage of crowded plants becomes infected and acts as a source of spores that then infect the flowers. In these crops, it is important to apply fungicides at an early stage when the lower foliage can be adequately covered by the chemical.

THE LILIUM ASSAY

Lilium description

Family: Liliaceae

Common name: Lily

Origin: Northern hemisphere

Flower Color: Various

This group consists of 80 to 90 perennial bulbs, of which most are hardy. True Lilies come from the group, *Lilium*. Many plants that have Lily as part of their common name are not true Lilies (i.e. Daylily comes from the group, *Hermerocallis*). Lilies come mainly from the temperate woodlands of the Northern Hemisphere; therefore, they do not like dry heat. They are usually found growing near shrubs and other plants that shade their



Picture 3 Lilium vivaldy

roots and keep the bulbs cool and moist. Lilies come in a huge variety of colors, shapes and sizes and can be grown both indoors and out. Some have strict soil requirements while others can be grown in ordinary garden soil. Lilies bloom from mid-spring to early fall depending upon the variety. Most Lilies are excellent cut flowers, each blossom often living for up to 8 days. However, when cutting for indoors, make sure to leave as much of the stem and leaves on the plant as possible in order to store food for the next year's flowers. The types of Lilies include the Asiatic hybrids, Oriental hybrids, Martagon hybrids, Candidum hybrids, American hybrids, Longiflorum hybrids, Trumpet hybrids and the wild species.

Asiatic hybrids were derived from a species that originated in Asia. They bloom in early summer, usually flowering for over a month. Their 10 to 15 cm blossoms, which may face up, out, or down, come in shades of red, orange, yellow, pink, lavender, and white. The plants produce compact growth and range from 60 to 150 cm high. They are great for growing in containers and for cutting and are quite disease resistant.

The lily is number five on the "Top Ten List" of flowers sold at the famous cut flower auctions in Holland. It follows roses, chrysanthemums, carnations and tulips, in that order.

Top Ten Lily Varieties

(based on acres under cultivation in Holland)

	Variety	Acres	Color	Type
1.	Star Gazer	966	red/white	Oriental
2.	Snow Queen	291	white	Longiflorum
3.	Pollyanna	197	yellow	Asiatic
4.	Vivaldi	170	pink	Asiatic
5.	Casa Blanca	165	white	Oriental
6.	Elite	158	orange	Asiatic
7.	Acapulco	150	white	Oriental
8.	Marco Polo	133	white/pink	Oriental
9.	Le Reve	116	pink	Oriental
10.	Montreux	35	pink	Asiatic

Table 1 Top ten Lily Varieties based on acres under cultivation in Holland

Lily (*Lilium* L.) is cultivated world wide as a cut flower, pot plant and garden plant. The lily is one of the economically important flower crops. Last year 11.8 billion cut flowers were offered to the Dutch auctions and 3.5 % of the cut flowers were lilies. The acreage of bulb production in The Netherlands amounts the last 5 years more than 4000 ha. In order to grow the bulbs during the summer 10-15 times fungicidal sprays are needed to protect the plants against the infection of *Botrytis elliptica*.

Lilies on the Cut Flower Market The U.S. leads the world in number of stems and pots available on the market, and that's just based on Dutch export statistics.

Lilies	Bulbs (x million)
United States	200
Italy	150
France	75
United Kingdom	60
Spain	30
Canada	15

Table 2 Lilies bulb market around the world

Fire, or *Botrytis* leaf blight caused by *Botrytis* spp. is the most important foliar disease of flower bulbs. The potentially high rate of increase of an epidemic in combination with lack of curative control options, have induced risk-adverse control practices among flower bulb growers. To control the disease most growers spray on a weekly base with protective fungicides during the course of the growing season, amounting to an input of approximately 15-40 kg / ha per year. For that reason it is important for new environment friendly protecting fungicides to be developed. In order to optimize the present control strategy and to reduce the amount of fungicides used in flower bulb growing.

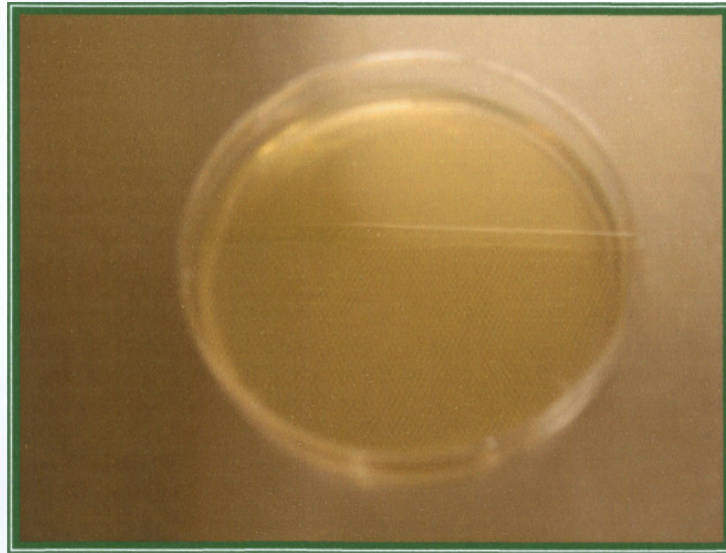


**Picture 4 Botrytis elliptica on
Lily leaves**

MATERIALS AND METHODS

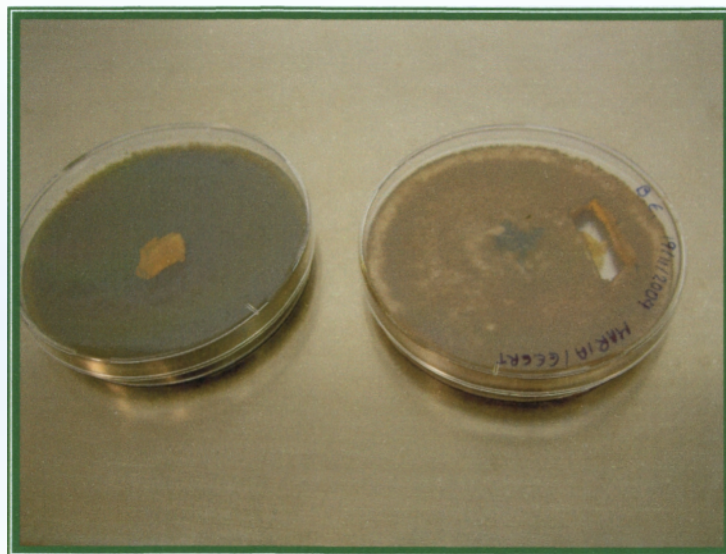
Botrytis elliptica culture

In this experiment *Botrytis elliptica* conidia, inoculated two weeks before the experiment, were used as the fundamental material. They were cultivated on two different agars, malt extract agar and lily leaves agar.



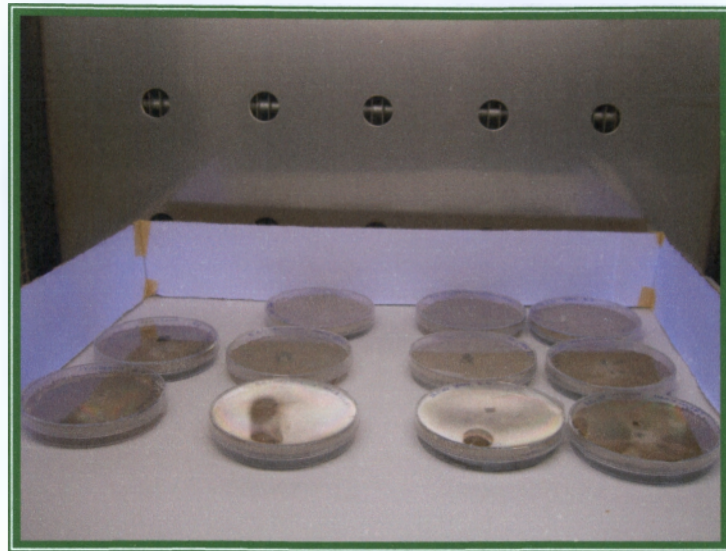
Picture 5 Malt extract agar

For the inoculation of the new dishes, small square pieces of agar, originating from a sporulating culture of *Botrytis elliptica*, were used. The sporulating culture of *Botrytis elliptica* had been inoculated two weeks before the time of this experiment.



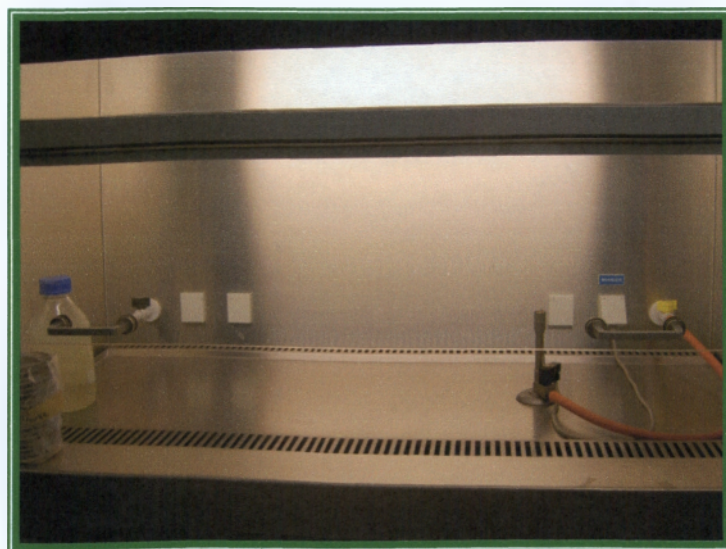
Picture 6 *Botrytis elliptica* transfer

The Petri dishes with the fungal spores were incubated at 20°C under constant normal light in combination with black light (UV), to induce sporulation.



Picture 7 *Botrytis elliptica* culture dishes under the black light into the climate chamber

It is important that the inoculation of agar dishes with *Botrytis elliptica* take place in antiseptic conditions. The reason for this is to avoid any bacterial or fungal infection. Therefore all the procedures of the transfer of the fungi to new dishes took place in a down flow cabinet.



Picture 8 The down flow cabinet

Plant material

The efficacy of new sustainable crop protectants was tested on leaf tissue of *Lilium vivaldi* (Asiatic lily). Bulbs of the above mentioned plants were planted in soil of ph 5.8 in a greenhouse where the climate conditions were not regulated during summer time.



Picture 9 *Lilium vivaldi* plants in the greenhouse

When the plants (*Lilium vivaldi*) had reached an early flowering stage (6-8 after having been planted), leaf tops were taken from the whole plant, treated with several compounds and afterwards were infected with *Botrytis*. At this stage, the lily plants are considered to be most susceptible to *Botrytis* infection. The effectiveness of each compound was evaluated by monitoring the formation of lesions.

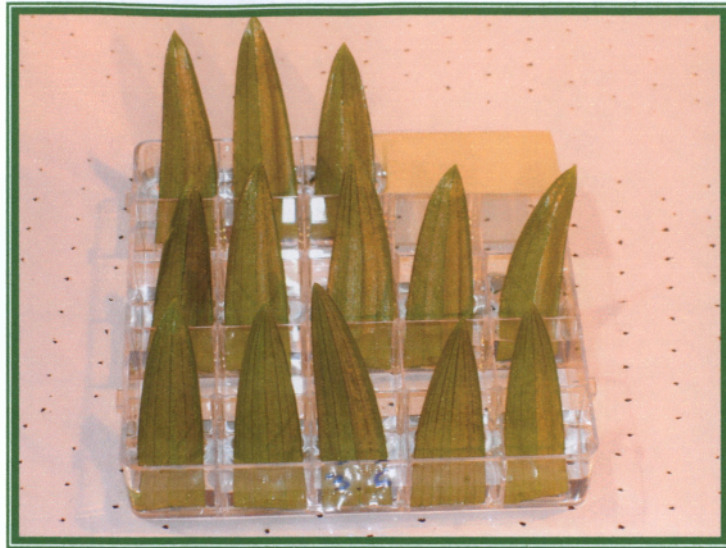
Leaf top system

The lily leaf experiment was basically carried out on special plastic trays of 25 square sections (2x2 cm), out of which only 15 were used.

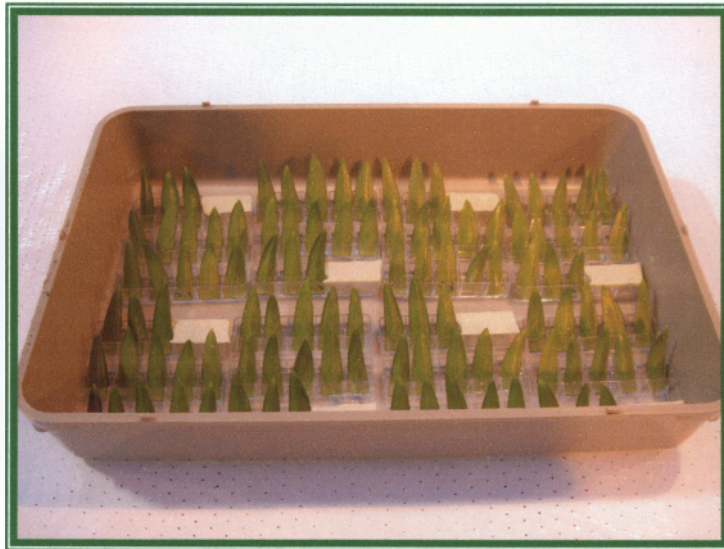


Picture 10 Plastic tray covered with tape in the control leaf positions

Firstly, 13 sections were filled with 3 ml of tap water and 2 sections were covered with tape for the later placement of the untreated leaves (control) as described in Picture 6. Afterwards, the leaf tops (top 5 cm of the leaf) were cut off the plants and placed in the sections. Each tray contained randomly chosen leaves from the bottom leaves, middle and top part of each plant. The back row of the tray contained bottom leaves, the front and middle ones contained leaves from the top part of each plant.

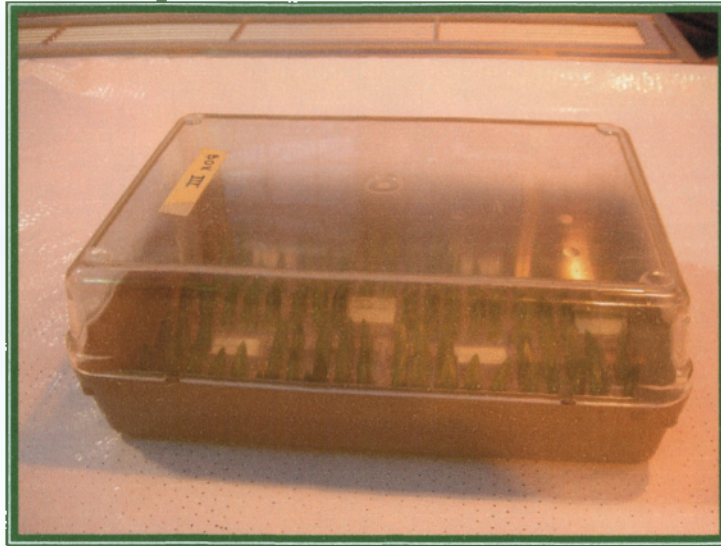


Picture 11 Plastic tray filled with the leaves



Picture 12 The box with the trays

To achieve the high levels of humidity necessary for fungus growth and the conservation of the leaf tops, a layer of wet filter paper was placed in the bottom of the boxes.



Picture 13 The box covered

The cover of the boxes was transparent, allowing sunlight to pass through it. This resulted in the rise of the temperature at the interior. 8 trays were placed in each one of the plastic boxes and were transferred to a greenhouse at 20 °C day and 18 °C night temperatures. In addition to this, to avoid direct sun radiation, the boxes were placed in the shade and they were covered with cheese cloth.



Picture 14 The boxes covered with the cheese cloth in the shade

Since the conditions per box may slightly differ, each box was considered as a separate experimental unit.

Preparing and applying the crop protection compounds

Several compounds and their combinations were tested and evaluated by their effect against fungal development. The ones that were considered to be effective were tested again in different concentration and combinations.

Solutions of the compounds to be tested were prepared in the laboratory with demineralized water in total volume 20 ml and applied to the leaf tops by spraying. During spraying, each tray containing the leaf tops was placed in a carton box with filter paper attached to its walls so that spraying vapours would be absorbed. All safety precautions were taken; such as use of gloves, mouth mask, glasses and coat.



Picture 15 50 ml tubes

Concerning the spraying technique, the procedure followed was as such: the treatments were applied to the leaf tops of each row in the trays three times, starting from the back row and moving forward to the front (Figure 1). The goal was to apply the same volume of each compound to all the leaves by creating a fine, homogenous

layer on them. Control leaves were sprayed separately with demineralized water. The applied volume was 5 ml approximately.

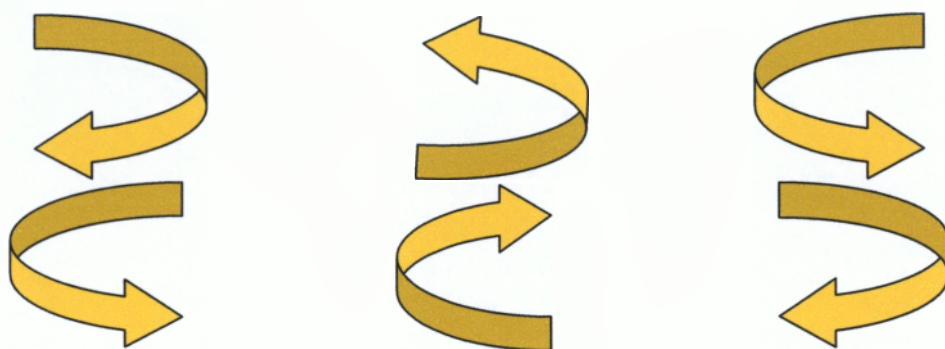


Figure 4 **first time**

second time

third time

Finally all leaves were left to dry for 30-40 min and then placed back in the boxes. At that experimental point, humidity was not needed, therefore the wet paper was removed from the bottom of the boxes and placed back again during the inoculation of the fungal spores.

Isolation of *Botrytis elliptica* conidia

For the isolation of the *Botrytis elliptica* conidia, a culture that had been cultivated for two weeks was used. In order to make a suspension of conidia, water was poured over the culture and rubbed with a glass triangle. The suspension was filtered and centrifuged several times to collect the conidia pellet. After the isolation, the conidia were counted with the help of a Haemocytometer in the microscope.

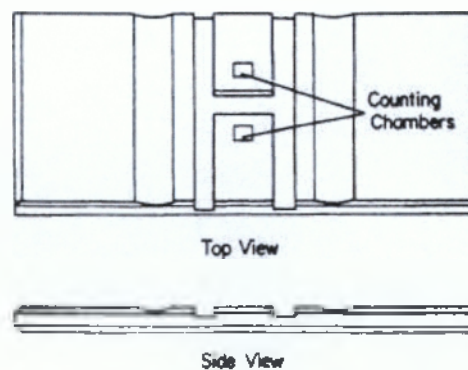
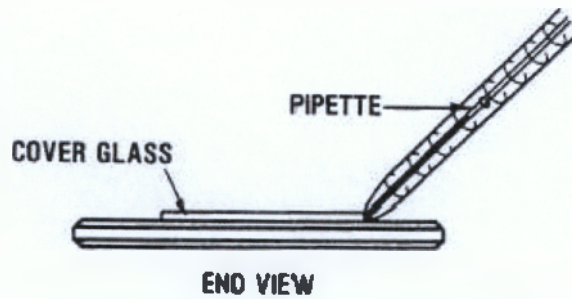
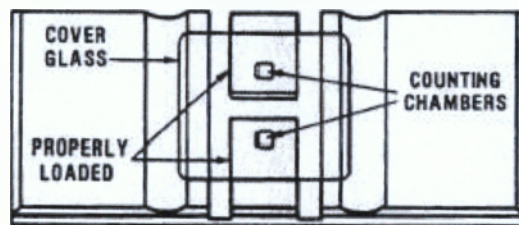
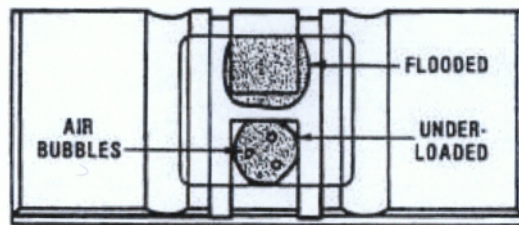


Figure 5 Haemocytometer



THIS IS THE CORRECT POSITION OF PIPETTE FOR PROPER LOADING OF THE COUNTING CHAMBER. THE PIPETTE TOUCHED BOTH GLASS AND SURFACE OF HEMACYTOMETER.

Figure 6 Instructions for the correct use of the haemocytometer

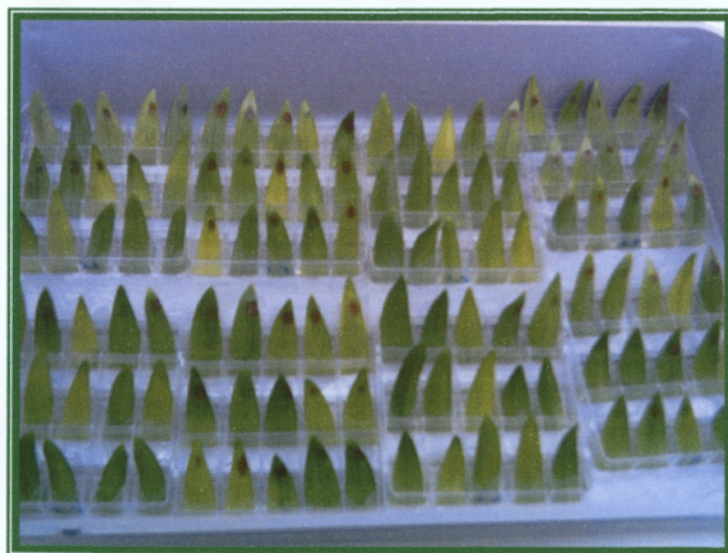
Inoculation of the leaf tissue with *Botrytis elliptica*

Once the conidia were isolated from the sporulating cultures of *Botrytis* that we were preserving, they were applied onto the leaves in a droplet of 2 μ l which contained 400 conidia. The droplet was placed at the left side of the leaf, using a pipette.

Conidia are relatively dense particles and have the tendency to sink quickly to the bottom. Therefore, the solution had to be mixed quite frequent to ensure that each droplet applied would contain 400 conidia.

Afterwards, wet layer paper was placed under the trays and the boxes were sealed with tape to facilitate the humidity increase.

The incubation boxes were transferred to the greenhouse, in the shade, covered with cheese cloth, as well. Monitoring of the infections and measurement of the lesions length occurred 3 days later.



Picture 16 The lily leaves three days later after the inoculation

PROTOCOLS

Lily leaves Agar

Apparatus

1. Blender
2. 500 ml bottle
3. 500 ml volumetric cylinder
4. Balance spoon
5. Balance
6. Water bath
7. Pressure cooker

Material

1. Lily leaves (*Lilium vivaldi*)
2. Demineralized water
3. Purified agar (OXOID)

Proportion

- 1:3 g/g Lily leaves/Demineralized water
- 1,2% Purified Agar (OXOID)

Method

- Firstly the leaves are melted into the blender with some water for 40 sec for 3-4 times.
- The rest water and the agar are putted in the bottle.
- The lid must be close carefully in order the air from inside to be able to come outside.

- It is sealed with tape that shows the temperature
- The bottle placed into the pressure cooker (we assure that there is enough water inside and that that the bottle's bottom will not get burned.
- The autoclave temperature must be 140°C.
- When the steam gets out the valve closes until the manometer reaches 1.
- Then the temperature should turn to 121°C for 15 minutes
- After the autoclave the bottle is placed in the water bath (The water bath must be switched on for 20 minutes earlier in 60°C)
- The bench with the horizontal air flow also must be switched on for 20 minutes before working there.
- The agar is poured in the dishes into the horizontal flow cabinet.
- The dishes must stay open at the cabinet for 20 minutes.
- When they are cool they are stored in bags in a dark dry place.

Malt extract agar

Apparatus

1. Pressure cooker
2. Balance
3. Balance spoon
4. 500 ml bottle
5. Water bath
6. 500 ml volumetric cylinder

Material

1. Malt extract agar (OXOID)
2. Demineralized water
3. Petri dishes

Proportion

- 5 % malt extract agar

Method

- The agar is balanced and added in a bottle with the water.
- Is sterilized at 125° C for 15 minutes using a pressure cooker and then cooled down at 55° C in a water bath.
- Afterwards, Petri dishes are filled in a cross flow cabinet and left to solidify with their lids partly open.
- Finally, agar dishes packed in plastic bags and stored at room temperature in the dark.

Sterile technique before the agar plates are poured

Method

- Hands are thoroughly washed with antimicrobial soap and hot water.
- The bench is wiped with ethanol or some other disinfectant
- A Bunsen burner is set up with a gentle blue flame. This will be used to sterilise the mouth of the bottle, and also provides a reasonably sterile environment in the vicinity.
- The number of plates to be poured is placed on the bench, with their lids still on.
- The lid of the bottle is removed carefully when the agar has reached the temperature of 50-40 degrees of celcium.
- The mouth of the flask is flamed to kill bacteria on the outside of the rim.
- The lid of the plate is lifted just high enough to allow the plate to be poured, and the dish is quickly half filled with agar.
- The plate swirled gently to ensure even distribution of the molten agar, then left to stand on the bench for at least 20 minutes to solidify then the lids of the plates are replaced.
- Once all the plates are poured, the bottle mouth is reflamed and the lid reinserted. Any unused agar is still sterile.

Setting the leaf-top system

Apparatus

1. Pipette (25ml)
2. Knife with surgical blade
3. Plastic boxes (30x35 cm)
4. Cheese cloth
5. Tape
6. Marker

Material

1. Trays with 25 square sections of (2x2 cm)
2. Lily plants (*Lilium vivaldi*)
3. Tissue paper
4. Tap water

Method

- Firstly the number of the control leaves is calculated and the number of the trays that will be used.
- The trays are marked.
- The two control leaf positions of each tray are sealed with tape.
- The rest 13 positions are filled with 3ml of water.
- The upper and the bottom 10 leaves of every plant are removed (the leaves of the experiment should have the same size).
- The first 5 leaves of each plant starting from the top are placed in the first position of each tray, afterwards we do the same with the second place etc. until all positions are filled (5 cm length its leaf).

- The bottom of each box is covered with tissue paper.
- Water fills the bottom of each box.
- The trays are placed in the right boxes.
- The boxes close.
- Boxes are moved in the greenhouse and covered with the cheese cloth.

1st	2nd	3rd	4th	5th
6th	7th	8th	9th	10th
11th	12th	13th	14th	15th

Figure 7 The scheme of the leaf placement in the plastic tray

*Control places may be 4th and 5th or 14th and 15th

Preparing and applying the crop protecting solutions

Apparatus

1. Pipettes (0,01-5ml)
2. Balance
3. Roller mixer
4. Ph meter
5. Carton box
6. Tape
7. Sprayers (Air boy)

Material

1. 50 ml tubes
2. Compounds
3. Tips
4. Tissue paper
5. Demineralized water

Precautionary measures

1. Gloves
2. Mouth mask
3. Smock

Method

- The compounds are balanced and prepared in solutions of 25 ml final volume.

-
- Before the spraying all precaution measures must be taken.
- The carton box is covered inside with tissue papers.
- Each solution must be shake before the use.
- Every tray it is placed into the carton box for spraying.
- The solutions are pressured in the sprayers and released in the trays.
- Every sprayer it must be cleaned and dry after the use of each compound.
- After the finishing with the spraying the trays are let to get dry for 30-40 minutes.
- When all trays are dry they placed into the boxes.
- Boxes are closed and covered with cheese cloth in the greenhouse.

Isolating, counting and inoculating the conidia

Apparatus

1. Pipettes (0,2-5 ml)
2. 2 μ l pipette and pipette tip
3. Glass spatula
4. Sigma centrifuge with rotor for 50 ml tubes
5. Microscope
6. Heamocytometer (Burker- Turk)
7. Tape
8. Funnel

Material

1. 2 weeks old sporulating culture of *Botrytis* on malt extract agar or lily leaf agar medium
2. Cheese cloth
3. 50 ml tubes
4. Tips
5. Alcohol 70%
6. 2 ml eppendorf micro test tube
7. Demineralized water

Method

- 10 ml of demineralized water is added in the *Botrytis* Agar dish.
- With the glass spatula we rub gently the surface of *Botrytis* agar cultivation until all conidia are released.
- The cheese cloth is washed very well with demineralized water.

- The funnel is placed in a 50 ml tube and the cheese cloth is placed inside the funnel.
- With the help of the pipette the conidia solution is poured into the 50 ml tube.
- Then the conidia solution centrifuged for 5 minutes (1000 speed in room temperature)
- The water is removed carefully and 10 ml of demineralized water is added.
- 5 more minutes in the centrifuge and then again the water is removed and 3-5 ml of demineralized water is added depending from how big is the pallet of the conidia.
- After the conidia solution is mixed well a drop is transferred in the heamocytometer.
- The heamocytometer placed under the microscope.
- 8 blocks have to be count.
- The average of those 8 blocks is divided by 0,0064 and then is multiplied by 1000.
- These numbers suggest the number of conidia in 1 ml volume of the solution.
- We adjust the volume of the solution if it is necessary by adding demineralized water in order the concentration of the conidia to be 200 conidia/ ml.
- 1 ml of the conidia solution is transferred to eppendorf micro test tubes.
- The tapes are removed from the trays and the positions are filled with 3 ml tap water then the control leaves are placed in their places.
- Tissue papers are placed in the bottom of each box and tap water fills the bottom.
- By piping 2 μ l drops of the solution the leaves are inoculated in the left top side of its leaf.
- The boxes close and sealed with tape for high humidity.
- All boxes are covered with cheese cloth and placed in the greenhouse.

Results-lesions counting

Apparatus

1. Electronic ruler

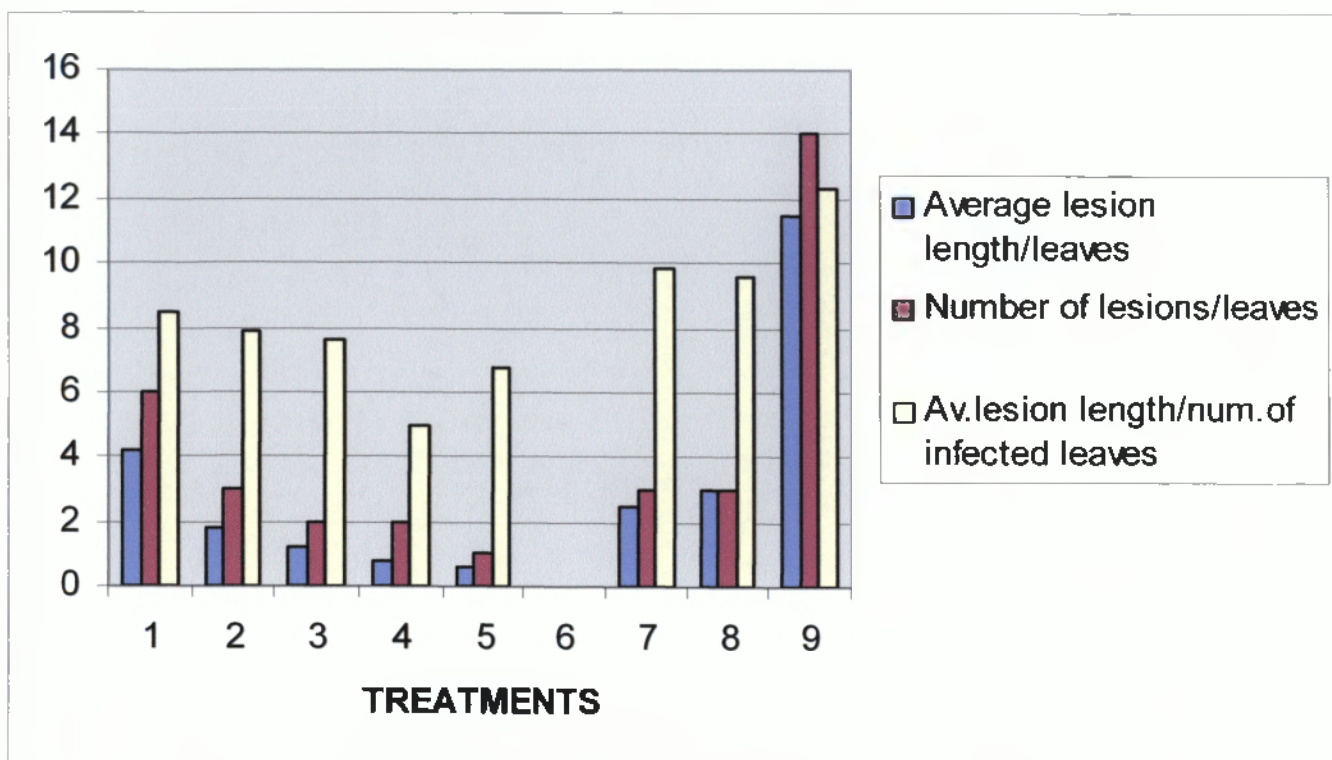
Precaution measures

1. Gloves

Method

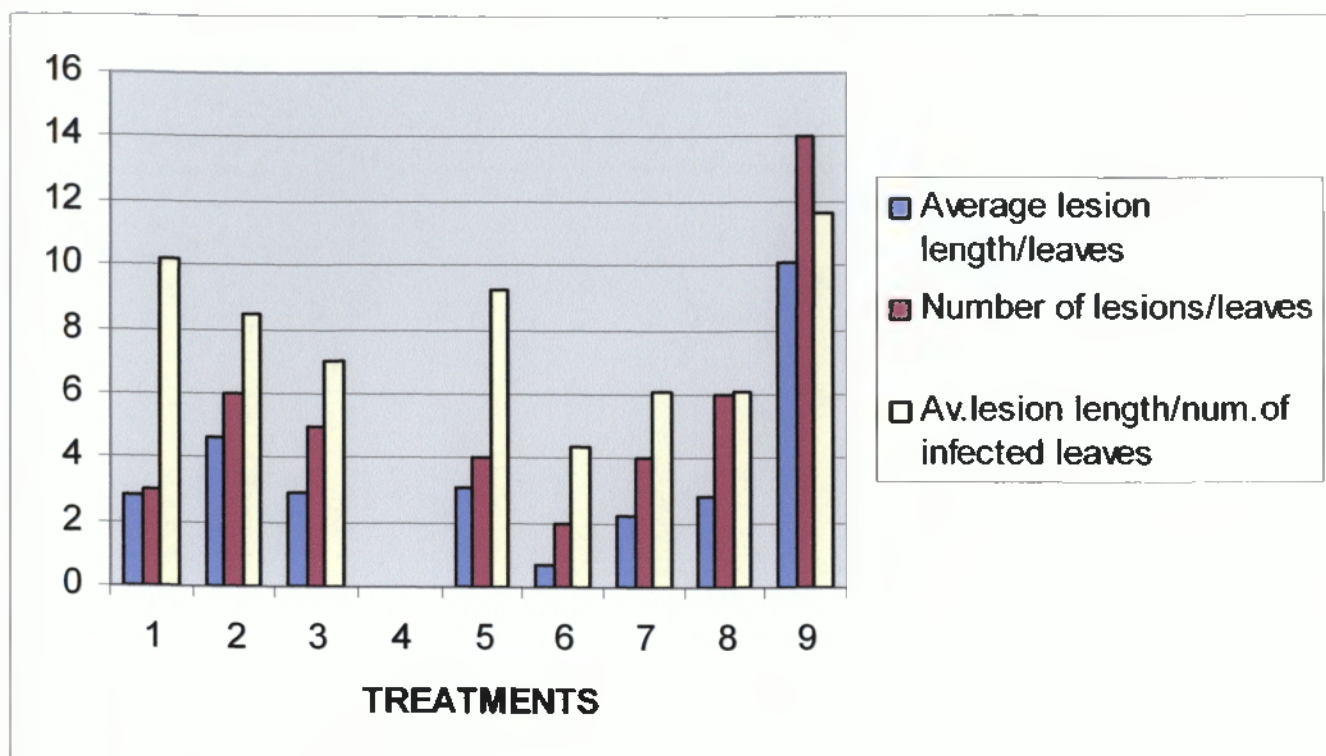
- After opening the boxes each leaf is counted separately.
- Every lesion noted down and every other significant notice about phytotoxicity or residues.

RESULTS



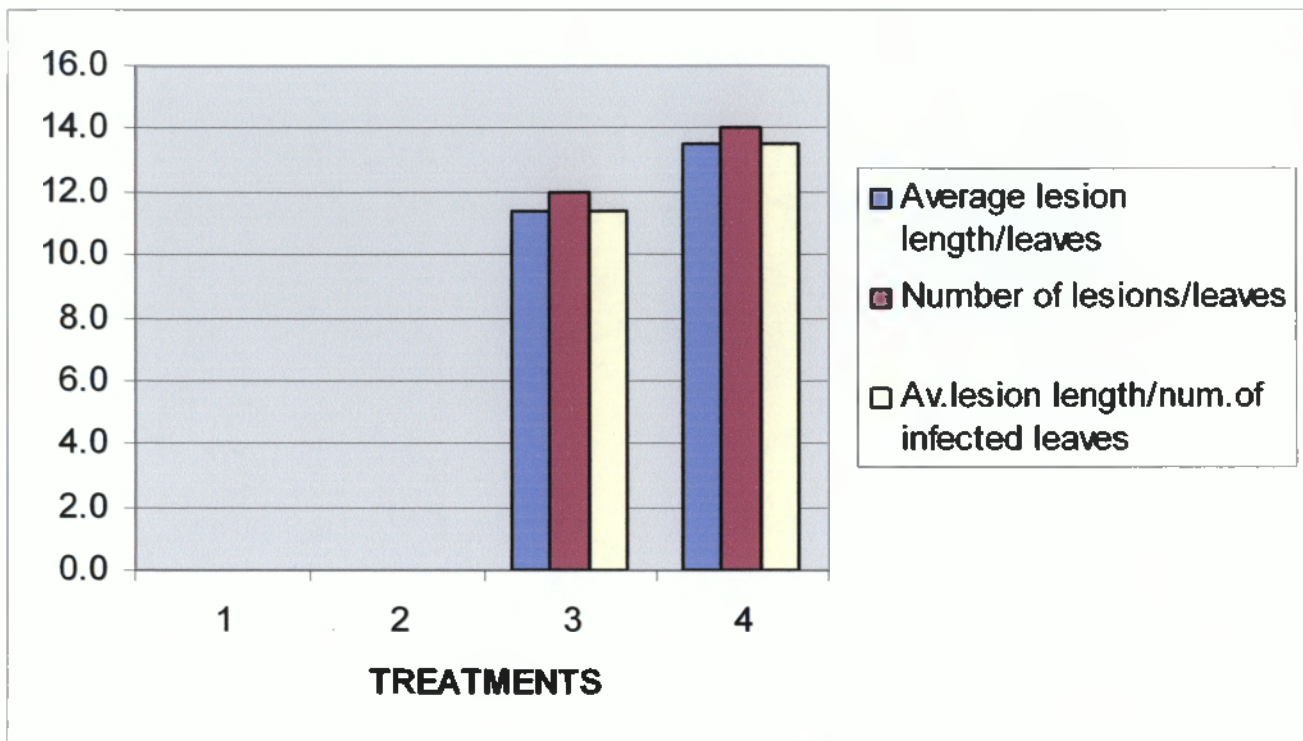
Tray	Treatments		
1	M 1 (0.2ml/l)	AS 3 (2mM)	OA 2 (0.2mM)
2	M 1 (1ml/l)	AS 3 (2mM)	OA 2 (0.2mM)
3	M 1 (1ml/l)	AS 3 (10mM)	OA 2 (0.2mM)
4	M 1 (1ml/l)	AS 3 (10mM)	OA 2 (1 mM)
5	M 1 (0.2ml/l)	AS 3 (10mM)	OA 2 (0.2mM)
6	M 1 (0.2ml/l)	AS 3 (10mM)	OA 2 (1 mM)
7	M 1 (0.2ml/l)	AS 3 (2mM)	OA 2 (1 mM)
8	M 1 (1ml/l)	AS 3 (2mM)	OA 2 (1 mM)
9	CONTROL		

The above graph shows that the combination of the compounds is very effective. Especially the combination that is applied in the 6th tray shows that the compounds AS 3 and OA 2 when they are in high concentrations in the solution are very effective against *Botrytis*.



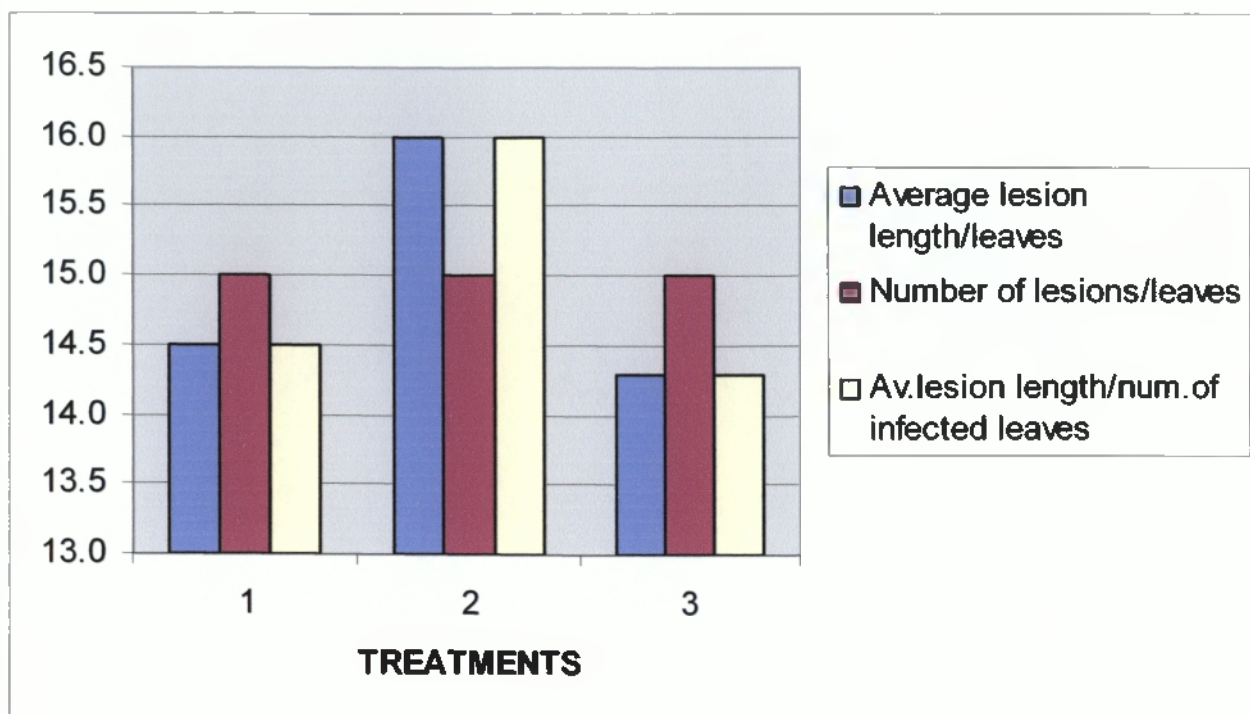
Tray	Treatment		
1	M 1 (0.2ml/l)	P 3 (0.1g/l)	OA 2 (0.2mM)
2	M 1 (1ml/l)	P 3 (0.1g/l)	OA 2 (0.2mM)
3	M 1 (1ml/l)	P 3 (0.5g/l)	OA 2 (0.2mM)
4	M 1 (1ml/l)	P 3 (0.5g/l)	OA 2 (1 mM)
5	M 1 (0.2ml/l)	P 3 (0.5g/l)	OA 2 (0.2mM)
6	M 1 (0.2ml/l)	P 3 (0.5g/l)	OA 2 (1 mM)
7	M 1 (0.2ml/l)	P 3 (0.1g/l)	OA 2 (1 mM)
8	M 1 (1ml/l)	P 3 (0.1g/l)	OA 2 (1 mM)
9	CONTROL		

The above graph shows that the compounds M 1, P 3, OA 2 are very effective when they act together and that their effectiveness is more powerful as the concentration of the compounds increases.



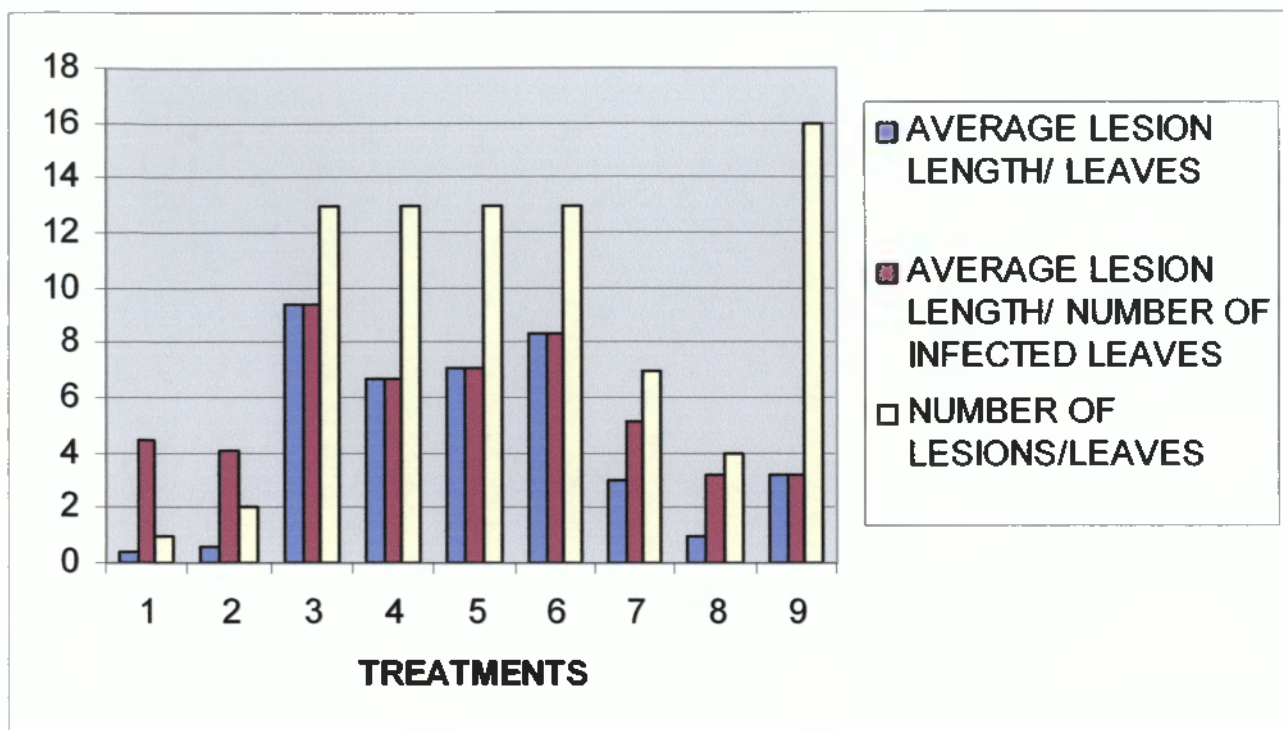
Tray	Treatment
1	SP 1 (0.5%)
2	SP 1 (0.1%)
3	SP 1 (0.02%)
4	Untreated

This graph suggest that the compound SP 1 is extremely effective in concentrations of 0.5% and 0.1% but when the concentration becomes lower then the positive effect becomes weaker and the leaves finally are infected by the fungi.



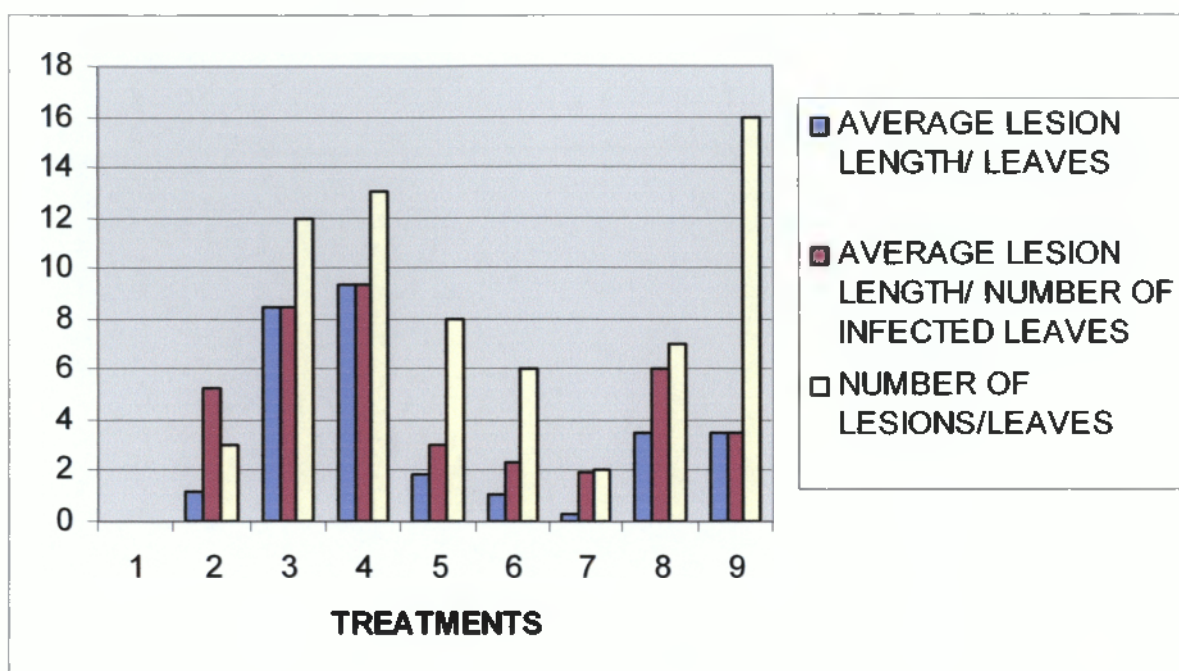
Tray	Treatment
1	SP 2 50 μ l/l
2	SP 2 10 μ l/l
3	Untreated

Here the compound SP 2 seems to have the opposite effect than what it was expected. It seems that the infection is bigger in the leaves when the compound is applied than in the untreated leaves.



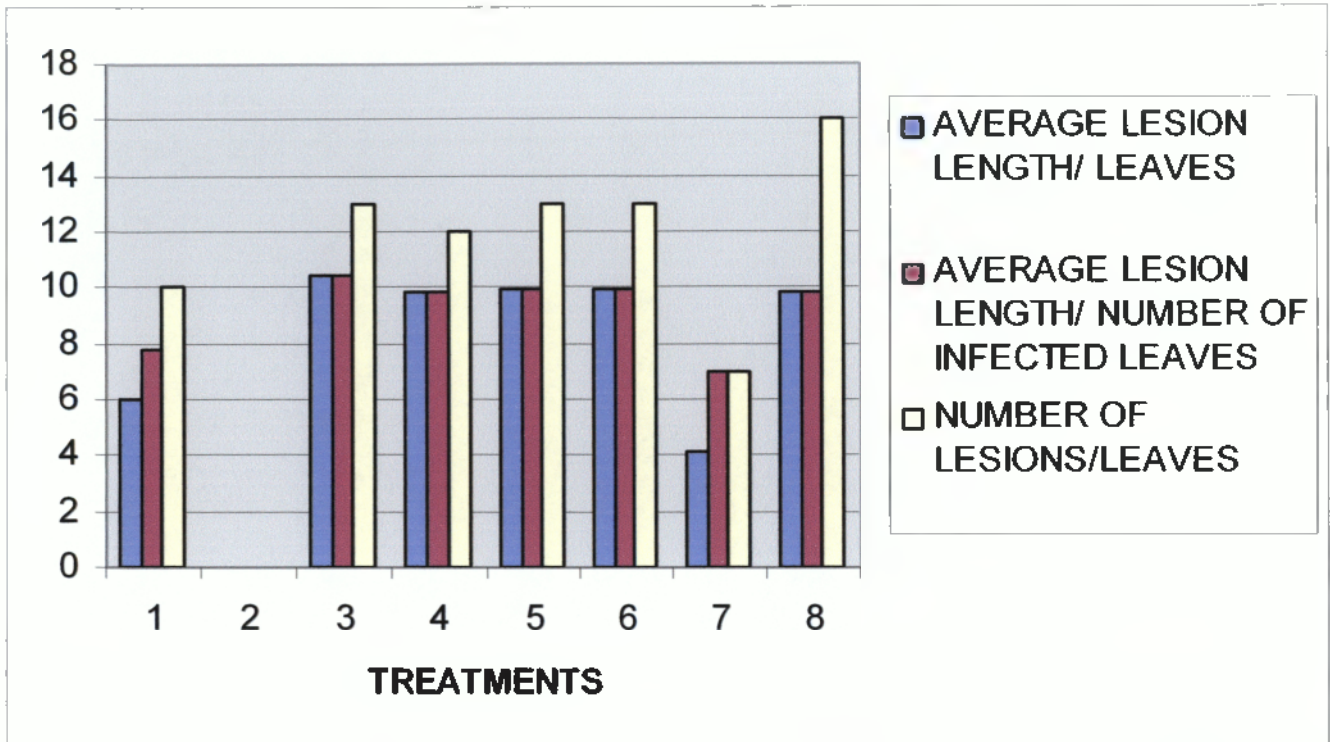
Tray	Treatment		
1	M 1 (0.25 ml/l)	SP 1 (0.04%)	OA 2 (0.2 mM)
2	-	SP 1 (0.04%)	OA 2 (0.2 mM)
3	-	-	OA 2 (0.2 mM)
4	-	-	-
5	M 1 (0.25 ml/l)	-	OA 2 (0.2 mM)
6	M 1 (0.25 ml/l)	-	-
7	M 1 (0.25 ml/l)	SP 1 (0.04%)	-
8	-	SP 1 (0.04%)	-
9	CONTROL		

From the results above the conclusion is that the combination of SP 1 and OA 2 is very effective. Moreover the compound SP 1 can be alone effective against the fungi.



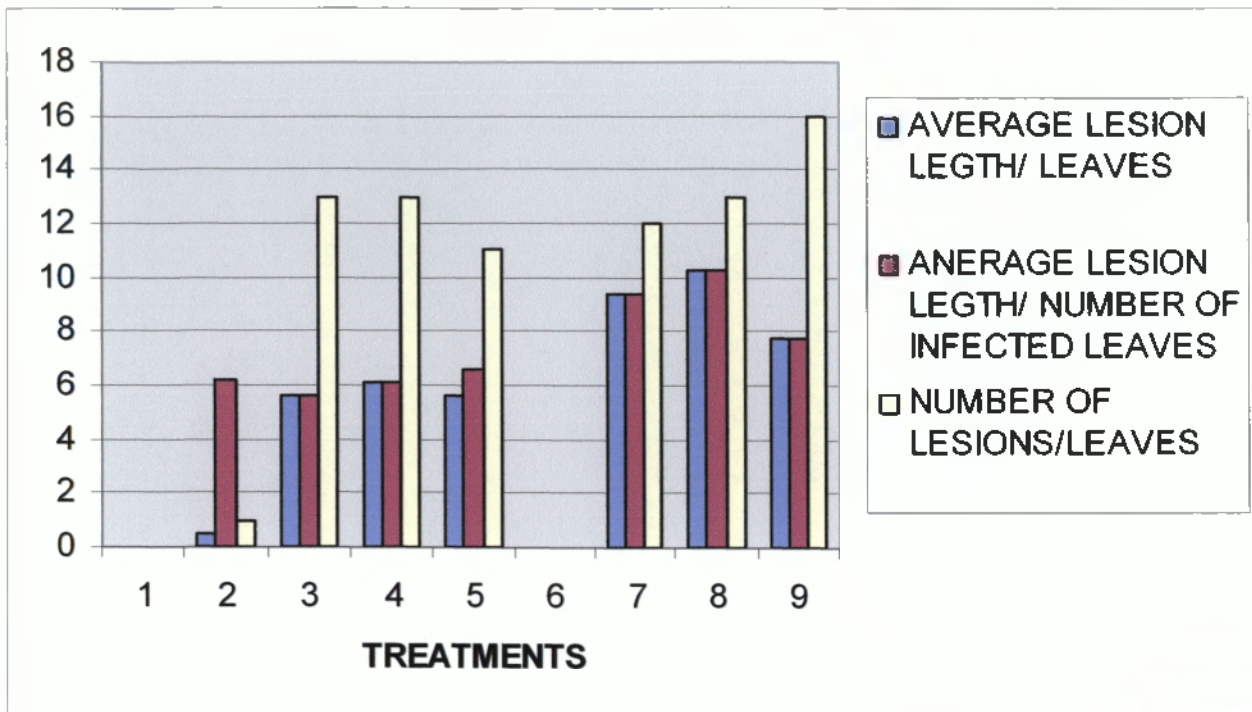
Tray	Treatments		
1	P 3 (0.25 g/l)	SP 1 (0.04%)	OA 2 (0.2 mM)
2	-	SP 1 (0.04%)	OA 2 (0.2 mM)
3	-	-	OA 2 (0.2 mM)
4	-	-	-
5	P 3 (0.25 g/l)	-	OA 2 (0.2 mM)
6	P 3 (0.25 g/l)	-	-
7	P 3 (0.25 g/l)	SP 1 (0.04%)	-
8	-	SP 1 (0.04%)	-
9	CONTROL		

The compound P 3 is very effective against the fungi but it is also very phytotoxic and residues are obvious in the leaves.



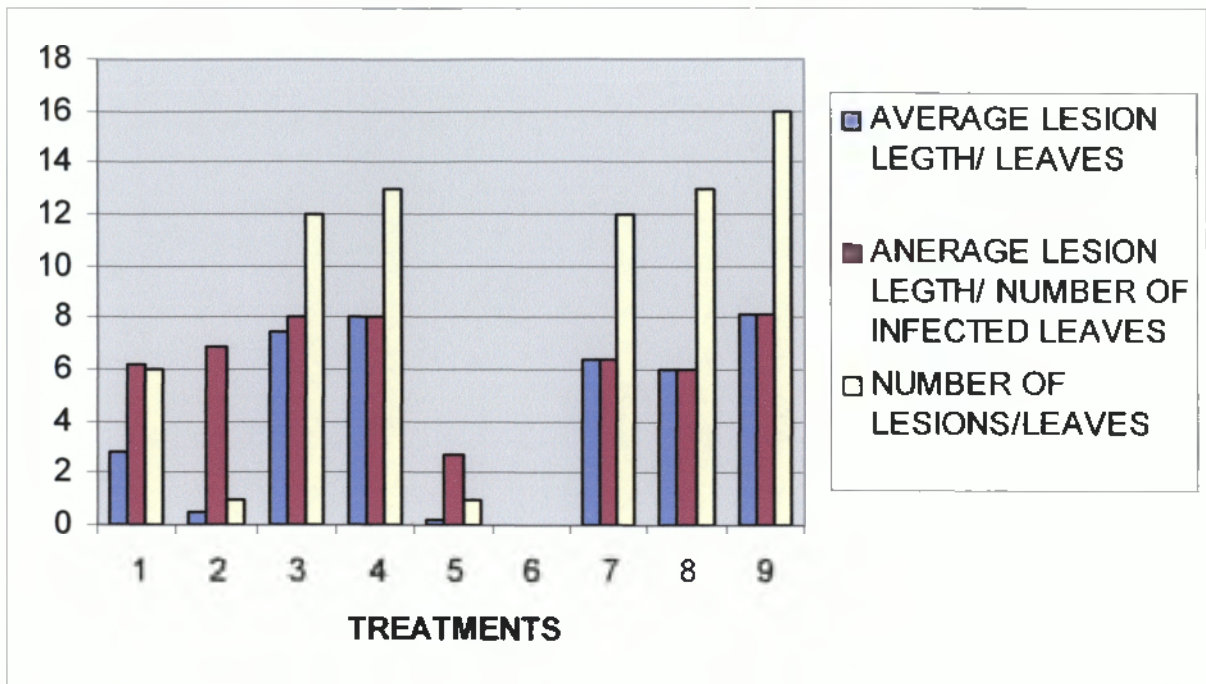
Tray	Treatment		
	1	OA 3 (0.5 mM)	SP 1 (0.04%)
2	-	SP 1 (0.04%)	OA 2 (0.2 mM)
3	-	-	OA 2 (0.2 mM)
4	-	-	-
5	OA 3 (0.5 mM)	-	OA 2 (0.2 mM)
6	OA 3 (0.5 mM)	-	-
7	OA 3 (0.5 mM)	SP 1 (0.04%)	-
8	-	SP 1 (0.04%)	-

The compound OA3 seems to help Botrytis sporulation.



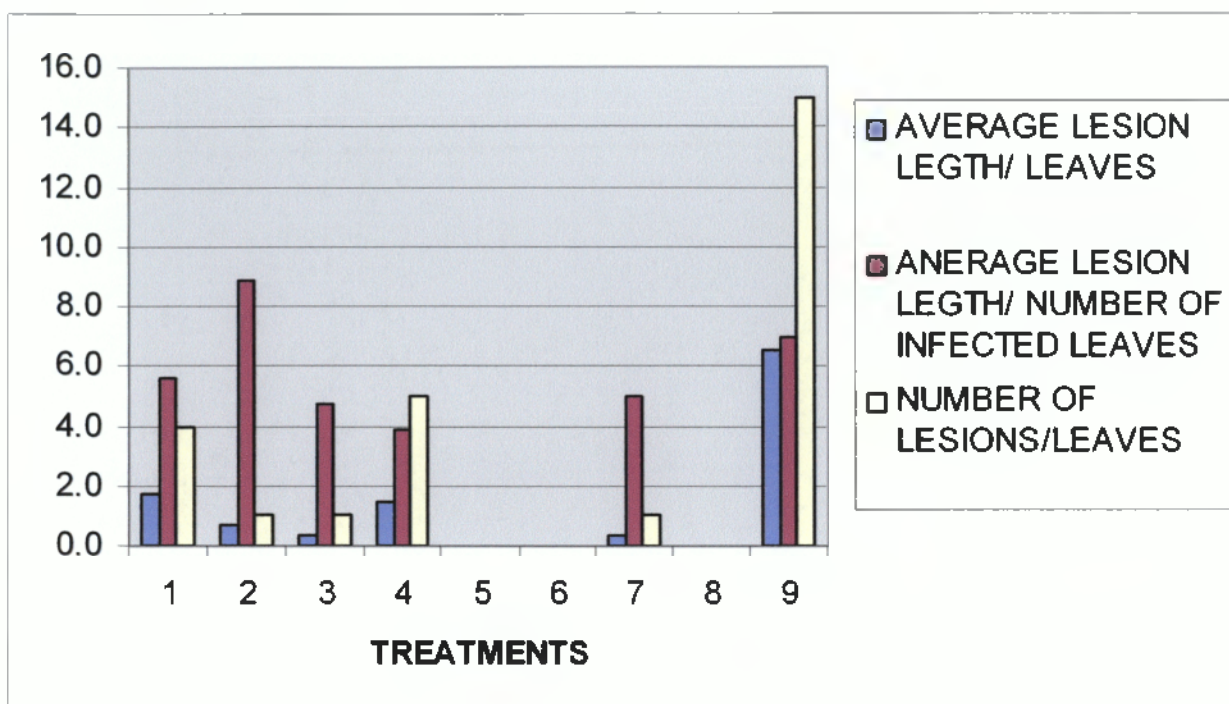
Tray	Treatments				
1	P 3 (0.25 g/l)	SP 1 (0.03%)	OA 2 (0.2 mM)	FA 1(200 µl/l)	-
2	P 3 (0.25 g/l)	SP 1 (0.03%)	OA 2 (0.2 mM)	-	-
3	-	SP 1 (0.03%)	OA 2 (0.2 mM)	FA 1(200 µl/l)	-
4	-	-	-	FA 1 (200 µl/l)	-
5	P 3 (0.25 g/l)	SP 1 (0.03%)	OA 2 (0.2 mM)	-	FA 2 (200 µl/l)
6	P 3 (0.25 g/l)	SP 1 (0.03%)	OA 2 (0.2 mM)	-	-
7	-	SP 1 (0.03%)	OA 2 (0.2 mM)	-	FA 2 (200 µl/l)
8	-	-	-	-	FA 2 (200 µl/l)
9	CONTROL				

The combination of P3, SP 1, OA 2 is very effective. The compound FA 1 seems to promote the compounds effect in contrast the compound FA 2 seems to have negative effect because of the phytotoxic effect that were appeared during the application of the solution in the leaves.



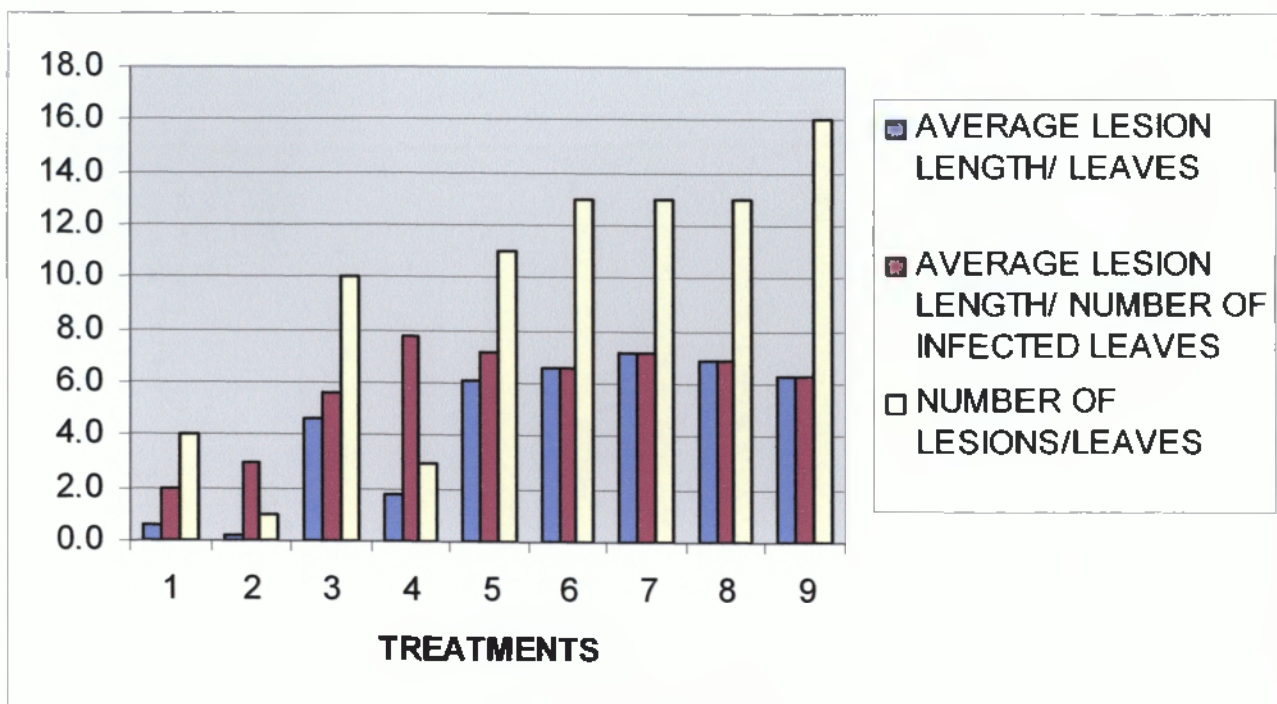
Tray	Treatment				
1	P 3 (0.25 g/l)	SP 1 (0.03%)	OA 2 (0.2 mM)	FA 3 (200 µl/l)	-
2	P 3 (0.25 g/l)	SP 1 (0.03%)	OA 2 (0.2 mM)	-	-
3	-	SP 1 (0.03%)	OA 2 (0.2 mM)	FA 3 (200 µl/l)	-
4	-	-	-	FA 3 (200 µl/l)	-
5	P 3 (0.25 g/l)	SP 1 (0.03%)	OA 2 (0.2 mM)	-	FA 4 (200 µl/l)
6	P 3 (0.25 g/l)	SP 1 (0.03%)	OA 2 (0.2 mM)	-	-

The compounds FA 3 and FA 4 seems to have negative effect in the effect of the solutions.



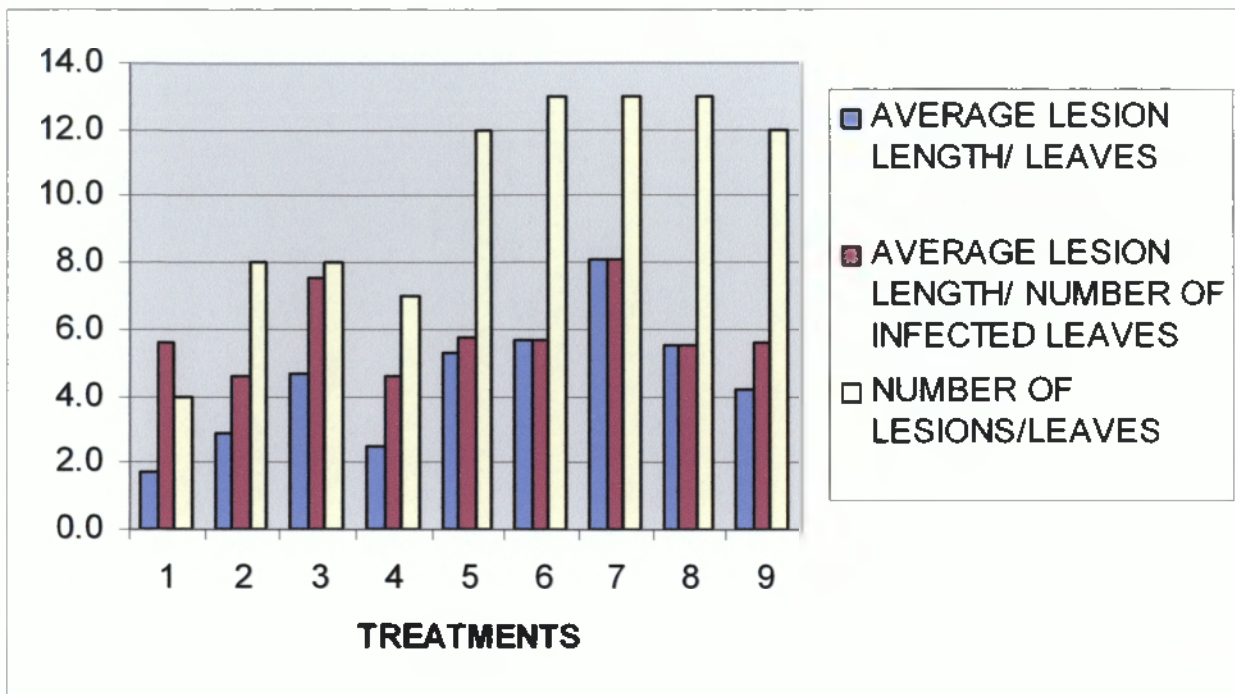
Tray	Treatments	
1	AS 4	0.004 M
2	AS 4	0.02 M
3	AS 4	0.1 M
4	AS 1	0.004 M
5	AS 1	0.02 M
6	AS 1	0.1 M
7	AS 2	0.004 M
8	AS 2	0.02 M
9	CONTROL	

The compounds AS 4 , AS 1 and AS 2 are very effective against *Botrytis* sporulation.



Tray	Treatments	
1	OA 1 (1.6%)	
2	OA 1 (0.4%)	
3	OA 1 (0.1%)	
4	OA 1 (0.25%)	
5	OA 1 (1.6%)	P3 (5g/l)
6	OA 1 (0.4%)	P3 (5g/l)
7	OA 1 (0.1%)	P3 (5g/l)
8	OA 1 (0.25%)	P3 (5g/l)
9	CONTROL	

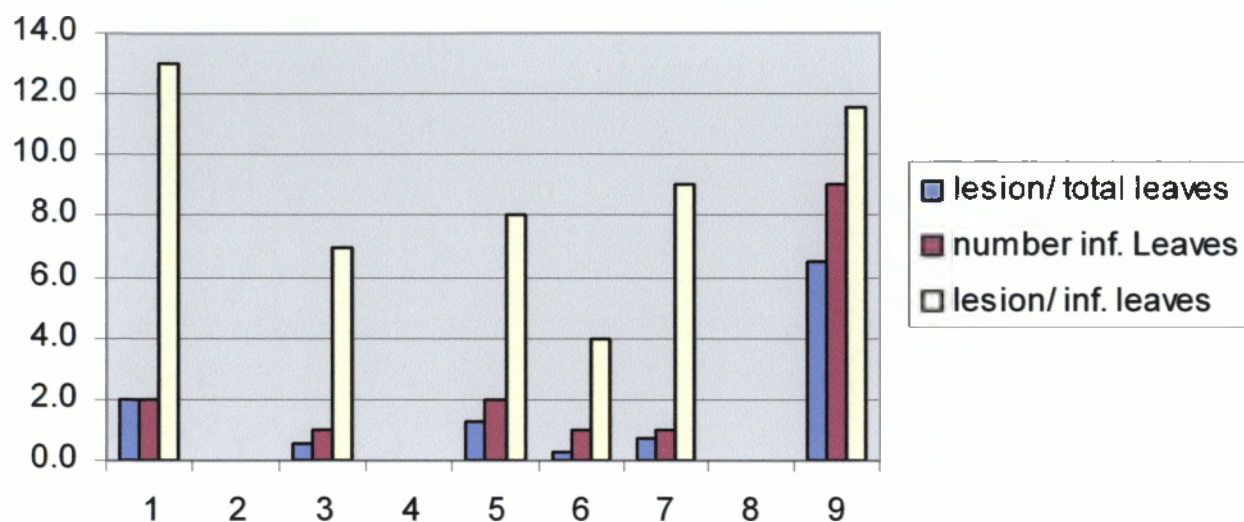
The compound OA 1 is very effective. P3 seems to have the opposite results as it was expected because it helps the *Botrytis* sporulation. In addition P3 has phytotoxic effect in high concentrations.



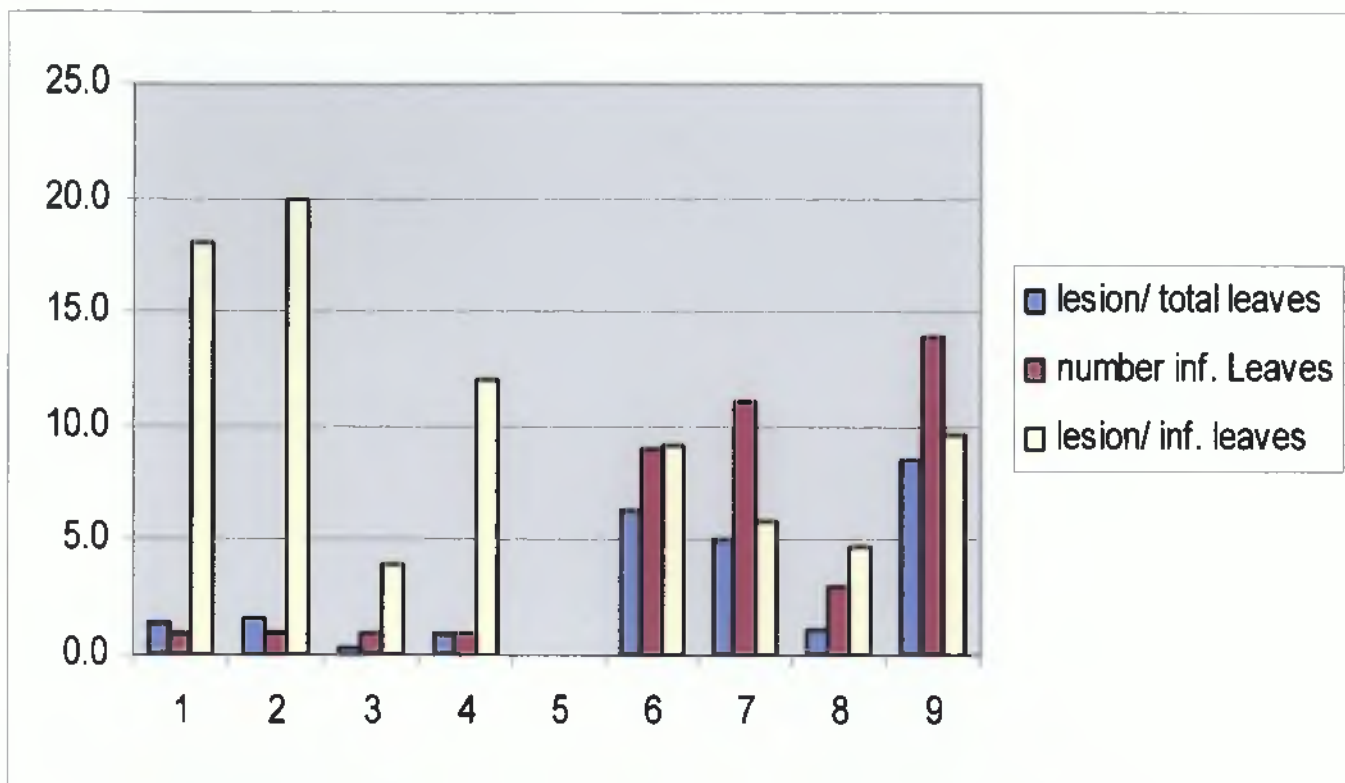
Tray	Treatment		
1	OA 1 (0.4%)		
2	OA 1 (0.4%)		P1 (0.5g/l)
3	OA 1 (0.1%)		
4	OA 1 (0.1%)		P1 (0.5g/l)
5	OA 1 (0.4%)	P3 (5g/l)	
6	OA 1 (0.4%)	P3 (5g/l)	P1 (0.5g/l)
7	OA 1 (0.1%)	P3 (5g/l)	
8	OA 1 (0.1%)	P3 (5g/l)	P1 (0.5g/l)
9	CONTROL		

From the above graph it is concluded that P3 is not an effective compound as the number of leaves that are infected are more than the control leaves.

box 2



Tray	Treatments				
1	AS 1 (1 mM)	SP 1 (0.02%)	OA 2 (0.1 mM)		M 1 (0.25 ml/L)
2	AS 1 (4 mM)	SP 1 (0.02%)	OA 2 (0.1 mM)		M 1 (0.25 ml/L)
3	AS 1 (1 mM)	SP 1 (0.02%)	OA 2 (0.1 mM)	P 3 (0.25 g/l)	
4	AS 1 (4 mM)	SP 1 (0.02%)	OA 2 (0.1 mM)	P 3 (0.25 g/l)	
5	AS 2 (0.25 mM)	SP 1 (0.02%)	OA 2 (0.1 mM)		M 1 (0.25 ml/L)
6	AS 2 (1 mM)	SP 1 (0.02%)	OA 2 (0.1 mM)		M 1 (0.25 ml/L)
7	AS 2 (0.25 mM)	SP 1 (0.02%)	OA 2 (0.1 mM)	P 3 (0.25 g/l)	
8	AS 2 (1 mM)	SP 1 (0.02%)	OA 2 (0.1 mM)	P 3 (0.25 g/l)	
9	CONTROL				



Tray	Treatments				
	1	AS 1 (1 mM)	SP 1 (0.02%)	OA 2 (0.1 mM)	
2	AS 1 (4 mM)	SP 1 (0.02%)	OA 2 (0.1 mM)		M 1 (0.25 ml/L)
3	AS 1 (1 mM)	SP 1 (0.02%)	OA 2 (0.1 mM)	P 3 (0.25 g/l)	
4	AS 1 (4 mM)	SP 1 (0.02%)	OA 2 (0.1 mM)	P 3 (0.25 g/l)	
5	AS 2 (0.25 mM)	SP 1 (0.02%)	OA 2 (0.1 mM)		M 1 (0.25 ml/L)
6	AS 2 (1 mM)	SP 1 (0.02%)	OA 2 (0.1 mM)		M 1 (0.25 ml/L)
7	AS 2 (0.25 mM)	SP 1 (0.02%)	OA 2 (0.1 mM)	P 3 (0.25 g/l)	
8	AS 2 (1 mM)	SP 1 (0.02%)	OA 2 (0.1 mM)	P 3 (0.25 g/l)	
9	CONTROL				

CONCLUSION-DISCUSSION

Table 1 Overview of the tested compounds and their effectiveness

<i>*Polyphenols (P)</i>				
			<i>Remarks</i>	
	<i>Concentrations</i>	<i>*Effect (+, /, -)</i>	<i>Phytotoxicity</i>	<i>Residues</i>
<i>P1</i>	<i>0,5 g/l</i>	<i>+</i>	<i>No</i>	<i>No</i>
<i>P 2</i>	<i>10 g/l</i>	<i>-</i>	<i>No</i>	<i>Yes</i>
	<i>5 g/l</i>	<i>-</i>	<i>No</i>	<i>Yes</i>
	<i>2,5 g/l</i>	<i>-</i>	<i>No</i>	<i>No</i>
	<i>0,5 g/l</i>	<i>-</i>	<i>No</i>	<i>No</i>
<i>P 3</i>	<i>0,5 g/l</i>	<i>++</i>	<i>No</i>	<i>Yes</i>
	<i>0,25 g/l</i>	<i>+</i>	<i>No</i>	<i>Yes</i>
	<i>0,1 g/l</i>	<i>+</i>	<i>No</i>	<i>No</i>
<i>Formulation agents (FA)</i>				
			<i>Remarks</i>	
	<i>Concentrations</i>	<i>Effect (+, /, -)</i>	<i>Phytotoxicity</i>	<i>Residues</i>
<i>FA 1</i>	<i>200 µl/l</i>	<i>+</i>	<i>No</i>	<i>No</i>
<i>FA 2</i>	<i>200 µl/l</i>	<i>-</i>	<i>Yes</i>	<i>No</i>
<i>FA 3</i>	<i>200 µl/l</i>	<i>-</i>	<i>No</i>	<i>No</i>
<i>FA 4</i>	<i>200 µl/l</i>	<i>-</i>	<i>No</i>	<i>No</i>
<i>Organic acids (OA)</i>				
			<i>Remarks</i>	
	<i>Concentrations</i>	<i>Effect (+, /, -)</i>	<i>Phytotoxicity</i>	<i>Residues</i>
<i>OA 1</i>	<i>1,6 %</i>	<i>++</i>	<i>Yes</i>	<i>No</i>
	<i>0,4 %</i>	<i>++</i>	<i>Yes</i>	<i>No</i>
	<i>0,25 %</i>	<i>+</i>	<i>No</i>	<i>No</i>
	<i>0,1 %</i>	<i>/</i>	<i>No</i>	<i>No</i>
<i>OA 2</i>	<i>1 mM</i>	<i>++</i>	<i>No</i>	<i>No</i>
	<i>0,2 mM</i>	<i>/</i>	<i>No</i>	<i>No</i>
<i>OA 3</i>	<i>0,5 %</i>	<i>/</i>	<i>No</i>	<i>No</i>
<i>Anorganic salts (AS)</i>				
			<i>Remarks</i>	

	Concentrations	Effect (+, /, -)	Phytotoxicity	Residues
AS 1	4Mm	++	No	No
	1mM	++	No	No
	0,25mM	+	No	No
AS 2	1Mm	++	No	No
	0,25mM	++	No	No
AS 3	10 ml/l	++	No	No
	2 ml/l	+	No	No
Miscellaneous (M)				
<i>Remarks</i>				
	Concentrations	Effect (+, /, -)	Phytotoxicity	Residues
M 1	1 ml/l	+	No	No
	0,25 ml/l	-	No	No
	0,2 ml/l	-	No	No
M 1	500 x diluted	++	No	No
	2000 x diluted	+	No	No
	8000 x diluted	+	No	No
Synthetic preservatives (SP)				
<i>Remarks</i>				
	Concentrations	Effect (+, /, -)	Phytotoxicity	Residues
SP 1	0,5 %	++	No	No
	0,1 %	++	No	No
	0,04 %	+	No	No
	0,03 %	+	No	No
	0,02 %	+	No	No
SP 2	50 µl/l	-	No	No
	10 µl/l	-	No	No

***Effect symbols:**

++ means very effective against *Botrytis elliptica*

+ means effective against *Botrytis elliptica*

/ means neutral effect

- means with beneficial results for *Botrytis sporulation*

Throughout the experiments and the measurement procedure many factors could have interfered with the results' outcome.

For instance, the changing climatic conditions that dominated in each stage of the plant materials' growth might have had something to do with the way the plants developed their own mechanisms against pathogen infections. In addition to this, some other unpredicted factors could determine the size dimensions of the infection on the leaves despite their having been handled in the same way and according to a standard protocol throughout the duration of the experiments.

Generally speaking, the point is that many things are difficult to keep under control, regardless the care taken when handling the experiment process.

After examining the results of these experiments, it can be concluded that many compounds can be effective against fungus infection, in particular when set against *Botrytis cinerea* on Lily leaves, the results indicate that compounds are very effective. The only issue here is that these were all applied to the leaves of the lily and not the entire plant. This leads to necessary progression of testing the compounds on the whole plant before their reaching to the next step as is the whole plant and the crop.

Different relevant tests show that some compounds may have positive effects against the fungus sporulation but in a total application the results can be harmful for the plant. This was the result of a further examination of OA 2 compound, which suggests that different parts of the plant may have different sensitivity to several compounds.

Although that in some cases the results were very encouraging these compounds need a further examination in different conditions before a final decision can be reached.

However the results of this experiment are the premises for a series of new fungicide combinations that are going to be friendlier for the environment and for the people's health. For that reason the experiments must continue and the results must be analyzed more.

APPENDIX



The PRI greenhouse



The PRI laboratory

**For further information about this project please contact with
Plant Research International
Luc Stevens
Luc.Stevens@wur.nl
Tel. +31 0317 47 5821**