



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής

Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**Μελέτη του μηχανισμού δράσης του
βιολογικού παράγοντα F2 και βελτιστοποίηση
τρόπων εφαρμογής του στον αγρό κατά
παθογόνων αδρομυκώσεων**

ΣΟΦΙΑ ΚΟΥΝΤΟΥΡΗ

Αθήνα, Ιούλιος 2012

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής

Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**Μελέτη του μηχανισμού δράσης του
βιολογικού παράγοντα F2 και βελτιστοποίηση
τρόπων εφαρμογής του στον αγρό κατά
παθογόνων αδρομυκώσεων**

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ε. Παπλωματάς	Καθηγητής	Επιβλέπων
Π. Αντωνίου	Επικ. Καθηγήτρια	Μέλος
Σ. Τζάμος	Λέκτορας	Μέλος

Ευχαριστίες

Η μεταπτυχιακή αυτή μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Κατά τη διάρκεια της πραγματοποίησης της πολλοί ήταν εκείνοι που βοήθησαν να ολοκληρωθεί και θέλω να τους ευχαριστήσω ιδιαίτερα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Ομότιμο Καθηγητή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας κ. Ελευθέριο Τζάμο, ο οποίος μου εμφύσησε την αγάπη για το αντικείμενο της Φυτοπαθολογίας από τα προπτυχιακά κιόλας μαθήματα. Επίσης, καθ' όλη τη διάρκεια της πραγματοποίησης της μεταπτυχιακής μελέτης υπήρξα δέκτης πολλών και διαφορετικών φυτοπαθολογικών ερεθισμάτων τόσο σε εργαστηριακό όσο και σε επίπεδο αγρού και τον ευχαριστώ πολύ γι' αυτό.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω, τον Επιβλέποντα Καθηγητή της μεταπτυχιακής μελέτης αυτής, Δρ Επαμεινώνδα Παπλωματά, ο οποίος με τις χρήσιμες παρατηρήσεις, τη καθοδήγηση του για τη μελέτη και το ευχάριστο κλίμα που έχει διαμορφώσει στο εργαστήριο βοήθησε ουσιαστικά στην ολοκλήρωση αυτής της μελέτης.

Ευχαριστώ πολύ επίσης, το Λέκτορα της Φυτοπαθολογίας, Δρ Σωτήριο Τζάμο για τις συμβουλές του σχετικά με το πειραματικό μέρος, την επεξήγηση αποριών και την επίλυση προβλημάτων που προέκυψαν κατά τη διάρκεια της εργασίας. Χωρίς τη συμβολή του θα ήταν αδύνατη η πραγματοποίηση αυτής της μελέτης.

Ευχαριστώ επίσης, την Επίκουρη Καθηγήτρια του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας, Δρ Πολύμνια Αντωνίου για τις πολύτιμες συμβουλές και τη βοήθεια της στο πειραματικό σκέλος της εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης όλα τα υπόλοιπα μέλη ΔΕΠ του εργαστηρίου την Δρ Μυρτώ Δημακοπούλου, την Δρ Ελισσάβητ Χατζηβασιλείου για την προθυμία τους για βοήθεια όποτε αυτό ήταν αναγκαίο, καθώς επίσης και όλους τους φοιτητές του εργαστηρίου και ιδιαίτερα τον μεταπτυχιακό συμφοιτητή μου κ. Ιωάννη Στριγγλή.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω το σύζυγο μου, Δρ Δημήτριο Τσιτσιγιάννη για την υποστήριξη του και την υπόδειξη διορθώσεων κατά τη διάρκεια εκπόνησης της μελέτης.

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1. Αδρομύκωση από τον εδαφογενή μύκητα <i>Verticillium dahliae</i>	8
1.1.1. Χαρακτηριστικά του μύκητα – Βιολογικός κύκλος του μύκητα	8
1.1.2. Συμπτώματα	10
1.1.3. Αντιμετώπιση	11
1.2. Βιολογική αντιμετώπιση των ασθενειών των φυτών	12
1.2.1. Βιολογική αντιμετώπιση εδαφογενών παθογόνων των φυτών	13
1.2.2. Μηχανισμοί δράσης των βιολογικών παραγόντων	13
1.2.3. Ο μύκητας <i>Fusarium oxysporum</i> ως βιολογικός παράγοντας καταπολέμησης ασθενειών	14
1.2.4. Κίνδυνοι από τη χρήση βιολογικών παραγόντων	17
1.3. Το Αμυντικό Σύστημα των φυτών	17
1.3.1. Διεγέρτες-Τελεστές	18
1.3.2. Πρωτεΐνες Ανθεκτικότητας	20
1.3.3. Αλληλοαναγνώριση Ξενιστή-Παθογόνου	21
1.3.4. Επίκτητη και Επαγόμενη Διασυστηματική Αντοχή των Φυτών	25
1.3.5. Επαγόμενη διασυστηματική αντοχή από Ριζοσφαιρικά βακτήρια	25
1.3.6. Πρωτεΐνες παθογένειας	26
1.4. Σκοπός της εργασίας	32
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	33
2.1. Θρεπτικό υλικό PDA	33
2.2. Θρεπτικό υλικό SSN	34
2.3. Εγκατάσταση στον αγρό των φυτών μελιτζάνας που έχει γίνει εφαρμογή του F2	34
2.4. Προετοιμασία και εφαρμογή του μολύσματος	36
2.5. Αξιολόγηση της ασθένειας	38
2.6. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων	38
2.7. Προετοιμασία του μολύσματος <i>Verticillium dahliae</i> και της καλλιέργειας του μη παθογόνου μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i> F2 για τα πειράματα έκκρισης πρωτεϊνών παθογένειας	39
2.8. Διαδικασία μόλυνσης φυτών μελιτζάνας με <i>Verticillium dahliae</i> και εφαρμογή F2 για λήψη ριζών και εξέταση χιτινασών και γλουκανασών	43
2.9. Διαδικασία αξιολόγησης των πρωτεϊνών παθογένειας σε φυτά μελιτζάνας προσβεβλημένα με <i>Verticillium dahliae</i> μετά από εφαρμογή του στελέχους F2	44

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	52
3.1 Επίδραση των διαφορετικών επεμβάσεων του F2 παράγοντα στην εξέλιξη της βερτισιλλίωσης σε φυτά μελιτζάνας στον αγρό	52
3.2 Επίδραση των εφαρμογών του μη παθογόνου <i>Fusarium oxysporum</i> F2 στην παραγωγή καρπών μελιτζάνας	57
3.3 Αξιολόγηση της επαγωγής των χιτινασών και γλουκανασών σε βλαστό της μελιτζάνας μετά την εφαρμογή του μη παθογόνου παράγοντα F2 του μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i>	58
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	64
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	69

Περίληψη

Η βερτισιλλίωση προκαλείται από τον αδηλομύκητα *Verticillium dahliae*, έναν εδαφογενή μύκητα που προκαλεί αδρομυκώσεις. Η ιδιαιτερότητα του να προσβάλλει περισσότερα από 200 είδη ξενιστών, αποτελεί στοιχείο που επιβάλλει νέες μεθόδους και τρόπους αντιμετώπισης. Η κατάργηση των χημικών υποκαπνιστικών, που χρησιμοποιήθηκαν ευρύτατα στο παρελθόν σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους, έδωσε έναυσμα για την εξεύρεση νέων εναλλακτικών μεθόδων, όπως η ηλιοαπολύμανση των εδαφών και η ανακάλυψη νέων βιολογικών παραγόντων-ανταγωνιστών του *V. dahliae*. Η χρήση μη παθογόνων στελεχών του μύκητα *Fusarium oxysporum* εφαρμόζεται ήδη αρκετά χρόνια για την αντιμετώπιση διάφορων αδροφουζαριώσεων σε πολλούς ξενιστές του μύκητα. Στην παρούσα μελέτη, κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η επίδραση ενός βιολογικού παράγοντα, του παράγοντα F2, μη παθογόνου στελέχους του μύκητα *Fusarium oxysporum* εναντίον του μύκητα *V. dahliae* σε φυτά μελιτζάνας. Η μελέτη εφαρμόστηκε σε αγρό, μολυσμένο με *V. dahliae* όπου και έγιναν τρεις διαφορετικές εφαρμογές του F2 πριν την φύτευση των φυτών στον αγρό. Η πρώτη περιελάμβανε έγχυση 10 μl αιωρήματος κονιδίων στο βλαστό, στη δεύτερη έγινε εφαρμογή χλαμυδοσπορίων σε μορφή σκόνης (τάλκ) και στην τρίτη εφαρμογή έγινε ριζοπότισμα με αιώρημα κονιδίων στο έδαφος. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι η εφαρμογή της έγχυσης στο βλαστό μείωσε τη σοβαρότητα της ασθένειας κατά 12% περίπου συγκριτικά με το μάρτυρα. Στη συνέχεια, διερευνήθηκε περαιτέρω αν η εφαρμογή της έγχυσης στα αγγεία φυτών μελιτζάνας μπορεί να οδηγήσει στη διέγερση μηχανισμών άμυνας των φυτών με την επαγωγή έκκρισης χιτινασών και γλουκανασών στο ριζικό σύστημα. Οι χιτινάσες και οι γλουκανάσες αποτελούν πρωτεΐνες παθογένειας, είναι αντιμικροβιακές ενώσεις και επάγονται με την ανάπτυξη της επαγόμενης διασυστηματικά αντοχής σε συνθήκες μόλυνσης από διάφορα παθογόνα. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι οι χιτινάσες και οι γλουκανάσες αυξάνονται μετά την έγχυση του βλαστού του ξενιστή με το βιολογικό παράγοντα και σε συνθήκες που το φυτό αρχίζει να αποικίζεται από το εδαφογενές παθογόνο *V. dahliae*. Αυτό δείχνει ότι ο παράγοντας F2 διεγείρει μηχανισμούς άμυνας με τη μορφή πιθανώς της διασυστηματικά επαγόμενης αντοχής.

Abstract

The soilborne pathogen *Verticillium dahliae* causes Verticillium wilt in more than 200 host species. The elimination of chemical fumigants that used extensively in the past in combination with other methods to control Verticillium wilt, led to the development of new alternative strategies, such as soil solarization or the discovery of new biological control agents of *V. dahliae*. The non-pathogenic strains of the fungus *Fusarium oxysporum* have been used for several years to control various vascular wilt diseases in several hosts. In this study, it was investigated the effect of F2, a non-pathogenic strain of the fungus *Fusarium oxysporum* as biological agent against *V. dahliae* in eggplant. The study carried out in a field heavily contaminated with *V. dahliae* microsclerotia where three different applications of F2 applied before transplanting the plants in the field. For the first application, 10 µl of F2 conidia suspension were injected in the stem, for the second application, chlamydospores of the fungus were applied as powder (talc) formulation, and for the third application, F2 conidia suspension were applied in eggplant roots by drenching. The results showed that application of the conidia injection in the eggplant stem decreased the disease severity for about 12% providing a great promise for the disease treatment in the field. Then, it was investigated whether the application of injection in eggplant stem can lead to stimulation of plant defense mechanisms by inducing secretion of chitinases and glucanases in the root system. The chitinases and glucanases, which are Pathogenesis Related (PR) proteins, are antimicrobial compounds able to induce the development of induced systemic resistance during pathogens infection. Analysis of these enzymes showed that chitinases and glucanases are increased after the stem injection of the host with the F2 biological agent during the plant colonization with the soilborne pathogen *V. dahliae*. The results of this study demonstrate for the first time, that the F2 biocontrol agent can control Verticillium wilt by possibly stimulating induced systemic resistance defense mechanisms.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αδρομύκωση από τον εδαφογενή μύκητα *Verticillium dahliae*

Η βερτισιλλίωση είναι ασθένεια προκαλούμενη από τον αδηλομύκητα *Verticillium dahliae*. Πρόκειται για έναν εδαφογενή μύκητα που προκαλεί αδρομυκώσεις (προσβολή στο αγγειακό σύστημα του φυτού). Προσβάλλει περισσότερα από 200 είδη ξενιστών, συμπεριλαμβανομένων ετήσιων και δενδρωδών καλλιεργειών. Από αυτές ευπαθείς δενδρώδεις καλλιέργειες αποτελούν η ελιά, τα πυρηνόκαρπα, η φιστικιά και το αμπέλι ενώ από ετήσια κηπευτικά ευπαθή είναι η τομάτα, η μελιτζάνα, τα κολοκυνθοειδή και πολλά βιομηχανικά φυτά όπως το βαμβάκι καθώς και διάφορα καλλωπιστικά φυτά (Εικόνα 1.1) (Παναγόπουλος, 2007).



Εικόνα 1.1 Συμπτώματα της βερτισιλλίωσης σε ελαιόδενδρο

1.1.1 Χαρακτηριστικά του μύκητα *Verticillium dahliae* – Βιολογικός κύκλος του μύκητα

Ο μύκητας *V. dahliae* ανήκει στους Αδηλομύκητες (Hyphomycetes), τάξη *Moniliales*. Έχει πολυκύτταρο μυκήλιο διαμέτρου 2,0-4,5 mm, αρχικά υαλώδες και μετά καστανό. Σχηματίζει ελεύθερους, ανορθωμένους, υαλώδεις, πολυκύτταρους κονιδιοφόρους που παρουσιάζουν χαρακτηριστική σπονδυλωτή διάταξη, ενώ στα εγκάρσια χωρίσματα (septa) των κονιδιοφόρων σχηματίζονται 3-4 πλάγια, μονοκύτταρα στηρίγματα, τα φιαλίδια με τα κονίδια (φιαλιδοσπόρια). Τα κονίδια που σχηματίζει ο μύκητας είναι

μονοκύτταρα, υαλώδη, ωσειδή. Στην κορυφή κάθε στηρίγματος παράγονται πολλά κονίδια σε σχηματισμό κεφαλής (Εικόνα 1.2). Η διασπορά των κονιδίων επιτυγχάνεται με το νερό (Παναγόπουλος, 2007).



Εικόνα 1.2 Κονιδιοφόρος και κονίδια του μύκητα *V. dahliae*

Πηγή: <http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/Verticillium/Vertifin.htm>

Το παθογόνο ευνοείται από μέσες θερμοκρασίες περιβάλλοντος (21-27 °C). Έχει ευρύ κύκλο ξενιστών και δεν παρουσιάζει συνήθως παθογόνο εξειδίκευση, δηλαδή τα μολύσματα από ένα φυτό προκαλούν ασθένεια σε πολλές καλλιέργειες. Ο κύριος τρόπος με τον οποίο ο μύκητας επιβιώνει είναι τα μικροσκληρώτια που σχηματίζει, διαμέτρου 15-100 μm, ποικίλου μεγέθους και σχήματος ενώ μπορεί να διατηρείται και με μυκήλιο και κονίδια. Επίσης ο μύκητας μπορεί να διαβιώνει με τα διάφορα ζιζάνια –ξενιστές του (π.χ. *Xanthium spinosum*), να αυξάνει το μόλυσμα στο έδαφος και να επαναμολώνει νέες καλλιέργειες. Σε μεγάλες αποστάσεις η διασπορά του μολύσματος γίνεται με το νερό, τα υπολείμματα των καλλιεργειών, τα ζιζάνια και το έδαφος που μεταφέρεται κατά την κατεργασία αυτού. Από αυτούς τους παράγοντες σημαντικό ρόλο παίζει το νερό στη διασπορά σε αμόλυντες περιοχές. Σε μεγάλες αποστάσεις το μόλυσμα μεταφέρεται με το ήδη μολυσμένο πολλαπλασιαστικό υλικό (εμβόλια, κόνδυλοι πατάτας, μοσχεύματα, σπόρος). Η είσοδος του παθογόνου γίνεται απευθείας κυρίως από τις ρίζες ή ως αποτέλεσμα τραυματισμού τους από έντομα, νηματώδεις κ.ά. Μετά την είσοδο του ο μύκητας εγκαθίσταται στα αγγεία του ξύλου και ακολουθεί η εμφάνιση του παθολογικού συνδρόμου της ασθένειας. Αυτό γίνεται επειδή μετά την εγκατάσταση του παθογόνου τα κονίδια του μύκητα παρασύρονται με το ανιόν ρεύμα του χυμού και μολύνουν μεμονωμένα βλαστούς και κλάδους. Βέβαια σε πολλές περιπτώσεις παρατηρείται αυτόματη θεραπεία ή

ανάρρωση των προσβεβλημένων δένδρων, η οποία όμως δεν είναι αυτοίαση αλλά το παθογόνο για κάποιο λόγο πεθαίνει εγκλωβιζόμενο στο παλαιό ξύλο με την επίδραση διαφόρων ενδογενών ή εξωτερικών παραγόντων. Σε ορισμένες δενδρώδεις καλλιέργειες όπως τα πυρηνόκαρπα εμφανίζεται το φαινόμενο της αυτοθεραπείας πιθανότατα λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του ξύλου τους σε ταννίνη (Παναγόπουλος, 2007).

1.1.2 Συμπτώματα

Τα πρώτα συμπτώματα της προσβολής από τον μύκητα *V. dahliae* είναι μαρασμός των κλάδων και χλώρωση των φύλλων. Ακολουθεί καστανόχρωση, καρούλιασμα και πτώση των φύλλων και τελικά ξήρανση των κλάδων. Χαρακτηριστικό σύμπτωμα των αδρομυκώσεων αποτελεί ο μαρασμός που παρατηρείται από τη μια πλευρά του φυτού (ημιπληγία). Σε μεγαλύτερα φυτά παρουσιάζεται χαρακτηριστικός καστανός ή καστανέρυθρος μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου λόγω της οξειδωσης φαινολικών ουσιών, σύμπτωμα ενδεικτικό της ασθένειας αλλά όχι παθογνωμονικό (στην ελιά σπάνια παρατηρείται μεταχρωματισμός). Χλώρωση εμφανίζεται πρώτα στα κατώτερα φύλλα των προσβεβλημένων φυτών και αργότερα στα ανώτερα λόγω του σχηματισμού τυλώσεων που φράσσουν τα αγγεία του ξύλου και οδηγούν σε ανεπαρκή εφοδιασμό των ανωτέρων τμημάτων του φυτού με νερό και θρεπτικά συστατικά. Ως τελικό αποτέλεσμα μπορεί να έχουμε εκτός της μάρανσης, επιναστία και αποξήρανση ολόκληρου του φυτού. Τα συμπτώματα εκδηλώνονται με δύο μορφές, η πρώτη με τη μορφή του απότομου μαρασμού ή αποπληξίας και η δεύτερη με το σύνδρομο της βραδείας αποξήρανσης. Στη δεύτερη περίπτωση η ασθένεια εμφανίζεται ημιπληγικά, τα φύλλα παρουσιάζουν χλώρωση και τελικά αποξηραίνονται και πέφτουν (Εικόνα 1.3). Στην ελιά ο μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου συνήθως εκλείπει γι' αυτό και η διάγνωση της ασθένειας είναι δύσκολη. Έτσι συνίσταται απομόνωση του παθογόνου για ασφαλή διάγνωση. Έχουν ανιχνευθεί δύο φυλές του μύκητα όσον αφορά την ελιά, η αποφυλλωτική και η μη αποφυλλωτική φυλή (με PCR). (Παναγόπουλος, 2007). Τα τυπικά συμπτώματα της βερτισιλλίωσης παρατηρούνται και στο φυτό – μοντέλο *Arabidopsis thaliana*.



(A)

(B)

Εικόνα 1.3 Α) Συμπτώματα χλωρώσεων–ξηράνσεων σε φυλλάρια τομάτας και Β) καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου σε βλαστό τομάτας

1.1.3 Αντιμετώπιση

Η βερτισιλλίωση αποτελεί μια ασθένεια μη ιάσιμη για τα φυτά που ασθενούν και που δεν μπορεί να αντιμετωπιστεί με τις εφαρμογές των κλασσικών χημικών σκευασμάτων. Η αντιμετώπιση έγκειται κυρίως στα προληπτικά μέτρα που λαμβάνονται ώστε να μην μολυνθεί η καλλιέργεια από το μύκητα όπως είναι η χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού και η χρησιμοποίηση ανθεκτικών ποικιλιών. Επίσης, εδάφη ήδη μολυσμένα πρέπει να απολυμαίνονται πριν καλλιεργηθούν ξανά. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στην εναλλαγή των καλλιεργειών αφού ο μύκητας *Verticillium dahliae* έχει πολλούς ξενιστές και όταν υπάρχει ήδη εγκατεστημένη μια καλλιέργεια με προσβεβλημένα φυτά, η επόμενη αν είναι ευαίσθητη στον μύκητα, είναι σχεδόν βέβαιο ότι θα προσβληθεί από τον μύκητα. Έτσι, μια προσπάθεια για μείωση του αρχικού μολύσματος, πριν την εγκατάσταση της φυτείας είναι κάτι που θα βοηθούσε στην αντιμετώπιση του παθογόνου.

Μια νέα διάσταση στην απολύμανση του εδάφους με βιολογικό τρόπο έρχεται να φέρει η ηλιοαπολύμανση των εδαφών με τη χρήση ειδικού διάφανου πλαστικού σε καλά ποτισμένο έδαφος κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού. Παλαιότερα, η εφαρμογή της μεθόδου της ηλιοαπολύμανσης, μόνη της ή σε συνδυασμό με μειωμένη δόση βρωμιούχου μεθυλίου, είχε δείξει πολύ καλά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση του παθογόνου μύκητα στο έδαφος σε διάφορες καλλιέργειες όπως η αγκινάρα (Tjamos *et al*, 1991). Η μείωση της εμφάνισης της ασθένειας στις κεφαλές της αγκινάρας οφείλεται στο σημαντικό ποσοστό μείωσης του αριθμού των μικροσκληρωτίων του παθογόνου στο έδαφος και κατά συνέπεια στη μείωση των ασθενών φυτών. Η μείωση αυτή του μολύσματος στο έδαφος οδήγησε στην αύξηση της παραγωγής της αγκινάρας. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ευεργετική

επίδραση της ηλιοαπολύμανσης στο έδαφος δεν έχει παροδικά αποτελέσματα αλλά διαρκεί για περισσότερες από μια καλλιεργητικές περιόδους. Η ίδια μέθοδος έχει εφαρμοστεί και σε καλλιέργεια ελαιοδέντρων στην Ελλάδα (Tjamos *et al*, 1987) με πολύ καλά αποτελέσματα, καθώς και σε άλλες καλλιέργειες όπως υπαίθρια τομάτα, βαμβάκι, πυρηνόκαρπα (Tjamos *et al*, 1994).

Παράλληλα, με τη μείωση του μολύσματος του *Verticillium dahliae* στο έδαφος παρατηρήθηκε η αύξηση μη παθογόνων μυκήτων, όπως ο *Talaromyces flavus* (Tjamos *et al*, 1994), γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ηλιοαπολύμανση οδηγεί στην βιολογική αντιμετώπιση του παθογόνου με ταυτόχρονη αύξηση των βιολογικών παραγόντων που συνυπάρχουν στο έδαφος.

Η χρήση όμως των διαφόρων χημικών υποκαπνιστικών έχει απαγορευθεί τα τελευταία έτη και δεν υπάρχουν σκευάσματα που να αντικαθιστούν τα αποσυρθέντα, με αποτέλεσμα η ηλιοαπολύμανση να αποτελεί τη μόνη και αποτελεσματική λύση στην αντιμετώπιση των εδαφογενών παθογόνων.

1.2 Βιολογική αντιμετώπιση των ασθενειών των φυτών

Η χρήση βιολογικών παραγόντων στην αντιμετώπιση των ασθενειών των φυτών έχει γνωρίσει μεγάλη ανάπτυξη τα τελευταία χρόνια και η έρευνα στρέφεται με μεγάλο ενδιαφέρον και προς αυτήν την κατεύθυνση. Τόσο τα προβλήματα της χρόνιας κατάχρησης των χημικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων όσο και το κόστος των προϊόντων αυτών οδήγησε τους ερευνητές στην εξεύρεση άλλων μεθόδων στην αντιμετώπιση των ασθενειών στα φυτά (Τζάμος, 2007).

Η βιολογική αντιμετώπιση περιλαμβάνει τη χρησιμοποίηση μικροοργανισμών που καταστέλλουν τη δραστηριότητα των παθογόνων αιτιών, παρεμποδίζουν τη μόλυνση των φυτών και κατά συνέπεια την εκδήλωση της ασθένειας. Η βιολογική αντιμετώπιση στηρίζεται στην αλληλεπίδραση του συστήματος παθογόνο – φυτό - βιολογικός παράγοντας καθώς και στο περιβάλλον που περικλείει αυτό το σύστημα. Σκοπός της βιολογικής αντιμετώπισης των παθογόνων είναι:

- Είτε να παρεμποδιστεί η μείωση του μολύσματος με τη μέθοδο της αμειψισποράς
- Είτε να παρεμποδιστεί ή να επιβραδυνθεί το παθογόνο από βιολογικούς παράγοντες ανταγωνιστές που υπάρχουν

- Είτε να διεγερθούν λανθάνοντες μηχανισμοί άμυνας και να αντιμετωπιστεί το παθογόνο (Τζάμος, 2007).

1.2.1 Βιολογική αντιμετώπιση εδαφογενών παθογόνων των φυτών

Η βιολογική αντιμετώπιση των παθογόνων που προκαλούν προβλήματα στις καλλιέργειες και βρίσκονται στο έδαφος, έγκειται στις αλληλεπιδράσεις του φυτικού ριζικού συστήματος και του εδάφους, ενός συστήματος που ονομάζεται ριζόσφαιρα. Εκεί διαμορφώνονται ιδιαίτερες συνθήκες, περιβαλλοντολογικές και μικροχλωρίδας, με αποτέλεσμα να υπάρχει ένα ιδιαίτερο μικροβιακό δυναμικό.

Έτσι, διατηρώντας αυτό το μικροβιακό δυναμικό στη ριζόσφαιρα με την επιβίωση των ήδη υπάρχοντων ανταγωνιστών ή εναλλακικά εισάγοντας καινούργιους παράγοντες-ανταγωνιστές στο έδαφος, επιτυγχάνεται η βιολογική καταστολή των παθογόνων που βρίσκονται στο έδαφος.

1.2.2 Μηχανισμοί δράσης των βιολογικών παραγόντων

Οι βιολογικοί παράγοντες φαίνεται ότι λαμβάνουν δράση για την καταστολή των παθογόνων για συγκεκριμένους λόγους. Αυτοί είναι:

- Ανταγωνισμός για θρεπτικά συστατικά. Οι διάφοροι μικροοργανισμοί ανταγωνίζονται μεταξύ τους για διάφορα θρεπτικά στοιχεία που βρίσκονται στο έδαφος. Έτσι, αν συνυπάρχει ένα παθογόνο με ένα βιολογικό παράγοντα στο έδαφος τότε το ένα θα ανταγωνίζεται το άλλο και πιθανόν να οδηγήσει αυτή η αλληλεπίδραση στη μείωση της δραστηριότητας του παθογόνου μικροοργανισμού. Κάποια βακτήρια εγκαθίστανται στις ρίζες των φυτών και χρησιμοποιούν μεγάλες ποσότητες άνθρακα και αζώτου με αποτέλεσμα να μην μπορεί το παθογόνο να διαχειμάσει ή και να αποικίσει το φυτό.

Οι σιδηροφόροι αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα ανταγωνισμού για σίδηρο μεταξύ βιολογικών παραγόντων και παθογόνων. Πρόκειται για χαμηλού μοριακού βάρους μόρια που εκκρίνονται από μικροοργανισμούς, για να προσλάβουν σίδηρο από το περιβάλλον τους (Hofte, 1993). Οι τρόποι δράσης στην καταστολή των παθογόνων φαίνεται ότι οφείλονται στον ανταγωνισμό για σίδηρο με το παθογόνο (Bakker *et al.* 1993, Duijff *et al.* 1999, Loper and Buyer 1991). Οι σιδηροφόροι μπορούν επίσης να επάγουν την

επαγόμενη διασυστηματική αντοχή (induced systemic resistance, ISR) (Leeman *et al.* 1996).

- Παρασιτισμός με τη διαδικασία της αδρανοποίησης του παθογόνου από ένζυμα του βιολογικού παράγοντα. Πολλοί από τους βιολογικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται παρασιτούν και ανταγωνίζονται τα παθογόνα μέσω της κυτταρόλυσης που προκαλούν στα παθογόνα. Η λύση των κυττάρων επιτυγχάνεται μέσω της έκκρισης διαφόρων ενζύμων όπως οι χιτινάσες, οι γλουκανάσες και οι πρωτεάσες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το παράσιτο *Trichoderma harzianum* το οποίο παράγει τουλάχιστον τρεις χιτινάσες και γλουκανάσες.

- Αντιβίωση με την παραγωγή τοξικών μεταβολιτών από το βιολογικό παράγοντα. Η παραγωγή αντιβιοτικών έχει περιγραφεί σαν ένας δυναμικός τρόπος δράσης στην καταστολή της ασθένειας από την οποία και η δραστηριότητα του παθογόνου καταστέλλεται (Handelsman and Stabb 1996). Η συσχέτιση της παραγωγής αντιβιοτικών με την επαγόμενη διασυστηματική αντοχή δεν έχει διερευνηθεί. Ωστόσο, από έρευνες φαίνεται ότι κάποιες φυλές παθογόνων που διαφοροποιούν την ευαισθησία τους στα αντιβιοτικά που παράγονται από βακτήρια-βιολογικούς παράγοντες, δεν επάγουν επαγόμενη διασυστηματική αντοχή των φυτών

- Αποικισμός

- Ενεργοποίηση λανθανόντων μηχανισμών αμύνης. Οι διάφοροι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για αντιμετώπιση παθογόνων μικροοργανισμών, διεγείρουν την επαγόμενη διασυστηματική αντοχή των φυτών με αποτέλεσμα την αύξηση της αντοχής του φυτού.

- Συνδυασμός όλων των παραπάνω παραγόντων.

1.2.3. Ο μύκητας *Fusarium oxysporum* ως βιολογικός παράγοντας καταπολέμησης ασθενειών των φυτών

Οι στρατηγικές αντιμετώπισης των ασθενειών, ειδικά των αδρομυκώσεων, επικεντρώνονται σε προληπτικά κυρίως μέτρα. Σε μελέτες που έχουν δημοσιευθεί φαίνεται η επίδραση διαφόρων μη παθογόνων φουζαρίων που ανταγωνίζονται παθογόνους μικροοργανισμούς και τους καταστέλλουν με αποτέλεσμα την ενίσχυση της άμυνας των

φυτών. Τα είδη του *Fusarium oxysporum* θεωρούνται ως φυσικά συστατικά των εδαφών και των μυκήτων που περιέχονται στη ριζόσφαιρα των φυτών (Gordon *et al.*, 1997).

Όλα τα στελέχη του *F. oxysporum* είναι σαπροφυτικά και ικανά να αναπτυχθούν και να επιβιώσουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε οργανική ύλη στο έδαφος και στη ριζόσφαιρα πολλών φυτών (Garrett, 1970). Επιπλέον, ορισμένα στελέχη του *F. oxysporum* είναι παθογόνα σε διαφορετικά είδη φυτών. Εισέρχονται από τις ρίζες των φυτών και μπορούν να προκαλέσουν αδρομυκώσεις όταν μπουν στο αγγειακό σύστημα. Άλλα είδη μπορούν να εισχωρήσουν στις ρίζες, να προκαλέσουν σηψιρριζίες χωρίς να εισέρχονται στο αγγειακό σύστημα των φυτών, και να προκαλέσουν ασθένεια (Olivain *et al.*, 1997).

Σε προηγούμενες μελέτες που χρησιμοποιήθηκαν ως βιολογικοί παράγοντες στελέχη του *F. oxysporum* οι μηχανισμοί που φαίνεται να σχετίζονται με τον τρόπο δράσης είναι ο ανταγωνισμός (Larkin *et al.*, 1993. Lemanceau *et al.*, 1993, Postma and Rattink, 1992) και η επαγόμενη διασυστηματική αντοχή των φυτών (ISR) (Biles *et al.*, 1989, Fuchs *et al.*, 1997, Kroon *et al.*, 1992, Larkin and Fravel, 1999. Mandeel and Baker, 1991; Olivain *et al.*, 2006).

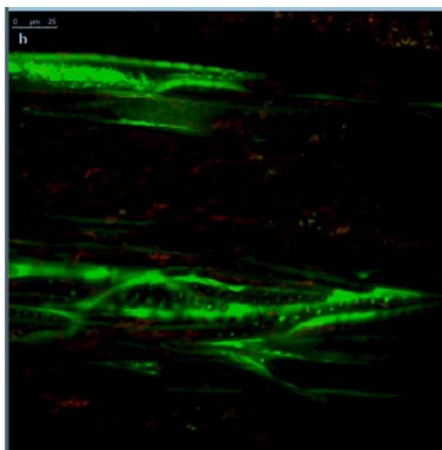
Ο ανταγωνισμός που φαίνεται να είναι ο πιθανός μηχανισμός δράσης γίνεται είτε για θρεπτικά στοιχεία στο έδαφος και στη ριζόσφαιρα (Couteaudier and Alabouvette, 1990 Larkin and Fravel, 1999. Lemanceau *et al.*, 1993. Postma and Rattink, 1992) όπως έδειξαν για τα στελέχη 618.12 οι Postma και Rattink το 1992 και για τα στελέχη C5 και C14 οι Mandeel και Baker το 1991 και οι Larkin και Fravel το 1999 για το στέλεχος Fo47, είτε για τον παρασιτισμό και τον ανταγωνισμό για σημεία μόλυνσης στο ριζικό σύστημα (Eparvier and Alabouvette, 1994. Mandeel and Baker, 1991. Schneider, 1984). Ωστόσο οι Mandeel and Baker το 1991 απέδειξαν ότι η απομόνωση C14 ανταγωνίζεται το στέλεχος *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* για σημεία που είναι ευαίσθητα για μόλυνση στις ρίζες των αγγουριών παρά ανταγωνίζονται για θρεπτικά συστατικά. Αυτός είναι και ο πιο πιθανός μηχανισμός για την επίδραση που έχει σαν βιολογικός παράγοντας.

Για την αντιμετώπιση της αδροφουζαρίωσης του γαρύφαλλου από το μύκητα *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*, χρησιμοποιούνται ανταγωνιστικά φουζάρια που απομονώνονται από υγιή εδάφη με υψηλή ικανότητα να αποικίζουν τη ριζόσφαιρα φυτών (Garibaldi *et al.*, 1990). Ο ανταγωνισμός αυτός πάλι, φαίνεται να γίνεται για τις θέσεις εισόδου από το ριζικό σύστημα (Cugudda and Garibaldi, 1987).

Πολλά μη παθογόνα στελέχη *F. oxysporum* έχουν χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο καλλιεργειών όπως η μπανάνα (Gerlach *et al.*, 1999), ο βασιλικός (Fravel and Larkin, 2002), το αγγούρι (Mandeeel and Bakker, 1991), το κυκλάμινο (Minuto *et al.* 1995), τη φράουλα (Tezuka and Makino, 1991), το λινάρι (Alabouvette *et al.*, 1993), το καρπούζι (Larkin *et al.*, 1996) και τη τομάτα (Lemancheu and Alabouvette, 1991).

Το στέλεχος F2 απομονώθηκε από ένα τροποποιημένο είδος οργανικά ζυμωμένου υποστρώματος, το οποίο αναφέρθηκε ότι μειώνει τα συμπτώματα της ασθένειας που προκαλεί το παθογόνο *Verticillium dahliae* και τα συμπτώματα της αδρομύκωσης σε φυτά μελιτζάνας τόσο σε θερμοκήπια όσο και σε υπαίθριες καλλιέργειες (Malandraki *et al.*, 2008. Pantelides *et al.*, 2009, Gizi *et al.*, 2011). Οι Malandraki *et al.* έδειξαν το 2008 την αποτελεσματικότητα του στελέχους F2 σε πειράματα σε θερμοκήπιο και σε πειράματα αγρού. Σε αυτά τα πειράματα η εφαρμογή του βιολογικού παράγοντα F2 μείωσε την σχετική AUDPC (Area Under Disease Progress Curve) σχεδόν 4 φορές σε σύγκριση με το μάρτυρα (Εικόνα 1.4).

Επίσης, το ποσοστό της ασθένειας σε προσβεβλημένα από βερτισιλλίωση φυτά μελιτζάνας που είχε γίνει ριζοπότισμα με F2, ήταν πολύ μικρότερο σε σχέση με το μάρτυρα σε πειράματα που έκαναν οι Pantelides *et al.*, (2009), γεγονός που δείχνει ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ του παθογόνου και του βιολογικού παράγοντα.



Εικόνα 1.4 Αποικισμός των ριζών φυτών μελιτζάνας από το μη παθογόνο στέλεχος F2. Επάνω, όπως φαίνεται μια μέρα μετά την έγχυση 10μl του F2 (10^7 cfu/ml) με τη μέθοδο της έγχυσης. Κάτω, ο αποικισμός των αγγείων του φυτού μια εβδομάδα μετά την εφαρμογή της έγχυσης. Πηγή: Gizi *et al.*, 2011.

Αν και αρκετά στελέχη *F. oxysporum* έχουν χαρακτηριστεί ως πιθανοί βιολογικοί παράγοντες εναντίον αδροφουζαριώσεων (Larkin *et al.*, 1998, Lemanceau *et al.*, 1991, Postma *et al.*, 1992) δεν υπάρχουν αναφορές για μείωση του μολύσματος του *V. dahliae* από στελέχη βιολογικού παράγοντα *F. oxysporum*, εναντίον της βερτισιλλιώσεως στον αγρό. Για τους ανωτέρω λόγους είναι σημαντικό να διερευνηθεί περαιτέρω ο τρόπος δράσης του παράγοντα F2 εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *V. dahliae* και να αναγνωριστούν οι μηχανισμοί δράσης αυτού του πιθανού βιολογικού παράγοντα, ο οποίος μέχρι τώρα έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τα ποσοστά μολύσματος σε παθογόνα είδη *F. oxysporum*.

1.2.4. Κίνδυνοι από τη χρήση βιολογικών παραγόντων

Η εισαγωγή βιολογικών παραγόντων, γενετικά τροποποιημένων ή όχι, χρειάζεται προσεκτική αξιολόγηση της επίδρασης που θα έχει στο περιβάλλον που θα εισαχθεί (Gullino *et al.*, 1995). Οι βιολογικοί ανταγωνιστές που θα χρησιμοποιηθούν πρέπει να είναι γενετικά σταθεροί μετά την εισαγωγή τους στο εδαφικό περιβάλλον και θα πρέπει να είναι ικανοί να επιζήσουν, να πολλαπλασιαστούν και να διατηρηθούν για να συνεχίσει να υφίσταται επαρκής ανταγωνιστική βιολογική δραστηριότητα του παράγοντα χωρίς να παρεμβαίνει στην υπάρχουσα μικροχλωρίδα του εδάφους.

Οι ενδεχόμενοι κίνδυνοι από τη χρήση των βιολογικών παραγόντων είναι ότι σε εφαρμογή σε μεγάλη κλίμακα του *F. oxysporum*, πρέπει να γίνει προσεκτική μελέτη του δυναμικού που μεταφέρεται μεταξύ των στελεχών λόγω της γενετικής συγγένειας των ανταγωνιστών με το παθογόνο *F. oxysporum* (Gullino *et al.*, 1995).

1.3 Το Αμυντικό Σύστημα των φυτών

Τα φυτά εκτίθενται συνεχώς σε ένα μεγάλο αριθμό παθογόνων. Κατά τη διάρκεια της εξελικτικής τους πορείας ανέπτυξαν όμως διάφορα συστήματα άμυνας ώστε να μπορέσουν να προστατευτούν από ενδεχόμενη μόλυνση από διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς. Για να αποβούν μολυσματικά τα περισσότερα παθογόνα πρέπει να αποκτήσουν πρόσβαση στο εσωτερικό του φυτού, είτε διαπερνώντας απευθείας τη φυλλική ή ριζική επιφάνεια, είτε εισερχόμενα από πληγές ή φυσικά ανοίγματα στα φύλλα όπως

είναι τα στομάτια. Τα φυτά σε αντίθεση με τα θηλαστικά, δεν διαθέτουν κινούμενα αμυντικά κύτταρα. Για να αποφύγουν την προσβολή, βασίζονται στον αμυντικό μηχανισμό κάθε μεμονωμένου κυττάρου καθώς και στην παραγωγή διασυστηματικών σημάτων προερχόμενα από το σημείο της αρχικής προσβολής. Τα φυτά έχουν αναπτύξει έναν παθητικό μηχανισμό και έναν ιδιαίτερα πολύπλοκο εγγενή μηχανισμό άμυνας. Ο πρώτος αποτελείται από φυσικούς παράγοντες άμυνας των φυτών δηλαδή ειδικές κατασκευές όπως φυσικοί φραγμοί της εφυμενίδας (κυτταρικά τοιχώματα, στομάτια, κηροί, τοξικοί μεταβολίτες). Ο δεύτερος έχει τη δυνατότητα να ενεργοποιείται μέσα σε λίγα λεπτά - ώρες από την πρώτη επαφή του φυτού με το παθογόνο το οποίο έχει τη δυνατότητα παραγωγής εξειδικευμένων μορίων όπως είναι οι διεγέρτες (elicitors) που ενεργοποιούν με τη σειρά τους εγγενείς μηχανισμούς ανθεκτικότητας των φυτών. Ο εγγενής ή ενεργητικός μηχανισμός άμυνας των φυτών, στον οποίο περιλαμβάνονται διάφοροι ιστολογικοί και βιοχημικοί μηχανισμοί, με τους οποίους τα φυτά αντιδρούν στην προσβολή από τα παθογόνα διαφοροποιείται βιοχημικά στα ακόλουθα συστήματα:

A) στο **βασικό ανοσοποιητικό σύστημα** (basal innate immune system), που ενεργοποιείται μέσα σε 10-30 min από την επαφή του παθογόνου με το φυτό.

B) στο **ανοσοποιητικό σύστημα των γονιδίων ανθεκτικότητας** (resistance (R) - gene-mediated mediated innate immune system) που ενεργοποιείται 2-3 h μετά την επαφή και την απελευθέρωση των διεγερτών από το παθογόνο στο φυτικό κύτταρο.

Γ) στην **επαγόμενη και επίκτητη διασυστηματική ανοχή** (Systemic Acquired Resistance και Induced Systemic Resistance) δηλαδή στη βιολογική, βιοχημική ή χημική διέγερση λανθανόντων μηχανισμών ανοχής των φυτών σε παθογόνα στα οποία τα διεγερμένα φυτά εμφάνιζαν ευαισθησία πριν από τη δράση των παραγόντων διέγερσης (Τζάμος, 2007).

1.3.1 Διεγέρτες-Τελεστές

Καθοριστική σημασία για την επαγωγή οποιουδήποτε αμυντικού μηχανισμού, είναι η έγκαιρη αναγνώριση του παθογόνου. Τα φυτά έχουν αποκτήσει την ικανότητα να αναγνωρίζουν μόρια που παράγονται από τα παθογόνα, όπως οι διεγέρτες (elicitors) και να τα χρησιμοποιούν για την επαγωγή ανοχής. Ο όρος διεγέρτης, που αρχικά αποδιδόταν σε κάθε ουσία που είχε τη δυνατότητα να προκαλέσει στα φυτά συσσώρευση φυτοαλεξινών,

δηλαδή μικρού μοριακού βάρους αντιμικροβιακές ενώσεις που παράγονται και συσσωρεύονται στα φυτά ως αποτέλεσμα μόλυνσης από φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς ή ως απόρροια της επίδρασης χημικών ή άλλης φύσεως μη παρασιτικών αιτίων, πλέον χρησιμοποιείται για να περιγράψει κάθε παράγοντα που προκαλεί οποιαδήποτε μορφή άμυνας (Nürnberg, 1999). Αυτός ο διευρυμένος ορισμός των διεγερτών περιλαμβάνει τόσο παράγοντες που προέρχονται από το παθογόνο (εξωγενείς διεγέρτες) όσο και χημικές ενώσεις που απελευθερώνονται από τα φυτά λόγω της δράσης του παθογόνου (ενδογενείς διεγέρτες) (Boller, 1995; Ebel and Cosio, 1994).

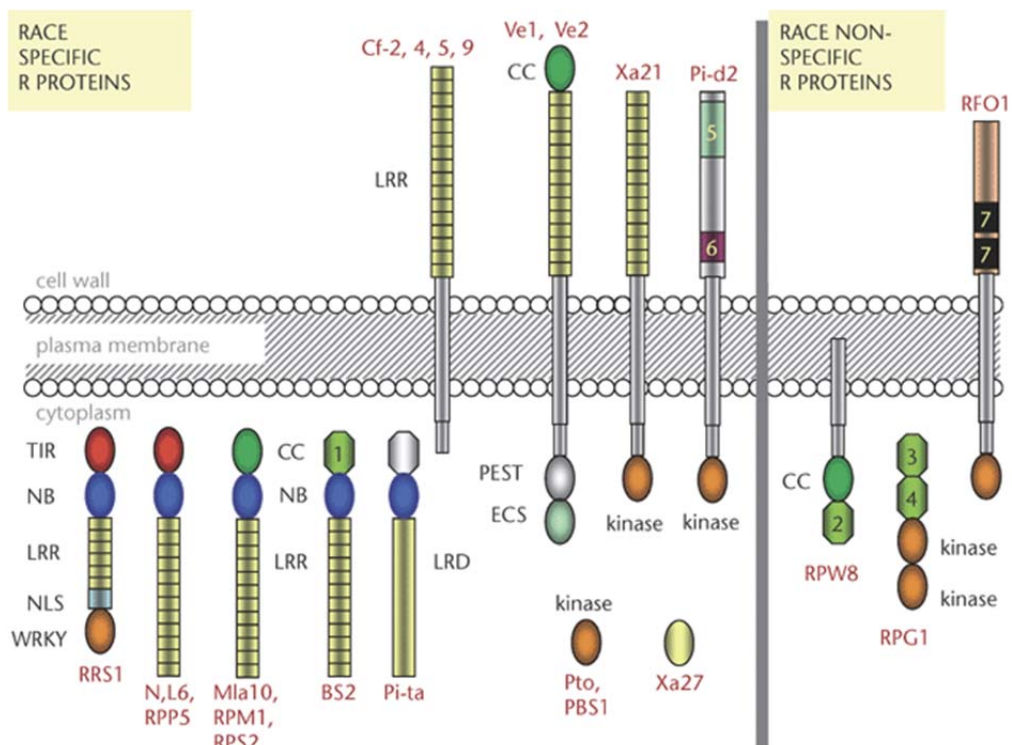
Οι διεγέρτες διακρίνονται σε γενικούς ή χωρίς εξειδίκευση προς τη φυλή (general or race-nonspecific) και εξειδικευμένους (race-specific). Οι γενικοί διεγέρτες επάγουν αμυντικές λειτουργίες σε όλες τις ποικιλίες ενός τουλάχιστον είδους φυτού, ή ακόμα και σε επίπεδο οικογένειας φυτών, ανεξάρτητα δηλαδή από το αν το φυτό είναι ξενιστής ή όχι του παθογόνου. Οι ειδικοί διεγέρτες θεωρείται ότι είναι άμεσα ή έμμεσα προϊόντα των γονιδίων αμολυσματικότητας (avirulence ή avr genes) που κωδικοποιούν τα φυτά και αναφέρονται με τον όρο «τελεστές» (effectors). Έτσι ένας εξειδικευμένος διεγέρτης που ενεργοποιείται ή παράγεται από ένα Avr γονίδιο που εδράζει σε μια συγκεκριμένη φυλή παθογόνου, προσδίδει αντοχή μόνο σε ποικιλίες φυτών-ξενιστών που διαθέτουν το αντίστοιχο γονίδιο.

Η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο τα φυτά αναγνωρίζουν τα «αντιγόνα» ή τους γενικούς διεγέρτες που παράγονται από τα διάφορα παθογόνα, βρίσκεται κυρίως στη δομή τους, καθώς αποτελούν συστατικά στοιχεία των κυτταρικών τοιχωμάτων των παθογόνων, όπως π.χ. τα λιποπολυσακχαρίτες (lipopolysaccharide-LPS) των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, οι γλυκάνες, οι χιτίνες και διάφορες πρωτεΐνες που προέρχονται από το κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων αλλά και η φλατζελίνη (flagellin) των βακτηρίων. Οι παράγοντες αυτοί περιγράφονται με τον όρο γενικοί διεγερτές Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs), που όπως έχει πρόσφατα διαπιστωθεί, προσδέονται σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης του φυτού, (pattern recognition receptors-PRRs) και ακολούθως ενεργοποιούν την έκφραση αντιμικροβιακών γονιδίων άμυνας και αντιμικροβιακών ενώσεων.

1.3.2 Πρωτεΐνες Ανθεκτικότητας

Τα τελευταία χρόνια έχουν απομονωθεί και προσδιορισθεί γονίδια ανθεκτικότητας (Resistance ή R genes) από πολλά καλλιεργούμενα φυτά ή φυτά-μοντέλα (*Arabidopsis thaliana*). Τα λειτουργικά γονίδια ανθεκτικότητας που έχουν απομονωθεί μέχρι σήμερα, συμβάλλουν στην ανθεκτικότητα σε μυκητολογικές, βακτηριολογικές και ιολογικές ασθένειες των φυτών και μοιάζουν δομικά με αντίστοιχες αμυντικές πρωτεΐνες των ασπονδύλων ζώων. Τα φυτά έχουν στο γονιδίωμα τους έναν μεγάλο αριθμό R πρωτεϊνών, πολύ μεγαλύτερο σε σχέση με τα ασπόνδυλα ζώα. Οι τελεστές που αναγνωρίζουν τις αντίστοιχες - συμπληρωματικές πρωτεΐνες ανθεκτικότητας (R proteins) των φυτών σε παρασιτικές ασθένειες (δρουν ως υποδοχείς) ονομάζονται γόνιοι αμολυσματικότητας (Avr genes) διότι καθιστούν μια συγκεκριμένη φυλή του παθογόνου μη μολυσματική στον συγκεκριμένο ξενιστή που φέρει το αντίστοιχο R γονίδιο (Εικόνα 1.5).

Παρά τη μεγάλη διαφοροποίηση μεταξύ των παθογόνων αναφορικά με τις ιδιότητες των τελεστών, οι γόνιοι ανθεκτικότητας των φυτών κωδικοποιούν πέντε κατηγορίες πρωτεϊνών-υποδοχέων (ανεξάρτητα από την κατηγορία του παθογόνου) που μπορεί να είναι είτε εξωκυτταρικοί είτε ενδοκυτταρικοί.



Εικόνα 1.5 Κατηγορίες Πρωτεϊνών ανθεκτικότητας στα φυτά (<http://www.els.net>)

1.3.3 Αλληλοαναγνώριση Ξενιστή-Παθογόνου

Η επαφή αποτελεί το πρώτο στάδιο επικοινωνίας του παθογόνου με τον ξενιστή. Για τη μετάβαση όμως στα επόμενα στάδια απαιτείται διείσδυση και εγκατάσταση του παθογόνου και μια σειρά γενετικών πληροφοριών που υπάρχουν σε παθογόνο και ξενιστή που θα εξασφαλίσουν την αλληλοαναγνώριση. Η αναγνώριση αποτελεί το βασικό βήμα σε οποιαδήποτε άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ παθογόνων ή μη παθογόνων και ξενιστών φυτών. Πρόκειται για σημαντικότερη βιοχημική και μοριακή διεργασία που παρέχει τη δυνατότητα στα παθογόνα να αναγνωρίζουν τους ξενιστές στο περιβάλλον τους και ειδικότερα εξειδικευμένες επιφάνειες και χαρακτηριστικά τους, για να εξασφαλίσουν τη διείσδυση και τη μόλυνση. Επιτυχημένα παθογόνα θεωρούνται εκείνα που κατά την αλληλεπίδραση τους με ένα ξενιστή αποφεύγουν τους διάφορους μηχανισμούς αμύνης των φυτών και επιτυγχάνουν τη μόλυνση. Διότι τα φυτά για να αντιμετωπίσουν τον εισβολέα έχουν αποκτήσει κατά τη διάρκεια της εξελικτικής τους πορείας ένα σύστημα πολλαπλών στρωμάτων ανθεκτικότητας (defense layers) κατά των παθογόνων και πολύπλοκους βιοχημικούς μηχανισμούς για να ανιχνεύουν τα διάφορα δυνητικά παθογόνα στο περιβάλλον τους και να ενεργοποιούν ακολούθως διάφορους μηχανισμούς αντοχής.

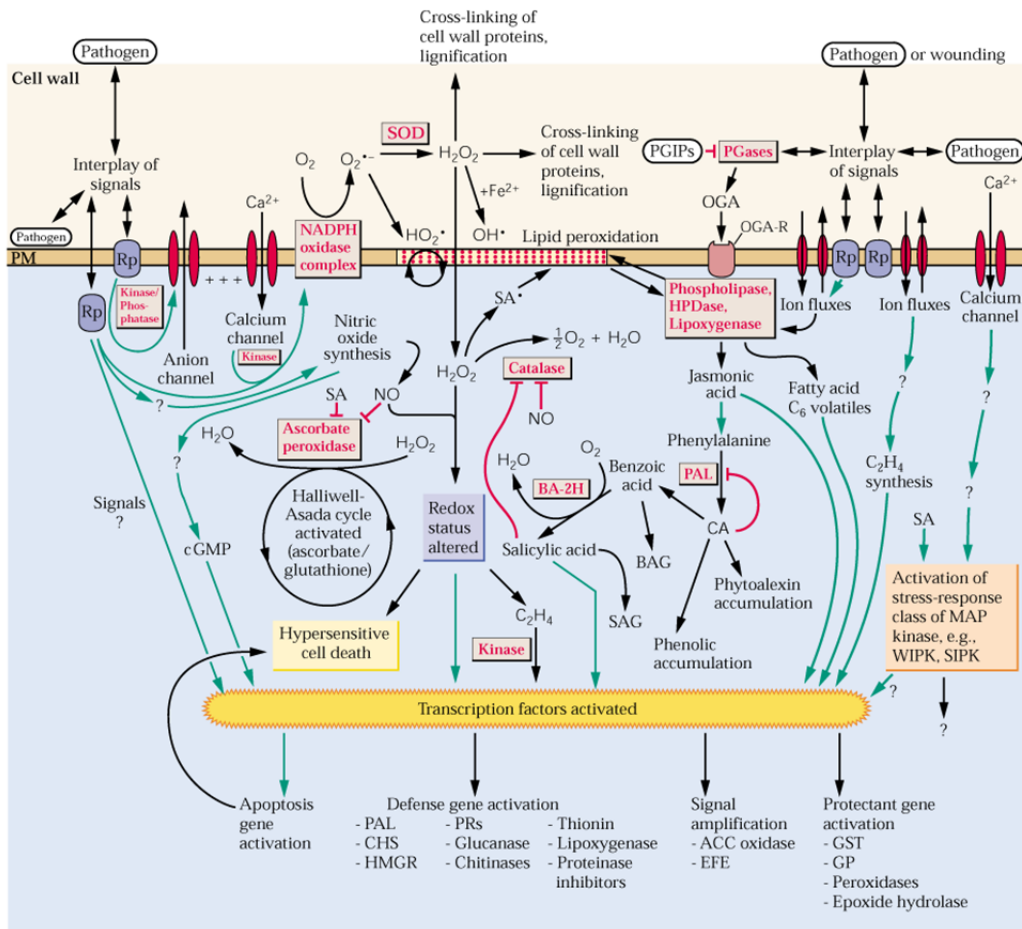
Η βαθμιαία εξέλιξη των ξενιστών-φυτών και των παθογόνων τους είναι παράλληλη όπως και η εξέλιξη της ασθένειας και της ανθεκτικότητας. Η αναγνώριση μεταξύ φυτοπαθογόνων και ξενιστών, ρυθμίζεται από εξειδικευμένες αντιδράσεις μεταξύ των γενετικών τόπων αμολυσματικότητας (Avr gene loci) ή τελεστών του παθογόνου και των αλληλομόρφων του αντιστοίχου γενετικού τόπου ανθεκτικότητας του ξενιστού (R locus) (ιδιαίτερως εκείνων που είναι υποχρεωτικά παράσιτα). Το απλούστερο μοντέλο που είναι υπεύθυνο για αντιδράσεις σε επίπεδο γονιδίων προϋποθέτει τα προϊόντα των γονιδίων αντοχής να αναγνωρίζουν βιοχημικά μηνύματα που προέρχονται από τους τελεστές των παθογόνων, ώστε να διεγείρουν την αλυσίδα μεταγωγής των σημάτων και τη διέγερση μηχανισμών αντοχής, που οδηγεί στην παρεμπόδιση εγκαταστάσεως του παθογόνου. Διάφοροι τελεστές επίσης έχουν σκοπό την καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος του φυτού με σκοπό την επιτυχή μόλυνση και εγκατάσταση του παθογόνου στον ξενιστή. Οι τελεστές επίσης έχουν την ικανότητα τροποποίησης διαφόρων πρωτεϊνών στα φυτικά κύτταρα με στόχο την ενίσχυση της μολυσματικής τους ικανότητας και τη διαφυγή τους από τον αμυντικό μηχανισμό του φυτού.

Η θεωρία του **γόνου προς γόνο** (gene-for-gene hypothesis) του μοριακού συμπλόκου Avr-R στην αλληλεπίδραση ξενιστών-παθογόνων, που διατυπώθηκε από τον Flor το 1971, αναπτύχθηκε και επιβεβαιώθηκε στην πράξη για κάποιες αλληλεπιδράσεις. Περιλαμβάνει την εξειδικευμένη αναγνώριση μιας πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από κυρίαρχους γόνους αμολυσματικότητας (*Avr*) του παθογόνου, μέσω μιας συμπληρωματικής πρωτεΐνης του φυτού που κωδικοποιείται από ένα κυρίαρχο γόνο ανθεκτικότητας (*R*). Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, όταν ένα από τα γονίδια αμολυσματικότητας (*Avr* gene) ή το αντίστοιχο γονίδιο ανθεκτικότητας (*R* gene) δεν εκφράζεται, τότε δεν παρατηρείται αλληλοαναγνώριση με αποτέλεσμα η σχέση ξενιστή - παθογόνου να είναι ασύμβατη και να εκδηλώνεται η ασθένεια. Στην περίπτωση όμως που και τα δύο αντιδρώντα μέλη, δηλαδή η Avr πρωτεΐνη και η αντίστοιχη συμπληρωματική πρωτεΐνη ανθεκτικότητας (*R* protein) είναι παρόντα παρατηρείται αναγνώριση, που οδηγεί σε ασύμβατη σχέση που εκδηλώνεται με αντοχή του φυτού στο παθογόνο κυρίως με την αντίδραση υπερευαισθησίας. Σε μερικές περιπτώσεις έχουν περιγραφεί πρωτεΐνες αμολυσματικότητας που αναγνωρίζονται από 2 πρωτεΐνες ανθεκτικότητας ή και το αντίστροφο πολλές πρωτεΐνες αμολυσματικότητας να αναγνωρίζονται από μια πρωτεΐνη ανθεκτικότητας (Hammond-Kosack and Jones, 2000).

Η έλλειψη αποδεικτικών στοιχείων της άμεσης επαφής σε διάφορους συνδυασμούς R-Avr πρωτεϊνών οδήγησε τους Van der Biezen και Jones (1998) στη διατύπωση της υπόθεσης του φρουρού. Με βάση αυτό το μοντέλο οι R πρωτεΐνες ενεργοποιούν τους μηχανισμούς άμυνας όταν έρθουν σε επαφή με μια άλλη πρωτεΐνη του φυτού (“φρουρούμενη”) που γίνεται στόχος και τροποποιείται από το παθογόνο στην προσπάθεια του να δημιουργήσει μέσα στο φυτό ευνοϊκό για την ανάπτυξή του περιβάλλον. Η άμυνα του φυτού ενεργοποιείται όταν η R πρωτεΐνη εντοπίσει οποιαδήποτε προσπάθεια επίθεσης στη «φρουρούμενη» πρωτεΐνη της, γεγονός που δεν καθιστά απαραίτητη την άμεση αλληλεπίδραση ανάμεσα στις R και Avr πρωτεΐνες (McDowell and Woffenden, 2003). Με την υπόθεση του φρουρού ερμηνεύτηκε το γεγονός ότι η R πρωτεϊνική κινάση Pto αναγνωρίζει και προσδένεται στον τελεστή AvrPto έμμεσα μέσω της NB-LRR πρωτεΐνης Prf με σκοπό να δραστηριοποιήσει το εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα. Σε ένα άλλο παράδειγμα, ο τελεστής Avr2 του μύκητα *Fulvia fulva* εκκρίνεται από το μύκητα στον αποπλαστικό χώρο φυτών τομάτας και αλληλεπιδρά με την εξωκυτταρική πρωτεάση της κυστεΐνης (cysteine protease) Rcr3 της τομάτας. Στη συνέχεια το σύμπλοκο Rcr3-Avr2 σε

συνδυασμό με την πρωτεΐνη ανθεκτικότητας Cf-2 ενεργοποιεί το εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα και την αντίδραση υπερευαισθησίας (Τζάμος, 2007).

Τα φυτά μέσω του **εγγενούς ενεργητικού ανοσοποιητικού συστήματος** αντιλαμβάνονται τα αρχικά στάδια προσβολής από τα διάφορα παθογόνα και μεταφέρουν αυτή την επαφή σε μια σειρά βιοχημικών αντιδράσεων που οδηγούν στην ΑΥ (Εικόνα Υ). Η αναγνώριση του παθογόνου γίνεται άμεσα με διάφορες αλλαγές που συμβαίνουν στη βιοχημική σύσταση των κυττάρων όπως στη σύσταση των μεμβρανών σε ιόντα, τοπική συσσώρευση μικρομοριακών ενώσεων (σαλικυλικό οξύ, οξειδία του αζώτου (NO), ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) οι οποίες είναι σε θέση να κατευθύνουν τα κύτταρα σε Προγραμματισμένο Κυτταρικό Θάνατο (Hammond-Kosack and Jones, 1996, 1997, Lamb and Dixon, 1997, Shirasu and Schulze-Lefert, 2000, Mur, 2006). Επιπλέον, τα φυτά προσπαθούν να ενισχύσουν το αμυντικό τους σύστημα και με άλλους τρόπους όπως είναι η εναπόθεση στα κυτταρικά τους τοιχώματα στρωμάτων λιγνίνης και καλλόζης για ενίσχυση των φυσικών φραγμών του φυτού και τη σύνθεση αντιμικροβιακών μεταβολιτών όπως οι φυτοαλεξίνες για να εμποδίσουν την ανάπτυξη των παθογόνων (Εικόνα. 1.6).



Εικόνα. 1.6 Βιοχημικά μονοπάτια μεταγωγής του σήματος που οδηγούν στην ενεργοποίηση και συγχρονισμό των αμυντικών μηχανισμών των φυτών. Οι πρωτεΐνες υποδοχείς των φυτών (RP) αναγνωρίζουν τα σήματα που προέρχονται από το παθογόνο ή σχετίζονται με αλληλεπιδράσεις. Αυτά τα σήματα περιλαμβάνουν τα άμεσα ή έμμεσα προϊόντα των *Anr* γονιδίων, της φυσικής επαφής και των γενικών συστατικών στοιχείων κάθε οργανισμού, όπως η χιτίνη, τα ένζυμα και τα στοιχεία του φυτικού κυττάρου. Οι πρωτεΐνες υποδοχείς των φυτών μπορεί να είναι ή να μην είναι προϊόντα των R γονιδίων. Η άμεση παραγωγή σήματος σε μεταγενέστερα στάδια της μόλυνσης δεν είναι γνωστή σαν διαδικασία αλλά περιλαμβάνει κινάσες, φωσφατάσες, G πρωτεΐνες και ροή ιόντων. Διάφορα ξεχωριστά και άμεσα ενεργοποιούμενα γεγονότα αναγνωρίζονται, όπως η παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) και μονοξειδίου του αζώτου, και η άμεση επαγωγή μεταγραφής αμυντικών γονιδίων (ή πιθανόν και γονιδίων απόπτωσης). Ενίσχυση της αρχικής αμυντικής λειτουργίας συμβαίνει μέσω της παραγωγής πρόσθετων συστατικών σήματος, όπως άλλες ROS, υπεροξειδωμένα λιπίδια, βενζοϊκό οξύ (BA), σαλικυλικό οξύ (SA), ιασμονικό οξύ (JA) και αιθυλένιο (ET). Αυτό με τη σειρά του επάγει άλλα σχετιζόμενα με την άμυνα γονίδια και τροποποιεί αμυντικές πρωτεΐνες και ένζυμα. Ταυτόχρονες αλλαγές στην οξειδαναγωγική κατάσταση του κυττάρου ή η κυτταρική καταστροφή θα ενεργοποιήσουν προσηματοποιημένους μηχανισμούς για τη κυτταρική προστασία (Halliwell-Asada κύκλος, plastid-localized superoxide dismutase SOD και ένζυμα καταλάσης) και επάγουν γονίδια που κωδικοποιούν διάφορα συστατικά που προστατεύουν το κύτταρο. Η πίεση που προκαλείται από την άμυνα μπορεί επίσης να επάγει κυτταρικό θάνατο. Επικοινωνία μεταξύ των μονοπατιών σήμανσης φαίνεται να συντονίζει τις λειτουργίες. Ένα πράσινο βέλος υποδεικνύει τις θετικές αντιδράσεις και η κόκκινη γραμμή τις αρνητικές (Προσαρμογή από Hammond-Kosack and Jones, 2000).

1.3.4. Επίκτητη και Επαγόμενη Διασυστηματική Αντοχή των Φυτών

Η επίκτητη (systemic acquired resistance, SAR) και η επαγόμενη διασυστηματική αντοχή (induced systemic resistance, ISR), είναι η βιολογική, βιοχημική ή χημική διέγερση λανθανόντων μηχανισμών αντοχής, ώστε ένα φυτό ευπαθές σε ένα σύστημα ξενιστή-παθογόνου, να καθίσταται ανθεκτικό στο ίδιο αυτό σύστημα. Έχει επικρατήσει η «διασυστηματική αντοχή» να αποδίδεται και με το γενικό όρο «Ανοσοποίηση» (Τζάμος, 2007). Η εκδήλωση της επίκτητης διασυστηματικής αντοχής έχει επαληθευτεί σε διάφορα δικοτυλήδωνα και μονοκοτυλήδωνα είδη και η ανθεκτικότητα που προσδίδει είναι αποτελεσματική ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα ιών, βακτηρίων, ωομυκήτων, και μυκήτων. Η επίκτητη διασυστηματική αντοχή, είναι η άμυνα των φυτών σε «δεύτερο χρόνο», και επάγεται μετά το σχηματισμό της αντίδρασης υπεραισθησίας στο παθογόνο. Αρχικά η επίκτητη ανθεκτικότητα εστιάζεται γύρω από το σημείο της νέκρωσης που προκαλείται από το παθογόνο ή το χημικό παράγοντα, οπότε καλείται τοπική επίκτητη αντοχή. Ακολούθως η ανθεκτικότητα μεταδίδεται διασυστηματικά μέσω κάποιου άγνωστου μέχρι σήμερα μορίου-σήματος και αναπτύσσεται σε απομακρυσμένα, μη προσβεβλημένα μέρη του φυτού οπότε καλείται επίκτητη διασυστηματική αντοχή (Agiros, 2005). Στο καπνό για παράδειγμα, η ανθεκτικότητα που επάγεται από το γονίδιο ανθεκτικότητας N ενάντια στον ιό του μωσαϊκού του καπνού (TMV), προστατεύει το φυτό από ακόλουθη μόλυνση από την φυλή TMV αλλά και από άλλα παθογόνα του καπνού που δοκιμάστηκαν (Hammond-Kosack and Jones, 2000). Αντίστοιχη διαδικασία με τη διασυστηματική αντοχή είναι και η επαγόμενη αντοχή των φυτών που ενεργοποιείται από βιολογικούς παράγοντες που δεν προκαλούν τοπική νέκρωση όπως πχ. βακτήρια της ριζόσφαιρας.

Επιπλέον, η ανοσοποίηση εκφράζεται με δύο μορφές μία που έχει τοπικό χαρακτήρα και μία με διασυστηματικό χαρακτήρα. Δηλαδή, όταν έχουμε τοπικό χαρακτήρα η νέκρωση συμβαίνει τοπικά με τη μορφή αντίδρασης υπερευαισθησίας ενώ στη διασυστηματικού τύπου η άμυνα του φυτού εκφράζεται πέραν του σημείου μόλυνσης και σε άλλα σημεία.

1.3.5. Επαγόμενη διασυστηματική αντοχή από ριζοσφαιρικά βακτήρια

Η εφαρμογή διαφόρων ριζοσφαιρικών βακτηρίων σε φυτά έχει βρεθεί ότι επάγουν μηχανισμούς άμυνας ενάντια σε παθογόνα και προστατεύουν τα φυτά. Αυτός ο μηχανισμός

χαρακτηρίζεται και ως ανοσοποίηση. Η εφαρμογή αυξητικών ριζοσφαιρικών βακτηρίων (Plant Growth Promoting Rizobacteria- PGPR) οδηγεί σε καθυστέρηση στην έκφραση συμπτωμάτων της ασθένειας καθώς και σε μείωση της έντασης της ασθένειας. Παράλληλα, επάγονται μηχανισμοί άμυνας που βοηθούν στη διασυστηματική προστασία των φυτών από φυτοπαθογόνους μύκητες, βακτήρια και ιούς (Τζάμος, 2007).

Τα κυριότερα γένη των αυξητικών ριζοβακτηρίων που χρησιμοποιούνται είναι τα γένη *Bacillus* και *Pseudomonas*. Η μέγιστη έκφραση της επαγόμενης διασυστηματικής αντοχής γίνεται όταν προκαλείται νέκρωση στο φυτικό ιστό, όχι όμως απαραίτητα και από την εκδήλωση αντίδρασης υπερευαισθησίας. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί μια ταχεία ανάπτυξη του φυτού που εφαρμόζονται τα ριζοσφαιρικά βακτήρια και συνήθως δεν παρουσιάζουν κανένα σύμπτωμα στο φυτό.

Τα ριζοβακτήρια μπορούν να καταστείλουν την ασθένεια μέσω της επαγωγής λανθανόντων μηχανισμών άμυνας. Η επαγωγή εξαρτάται από το βαθμό αποίκησης του βακτηρίου στο ριζικό σύστημα του φυτού, που θα γίνει με την εφαρμογή αιωρήματος πριν τη φύτευση, κατά τη μεταφύτευση ή με την επίπαση του σπόρου με βακτήρια υπό μορφή σκόνης (τάλκ). Επειδή σημαντικό ρόλο παίζει ο βαθμός αποίκησης του ριζοβακτηρίου, είναι επιβεβλημένο να εφαρμοστεί μια ποσότητα από το ριζοβακτήριο με συγκέντρωση τουλάχιστον 10^5 cfu/gr ριζόσφαιρας.

Ορισμένα βακτήρια παρουσιάζουν την ικανότητα να εισέρχονται από τη ρίζα και να αποικίζουν ενδοφυτικά το φυτό. Αυτά τα ριζοβακτήρια φαίνεται να επάγουν σε μεγαλύτερο βαθμό μηχανισμούς άμυνας από ότι τα υπόλοιπα ριζοβακτήρια.

1.3.6. Πρωτεΐνες παθογένειας

Στις ασύμβατες σχέσεις μεταξύ ξενιστή και παθογόνου, η βλάβη που προκαλείται από το παθογόνο περιορίζεται σαν αποτέλεσμα της άμυνας του φυτού ενάντια στο μικροοργανισμό. Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η αντίδραση υπερευαισθησίας στην οποία προκαλείται ταχύτατη νέκρωση στα γύρω κύτταρα του σημείου της εισβολής του παθογόνου με αποτέλεσμα τον περιορισμό του παθογόνου στο σημείο αυτό και την αντοχή του φυτού. Σε αυτήν την περίπτωση ιόντα μετακινούνται στην κυτταρική μεμβράνη, δημιουργούνται ενεργές ρίζες οξυγόνου, αλλάζει η φωσφορυλίωση των

πρωτεϊνών και ενεργοποιείται το αμυντικό σύστημα των φυτών με τη συσσώρευση φυτοαλεξινών, λιγνιτοποίηση και πάχυνση των κυτταρικών τοιχωμάτων.

Επιπλέον, ενεργοποιείται η έκκριση διαφόρων πρωτεϊνών, των πρωτεϊνών παθογένειας (PR proteins, Pathogenesis Related Proteins) οι οποίες φαίνεται ότι εκκρίνονται από το φυτό-ξενιστή σε κατάσταση εισβολής ενός παθογόνου ή σε άμυνα. Αυτές εμφανίζονται όχι μόνο τοπικά στο σημείο της μόλυνσης αλλά και με την ανάπτυξη της επαγόμενης διασυστηματικά αντοχής (SAR- Systemic Acquired Resistance) όπου κάποιο σήμα μεταφέρεται σε όλο το φυτό για την άμυνα εναντίον σε νέα μόλυνση από άλλους μύκητες, ιούς και βακτήρια.

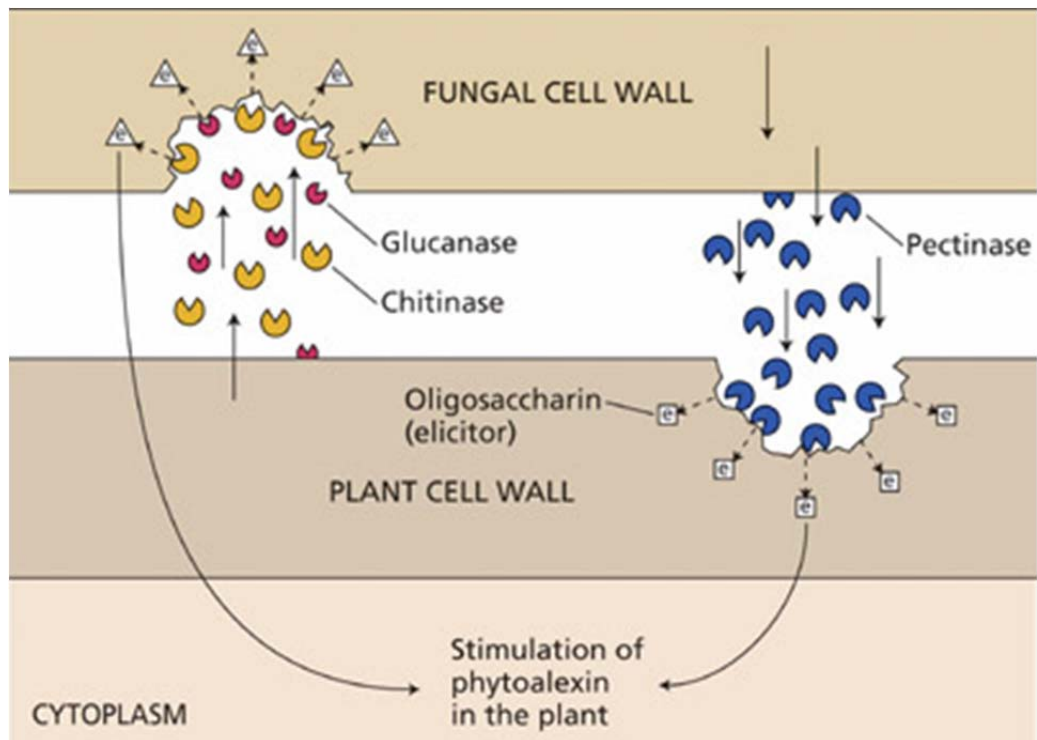
Η επαγόμενη αντοχή στα φυτά (ISR) είναι μια συνηθισμένη απόκριση σε μη παθογόνα βακτήρια, ιούς και μύκητες και επιτυγχάνεται με τη μόλυνση ενός φυτού με ένα μη παθογόνο ή αμολυσματικό παράγοντα πριν τη μόλυνση από ένα παθογόνο μικροοργανισμό. Εφ' όσον η επαγόμενη αντοχή ξεκινήσει, τότε το φυτό εκφράζει ένα μεγάλο αριθμό επαγόμενων αποκρίσεων που περιλαμβάνουν την παραγωγή λυτικών ενζύμων των κυτταρικών τοιχωμάτων των παθογόνων όπως οι χιτινάσες και γλουκανάσες, η σύνθεση φυτοαλεξινών, η ενίσχυση των κυτταρικών τοιχωμάτων του φυτού με την ενεργοποίηση των περοξειδασών και η εναπόθεση λιγνίνης και καλλόζης.

Οι χιτινάσες και οι γλουκανάσες αποτελούν πρωτεΐνες παθογένειας (PR-proteins) και αυξάνεται η έκκριση τους σε συνθήκες άμυνας των φυτών, καθώς είναι αντιμικροβιακές ενώσεις. Έτσι, μετά την επαφή των φυτών με παθογόνα παράγονται μικρού μοριακού βάρους ενώσεις. Οι χιτινάσες και οι γλουκανάσες (PR3 και PR2, αντίστοιχα) είναι οι μοναδικές κατηγορίες που έχει διααφημιστεί πλήρως ο ρόλος τους.

	Κατηγορία
PR-1	Άγνωστη
PR-2	β-1,3- γλουκανάσες
PR-3	Χιτινάσες τύποι I, II, III,IV, V,VI,VII
PR-4	Χιτινάσες τύποι I, II
PR-5	Θαυματίνες (Thaumatin-like proteins)
PR-6	Αναστολείς Πρωτεασών (Proteinase inhibitors)
PR-7	Ενδοπρωτεάσες
PR-8	Χιτινάσες τύπος III
PR-9	Περοξειδάσες
PR-10	Ριβονουκλεάσες (Ribonuclease-like proteins)
PR-11	Χιτινάσες τύπος I
PR-12	Defensins
PR-13	Thionins
PR-14	Lipid transfer proteins

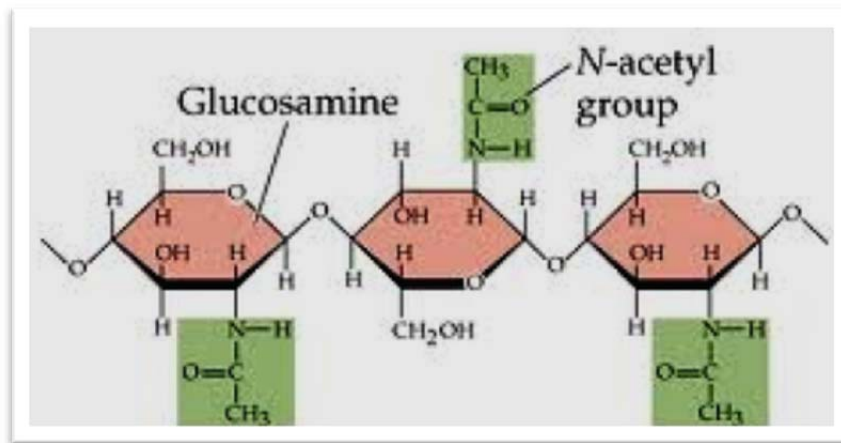
Πηγή: Van Loon, 1999

Οι χιτινάσες και οι γλουκανάσες, ως προς τη βιολογική τους δράση, έχουν την ικανότητα να υδρολύουν τις χημικές δομές πολυσακχαριτών των κυτταρικών τοιχωμάτων των μυκήτων και με αυτόν τον τρόπο να εμποδίζουν τη μόλυνση από παθογόνα (Collinge et al,1993). Επιπλέον, τα αποσυντιθέμενα κυτταρικά τοιχώματα των μυκήτων λειτουργούν ως διεγέρτες (elicitors) για την έναρξη και άλλων μηχανισμών άμυνας του φυτού-ξενιστή. Επίσης, οι γλουκανάσες και οι χιτινάσες είναι γνωστό ότι επάγουν την επίκτητη διασυστηματική ανοχή των φυτών (Systemic Acquired Resistance-SAR) η οποία προφυλάσσει τα φυτά από επόμενη προσπάθεια μόλυνσης από ίδιο ή διαφορετικό παθογόνο (Εικόνα 1.7).



Εικόνα.1.7 Οι χιτινάσες και οι γλουκανάσες αποδομούν τα κύτταρα των μυκήτων, καταστρέφοντας τους αλλά και δίνοντας σήματα για έναρξη και άλλων μηχανισμών άμυνας.
 Πηγή: <http://5e.plantphys.net/article.php?ch=t&id=436>

Η χιτίνη είναι ένα γραμμικό (1->4) πολυμερές της Ν-ακετυλο-D-γλουκοζαμίνης (N-Acetyl-D-Glucosamine) και είναι ένα από τα πιο γνωστά πολυμερή στη γη (Εικόνα 1.8). Η χιτίνη απαντάται σε ένα πλήθος οργανισμών, όπως αράχνες, στα κυτταρικά τοιχώματα των περισσότερων ανώτερα εξελικτικά μυκήτων, στον εξωσκελετό των εντόμων σαν βασικό δομικό συστατικό αυτού, σε οστρακοειδή, σε μερικά είδη ασπονδύλων και σαν εξωτερικό πολυμερές σε κάποια βακτήρια (Εικόνα 1.7) (Flach *et al* 1992, Gooday 1990, Tanaka *et al*).



Εικόνα 1.8 Πηγή: <http://www.scottsmithonline.com>

Η χιτίνη και τα παράγωγα της είναι ευρέως γνωστά και χρησιμοποιούνται σαν βιοιατρικά υλικά εξαιτίας της ποικιλότητας και βιοσυμβατότητας τους. Οι χιτινάσες είναι ένζυμα που παράγουν χιτο-ολιγοσακχαρίτες από τη χιτίνη. Η μέθοδος της ενεργοποίησης των χιτινασών είναι δύσκολη εξαιτίας των λίγων υποστρωμάτων που είναι διαθέσιμα.

Το ποσό χιτίνης που συντίθεται και ο ρυθμός σύνθεσης χιτίνης είναι περίπου 10^{10} έως 10^{11} τόνοι κάθε χρόνο, όπως αναφέρει ο Gooday, το 1994. Τα περισσότερα βιολογικά υλικά που παράγονται από χιτίνη τελικά καταλήγουν σε βιολογικά απόβλητα. Τα παράγωγα χιτίνης στα οποία η χιτίνη αποδομείται μερικώς από ενζυματικές ή χημικές διαδικασίες έχουν βρει εφαρμογή σε ορισμένους τομείς μη δραστηριότητας των ενζύμων και αυτά τα υλικά βοηθούν στην απόρριψη των βιομηχανικών αποβλήτων (Sakai *et al*, 1998).

Οι χιτινάσες μπορούν να απομονωθούν από βακτήρια, ιούς, ανώτερα φυτά και ζώα (Park *et al.*, 1997. Gooday, 1990). Τα υποστρώματα που θα χρησιμοποιηθούν εξαρτώνται από την ευκολία μέτρησης των χιτινασών. Η χιτίνη, η κολλοειδής χιτίνη, η χιτίνη που συνδέεται ομοιοπολικά με χρωστικές, η χιτίνη με τρίτιο αποτελούν αδιάλυτα υποστρώματα, σε αντίθεση με τη γλυκολική χιτίνη, την καρβοξυμεθυλική χιτίνη και την 6-O-υδροξυ-προπυλ-χιτίνη που είναι διαλυτά υποστρώματα και χημικά συντιθέμενες χιτίνες (Shen *et al*, 2010). Χρησιμοποιώντας αυτά τα υποστρώματα η δραστηριότητα των χιτινασών μπορεί να μετρηθεί με φασματοφωτόμετρο ή με ραδιόμετρο (Gomez Ramirez *et al*, 2004, Spindler, 1997). Τυπικά η μέτρηση της δραστηριότητας των χιτινασών υπολογίζεται μετρώντας την παραγωγή των μειούμενων σακχάρων (π.χ. χιτο-ολιγοσακχαριτών) με τη βοήθεια κολλοειδούς χιτίνης σαν υπόστρωμα. Τα μειούμενα σάκχαρα

αντιδρούν στην παρουσία ενός χρωματιστού αντιδραστηρίου σε δικαρβονικό νάτριο. Η απορρόφηση των προϊόντων της αντίδρασης μετράται σε φασματοφωτόμετρο στα 420 nm.

Οι γλουκανάσες έχουν την β-1,3- ενδογλουκανάση σε δραστηριότητα *in vitro* και διαχωρίζονται σε 3 υπο-ομάδες ανάλογα με την ανάλυση των αμινοξέων που έχει η κάθε μία. Η υπο-ομάδα I έχει μέγεθος περίπου 33 kDa και βρίσκεται συνήθως στα χυμοτόπια. Οι υπο-ομάδες II,III έχουν μέγεθος περίπου 36 kDa και περιλαμβάνουν όξινες, εξωκυττάρια πρωτεΐνες. Η βασική δομική διαφορά των υποομάδων I, II και III είναι ότι οι υπο-ομάδα I είναι πρόδρομες πρωτεΐνες που προορίζονται να είναι ενζυμικά ενεργές. Οι γλουκανάσες έχουν βρεθεί σε ένα πλήθος φυτών όπως ο καπνός, η *Arabidopsis thaliana*, διάφορα φρούτα, καρποί, φασόλια (Εικόνα 1.8) (Cote et al.,1991; Kim et al., 1997; Rezzonico et al., 1998).

1.4 Σκοπός της εργασίας

Η αδρομύκωση βερτισιλλίωση, που προκαλείται από το μύκητα *Verticillium dahliae* αποτελεί μια σημαντική ασθένεια για ένα μεγάλο εύρος φυτών που είναι ξενιστές του συγκεκριμένου παθογόνου και η οποία δεν αντιμετωπίζεται με χημικά μέσα. Οι βιολογικοί παράγοντες έχουν χρησιμοποιηθεί εδώ και αρκετά χρόνια για την αντιμετώπιση των αδρομυκώσεων σε διάφορα φυτά-ξενιστές. Από τα πειράματα αυτά φαίνεται ότι, για λόγους όπως ο ανταγωνισμός για θρεπτικά συστατικά, ο ανταγωνισμός ως προς τη θέση εισόδου από το ριζικό σύστημα και αποίκηση της ριζόσφαιρας, ο βιολογικός παράγοντας καταφέρνει να μειώσει τη δραστηριότητα του παθογόνου και έτσι να παρεμποδιστεί η εκδήλωση συμπτωμάτων και κατ' επέκταση και της ασθένειας στα φυτά-ξενιστές.

Στόχοι της παρούσης μελέτης είναι:

1. Η μελέτη διαφόρων τρόπων εφαρμογής του βιολογικού παράγοντα *Fusarium oxysporum* F2, όπως η έγχυση στο βλαστό αιωρήματος κονιδίων, η εφαρμογή χλαμυδοσπορίων σε αδρανή σκόνη (ταλκ) και το ριζοπότισμα αιωρήματος κονιδίων καθώς και η επίδραση τους στην εξέλιξη της ασθένειας και στην απόδοση της καλλιέργειας .
2. Η μελέτη της δραστηριότητας του αμυντικού συστήματος των φυτών και συγκεκριμένα της επαγωγής έκκρισης πρωτεϊνών παθογένειας όπως οι χιτινάσες και οι γλουκανάσες μετά την έγχυση του παράγοντα F2. Αυτές οι πρωτεΐνες είναι γνωστό ότι εκκρίνονται σε περιπτώσεις που ένα φυτό-ξενιστής έχει έρθει σε αλληλεπίδραση με κάποιο παθογόνο και το φυτό διεγείρει μηχανισμούς άμυνας για να προστατευτεί από την επικείμενη μόλυνση.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για να αναπτυχθεί το κάθε παθογόνο ήταν τα εξής:

- *Fusarium oxysporum*-στέλεχος F2 και *Verticillium dahliae*

Το θρεπτικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για ανάπτυξη των μυκήτων σε τρυβλίο ήταν PDA (Potato Dextrose Agar), ενώ το θρεπτικό υλικό για υγρή καλλιέργεια του μύκητα ήταν SSN (Sodium Nitrate Solution).

2.1 Θρεπτικό υλικό PDA

Για την παρασκευή 1L θρεπτικού υλικού PDA, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

1. Πατάτα	200 gr
2. Γλυκόζη	20 gr
3. Άγαρ	20 gr
4. Νερό (αποστειρωμένο και απεσταγμένο)	μέχρι V=1L

Η διαδικασία παρασκευής είναι η ακόλουθη:

Σε δύο κωνικές φιάλες των 1000 ml τοποθετούνται 500 ml απεσταγμένου νερού σε κάθε μία και τις βάζουμε να βράσει το νερό. Στη μια κωνική φιάλη των 1000 ml, τοποθετούνται τα 200 gr πατάτας, αφού τεμαχιστεί η πατάτα σε μικρά κομμάτια. Αφού ξεκινήσει ο βρασμός, χρονομετρούμε 45'. Στην άλλη κωνική τοποθετείται η γλυκόζη και το άγαρ. Αφού περάσουν τα 45', ακολουθεί η διήθηση της κωνικής με την πατάτα για να ληφθεί το εκχύλισμα. Γίνεται ανάμειξη με το περιεχόμενο της άλλης κωνικής και συμπληρώνεται απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 1000 ml ενώ τέλος γίνεται διαμοιρασμός σε φιάλες ώστε τελικά να γίνει αποστείρωση τους σε κλίβανο για 20', στους 120⁰C.

2.2 Θρεπτικό υλικό SSN

Για την παρασκευή 1L SSN, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

1. Σουκρόζη	15 gr
2. KH_4PO_4	1 gr
3. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 gr
4. NaNO_3	2 gr
5. KCl	0,5 gr
6. Διάλυμα ιχνοστοιχείων	1 ml

Για το διάλυμα ιχνοστοιχείων προστίθενται σε απιονισμένο νερό μέχρι να συμπληρωθούν 100 ml :

• $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	249 mg
• $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	40 mg
• $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	44 mg
• $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	41 mg
• $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	51 mg
7. Απεσταγμένο νερό	μέχρι $V_{\text{τελ}}=1\text{L}$

Η παρασκευή γίνεται με ανάδευση όλων των παραπάνω υλικών μέχρι να διαλυθούν πλήρως. Στη συνέχεια συμπληρώνουμε με απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 1L και το υλικό διαμοιράζεται σε κωνικές φιάλες των 250 ml (100 ml ανά φιάλη) και αποστειρώνονται σε κλίβανο για 20', στους 120 °C.

2.3 Εγκατάσταση στον αγρό των φυτών μελιτζάνας που έχει γίνει εφαρμογή του F2

Αρχικά, έγινε η εφαρμογή του βιολογικού παράγοντα F2 με τρεις διαφορετικές μεθόδους σε φυτάρια μελιτζάνας σε γλαστράκια στο θερμοκήπιο. Οι τρεις διαφορετικές μέθοδοι που εφαρμόστηκε το F2 ήταν με:

- έγχυση αιωρήματος κονιδίων, συγκέντρωσης 10^7 κονίδια/ml, στο βλαστό ακριβώς κάτω από το πρώτο φύλλο,

- χλαμυδοσπόρια του μη παθογόνου φουζαρίου που διατηρούνταν σε αδρανή σκόνη (τάλκ),
- ριζοπότισμα του αιωρήματος κονιδίων συγκέντρωσης 10^7 κονίδια/ml, απευθείας στο ριζικό σύστημα.

Όλες οι εφαρμογές έγιναν μια εβδομάδα πριν τη μεταφύτευση στον αγρό (σχεδιάγραμμα), ο οποίος είναι φυσικά μολυσμένος με το μύκητα *Verticillium dahliae* από παλαιότερα πειράματα που έχουν διεξαχθεί στον ίδιο χώρο και έχει υψηλό ποσοστό μολύσματος στο έδαφος.

8 ΜΕΤΡΑ

15 Μ Ε ΤΡ Α	1 ^Η	ΕΓΧΥΣΗ	ΧΛΑΜ/ΡΙΑ	ΜΑΡ/ΡΑΣ	ΡΙΖ/ΣΜΑ	ΜΑΡ/ΡΑΣ	ΕΓΧΥΣΗ	ΡΙΖ/ΣΜΑ	ΧΛΑΜ/ΡΙΑ
	ΣΕΙΡΑ	ΕΓΧΥΣΗ	ΧΛΑΜ/ΡΙΑ	ΜΑΡ/ΑΣ	ΡΙΖ/ΣΜΑ	ΜΑΡ/ΑΣ	ΕΓΧΥΣΗ	ΡΙΖ/ΣΜΑ	ΧΛΑΜ/ΡΙΑ
	2Η	ΕΓΧΥΣΗ	ΧΛΑΜ/ΡΙΑ	ΜΑΡ/ΑΣ	ΡΙΖ/ΣΜΑ	ΜΑΡ/ΑΣ	ΕΓΧΥΣΗ	ΡΙΖ/ΣΜΑ	ΧΛΑΜ/ΡΙΑ
	3Η	ΕΓΧΥΣΗ	ΧΛΑΜ/ΡΙΑ	ΜΑΡ/ΑΣ	ΡΙΖ/ΣΜΑ	ΜΑΡ/ΑΣ	ΕΓΧΥΣΗ	ΡΙΖ/ΣΜΑ	ΧΛΑΜ/ΡΙΑ
	4Η	ΕΓΧΥΣΗ	ΧΛΑΜ/ΡΙΑ	ΜΑΡ/ΑΣ	ΡΙΖ/ΣΜΑ	ΜΑΡ/ΑΣ	ΕΓΧΥΣΗ	ΡΙΖ/ΣΜΑ	ΧΛΑΜ/ΡΙΑ
	5Η	ΕΓΧΥΣΗ	ΧΛΑΜ/ΡΙΑ	ΜΑΡ/ΑΣ	ΡΙΖ/ΣΜΑ	ΜΑΡ/ΑΣ	ΕΓΧΥΣΗ	ΡΙΖ/ΣΜΑ	ΧΛΑΜ/ΡΙΑ
	6Η	ΜΑΡ/ΡΑΣ	ΕΓΧΥΣΗ	ΡΙΖ/ΣΜΑ	ΧΛΑΜ/ΡΙΑ	ΡΙΖ/ΣΜΑ	ΜΑΡ/ΡΑΣ	ΧΛΑΜ/ΡΙΑ	ΕΓΧΥΣΗ
	7Η	ΜΑΡ/ΡΑΣ	ΕΓΧΥΣΗ	ΡΙΖ/ΣΜΑ	ΧΛΑΜ/ΡΙΑ	ΡΙΖ/ΣΜΑ	ΜΑΡ/ΡΑΣ	ΧΛΑΜ/ΡΙΑ	ΕΓΧΥΣΗ
	8Η	ΜΑΡ/ΡΑΣ	ΕΓΧΥΣΗ	ΡΙΖ/ΣΜΑ	ΧΛΑΜ/ΡΙΑ	ΡΙΖ/ΣΜΑ	ΜΑΡ/ΡΑΣ	ΧΛΑΜ/ΡΙΑ	ΕΓΧΥΣΗ
	9Η	ΜΑΡ/ΡΑΣ	ΕΓΧΥΣΗ	ΡΙΖ/ΣΜΑ	ΧΛΑΜ/ΡΙΑ	ΡΙΖ/ΣΜΑ	ΜΑΡ/ΡΑΣ	ΧΛΑΜ/ΡΙΑ	ΕΓΧΥΣΗ
	10Η	ΜΑΡ/ΡΑΣ	ΕΓΧΥΣΗ	ΡΙΖ/ΣΜΑ	ΧΛΑΜ/ΡΙΑ	ΡΙΖ/ΣΜΑ	ΜΑΡ/ΡΑΣ	ΧΛΑΜ/ΡΙΑ	ΕΓΧΥΣΗ
	11Η	ΡΙΖ/ΣΜΑ	ΧΛΑΜ/ΡΙΑ	ΕΓΧΥΣΗ	ΜΑΡ/ΡΑΣ	ΕΓΧΥΣΗ	ΡΙΖ/ΣΜΑ	ΜΑΡ/ΡΑΣ	ΧΛΑΜ/ΡΙΑ
	12Η	ΡΙΖ/ΣΜΑ	ΧΛΑΜ/ΡΙΑ	ΕΓΧΥΣΗ	ΜΑΡ/ΡΑΣ	ΕΓΧΥΣΗ	ΡΙΖ/ΣΜΑ	ΜΑΡ/ΑΣ	ΧΛΑΜ/ΡΙΑ
	13Η	ΡΙΖ/ΣΜΑ	ΧΛΑΜ/ΡΙΑ	ΕΓΧΥΣΗ	ΜΑΡ/ΡΑΣ	ΕΓΧΥΣΗ	ΡΙΖ/ΣΜΑ	ΜΑΡ/ΑΣ	ΧΛΑΜ/ΡΙΑ
	14Η	ΡΙΖ/ΣΜΑ	ΧΛΑΜ/ΡΙΑ	ΕΓΧΥΣΗ	ΜΑΡ/ΡΑΣ	ΕΓΧΥΣΗ	ΡΙΖ/ΣΜΑ	ΜΑΡ/ΑΣ	ΧΛΑΜ/ΡΙΑ
15Η	ΡΙΖ/ΣΜΑ	ΧΛΑΜ/ΡΙΑ	ΕΓΧΥΣΗ	ΜΑΡ/ΡΑΣ	ΕΓΧΥΣΗ	ΡΙΖ/ΣΜΑ	ΜΑΡ/ΑΣ	ΧΛΑΜ/ΡΙΑ	

Σχεδιάγραμμα του αγρού. Κάθε επέμβαση αποτελούνταν από 30 φυτά που χωρίστηκαν με τυχαιοποιημένο σχέδιο σε 6 υπο-τεμάχια των 5 φυτών. Οι διαστάσεις του αγρού ήταν 8X15 μέτρα. Όπου Μαρ/ας=μάρτυρας, Χλαμ/ρια= Χλαμυδοσπόρια, Ριζ/σμα=Ριζοπότισμα.

Μεταφυτεύτηκαν 120 φυτά συνολικά, σε αποστάσεις 80X80 cm μεταξύ των φυτών και μεταξύ των σειρών. Χρησιμοποιήθηκαν 30 φυτά για μάρτυρες, 30 φυτά για την εφαρμογή με την έγχυση στο βλαστό του F2, 30 φυτά για την εφαρμογή με τα χλαμυδοσπόρια και 30 φυτά που είχε γίνει ριζοπότισμα.

Η κάθε επέμβαση χωρίστηκε σε 6 υπο-ομάδες των 5 φυτών και διαμοιράστηκαν με απλό τυχαιοποιημένο σχέδιο στον αγρό για να περιοριστούν οι ιδιομορφίες του μολύσματος στον αγρό.

Οι πρώτες μετρήσεις συμπτωμάτων ελήφθησαν 11 μέρες μετά τη φύτευση στον αγρό διότι λόγω ευαισθησίας του ξενιστή, της μελιτζάνας, των θερμοκρασιών που ήταν ευνοϊκές για την ανάπτυξη του μύκητα, τα συμπτώματα εμφανίστηκαν σχετικά γρήγορα. Στη συνέχεια, οι μετρήσεις καταγράφονταν κάθε εβδομάδα για να αξιολογηθεί το ποσοστό της ασθένειας των φυτών.

2.4 Προετοιμασία και εφαρμογή του φυτοπαθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae*

Μικρή ποσότητα DNA του μύκητα που βρισκόταν αποθηκευμένο στους -80°C σε γλυκερόλη (glycerol stock) παραλαμβάνονταν και εμβολιαζόταν σε θρεπτικό διάλυμα PDA (Potato Dextrose Agar). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν να παραληφθεί μικρή ποσότητα του μύκητα και υπό ασηπτικές συνθήκες η μεταφορά σε αποστειρωμένα τρυβλία με θρεπτικό υλικό PDA και εφαρμογή μεθόδου streaking (γραμμική διασπορά του μύκητα στην επιφάνεια του τρυβλίου για ομοιόμορφη ανάπτυξη). Τα τρυβλία αποθηκεύονταν σε θάλαμο με σταθερή θερμοκρασία 22°C . Η ανάπτυξη του μύκητα για περαιτέρω καλλιέργεια ήταν ικανοποιητική μετά από 4 περίπου ημέρες. Από τα τρυβλία γινόταν υπό ασηπτικές συνθήκες πάλι, μεταφορά μικρής ποσότητας βιομάζας του μύκητα μαζί με ποσότητα θρεπτικού υλικού PDA σε υγρό θρεπτικό υλικό SSN (Sodium Nitrate Solution), εκλεκτικό για την ανάπτυξη του μύκητα *Verticillium dahliae*. Οι κωνικές φιάλες που είχαν πρωτύτερα ετοιμαστεί με ποσότητα 100 ml του SSN και στις οποίες θα γινόταν ο εμβολιασμός αποστειρώνονταν σε κλίβανο για αποφυγή ανάπτυξης άλλων παθογόνων, και εν συνεχεία γινόταν μεταφορά της βιομάζας του μύκητα (μυκήλιο και κονίδια) στην κωνική φιάλη με το SSN. Στη συνέχεια, οι φιάλες μεταφέρονταν σε επωαστικό θάλαμο με σταθερή θερμοκρασία 22°C και με ειδικούς αναδευτήρες, που γινόταν συνεχής περιστροφική κίνηση (επί 24ώρου) με 120 στροφές το λεπτό. Η ανάπτυξη του μύκητα στο SSN, είχε φτάσει την επιθυμητή συγκέντρωση μετά από περίπου 5 ημέρες επώασης. Η επιθυμητή συγκέντρωση του μολύσματος για να επιτευχθεί τεχνητή μόλυνση στο εργαστήριο ήταν 10^7 κονίδια /ml μολύσματος. Ο έλεγχος της συγκέντρωσης του μολύσματος ελάμβανε χώρα ως εξής:

- Όλο το περιεχόμενο της καλλιέργειας με το SSN, μεταγγίζεται σε άλλη κωνική φιάλη με τη χρήση διάτρητου υφάσματος (τούλι) ώστε να διαπεράσουν τα κονίδια και να διαφύγουν στην κωνική
- Αναδεύεται πολύ καλά το υγρό SSN με τα κονίδια
- Σε ένα μικρό φιαλίδιο τύπου erpendorf (όγκου των 2 μl) προστίθεται 990 μl νερό απεσταγμένο και 10 μl από την κωνική (100X φορές αραιώση) δημιουργώντας έτσι ένα μικρό δείγμα του περιεχομένου της κωνικής
- Γίνεται ανάδευση, για 10'
- Με πιπέτα των 20 μl, ποσότητα 20 μl από την αραιωμένη καλλιέργεια τοποθετείται σε αιματοκυτταρόμετρο πάνω και κάτω αντίστοιχα της χαραγής
- Τοποθετείται το αιματοκυτταρόμετρο σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και μετρώνται τα κονίδια που βρίσκονται στα τετράγωνα των τεσσάρων γωνιών και του κεντρικού από το σύνολο των 25 μεγάλων τετραγώνων
- Υπολογίζεται ο μέσος όρος των δύο αριθμών στον οποίο καταλήξαμε
- Πολλαπλασιάζεται ο αριθμός αυτός με 50.000 για να βρούμε τον αριθμό των κονιδίων/ml. Στη συνέχεια, πολλαπλασιάζουμε επί 100 (100X αραιώση) και προκύπτει ο αριθμός των κονιδίων/ml του αρχικού αιωρήματος.
- Σε κάθε γλαστράκι (9 cm X 9 cm) με φυτό, γίνεται μόλυνση με 10 ml από το αιώρημα με συγκέντρωση 10^7 κονίδια /ml *Verticillium dahliae* (σύνολο δηλαδή 10X40 φυτά=400ml τελικός όγκος μολύσματος)
- Από τα παραπάνω, εύκολα βρίσκεται με εφαρμογή του τύπου $C_1V_1=C_2V_2$ και βρίσκεται η απαραίτητη ποσότητα από το αιώρημα που θα εφαρμοστεί στα φυτά για την επικείμενη μόλυνση με 10^7 κονίδια/ml
- Η μόλυνση πρέπει να γίνει άμεσα μετά την ετοιμασία του μολύσματος διότι μειώνεται η μολυσματικότητα των κονιδίων του μύκητα
- Τα φυτά μελιτζάνας μολύνονται στο στάδιο των 4-5 εβδομάδων, μετά τη μεταφύτευση, δηλαδή ούτε σε πολύ νεαρό στάδιο ούτε να είναι γηρασμένα τα φυτά
 - 1-2 ημέρες πριν τη μόλυνση τα φυτά αφήνονται χωρίς πότισμα, ώστε το μολύσμα να απορροφηθεί με μεγαλύτερη ευκολία από το ριζικό σύστημα
 - Για μεγαλύτερη απορρόφηση από τις ρίζες, μετά το ριζοπότισμα του μολύσματος στα γλαστράκια, γίνεται προσεκτικός τραυματισμός με αιχμηρό αντικείμενο (π.χ.

οδοντογλυφίδα) στο ριζικό σύστημα των φυτών για να είναι πιο εύκολη η διείδυση και μόλυνση και εγκατάσταση του παθογόνου δια μέσω των ριζών.

2.5 Αξιολόγηση της ασθένειας

Οι μετρήσεις άρχισαν μια εβδομάδα μετά από τη μόλυνση διότι παρουσίασαν μεγάλη ευαισθησία στο βερτισίλλιο και γρήγορα εμφάνισαν τα συμπτώματα της ασθένειας, τα οποία ήταν μαρασμός των παλαιότερων φύλλων, «φύλλο σημαίας» και χλώρωση ολόκληρου του ελάσματος του φύλλου σε τελικό στάδιο. Το ποσοστό της ασθένειας προκύπτει από το κλάσμα των προσβεβλημένων προς το συνολικό αριθμό των φύλλων επί τοις εκατό (%).

$$\text{Ποσοστό Ασθένειας} = \frac{\text{αρ. προσβεβλημένων}}{\text{αρ. συνολικών φύλλων}} \%$$

Μετρήσεις παίρνονταν κάθε εβδομάδα έως ότου τα φυτά αποξηρανθούν σχεδόν εντελώς. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν σε πρόγραμμα EXCEL, στο οποίο δημιουργήθηκαν και οι γραφικές παραστάσεις ανάλυσης της εξέλιξης της ασθένειας.

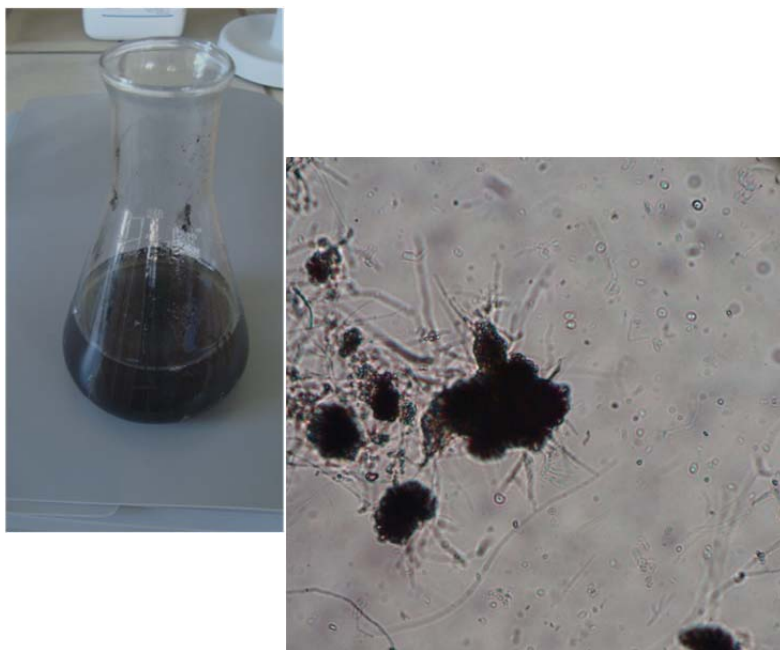
2.6 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Με τη μέτρηση της AUDPC περιοχής (Area Under Disease Progress Curve) υπολογίστηκε η ασθένεια καθόλη τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου. Η AUDPC είναι η περιοχή που καθορίζεται από το άθροισμα των εμβαδών των τραπεζίων που σχηματίζονται κάτω από την καμπύλη της ασθένειας (Campbell and Madden, 1990).

Τα δεδομένα για τη σοβαρότητα της ασθένειας (τιμές AUDPC) αναλύθηκαν στατιστικά με το πρόγραμμα SGWIN και η σύγκριση των μέσων των επεμβάσεων πραγματοποιήθηκε με το *t-test*, σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,005$.

2.7 Προετοιμασία του μολύσματος *Verticillium dahliae* και της καλλιέργειας του μη παθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* F2 για τα πειράματα έκκρισης πρωτεϊνών παθογένειας

Έγινε καλλιέργεια του μύκητα *Verticillium dahliae* σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA για ανάπτυξη της αποικίας του μύκητα σε τρυβλίο. Ένα μικρό κομμάτι του μύκητα που διατηρείται σε γλυκερόλη σε βαθεία κατάψυξη στους -80°C (glycerol stock) εμβολιάστηκε σε τρυβλίο με PDA και μετά από 5 ημέρες, σε θερμοκρασία 24°C η αποικία του μύκητα είχε αναπτυχθεί. Στη συνέχεια, κομμάτια της αποικίας μεταφέρθηκαν σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα SSN και επώαστηκαν στους 24°C σε επωαστικό θάλαμο ανάδευσης (orbital shaker) για να αναπτυχθεί κατάλληλα ο μύκητας (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1 Μικροσκληρώτια του μύκητα *Verticillium dahliae*

Μετά από 25 ημέρες, ο μύκητας είχε σχηματίσει μικροσκληρώτια που χρειάζονται για την τεχνητή μόλυνση που έγινε στα φυτά μελιτζάνας. Η τελική συγκέντρωση των μικροσκληρωτίων που χρησιμοποιήθηκε ήταν 20 μικροσκληρώτια/gr εδάφους. Στη συνέχεια, έγινε φιλτράρισμα με διάτρητο τούλι (miracloth) για να διαχωριστούν τα

μικροσκληρώτια από τα κονίδια που διαπερνούν το τούλι. Αφού στέγνωσαν σε τρυβλία σε θάλαμο κάθετης ροής, ομογενοποιήθηκαν σε αναδευτή (blender) για να διαχωριστούν τα συσσωματώματα που είχαν σχηματίσει και να γίνουν μεμονωμένα (Εικόνες 2.1-2.3)



Εικόνα 2.2 Φιλτράρισμα των μικροσκληρωτίων σε τούλι για να καθαριστούν από το θρεπτικό υλικό και το μυκήλιο.



Εικόνα 2.3 Ομογενοποιητής για ανάμειξη των μικροσκληρωτίων και ομογενοποίηση τους.

Τα φυτά μελιτζάνας ξεπλένονταν σε νερό από το υγιές χώμα στο οποίο είχαν φυτευτεί και αναμιγνύονταν με χώμα που είχαν προστεθεί 10 μικροσκληρώτια/ γραμ. εδάφους για να επιτευχθεί η μόλυνση με το μύκητα *Verticillium dahliae*.



Εικόνα 2.4 Καθαρισμός των ριζών από το χώμα για την προσθήκη χώματος με μικροσκληρώτια, για να επιτευχθεί η μόλυνση με το μύκητα *Verticillium dahliae*



Εικόνα 2.5 Φυτό καθαρισμένο από το χώμα. Έτοιμο για την προσθήκη χώματος με μικροσκληρώτια, για να επιτευχθεί η μόλυνση με το μύκητα *Verticillium dahlia*

Τα μικροσκληρώτια του μύκητα αναμίχθηκαν με χώμα που θα μεταφυτευόνταν οι μελιτζάνες πάλι στα ίδια γλαστράκια, ώστε σε κάθε γλαστράκι να υπάρχει σταθερή αναλογία μικροσκληρωτίων για όλες τις επεμβάσεις, πλην του μάρτυρα.



Εικόνα 2.6 Ανάμειξη των μικροσκληρωτίων με χώμα για την τεχνητή μόλυνση με *Verticillium dahlia*

Το στέλεχος του μη παθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* F2 επίσης καλλιεργήθηκε σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό PDA. Σε περίπου μια εβδομάδα ήταν ανεπτυγμένη η αποικία για μεταφορά σε υγρή καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό SSN για να αναπτυχθούν τα κονίδια του μύκητα που θα αιωρηματοποιηθούν και θα χρησιμοποιηθούν για τις διαφορετικές εφαρμογές του F2 στα φυτά μελιτζάνας. Η διαδικασία αυτή διαρκεί 4-5 ημέρες. Μετά την ανάπτυξη του μύκητα σε υγρή καλλιέργεια, με τη βοήθεια αιματοκυτταρόμετρου, παρασκευάστηκε αιώρημα κονιδίων συγκέντρωσης 10^7 κονίδια/ml του στελέχους F2. Αυτό το αιώρημα χρησιμοποιήθηκε για την έγχυση στο βλαστό, 10 μl σε κάθε βλαστό, με δημιουργία πληγής στα αγγεία του ξύλου και την εντεριώνη, ακριβώς κάτω από το πρώτο φύλλο καθώς και για το ριζοπότισμα με κονίδια στο γλαστράκι που αναπτύσσονταν τα φυτά μελιτζάνας πάλι με συγκέντρωση 10^7 κονίδια/ml στο ριζικό σύστημα κάθε φυτού.

2.8 Διαδικασία μόλυνσης φυτών μελιτζάνας με *Verticillium dahliae* και εφαρμογή F2, για λήψη ριζών για τον έλεγχο παραγωγής χιτινασών και γλουκανασών

Για την αξιολόγηση των χιτινασών και γλουκανασών ελήφθησαν ριζικό σύστημα και βλαστός από φυτά μελιτζάνας που αναπτύσσονταν στο θερμοκήπιο σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και φωτοπεριόδου.

- Το τμήμα ρίζας που επιλεγόταν, ξεπλενόταν σε νερό για να είναι όσο το δυνατόν περισσότερο καθαρό από χώμα (Εικόνες 2.7, 2.8).
- Στη συνέχεια, το ριζικό σύστημα τοποθετούνταν σε πλαστικό φιαλίδιο (falcon tube) για να καταψυχθεί αμέσως σε υγρό άζωτο.
- Τα φιαλίδια φυλάσσονταν σε βαθεία κατάψυξη στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Εικόνα 2.8).



Εικόνα 2.7 Λήψη ριζών



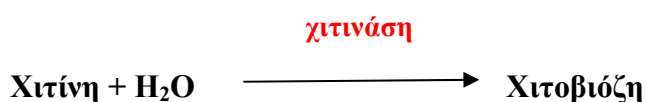
Εικόνα 2.8 (αριστερά) Καθαρισμός των ριζών. Φύλαξη του ιστού σε βαθεία κατάψυξη $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (δεξιά).

2.9 Διαδικασία αξιολόγησης των πρωτεϊνών παθογένειας σε φυτά μελιτζάνας προσβεβλημένα με *Verticillium dahliae* και μετά από εφαρμογή του στελέχους F2

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε εν συντομία, ήταν η εξής: αρχικά έγινε η λειοτρίβιση του φυτικού ιστού που είχε συλλεχθεί και διατηρούνταν σε θερμοκρασία -80 °C, όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, σε γουδί που προηγούμενα είχε αποστειρωθεί στον κλίβανο. Στη συνέχεια προστίθετο ορισμένο ρυθμιστικό διάλυμα (Potassium phosphate buffer) για να διαλυτοποιηθούν οι πρωτεΐνες που περιείχε ο φυτικός ιστός (διαδικασία κοινή και για τη μέτρηση των χιτινασών και των γλουκανασών) και τέλος ακολουθήσε το πρωτόκολλο για κάθε πρωτεΐνη παθογένειας ξεχωριστά.

Για τις χιτινάσες: πρόκειται για μια χρωμομετρική μέθοδο

Η διαδικασία βασίστηκε στις ακόλουθες χημικές αντιδράσεις:



- Οι αντιδράσεις λαμβάνουν μέρος σε θερμοκρασία 25 °C, σε όξινο pH (pH=6) και η απορρόφηση μετράται σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 540 nm.
- Για τη διενέργεια των αντιδράσεων χρειάστηκαν τα εξής αντιδραστήρια και διαλύματα που έπρεπε να παρασκευαστούν για τη μέτρηση των χιτινασών:
- **Διάλυμα Α:** Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (Potassium Phosphate Buffer)
 - Σε 100 ml H₂O προστίθεται το φωσφορικό κάλιο, μονοβασικό, άνυδρο, της εταιρείας SIGMA με Prod. No P-5379
 - Χλωριούχο ασβέστιο 2mM, δίδρο, της εταιρείας SIGMA με Prod. No C-3881

- Ρυθμίζεται το pH σε 6.0 στους 25 °C με 1M υδροξείδιο του καλίου (KOH)
- Διάλυμα Β: Διάλυμα χιτίνης 1.25 % w/v
 - Στο διάλυμα Α προσθέτουμε χιτίνη για όγκο 25 ml
 - Χρησιμοποιούμε χιτίνη της εταιρείας SIGMA με Prod. No C-8908
 - Αναδεύουμε για 15 λεπτά για να διαλυθούν πλήρως τα κομμάτια που πιθανόν να υπάρχουν στο διάλυμα
- Διάλυμα Γ: Sodium Potassium Tartrate Solution 5,3 M
 - Ανακατεύουμε 12 γρ. Sodium Potassium Tartrate, τετράυδρο, προϊόν της SIGMA με Prod. No S-2377 σε 8 ml καυστικού νατρίου (NaOH) συγκέντρωσης 2M.
 - Ζεσταίνουμε το διάλυμα σε νερό για να διαλυτοποιηθεί, αλλά δεν το βράζουμε
- Διάλυμα Δ: Διάλυμα 3,5-Δινιτροσαλικυλικού οξέος (3,5-Dinitrosalicylic Acid Solution) 96 mM
 - Διαλύουμε 438 mg 3,5-Δινιτροσαλικυλικού οξέος σε 20 ml απιονισμένο H₂O, της εταιρείας SIGMA Prod. No D-0550
 - Ζεσταίνουμε για να διαλυτοποιηθεί αλλά δεν βράζουμε το διάλυμα
- Διάλυμα Ε: Χρωμογόνο Διάλυμα
 - Αναδεύοντας, αναμιγνύουμε το διάλυμα Γ με το διάλυμα Δ.
 - Αραιώνουμε μέχρι όγκου 40 ml με απιονισμένο νερό
 - Αν δεν αναμιχθούν, τότε μετά την ανάδευση για λίγο χρόνο πρέπει να είναι διαλυτοποιημένα
- Διάλυμα ΣΤ: Διάλυμα χιτινάσης
 - Ανακατεύουμε 1 unit/ml ενζύμου χιτινάσης της SIGMA, σε κρύο διάλυμα, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου
- Διάλυμα Ζ: β-N-Ακετυλ-Γλουκοζαμινιδάση (NAGase)
 - Σε κρύο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου προσθέτουμε 35 units/ml -N-Ακετυλ-Γλουκοζαμινιδάση, της SIGMA με Prod. No. A-3189

- Διάλυμα Η: 0,1% w/v διάλυμα (N-acetyl-D-Glucosamine Standard Solution- NAG)
 - ο Διαλύουμε σε 10 ml απιονισμένο νερό τη Ν-Ακετυλ-D-Γλουκοζαμίνη, προϊόν της SIGMA με Prod. No. A-8625
- Για τις πρότυπες καμπύλες αναφοράς μετρήθηκε η απορρόφηση στα 540 nm
- Έπειτα, για να βρεθεί η απορρόφηση στην πρότυπη καμπύλη ακολουθήθηκε

$$\Delta A_{540 \text{ nm}} = A_{540 \text{ nm}} - A_{540 \text{ nmBlank}}$$
- Τότε η πρότυπη καμπύλη δείχνει τα ml της Ν-Ακετυλ-D-Γλουκοζαμίνης που απελευθερώνεται
- Οι μονάδες/ml ενζύμου υπολογίζονται από τη σχέση

$$\text{μονάδες/ml ενζύμου} = \frac{(\text{mg NAG})(\text{αρχικός όγκος της αντίδρασης} + \text{όγκος του NAGase})}{(\text{όγκος του υπερκείμενου})(\text{όγκος του ενζύμου})}$$

1 μονάδα ενζύμου απελευθερώνει από χιτίνη, ανά ώρα, σε pH 6,0, στους 25 °C, σε 2 στάδια αντίδρασης με β-N-Ακετυλ-Γλουκοζαμινιδάση (NAGase) από *Aspergillus niger*, 1,0 mg N-Ακετυλ-D-Γλουκοζαμίνης.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη μέτρηση των χιτινασών είναι η εξής:

- Τοποθετήθηκαν σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωληνίσκους τα διαλύματα της χιτίνης (διάλυμα Β), απιονισμένο νερό και το ένζυμο της χιτινάσης

	Test	Blank (Άγνωστο)
Διάλυμα Β (χιτίνη)	200 μl	200 μl
Απιονισμένο νερό	-	50 μl
Διάλυμα ΣΤ (χιτινάση)	50 μl	-

- Οι γυάλινοι δοκιμαστικοί σωληνίσκοι κλείστηκαν με καπάκι
- Τοποθετήθηκαν οι δοκιμαστικοί σωληνίσκοι σε περιστρεφόμενη φυγόκεντρο σε ταχύτητα τέτοια ώστε η χιτίνη να βρίσκεται συνεχώς σε ανάδευση
- Τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία 25 °C, για 2 ώρες
- Μετά από 2 ώρες, οι δοκιμαστικοί σωληνίσκοι τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο με νερό που βράζει 100 °C, για 5 λεπτά
- Οι δοκιμαστικοί σωληνίσκοι κρύωσαν μέχρι να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου σε κρύο υδατόλουτρο
- Προστέθηκε 1 unit ενζύμου του διαλύματος Z, β-N-Ακετυλ-Γλουκοζαμινιδάση (NAGase) σε κάθε σωληνίσκο, αφού πρώτα φυγοκεντρήθηκε σε 5.400 στροφές/ λεπτό και ελήφθηκε μόνο το ίζημα (pellet) το οποίο επαναιωρηματοποιήθηκε σε κρύο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (potassium phosphate buffer)
- Έγινε επώαση σε θερμοκρασία 25 °C, για 30 λεπτά, με ανάδευση όπως προηγούμενα
- Έγινε φυγοκέντρηση των δειγμάτων σε για 10 λεπτά σε 5400 στροφές/ λεπτό και διατηρήθηκε το υπερκείμενο

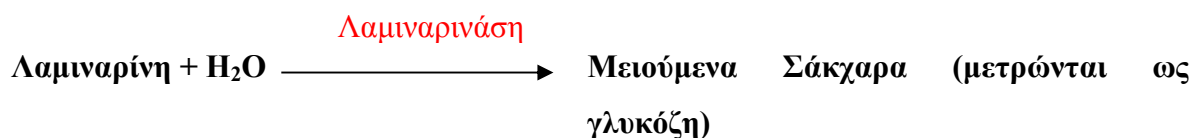
Η διαδικασία για τη κατασκευή των πρότυπων καμπύλων για τις χιτινάσες έγιναν με την προσθήκη των παρακάτω αντιδραστηρίων, όπως φαίνεται στον πίνακα, ως εξής:

	Std 1	Std 2	Std3	Std 4	Std blank
Διάλυμα Η (N-Ακετυλ-D-Γλουκοζαμίνη)	0,1 ml	0,2 ml	0,3 ml	0,4 ml	0,0 ml
Απιονισμένο νερό	2,9 ml	2,8 ml	2,7 ml	2,6 ml	3,0 ml
Διάλυμα Ε (Χρωμογόνο Διάλυμα)	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml

- Τοποθετήθηκαν οι δοκιμαστικοί σωληνίσκοι με τα ανωτέρω διαλύματα σε υδατόλουτρο 100 °C για 5 λεπτά
- Στη συνέχεια, οι δοκιμαστικοί σωληνίσκοι κρύωσαν μέχρι να φτάσουν θερμοκρασία δωματίου
- Τοποθετήθηκε 1 ml δείγματος σε ειδικά φιαλίδια (cuvettes) για τη φωτομέτρηση

Για τις γλουκανάσες: πρόκειται για χρωμομετρική μέθοδο

Η εκτίμηση των γλουκανασών βασίστηκε στις ακόλουθες χημικές αντιδράσεις:



- Οι συνθήκες που λαμβάνουν μέρος οι αντιδράσεις είναι σε θερμοκρασία 37 °C, σε pH=5.0, και μετράται η απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο, σε μήκος κύματος 540 nm.
- Τα διαλύματα που χρειάστηκαν για την μέτρηση των γλουκανασών ήταν τα ακόλουθα:
- Διάλυμα Α: Ρυθμιστικό διάλυμα Οξικού Νατρίου (Sodium Acetate Buffer) 100mM

ο Παρασκευάζεται 50 ml, σε απιονισμένο νερό χρησιμοποιώντας Οξικό Νάτριο, τριύδρο, της SIGMA, με Prod. No. S-8625. Ρυθμίζεται το pH στο 5.0 στους 37 °C, με 1 M HCl.

- Διάλυμα Β: Διάλυμα λαμιναρίνης 2,5% w/v (Laminarin Substrate Solution-Laminarin)
 - ο Παρασκευάζεται 5 ml σε απιονισμένο νερό χρησιμοποιώντας Laminarin, της SIGMA, με Prod. No. L-9634
- Διάλυμα Γ: Διάλυμα ενζύμου Λαμιναρινάσης (Laminarinase)
 - ο Πριν τη χρήση, παρασκευάζεται ένα διάλυμα περιέχοντας 0,075- 0,15 unit/ml της λαμιναρινάσης σε κρύο νερό
- Διάλυμα Δ: Προστίθενται τα εξής αντιδραστήρια για την παρασκευή του διαλύματος: 16 mM Θεϊκός Χαλκός (Copper Sulfate), 1,3 M Θεϊκό Νάτριο (Sodium Sulfate), 266 mM Ανθρακικό Νάτριο (Sodium Carbonate), 190 mM Διττανθρακικό Νάτριο (Sodium Bicarbonate), 43 mM διάλυμα Sodium Potassium Tartrate (Copper Solution)
 - ο Παρασκευάζεται ένα λίτρο σε απιονισμένο νερό χρησιμοποιώντας Cupric Sulfate Pentahydrate, SIGMA, Prod. No C-7631, Sodium Bicarbonate, SIGMA, Prod. No S-8875, Sodium Sulfate, Anhydrous, SIGMA, Prod. No S-9627, Sodium Carbonate, SIGMA, Prod. No S-2127, Sodium Potassium Tartrate Tetrahydrate, SIGMA, Prod. No. S-2377.
- Διάλυμα Ε: 40 mM Μολυβδικό οξύ (Molybdic Acid), 19 mM Αρσενικό Οξύ (Arsenic Acid), και 756 mM Sulfuric Acid Solution (Ars-Mol)
 - ο Παρασκευάστηκε 1 lt σε απιονισμένο νερό χρησιμοποιώντας, Άλας αμμωνίου τετράυδρο με Μολυβδικό οξύ (Ammonium Salt Tetrahydrate, της SIGMA Prod. No. M-0878), Άλας του Νατρίου με Αρσενικό οξύ (Arsenic Acid, Sodium Salt, της SIGMA Prod. No. A-6756) και Θεϊκό Οξύ (Sulfuric Acid της SIGMA με Prod. No. S-1526).

- Διάλυμα ΣΤ: 1 mg/ml Glucose Standard Solution της SIGMA Stock No. 635-100 χρειάστηκε για την πρότυπη καμπύλη αναφοράς
- Έπειτα, για να βρεθεί η απορρόφηση στην πρότυπη καμπύλη ακολουθήθηκε

$$\Delta A_{540 \text{ nm}} = A_{540 \text{ nm}} - A_{540 \text{ nmBlank}}$$
- Τα mg των μειούμενων σακχάρων που απελευθερώνονται σαν ισοδύναμα γλυκόζης μετρώνται από τη σχέση

μονάδες/ml ενζύμου= (mg Γλυκόζης που απελευθερώθηκε) (τελικό όγκο)/ χρόνο (min) (όγκο του ενζύμου) (όγκο του αγνώστου δείγματος)

- Τοποθετήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια σε ειδικούς γυάλινους δοκιμαστικούς σωληνίσκους.

Δείγματα	Test	Blank
Απιονισμένο Νερό	-	100 μl
Διάλυμα Α (Buffer)	300 μl	300 μl
Διάλυμα Β (Laminarin)	100 μl	100 μl

- Αναμιγνύεται το περιεχόμενο των δοκιμαστικών σωληνίσκων και επωάζεται στους 37 °C, για 60 λεπτά.
- Τοποθετούνται τα παρακάτω αντιδραστήρια σε ειδικούς γυάλινους δοκιμαστικούς σωληνίσκους, σύμφωνα με τις ποσότητες του παρακάτω πίνακα.

μl	Test	Blank	Std 1	Std2	Std3	Std 4	Std Blank
Απιονισμένο νερό	900	900	800	700	600	100	
Test Solution	100	-	-	-	-	-	-
Blank Solution	-	100	-	-	-	-	-
Διάλυμα ΣΤ (Glucose Std)	-	-	100	200	300	400	-
Διάλυμα Δ (Copper Solution)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

- Αμέσως πρέπει έγινε ανάδευση του περιεχομένου των σωληνίσκων.
- Οι δοκιμαστικοί σωληνίσκοι τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο με νερό που βράζει.

- Επώαση για 10 λεπτά.
- Στη συνέχεια, οι δοκιμαστικοί σωληνίσκοι βγήκαν από το υδατόλουτρο και αφέθηκαν να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου.
- Έπειτα, προστέθηκε 1 ml από το διάλυμα E (Ars-Mol).
- Έγινε ανάδευση των σωληνίσκων, μέχρι να σταματήσει η δημιουργία αφρού και να διαλυθεί κάθε υπόλειμμα.
- Προστίεθηκε έπειτα, 10 ml απιονισμένο νερό και αναμίχθηκε το περιεχόμενο.
- Τοποθετήθηκε 1 ml σε φιαλίδιο (cuvette) για φωτομέτρηση
- Μετρήθηκε η απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 540 nm, για το test, τα blank και τα standards δείγματα.

1 μονάδα ενζύμου απελευθερώνει 1,0 mg μειούμενων σακχάρων (μετρούμενα ως γλυκόζη) από λαμιναρίνη, ανά λεπτό, σε pH 5,0, στους 37 °C.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Επίδραση των διαφορετικών επεμβάσεων του F2 παράγοντα στην εξέλιξη της βερτισιλλίωσης σε φυτά μελιτζάνας στον αγρό

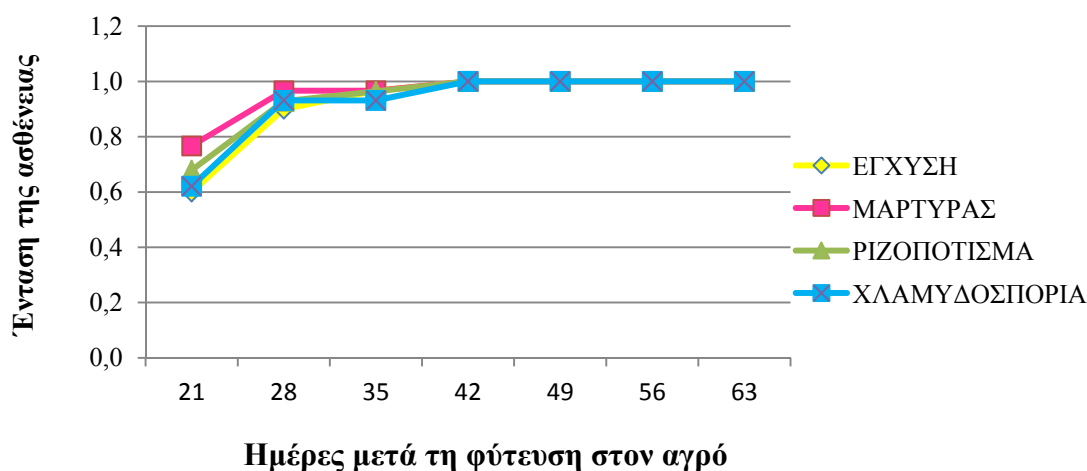
Πρόσφατα πειράματα που διεξήχθησαν στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του ΓΠΑ, έδειξαν ότι η εφαρμογή του βιολογικού παράγοντα F2 οδηγεί σε μείωση των συμπτωμάτων σε φυτά μελιτζάνας στο θερμοκήπιο που έχουν μολυνθεί με τον εδαφογενή μύκητα *Verticillium dahliae* (Gizi *et al.* 2011). Θα είχε ενδιαφέρον να εξεταστεί περαιτέρω η διαφορά στον τρόπο επίδρασης της εξέλιξης της βερτισιλλίωσης που συμβαίνει με διαφορετικούς τρόπους χρήσης του βιολογικού παράγοντα F2 στα φυτά αυτά καθώς και η πιθανή επαγωγή μηχανισμών άμυνας των φυτών που έχει εφαρμοστεί ο βιολογικός παράγοντας F2. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν μάρτυρες σε μολυσμένο αγρό (Εικόνα 3.1) με το μύκητα *Verticillium dahliae* και οι εφαρμογές έγιναν σε φυτά μελιτζάνας με α) έγχυση αιωρήματος κονιδίων F2 σε απεσταγμένο νερό στο βλαστό σε πληγή που είχε δημιουργηθεί με τη βοήθεια σύρριγγας, β) με ριζοπότισμα κονιδίων σε νερό εφαρμοζόμενο απευθείας στο ριζικό σύστημα και γ) με χλαμυδοσπόρια του φουζαρίου F2 αναμεμιγμένα σε αδρανή σκόνη (τάλκ) και εφαρμογή στη ρίζα προ της φυτεύσεως.



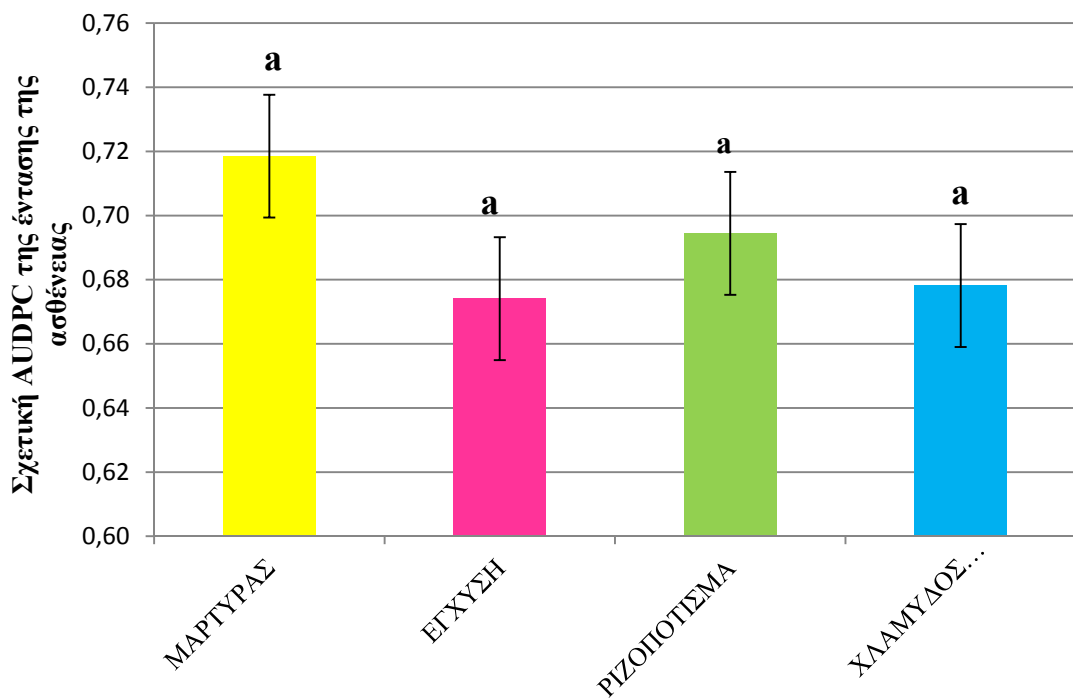
Εικόνα 3.1 Αγρός μολυσμένος με *Verticillium dahliae* και με τις τρεις διαφορετικές εφαρμογές του F2

Τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από αυτό το πείραμα, απεικονίζονται στις γραφικές παραστάσεις 3.1-3.4. Στη γραφική παράσταση 3.1 απεικονίζεται η ένταση της ασθένειας ως το ποσοστό των μολυσμένων φυτών μελιτζάνας ανά επέμβαση ενώ στη γραφική παράσταση 3.2 απεικονίζεται η αντίστοιχη σχετική AUDPC. Στη συνέχεια, στη γραφική παράσταση 3.3 απεικονίζεται το ποσοστό της ασθένειας (disease severity) ως ο αριθμός των των ασθενών φύλλων σε σχέση με τον συνολικό αριθμό φύλλων για κάθε φυτό και για κάθε επέμβαση, ενώ στη γραφική παράσταση 3.4 φαίνεται η αντίστοιχη AUDPC.

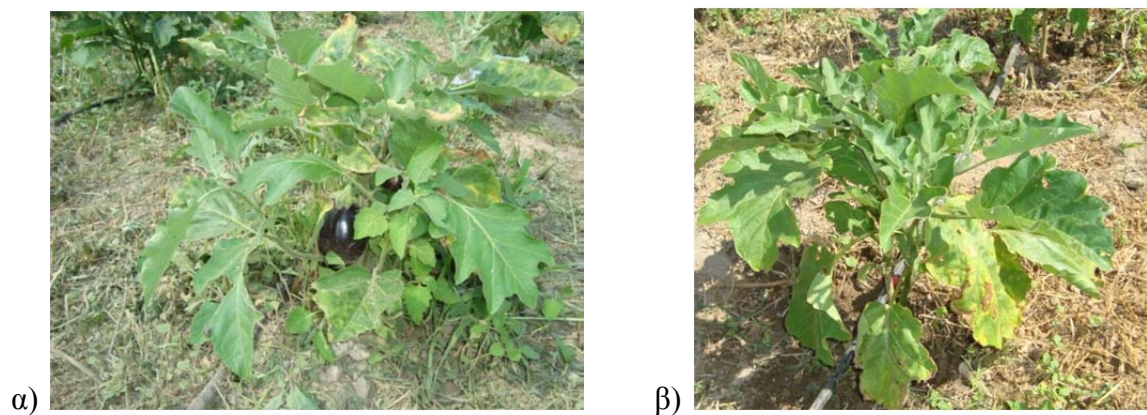
Από τη γραφική παράσταση 3.2 παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των επεμβάσεων. Οι γραφικές παραστάσεις 3.3 και 3.4 δείχνουν την εξέλιξη της σοβαρότητας της ασθένειας με την πάροδο του χρόνου και την AUDPC. Καταδεικνύεται ότι η εφαρμογή της έγχυσης και του ριζοποτίσματος με το αιώρημα των κονιδίων του μη παθογόνου φουζαρίου F2 μειώνει σημαντικά το ποσοστό της ασθένειας στα φυτά μελιτζάνας που εφαρμόστηκε σε σύγκριση με το μάρτυρα. Η στατιστική ανάλυση της AUDPC έδειξε ότι η εφαρμογή της έγχυσης στο βλαστό και των γλαυδοσπορίων σε τάλκ μείωσε στατιστικά σημαντικά το ποσοστό της ασθένειας με το t-test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.05\%$.



Γραφική παράσταση 3.1: Απεικόνιση της επίδρασης των επεμβάσεων στην ένταση της ασθένειας (Disease incidence) στη διάρκεια φύτευσης των 63 ημερών των φυτών μελιτζάνας στον αγρό.



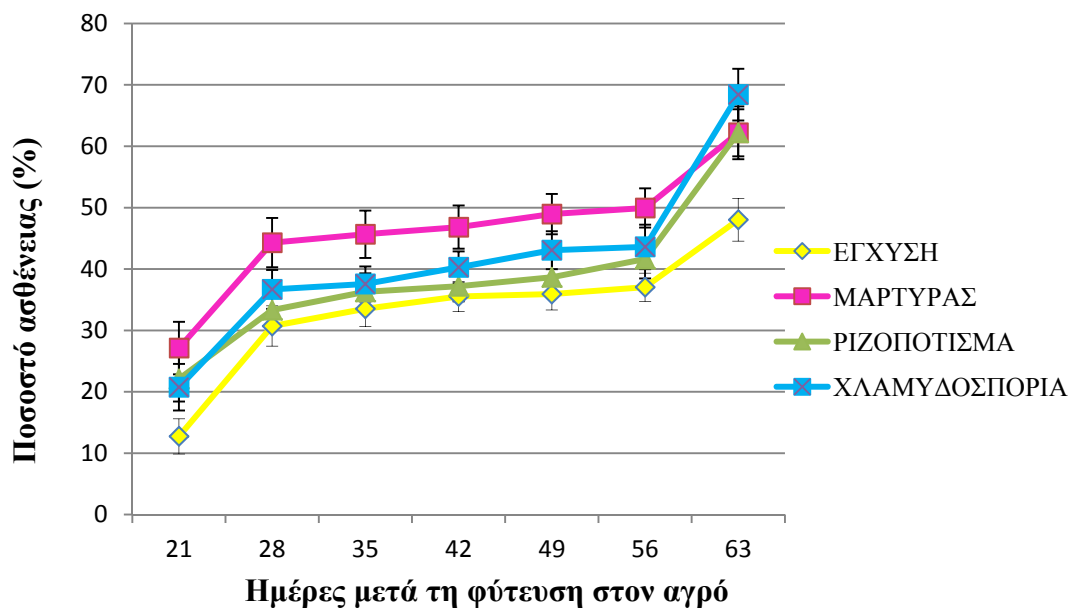
Γραφική παράσταση 3.2: Απεικόνιση της σχετικής AUDPC (Area Under Disease Progress Curve) της έντασης της ασθένειας στις τρεις διαφορετικές εφαρμογές του μη παθογόνου F2 φουζαρίου. Τα διαφορετικά γράμματα πάνω από κάθε στήλη δείχνουν ποιες επεμβάσεις διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας $\leq 0.05\%$ ($P \leq 0.05\%$) σύμφωνα με το t-test.



Εικόνα 3.2 Συμπτώματα της ασθένειας σε φυτά μελιτζάνας στον αγρό, α) 28 και β) 42 ημέρες μετά τη φύτευση στον αγρό.



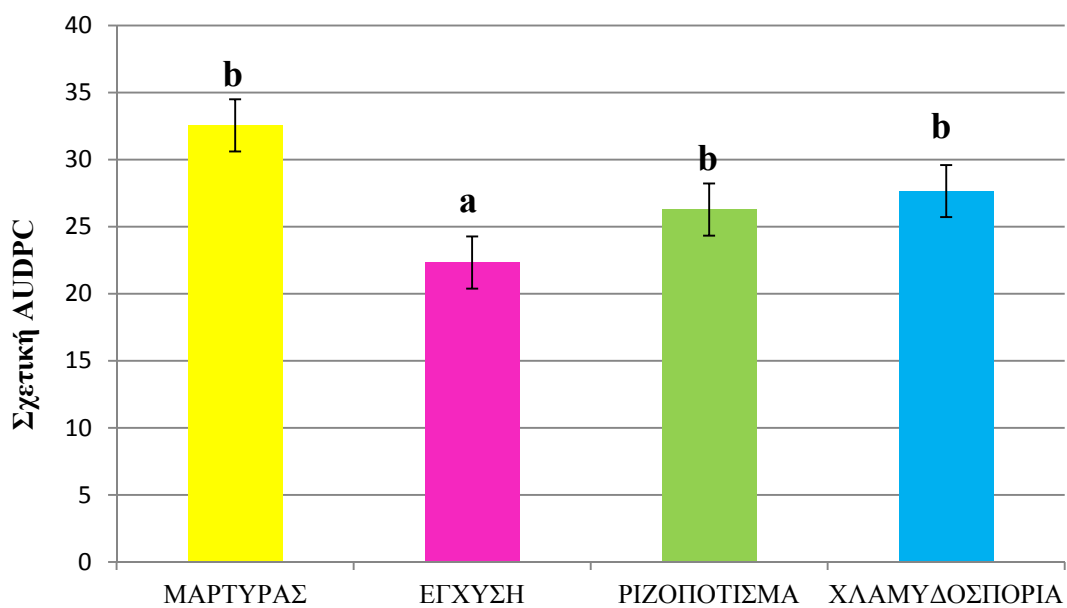
Εικόνα 3.3 Μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου σε στελέχη μελιτζάνας προσβεβλημένα από το μύκητα *V.dahliae*.



Γραφική παράσταση 3.3: Απεικόνιση του ποσοστού της σοβαρότητας της ασθένειας (%) σε φυτά μελιτζάνας ποικιλίας Black Beauty με τρεις διαφορετικές εφαρμογές του μη παθογόνου στελέχους F2 του μύκητα *Fusarium oxysporum*, σε διάστημα 63 ημερών μετά τη φύτευση στον αγρό. Η σοβαρότητα της ασθένειας υπολογίστηκε ως το ποσοστό του αριθμού των φύλλων που παρουσίασαν συμπτώματα βερτισιλλίωσης προς τον συνολικό αριθμό των φύλλων του κάθε φυτού μελιτζάνας. Κάθε επέμβαση περιελάμβανε 30 φυτά τα οποία τοποθετήθηκαν στον αγρό με τυχαίο τρόπο. Οι κάθετες ράβδοι δείχνουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα.



Εικόνα 3.4 Πλήρως αποξηραμένο φυτό μελιτζάνας 56 ημέρες μετά τη φύτευση στον αγρό.



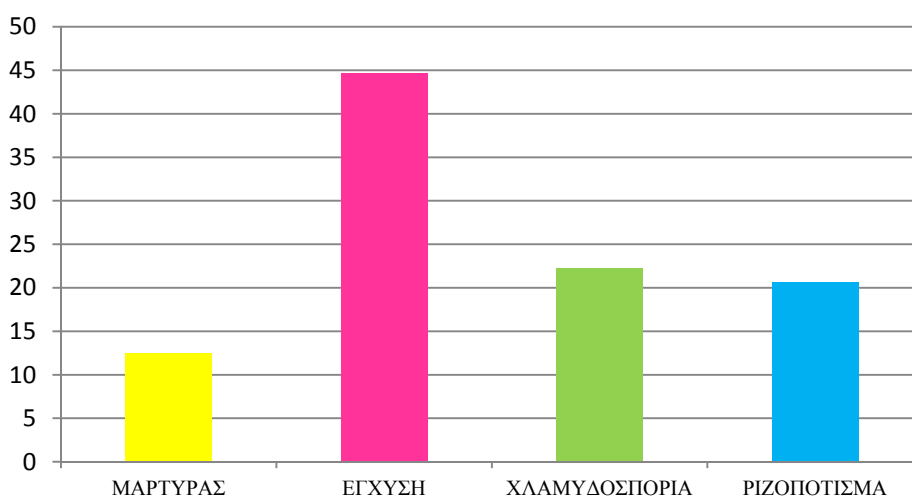
Γραφική παράσταση 3.4: Απεικόνιση της σχετικής AUDPC της σοβαρότητας της ασθένειας στις τρεις εφαρμογές που έγιναν στον αγρό πριν τη φύτευση. Τα διαφορετικά γράμματα πάνω από κάθε στήλη δείχνουν ποιες επεμβάσεις διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας $\leq 0.05\%$ ($P \leq 0.05\%$) σύμφωνα με το t-test. Οι κάθετες ράβδοι δείχνουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα.

3.2 Επίδραση των εφαρμογών του μη παθογόνου *Fusarium oxysporum* F2 στην παραγωγή καρπών μελιτζάνας

Η βερτισιλλίωση των φυτών της μελιτζάνας, των σολανωδών και άλλων ξενιστών είναι ένα σημαντικό πρόβλημα που αντιμετωπίζουν οι σύγχρονοι καλλιεργητές. Αποτελεί πρόβλημα τόσο για την καταστροφή των φυτειών στους αγρούς αλλά και για υποβάθμιση της παραγωγής των καρπών.

Για το λόγο αυτό έγινε προσπάθεια, δοκιμάστηκε να καταμετρηθεί η παραγωγή σε μια καλλιεργητική περίοδο (Μαΐου-Σεπτεμβρίου) σε κιλά και να διευκρινιστεί αν οι διαφορετικές εφαρμογές που έγιναν στον αγρό με τις μεθόδους, με έγχυση αιωρήματος κονιδίων F2, με ριζοπότισμα κονιδίων σε νερό εφαρμοζόμενο στο ριζικό σύστημα και με χλαμυδοσπορία του φουζαρίου F2 αναμεμιγμένα σε τάλκ και εφαρμογή στη ρίζα, θα είχαν ως αποτέλεσμα κάποια διαφοροποίηση στην ολική παραγωγή ανά εφαρμογή. Πράγματι, φαίνεται ότι στα φυτά που εφαρμόστηκε η έγχυση στο βλαστό παρουσίασαν πολύ μεγαλύτερη ποσότητα σε κιλά από το μάρτυρα. Ενώ αντιθέτως, οι εφαρμογές με χλαμυδοσπορία και ριζοπότισμα έδειξαν μεγαλύτερη παραγωγή σε σχέση με το μάρτυρα αλλά όχι μεγαλύτερη από την εφαρμογή της έγχυσης.

Ολική παραγωγή (%) Kg



Γραφική παράσταση 3.5. Απεικονίζεται η συνολική παραγωγή ανά επέμβαση σε Kg κατά τη διάρκεια μιας καλλιεργητικής περιόδου, Μαΐου-Σεπτεμβρίου.



α)



β)

Εικόνα 3.5 Συμπτώματα της βερτισιλλίωσης της μελιτζάνας. α) υγιές φυτό μελιτζάνας 15 ημέρες και β) αποφυλλωμένο φυτό μελιτζάνας στο τέλος της καλλιεργητικής περιόδου, 63 ημέρες μετά τη φύτευση στον αγρό.

3.3 Αξιολόγηση της επαγωγής των χιτινασών και γλουκανασών σε βλαστό της μελιτζάνας μετά την εφαρμογή του μη παθογόνου παράγοντα F2 του μύκητα *Fusarium oxysporum*

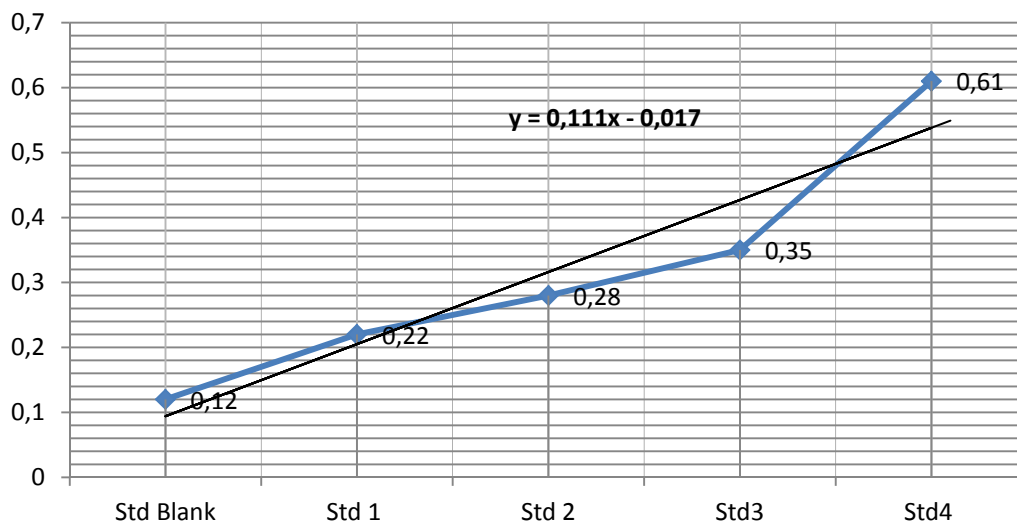
Οι χιτινάσες και οι γλουκανάσες αποτελούν πρωτεΐνες παθογένειας (PR-proteins) και υπερεκφράζονται σε συνθήκες άμυνας των φυτών, καθώς είναι αντιμικροβιακές ενώσεις. Έτσι, μετά την επαφή των φυτών με παθογόνα παράγονται αυτές οι μικρού μοριακού βάρους ενώσεις. Οι χιτινάσες και οι γλουκανάσες (PR3 και PR2, αντίστοιχα) μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 540 nm έως και 17 ημέρες μετά την εφαρμογή.

Χιτινάσες

Επέμβαση	3 ημέρες μετά την εφαρμογή	10 ημέρες μετά την εφαρμογή	17 ημέρες μετά την εφαρμογή
Μάρτυρας (1)	2,739	3,261	3,640
Μάρτυρας (2)	3,135	3,369	3,477
Μάρτυρας (3)	2,946	3,712	3,766
V.d. (1)	1,991	1,982	2,568
V.d.(2)	2,495	2,883	3,324
V.d. (3)	2,838	2,928	3,712
F2+V.d. (1)	6,748	7,441	7,865
F2+V.d. (2)	4,225	4,946	5,459
F2+V.d. (3)	3,126	4,577	5,135
F2 (1)	4,288	3,270	3,973
F2 (2)	5,919	7,234	7,072
F2(3)	7,270	7,838	7,982

Πίνακας 3.1. Παρουσιάζεται η αντιστοιχία των απορροφήσεων σε 540 nm με τα mg N-Ακετυλ-D-Γλουκοζαμίνης-NAG- που μετρήθηκε στα δείγματα του ριζικού συστήματος.

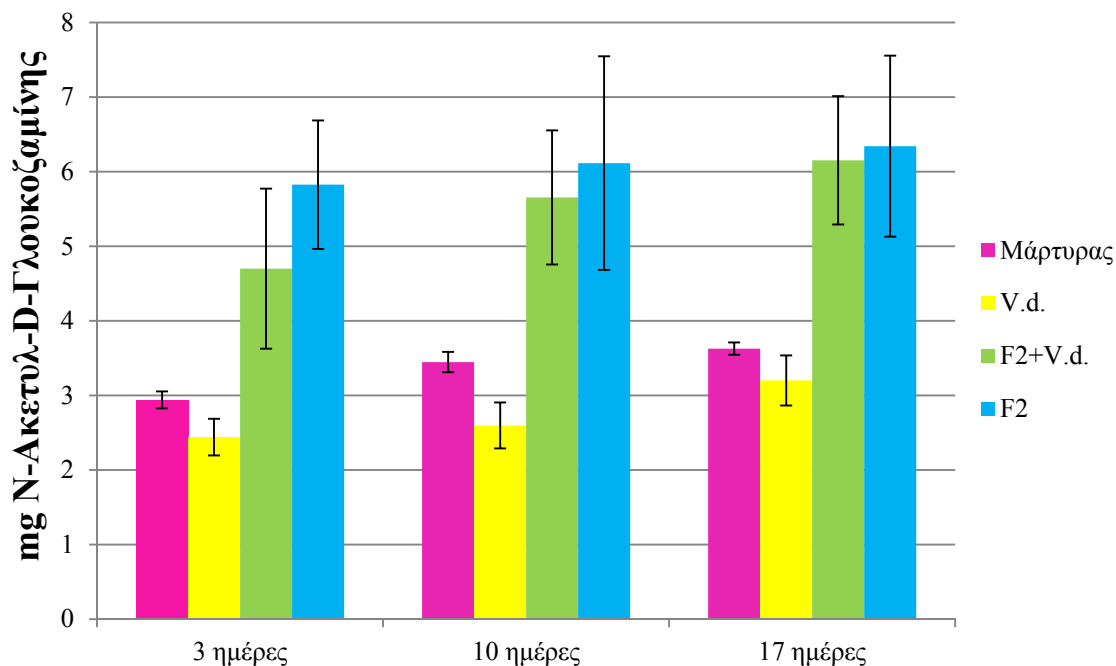
Στον πίνακα 3.1 απεικονίζεται η απορρόφηση της N-Ακετυλ-D-Γλουκοζαμίνης που μετρήθηκε στα 540 nm σε φασματοφωτόμετρο 3, 10 και 17 ημέρες μετά την εφαρμογή της έγχυσης του βιολογικού παράγοντα F2 στο βλαστό μελιτζάνας, σε φυτά που είχαν προσβληθεί τεχνητά με το μύκητα *Verticillium dahliae*, σε φυτά με το βιολογικό παράγοντα και τον παθογόνο μύκητα, σε φυτά που έγινε μόνο έγχυση του βιολογικού παράγοντα και σε φυτά μάρτυρες. Στη γραφική παράσταση 3.6 η καμπύλη αναφοράς δείχνει την μετατροπή της απορρόφησης σε mg N-Ακετυλ-D-Γλουκοζαμίνης. Στη γραφική παράσταση 3.7 απεικονίζεται ο μέσος όρος των 3 επαναλήψεων.



Γραφική παράσταση 3.6. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς με γνωστές συγκεντρώσεις Ν-Ακετυλ-*D*-Γλυκοζαμίνης με απορρόφηση στα 540 nm.

<u>Χιτινάσες</u> <u>O.D.:540 nm</u>	3 ημέρες μετά την εφαρμογή	10 ημέρες μετά την εφαρμογή	17 ημέρες μετά την εφαρμογή
Επέμβαση			
Μάρτυρας (1)	0,187	0,245	0,287
Μάρτυρας (2)	0,231	0,257	0,269
Μάρτυρας (3)	0,210	0,295	0,301
V.d. (1)	0,104	0,103	0,168
V.d.(2)	0,160	0,203	0,252
V.d. (3)	0,198	0,208	0,295
F2+V.d. (1)	0,632	0,709	0,756
F2+V.d. (2)	0,352	0,432	0,489
F2+V.d. (3)	0,230	0,391	0,453
F2 (1)	0,359	0,246	0,324
F2 (2)	0,540	0,686	0,668
F2(3)	0,690	0,753	0,769

Πίνακας 3.2. Ο πίνακας δείχνει τις απορροφήσεις των χιτινάσων σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 540 nm.



Γραφική παράσταση 3.7. Απεικόνιση της επαγωγής των χιτinasών (N-Ακετυλ-D-Γλουκοζαμίνης-NAG-σε φυτά 3, 10, 17 ημερών μετά την εφαρμογή του βιολογικού παράγοντα F2, με έγχυση στο βλαστό και λήψη ιστού από το ριζικό σύστημα. Παρουσιάζεται η ποσότητα σε mg της N-Ακετυλ-D-Γλουκοζαμίνης στα δείγματα που μετρήθηκαν.

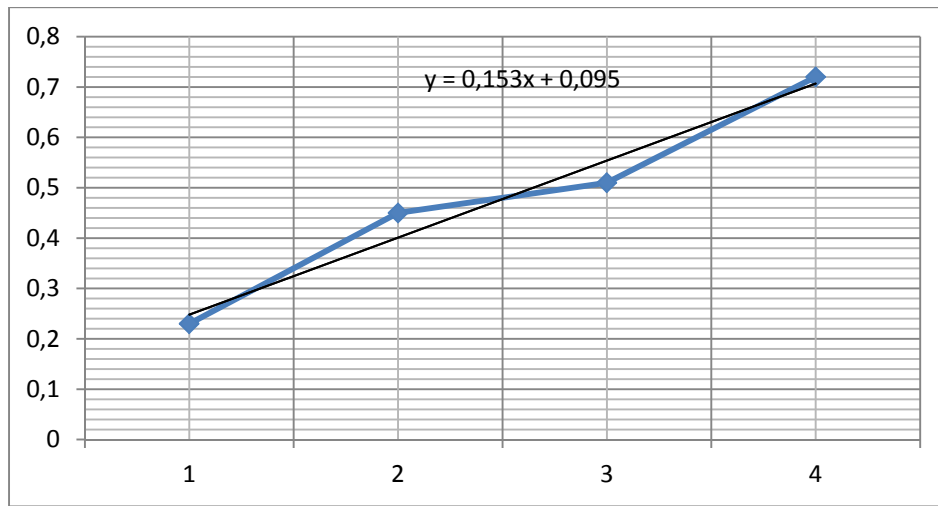
Γλουκανάσες

Στον πίνακα 3.3 απεικονίζεται η απορρόφηση της γλυκόζης στα 540 nm σε ρίζες φυτών μελιτζάνας που είχε γίνει λήψη ριζών 3, 10 και 17 ημέρες μετά την εφαρμογή της έγχυσης του βιολογικού παράγοντα F2 στο βλαστό μελιτζάνας. Πάλι, υπήρχαν φυτά που είχαν προσβληθεί τεχνητά με το μύκητα *Verticillium dahliae*, φυτά με το βιολογικό παράγοντα και τον παθογόνο μύκητα, φυτά που έγινε μόνο έγχυση του βιολογικού παράγοντα και φυτά μάρτυρες.

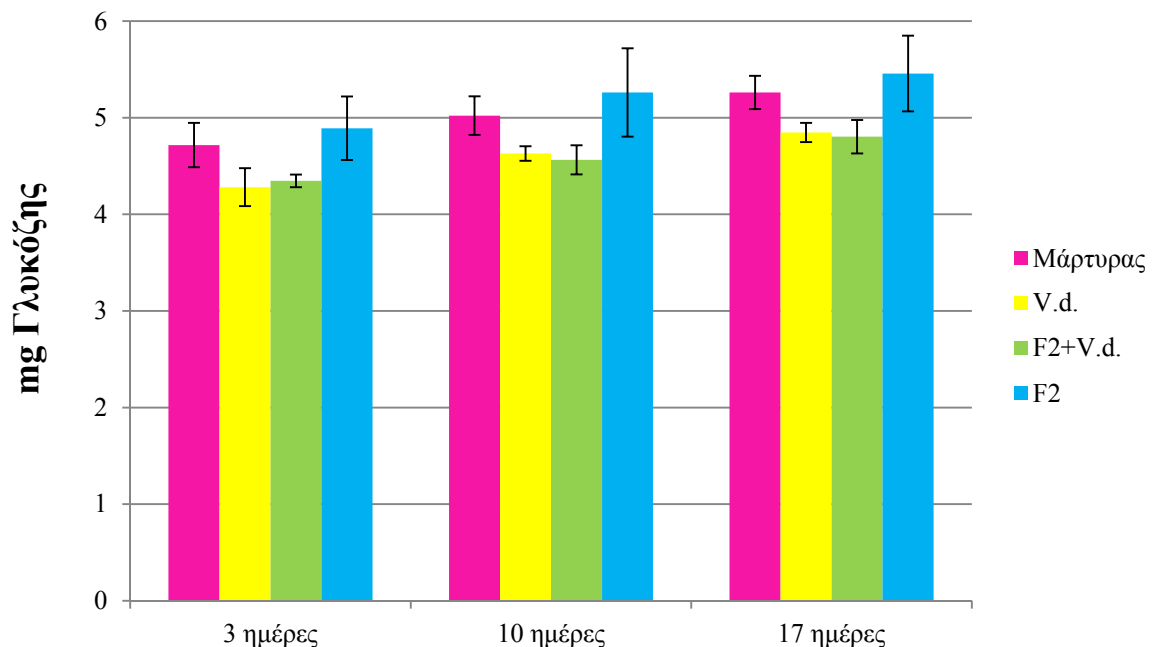
<u>Γλουκανάσες</u> <u>O.D.:540 nm</u>	3 ημέρες μετά την εφαρμογή	10 ημέρες μετά την εφαρμογή	17 ημέρες μετά την εφαρμογή
Επέμβαση			
Μάρτυρας (1)	0,78	0,83	0,87
Μάρτυρας (2)	0,82	0,89	0,92
Μάρτυρας (3)	0,85	0,87	0,91
V.d. (1)	0,75	0,81	0,84
V.d.(2)	0,72	0,79	0,82
V.d. (3)	0,78	0,81	0,85
F2+V.d. (1)	0,76	0,78	0,81
F2+V.d. (2)	0,77	0,82	0,86
F2+V.d. (3)	0,75	0,78	0,82
F2 (1)	0,79	0,83	0,87
F2 (2)	0,89	0,97	0,99
F2(3)	0,85	0,90	0,93

Πίνακας 3.3. Ο πίνακας δείχνει τις απορροφήσεις των γλουκανασών σε φασμαφωτόμετρο σε μήκος κύματος 540 nm.

Στη γραφική παράσταση 3.8 φαίνεται η πρότυπη καμπύλη αναφοράς με γνωστές συγκεντρώσεις γλυκόζης που σχεδιάστηκε για να βρεθούν οι απορροφήσεις των αγνώστων δειγμάτων. Στη συνέχεια, η γραφική παράσταση 3.10 δείχνει τα mg γλυκόζης που απορροφήθηκαν και το μέσο όρο των ποσοτήτων γλουκανασών που μετρήθηκαν.



Γραφική παράσταση 3.8. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς με γνωστές συγκεντρώσεις Γλυκόζης με απορρόφηση στα 540 nm.



Γραφική παράσταση 3.9. Απεικόνιση της επαγωγής των γλουκανασών σε φυτά 3, 10, 17 ημερών μετά την εφαρμογή του βιολογικού παράγοντα F2, με έγχυση στο βλαστό και λήψη ιστού από το ριζικό σύστημα. Παρουσιάζεται η ποσότητα σε mg της γλυκόζης στα δείγματα που μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο στα 450 nm.

Από τις γραφικές παραστάσεις 3.7 και 3.9 φαίνεται ότι οι χιτρινάσες επάγονται σημαντικά μετά την εφαρμογή του παράγοντα F2 είτε μόνο του, είτε με το μύκητα *Verticillium dahliae*, ενώ οι γλουκανάσες δεν φαίνεται να επάγονται. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ένα πιθανό τρόπο δράσης του παράγοντα F2.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η βερτισιλλίωση που προκαλείται από τον εδαφογενή μύκητα *Verticillium dahliae* αποτελεί σημαντική ασθένεια για ένα πλήθος φυτών που είναι ξενιστές του παθογόνου. Η εναλλαγή καλλιεργειών που είναι ευαίσθητες στο μύκητα είναι μια διαδικασία που οδηγεί στην αέναη διατήρηση του μολύσματος στο έδαφος και στην επαναμόλυνση των φυτών από τις διαχειμάζουσες μορφές που μένουν στο έδαφος.

Η αντιμετώπιση της ασθένειας είναι ιδιαίτερα δύσκολη δεν είναι εύκολη υπόθεση διότι η χημική καταπολέμηση είναι ανύπαρκτη, έχουν καταργηθεί τα περισσότερα χημικά απολυμαντικά εδάφους όπως το βρωμιούχο μεθύλιο και η αντιμετώπιση έγκειται στα καλλιεργητικά προληπτικά μέτρα, στην εφαρμογή της μεθόδου της ηλιοαπολύμανσης, στην καλλιέργεια ανθεκτικών ποικιλιών και στο υγιές πολλαπλασιαστικό υλικό (Τζάμος, 2007).

Τα τελευταία χρόνια έχουν ανακαλυφθεί οι βιολογικοί παράγοντες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο των αδρομυκώσεων και συμβάλλουν στη μείωση των συμπτωμάτων στα φυτά. Οι τρόποι δράσης των βιολογικών παραγόντων φαίνεται να είναι ο ανταγωνισμός για θρεπτικά συστατικά, ο ανταγωνισμός για τη θέση αποίκησης στη ρίζα και είσοδο στο ριζικό σύστημα του φυτού, ο παρασιτισμός του παθογόνου και η αδρανοποίηση ενζύμων του παθογόνου με αποτέλεσμα να μην μπορεί να μολύνει, η αντιβίωση με την παραγωγή από το βιολογικό παράγοντα τοξικών μεταβολιτών για το παθογόνο καθώς και η ενεργοποίηση μηχανισμών άμυνας του φυτού με την επαγόμενη διασυστηματική αντοχή των φυτών.

Μη παθογόνα στελέχη του *Fusarium oxysporum* έχουν χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο αδροφουζαριώσεων που προκαλούνται από τον παθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum* όπως π.χ για την αδροφουζαριώση του γαρύφαλλου από τον *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Αυτά φαίνεται να διαθέτουν υψηλή ικανότητα να αποικίζουν τη ριζόσφαιρα φυτών (Garibaldi *et al.*, 1990). Ο ανταγωνισμός αυτός πάλι, φαίνεται να γίνεται για θέσεις εισόδου από το ριζικό σύστημα (Cugudda and Garibaldi, 1987).

Ο ανταγωνισμός των μη παθογόνων στελεχών φουζαρίου και παθογόνων αδρομυκώσεων, που φαίνεται να είναι ο μηχανισμός δράσης, γίνεται είτε για θρεπτικά στοιχεία στο έδαφος και στη ριζόσφαιρα (Couteaudier and Alabouvette, 1990, Larkin and

Fravel, 1999, Lemanceau et al., 1993, Postma and Rattink, 1992) όπως έδειξαν για τα στελέχη 618.12 οι Postma και Rattink το 1992 και για τα στελέχη C5 και C14 οι Mandeel και Baker το 1991 και οι Larkin και Fravel το 1999 για το στέλεχος Fo47, είτε για τον παρασιτισμό και τον ανταγωνισμό για σημεία μόλυνσης στο ριζικό σύστημα (Eparvier and Alabouvette, 1994, Mandeel and Baker, 1991, Schneider, 1984). Ωστόσο οι Mandeel and Baker, το 1991, απέδειξαν ότι η απομόνωση C14 ανταγωνίζεται το *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* για σημεία που είναι ευαίσθητα για μόλυνση στις ρίζες της αγγουριάς παρά ανταγωνίζονται για θρεπτικά συστατικά. Αυτός είναι και ο πιο πιθανός μηχανισμός για την επίδραση που έχει σαν βιολογικός παράγοντας.

Το στέλεχος F2 απομονώθηκε από ένα τροποποιημένο είδος κομπόστας το οποίο αναφέρθηκε ότι μειώνει τα συμπτώματα της ασθένειας που προκαλεί το παθογόνο *Verticillium dahliae* και τα συμπτώματα της αδρομύκωσης σε φυτά μελιτζάνας τόσο σε θερμοκήπια όσο και σε ανοιχτούς αγρούς (Malandraki et al., 2008. Pantelides et al., 2009, Gizi et al., 2011). Οι Malandraki et al. έδειξαν το 2008 την αποτελεσματικότητα του στελέχους F2 σε πειράματα σε θερμοκήπιο και σε πειράματα αγρού. Σε αυτά τα πειράματα η εφαρμογή του βιολογικού παράγοντα F2 μείωσε την σχετική AUDPC (Area Under Disease Progress Curve) σχεδόν 4 φορές σε σύγκριση με το μάρτυρα.

Η εφαρμογή του βιολογικού παράγοντα F2 του μύκητα *Fusarium oxysporum* κρίθηκε σημαντικό να χρησιμοποιηθεί και σε πειράματα αντιμετώπισης του μύκητα *Verticillium dahliae* σε πειράματα αγρού για να διακριβωθεί περαιτέρω η επίδραση που έχει στο παθογόνο.

Στα πειράματα που διεξήχθησαν σε ανοιχτό αγρό χρησιμοποιήθηκαν τρεις εφαρμογές του μη παθογόνου στελέχους F2 με τις εξής μορφές: αιωρήματος κονιδίων συγκέντρωσης 10^7 κονίδια/ ml που εγχέονταν με τη μορφή έγχυσης στο βλαστό ακριβώς κάτω από το πρώτο φύλλο, με τη μορφή γλαμυδοσπορίων που είχαν αναμιχθεί σε τάλκ και εφαρμοζόταν στο ριζικό σύστημα πριν τη φύτευση και με ριζοπότισμα απευθείας στη γλάστρα μια εβδομάδα προ της μεταφύτευσης στον αγρό.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον αγρό κατέδειξαν ορισμένες απ.ο τις επεμβάσεις πιο αποτελεσματικές σε σύγκριση με το μάρτυρα. Η εφαρμογή της έγχυσης στο βλαστό φαίνεται να μειώνει το ποσοστό των συμπτωμάτων στα φυτά μελιτζάνας και να

μειώνει την εκδήλωση των συμπτωμάτων της ασθένειας στα φύλλα την 21^η ημέρα μετά τη μεταφύτευση στον αγρό (34% εμφανίζει ο μάρτυρας , 22% έχουν τα φυτά που τους έγινε έγχυση με το F2). Επίσης, η εφαρμογή των χλαμυδοσπορίων με τη μορφή τάλκ και η εφαρμογή των κονιδίων με ριζοπότισμα έδειξε μείωση των συμπτωμάτων και στα φυτά που έγιναν αυτές οι επεμβάσεις (Γραφική παράσταση 3.2).

Με τη σχετική AUDPC φαίνεται η εξέλιξη της ασθένειας κατά τη διάρκεια των μετρήσεων. Από τη γραφική παράσταση της σχετικής AUDPC, πάλι η εφαρμογή της έγχυσης στο βλαστό φαίνεται να οδηγεί σε μειωμένα ποσοστά συμπτωμάτων σχεδόν κατά το ήμισυ και εκδήλωσης της ασθένειας σε σύγκριση με το μάρτυρα και τις άλλες εφαρμογές. Η εφαρμογή των χλαμυδοσπορίων με τη μορφή τάλκ επίσης δείχνει μειωμένα συμπτώματα στον αγρό.

Τέλος, οδιαίτερα εντυπωσιακά ήταν τα αποτελέσματα της συνολικής παραγωγής που συλλέχθηκε κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου και έδειξε ότι στα φυτά που έγινε η έγχυση στο βλαστό μελιτζάνας υπήρξε μεγαλύτερη απόδοση κατά 4 φορές περίπου σε σχέση με το μάρτυρα, ενώ οι άλλες δύο εφαρμογές, με χλαμυδοσπόρια και ριζοπότισμα είχαν παραγωγή 2 φορές περίπου μεγαλύτερη παραγωγή σε σχέση με το μάρτυρα.

Στα περαιτέρω πειράματα που έγιναν για την προκαταρκτική αξιολόγηση εξετάστηκε η επαγωγή των πρωτεϊνών παθογένειας που εκκρίνονται μετά από μόλυνση και ο τρόπος δράσης του F2 με το μύκητα *Verticillium dahliae*. Πιο συγκεκριμένα, οι χιτινάσες αυξάνονται τόσο όταν συνυπάρχει το μη παθογόνο στέλεχος F2 στα μολυσμένα φυτά με *Verticillium dahliae*, όσο και όταν εφαρμόζεται μόνο του. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση των πρωτεϊνών αυτών από τις τρεις πρώτες μέρες, σε ποσοστό σχεδόν διπλάσιο από το μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι πιθανόν, να διεγείρονται τέτοιοι μηχανισμοί που να προωθούν την ανάπτυξη των ίδιων των φυτών και την προστασία των φυτών από τα παθογόνα. Οι γλουκανάσες δεν παρουσίασαν τόσο μεγάλη αύξηση στην έκκριση τους. Παρ'όλα αυτά παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση της έκκρισης τους κατά τη διάρκεια των μετρήσεων. Τόσο οι χιτινάσες όσο και οι γλουκανάσες φαίνεται να επάγονται ταυτόχρονα στα φυτά για αυτό το λόγο όταν υπάρχει αύξηση των χιτινασών συνοδεύεται και από αύξηση των γλουκανασών.

Οι πρωτεΐνες παθογένειας που επάγονται σε φυτά με πιθανή μόλυνση από παθογόνα, τους δίνει τη δυνατότητα προστασίας από την επικείμενη μόλυνση. Για να είναι ωστόσο, επιτυχημένη η εφαρμογή ενός βιολογικού παράγοντα, όπως το F2 στέλεχος του μύκητα *Fusarium oxysporum*, χρειάζεται να πληρούνται κάποιες προϋποθέσεις. Αυτές είναι η κατάλληλη εφαρμογή, στον κατάλληλο χρόνο, στο κατάλληλο σημείο. Η σκέψη που υπάρχει είναι να κυκλοφορήσουν στο εμπόριο οι βιολογικοί παράγοντες που έχουν δοκιμαστεί και είναι αποτελεσματικοί στη βιολογική αντιμετώπιση σημαντικών ασθενειών, όπως αυτή που προκαλείται από το μύκητα *Verticillium dahliae*. Θα πρέπει επίσης να είναι συμβατοί με το σύστημα παραγωγής κάθε καλλιέργειας. Για παράδειγμα, οι Larkin & Fravel (1998) έβαλαν το στέλεχος CS-20 σαν ριζοπότισμα σε μεταφυτευόμενα φυτά τομάτας πριν αυτά εγκατασταθούν στο αγρό. Το στέλεχος Fo47 προστέθηκε σε φυτά κυκλάμινου για να προστατευτούν από την αδροφουζαρίωση και αναμείχθηκαν στο υπόστρωμα χώματος που καλλιεργήθηκαν. Έτσι, είχαν προστασία από επικείμενη μόλυνση (Fravel et al., 2002).

Τα προβλήματα όμως που μπορούν να δημιουργηθούν σχετίζονται με την έλλειψη σταθερότητας των βιολογικών παραγόντων όσον αφορά στην εφαρμογή τους. Για αυτούς τους λόγους είναι λίγα τα σκευάσματα που κυκλοφορούν στο εμπόριο για αντιμετώπιση σημαντικών ασθενειών. Πέρα από τις εφαρμογές και τα πειράματα που πρέπει να συνεχιστούν στον αγρό, πρέπει να γίνει προσπάθεια για περαιτέρω εμβάθυνση στη γενετική, στη βιολογία και την οικολογία των βιολογικών παραγόντων. Είναι δεδομένο ότι η κατανόηση του τρόπου που μπορεί ένας βιολογικός παράγοντας να ενεργοποιήσει την επαγόμενη διασυστηματικά ανοχή, είναι αυτό που θα λύσει διάφορα θέματα σχετικά με την παραγωγή, τυποποίηση και διανομή ενός ζωντανού ανταγωνιστή.

Χρειάζεται, ωστόσο ιδιαίτερη προσοχή διότι ορισμένα στελέχη του μύκητα *Fusarium oxysporum* παράγουν μυκοτοξίνες και είναι σημαντικό να διευκρινιστεί ότι οι παράγοντες που χρησιμοποιούνται για βιολογική αντιμετώπιση δεν έχουν αυτή την ικανότητα. Με το μύκητα *Fusarium oxysporum* συγκεκριμένα, χρειάζεται να διευκρινιστεί ότι ο βιολογικός παράγοντας δεν είναι παθογόνος ή αν μπορεί να γίνει παθογόνος σε κάποιο είδος φυτού που δεν έχει ακόμα προσβάλλει. Η μοριακή γενετική είναι αυτή που θα δώσει απαντήσεις και λύσεις στις παραπάνω ανησυχίες, σε συνδυασμό με περαιτέρω

έρευνα σε συνθήκες αγρού και σε διαφορετικές περιβαλλοντολογικές συνθήκες για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα των βιολογικών παραγόντων.

Όσον αφορά στην παρούσα μελέτη, θα μπορούσε να εξεταστεί στο μέλλον η διασυστηματική επαγόμενη ανοχή που πιθανώς να ενεργοποιείται στα φυτά με την εφαρμογή του βιολογικού παράγοντα F2. Για παράδειγμα, θα μπορούσε να εξεταστεί κατά πόσο η εφαρμογή στο ριζικό σύστημα με κάποια μέθοδο, όπως το ριζοπότισμα ή η έγχυση στο βλαστό αιωρήματος κονιδίων, θα μπορούσε να οδηγήσει σε επαγωγή ανοχής στο φυτό. Αυτό θα μπορούσε να γίνει με την εξέταση αύξησης των πρωτεϊνών παθογένειας ή άλλων γονιδίων της άμυνας του φυτού, στο βλαστό ή σε κορυφαία φύλλα. Αν αυτό συμβαίνει, σημαίνει ότι δειγνύονται μηχανισμοί άμυνας διασυστηματικά.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Agrios, G.N. 2005.** Plant Pathology, 5th edition. San Diego: Academic Press, pp 526-528.
2. **Alabouvette C, Couteaudier Y. 1992.** Biological control of Fusarium wilts with nonpathogenic Fusaria. In: Tjamos EC, Cook RJ, Papavizas GC, eds. *Biological control of plant diseases*. New York, USA: Plenum Press, 415–426.
3. **Alabouvette C, Lemanceau P, Steinberg C. 1993.** Recent advances in biological control of fusarium wilts. *Pesticide Sciences* **37**: 365–373.
4. **Biles CL, Martyn RD. 1989.** Local and systemic resistance induced in watermelons by formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* **79**: 856–860.
5. **Bradford, M.1976.** Anal. Biochem. **72**, 248-254.
6. **Campbell, C.L., Madden, L.V., 1990.** Introduction to plant disease epidemiology. Wiley- Interscience, New York pp 532.
7. **Chet I, Ordentlich A, Shapira R and Oppenheim A. 1990.** Mechanisms of biocontrol of soilborne plant pathogens by Rhizobacteria. *Plant and Soil* **129**: 85–92
8. **Collinge D.B. , Kragh K.M., Mikkelsen D., Nielsen K.K., Rasmussen U., Vad K. 1993.** Plant chitinases, *The Plant Journal* **3(1)**, 31-40
9. **Cote, F., J. R. Cutt, A. Asselin, and D. F. Klessig. 1991.** Pathogenesis related acidic b-1,3-glucanase genes of tobacco are regulated by both stress and developmental signals. *Mol. Plant Microbe Interact.* **4**:173–181.
10. **Couteaudier Y., Alabouvette C. 1990.** Quantitative comparison of *Fusarium oxysporum* competitiveness in relation with carbon utilization. *FEMS Microbiology Ecology* **74**: 261–268
11. **Cugudda L, Garibaldi A. 1987.** Soil suppressive to Fusarium wilt of carnation: studies on mechanisms of suppressiveness. *Acta Horticulturae* **216**: 67±76.

12. **Duijff BJ, Pouhair D, Olivain C, Alabouvette C, Lemanceau P. 1998.** Implication of systemic induced resistance in the suppression of fusarium wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens* WCS417r and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *European Journal of Plant Pathology* **104**: 903–910.
13. **Duijff BJ, Recorbet G, Bakker PAHM, Loper JE & Lemanceau P. 1999.** Microbial antagonism at the root level is involve in the suppression of *Fusarium* wilt by the combination of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and *Pseudomonas putida* WCS358. *Phytopathology* **89**: 1073–1079.
14. **Ebel, J., and Scheel, D.** 1992. Elicitor recognition and signal transduction. In *Genes Involved in Plant Defense*, T. Boller and F. Meins, Jr., eds (Viennal New York: Springer-Verlag), pp. 183-205.
15. **Eparvier A, Alabouvette C. 1994.** Use of ELISA and GUS-transformed strains to study competition between pathogenic and non-pathogenic *Fusarium oxysporum* for root colonization. *Biocontrol Science and Technology* **4**: 35–47.
16. **Flach J., Pilet P.E., Jolles P.** 1992. What's new in chitinase research. *Experientia* **48**:701–706
17. **Fravel D.R., Larkin R.P. 2002.** Reduction of *Fusarium* wilt of hydroponically-grow basil by *Fusarium oxysporum* strain CS-20. *Crop Protection* **21**: 539–543.
18. **Fuchs J.G., Moëgne-Loccoz Y., Défago G. 1997.** Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 induces resistance to *Fusarium* wilt in tomato. *Plant Disease* **81**: 492–496.
19. **Garibaldi A., Guglielmo L., Gullino M.L. 1990.** Rhizosphere competence of antagonistic *Fusaria* isolated from suppressive soils. *Symbiosis* **9**: 401-402
20. **Garrett SD. 1970.** *Pathogenic root-infection fungi*. London, UK: Cambridge University Press.
21. **Gerlach K.S, Bentley S, Moore N.Y, Aitken E.A.B, Pegg K.G. 1999.** Investigation of Non-Pathogenic Strains of *Fusarium oxysporum* for Suppression of *Fusarium* Wilt of Banana in Australia, 28. In: Alabouvette C, ed. *Second International Fusarium Workshop*. Dijon, France: INRA-CMSE, 54

22. **Gizi D., Stringlis I., Tjamos S.E., Paplomatas E.J. 2011.** Seedling vaccination by stem injecting a conidial suspension of F2, a non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strain, suppresses Verticillium wilt of eggplant. *Biological Control* **58**: 387–392
23. **Gomez Ramirez M., Rojas-Avelizapa L.I., Camarillo C R.:** The chitinase of *Bacillus thuringiensis*, pp. 273–282 in R.A.A. Muzzarelli (Ed.): Chitin Enzymology 2001. University of Ancona (Italy) 2001.
24. **Gooday, G., and N. Gow.** 1990. Enzymology of tip growth in fungi, p. 31–58. In I. B. Heath (ed.), Tip growth in plant and fungal cells. Academic Press, San Diego, California
25. **Gooday, G. W. 1994.** Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. In Biochemistry of Microbial Degradation, pp. 279-312.
26. **Gordon-Weeks R, Sugars JM, Antoniw JF, White RF. 1997.** Accumulation of a novel PR1 protein in *Nicotiana langsdori* in response to virus infection or treatment with salicylic acid. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **50**: 263±273.
27. **Gullino M.L., Migheli Q., Mezzalama M. 1995.** Risk analysis in the release of biological control agents: antagonistic *Fusarium oxysporum* as a case study. *Plant Disease* **79**: 1193–1201
28. **Hammerschmidt R. and Kuc J. 1995.** Induced Resistance to Disease in Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
29. **Hammond-Kosack KE and Jones JDG, 1996.** Resistance Gene-Dependent Plant Defense Responses, *The Plant Cell*, **8**, 1773-1791
30. **Hammond-Kosack KE and Jones JDG, 1997.** Plant Disease Resistance, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biology*, **48**, 576-697
31. **Handelsman, J., and Stabb, E.V. 1996.** Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell*, **8**: 1855–1869.
32. **Höfte, M. 1993.** Classes of microbial siderophores. P. 3-26 in: Iron Chelation in Plants and Soil Microorganisms. L. L. Barton and B. C.Hemming, eds. Academic Press, San Diego.

33. **Kim, Y-S, Yoon K, Cho H-S, Liu J-R, Lee H-S. 1997.** Characterization of CHRK1, a receptor-like kinase containing a chitinase-related domain in its N-terminus. In: *Book of Abstracts 5th International Congress of Plant Molecular Biology*, Singapore, nr. 789.
34. **Kroon B.A, Scheffer R.J, Elgersma D.M. 1992.** Induced resistance in tomato plants against fusarium wilt involved by *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **97**: 401–408
35. **Lamb C., Dixon R.A., 1997.** The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 251–275
36. **Larkin RP, Hopkins DL, Martin FN. 1993a.** Effect of successive watermelon plantings on *Fusarium oxysporum* and other microorganisms in soils suppressive and conducive to Fusarium wilt of watermelon. *Phytopathology* **83**: 1097–1105.
37. **Larkin RP, Hopkins DL, Martin FN. 1993b.** Ecology of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in soils suppressive and conducive to Fusarium wilt of watermelon. *Phytopathology* **83**: 1105–1116.
38. **Larkin RP, Hopkins DL, Martin FN. 1996.** Suppression of fusarium wilt of watermelon by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other microorganisms recovered from a disease suppressive soil. *Phytopathology* **86**: 812–819.
39. **Larkin R.P., Fravel D.R. 1998.** Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of Fusarium wilt of tomato. *Plant Disease* **82**: 1022–1028.
40. **Larkin RP, Fravel DR. 1999.** Mechanisms of action and dose–response relationships governing biological control of fusarium wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium* spp. *Phytopathology* **89**: 1152–1161.
41. **Leeman, M., Den Ouden, F. M., Van Pelt, J. A., Dirkx, F. P. M., Steijl, H., Bakker, P. A. H. M., and Schippers, B. 1996.** Iron availability affects induction of systemic resistance against Fusarium wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* **86**:149-155.

42. **Lemanceau *et al.*, 1991, Lemanceau P, Alabouvette C. 1991.** Biological control of fusarium diseases by fluorescent *Pseudomonas* and non-pathogenic *Fusarium*. *Crop Protection* **10**: 279–286.
43. **Lemanceau P, Bakker PAHM, De Kogel WJ, Alabouvette C, Schippers B. 1993.** Antagonistic effect on nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 and Pseudobactin 358 upon pathogenic *Fusarium oxysporum* f.sp. *Dianthi*. *Applied and Environmental Microbiology* **59**:74–82.
44. **Loper, J. E., and Buyer, J. S. 1991.** Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**:5-13.
45. **Malandraki, I., Tjamos, SE., Pantelides, I., Paplomatas, E.J., 2008.** Thermal inactivation of compost suppressiveness implicates possible biological factors in disease management. *Biological Control* **44**, 180-187
46. **Mandeel, Q., Baker, R., 1991.** Mechanisms involved in biological control of Fusarium wilt of cucumber with strains of non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Phytopathol.* **81**: 462-469.
47. **Minuto A, Migheli Q, Garibaldi A. 1995.** Evaluation of antagonistic strains of *Fusarium* spp. in the biological and integrated control of Fusarium wilt of cyclamen. *Crop Protection* **14**: 221–226.
48. **McDowell JM, Woffenden BJ.2003.** Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends Biotech* **21**:178–183
49. **Olivain, C., Alabouvette, C., 1997.** Colonization of tomato root by a non pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*. *New Phytol.* **137**:481-494.
50. **Olivain, C., Alabouvette, C., 1999.** Process of tomato root colonisation by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* discussed in comparison to a non-pathogenic strain. *New Phytol.* **141**: 497-510.
51. **Olivain, C., Humbert, C., Nahalkova, J., Fatehi, J., L’Haridon, F., Alabouvette, C., 2006.** Colonisation of tomato root by pathogenic and non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strains inoculated together and separately into soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**: 1523-1531

52. **Pantelides IS, Tjamos SE, Striglis IA, Chatzipavlidis I, Paplomatas EJ. 2009.** Mode of action of a pathogenic *Fusarium oxysporum* strain against *Verticillium dahliae* using Real Time QPCR analysis and biomarker transformation. *Biological Control* **50**: 30–36.
53. **Postma, J., Rattink, H., 1992.** Biological control of Fusarium wilt of carnation with a non-pathogenic isolate of *Fusarium oxysporum*. *Canad. Journal of Bot.* **70**: 1199-1205.
54. **Rezzonico, E., N. Flury, F. Meins, Jr., and R. Beffa. 1998.** Transcriptional down-regulation by abscisic acid of pathogenesis-related b-1,3-glucanase genes in tobacco cell cultures. *Plant Physiol.* **117**:585–592.
55. **Sakai K, Uchiyama T, Matahira Y, Nanjo F. 1991.** Immobilization of chitinolytic enzymes and continuous production of N-acetyl D-glucosamine with the immobilized enzymes. *J Ferment Bioeng* **72**:168–172
56. **Schneider RW. 1984.** Effects of nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum* on celery root infection by *F. oxysporum* f. sp. *apii* and a novel use of the lineweaver-burk double reciprocal plot technique. *Phytopathology* **74**: 646–653.
57. **Shen W, Lin X, Gao N, Zhang H, Yin R, Shi W, Duan Z .2008.** Land use intensification affects soil microbial populations, functional diversity and related suppressiveness of cucumber Fusarium wilt in China's Yangtze River Delta. *Plant Soil* **306**:117–127
58. **Shirasu K, Schulze-Lefert P. 2000.** Regulators of cell death in disease resistance. *Plant Mol Biol* **44**: 371–385
59. **Spindler K.D, Spindler Barth M., Sakuda S. 1997.** Effect of demethylation on the chitinase inhibitory activity of allosamidin. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **36**: 223-227
60. **Stintzi A, Heitz T, Kauffmann S, LegrandMand FritigB.1991.** Identification of a basic pathogenesis-related, thaumatin-like protein of virus-induced tobacco as osmotin. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **38**: 137–146

61. **Tezuka N, Makino T. 1991.** Biological control of Fusarium wilt of strawberry by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* isolated from strawberry. *Annals of Phytopathology Society of Japan* **57**: 506–511.
62. **Van der Biezen, E.A. and Jones, J.D.G. 1998b.** Plant disease resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 454±456
63. **Van Loon L.C., 1997.** Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology* **103**: 753–765.
64. **Tjamos EC, Paplomatas E,J, & Biris DA. 1987.** Recovery of verticillium wilted olive-trees after individual application of soil solarization. Fourth International V'erticillium Symposium, Vmiversity of Guelph, Ontario, Canada (Abstract), *Canadian Journal of Plant Pathology*, **9**: 86-87.
65. **Tjamos EC, Biris DA and Paplomatas EJ .1991.** Recovery of Verticillium wilted olive trees following individual application of soil solarization in established olive orchards. *Plant Disease* **75**: 557–562

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Παναγόπουλος, Χ.Γ., 2007.** Αδρομυκώσεις, Ασθένειες Καρποφόρων Δένδρων και Αμπέλου, Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα-Πειραιάς, σελ: 206-217.
2. **Τζάμος Ε., 2007.** Γενική Φυτοπαθολογία. Εκδόσεις Α. Σταμούλης

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. <http://www.els.net>
2. <http://5e.plantphys.net/article.php?ch= t&id=436>
3. <http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/Verticillium/Vertifin.htm>