



ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ

ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ *RAENIBACILLUS ALVEI*

ΣΤΕΛΕΧΟΣ *K165* ΣΕ ΦΥΤΑ ΚΑΡΠΟΥΖΙΟΥ ΕΝΑΝΤΙΟΝ

ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *FUSARIUM OXYSPORUM*

F.SP. NIVEUM (FON) ΣΕ 6 ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΥΣ

ΤΥΠΟΥΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ»

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Ν. ΣΤΑΣΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2018

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΠΑΠΛΩΜΑΤΑΣ ΕΠΑΜΕΙΝΩΝΔΑΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΟΙΧΑΛΙΩΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΤΖΑΜΟΣ ΣΩΤΗΡΗΣ ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΗ

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ
ΡΑΕΝΙΒΑCΙLLUS ALVEI ΣΤΕΛΕΧΟΣ Κ165 ΣΕ ΦΥΤΑ ΚΑΡΠΟΥΖΙΟΥ ΕΝΑΝΤΙΟΝ ΤΟΥ
ΜΥΚΗΤΑ FUSARIUM OXYSPORUM F.SP.NIVEUM (FON) ΣΕ 6 ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΥΣ
ΤΥΠΟΥΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ»**

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Ν. ΣΤΑΣΗΣ
ΑΘΗΝΑ 2018**

ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

**ΠΑΠΛΩΜΑΤΑΣ ΕΠΑΜΕΙΝΩΝΔΑΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΟΙΧΑΛΙΩΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΤΖΑΜΟΣ ΣΩΤΗΡΗΣ ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ *RAENIBACILLUS ALVEI* ΣΤΕΛΕΧΟΣ K165 ΣΕ ΦΥΤΑ
ΚΑΡΠΟΥΖΙΟΥ ΕΝΑΝΤΙΟΝ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *FUSARIUM OXYSPORUM*
F.SP.NIVEUM (FON) ΣΕ 6 ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΥΣ ΤΥΠΟΥΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ»**

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Ν. ΣΤΑΣΗΣ

ΕΠΙΝΛΕΠΩΝ : ΤΖΑΜΟΣ ΣΩΤΗΡΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

ΠΑΠΛΩΜΑΤΑΣ ΕΠΑΜΕΙΝΩΝΔΑΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΟΙΧΑΛΙΩΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΤΖΑΜΟΣ ΣΩΤΗΡΗΣ ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή ξεκίνησε και ολοκληρώθηκε στο εργαστήριο φυτοπαθολογίας του τμήματος Επιστημής Φυτικής Παραγωγής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Αυτή τη στιγμή που το έργο έχει ολοκληρωθεί, θα ήθελα να ευχαριστήσω το καθηγητή μου κ.Σωτήρη Τζάμο για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, καταφέροντας να εμβαθύνω τις γνώσεις μου σ' αυτό το αντικείμενο, καθώς και τον κ. Ε. Παπλωμάτα και τον Αν. Καθηγητή κ. Κ.Οιχαλίωτη για την συμμετόχη τους στην τριμελή επιτροπή.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και τους στενούς μου φίλους για την αμέριστη συμπαράσταση και ενθάρρυνσή τους, καθόλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Citrullus lanatus ή Citrullus vulgaris(καρπουζιά)

1.1.1. ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

1.1.2 ΚΑΤΑΓΩΓΗ- ΙΣΤΟΡΙΚΟ

1.1.3 ΒΟΤΑΝΙΚΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΕΣ

1.1.4 ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΣΕ ΚΛΙΜΑ & ΕΔΑΦΟΣ

1.1.5 Η ΣΗΜΕΡΙΝΗ ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

1.2. Fusarium oxysporum f. sp niveum

1.2.1 ΑΔΡΟΜΥΚΩΣΕΙΣ

1.2.2. ΑΔΡΟΦΟΥΖΑΡΙΩΣΕΙΣ

1.2.3 ΤΑΞΙΝΟΜΙΣΗ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ

1.2.4. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ

1.2.5. ΕΠΙΒΙΩΣΗ – ΔΙΑΣΠΟΡΑ – ΜΟΛΥΝΣΗ

1.2.6. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ

1.3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ

1.3.1. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

1.3.2. ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ RAENIBACILLUS ALVEI K165 ΩΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

1.4 Η ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ.

1.4.1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΑΛΙΚΥΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

1.4.2. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΙΑΣΜΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ/ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

1.5. ΘΡΕΨΗ ΦΥΤΩΝ

1.6. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

2.2. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

2.3 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΓΙΑ ΕΞΑΓΩΓΗ RNA & ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ RNA

2.4 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΜΟΛΥΣΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ FUSARIUM OXYSPORUM F.SP.
NIVEUM

2.5. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ RAENIBACILLUS ALVEI K165 27

2.6. ΠΕΙΡΑΜΑ 1Ο:

2.6.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ

2.7. ΠΕΙΡΑΜΑ 2Ο

2.7.1.ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

2.7.2. ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ

2.7.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ ΦΥΤΑ ΚΑΡΠΟΥΖΙΑΣ

2.7.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ RNA

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ

3.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

3.3. ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ ΦΟΥΖΑΡΙΟ

3.4. ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ
RAENIBACILLUS ALVEI K165 ΣΕ ΑΡΑΙΩΣΗ10-4

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο μύκητας *Fusarium oxysporum* αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παθογόνους μικροοργανισμούς των φυτών παγκοσμίως, με περισσότερες από εκατό ειδικές μορφές με εξειδίκευση ως προς τον ξενιστή. Στην παρούσα ερευνητική εργασία μελετήθηκε η δυνατότητα βιολογικής αντιμετώπισης του μύκητα *Fusarium oxysporum f.sp. niveum* με τον ανταγωνιστικό μικροοργανισμό *Raenibacillus alvei* K165. Σε προγενέστερες εργασίες έχει διαπιστωθεί η φυτοπροστατευτική δράση του στελέχους *Raenibacillus alvei* K165 εναντίον του μύκητα *Fusarium oxysporum*, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί ο μηχανισμός δράσης του στελέχους K165 σε 6 διαφορετικούς τύπους υποστρώματος. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκε το στέλεχος K165 σε υγρή μορφή όπου έγινε ανάμειξη με τους 6 διαφορετικούς τύπους υποστρωμάτων όπου αναπτύχθηκαν φυτά καρπουζιάς. Τα φυτά μεταφέρθηκαν στο στάδιο του 2^{ου} φύλλου σε έξι τεχνητά μολυσμένα υποστρώματα με 10³ χλαμυδοσπόρια του μύκητα/g υποστρώματος και την 8^η & την 16^η ημέρα μετά τη μεταφύτευση στα μολυσμένα υποστρώματα συλλέχθηκαν δείγματα προκειμένου να καταγραφεί η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι η φυτοπροστατευτική δράση του στελέχους K165 εξαρτάται από την σύσταση του υποστρώματος, καθώς η ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων *CHIT1* και *GLUC* έδειξε ότι η εφαρμογή του στελέχους K165 οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης τους. Το γονίδιο *CHIT1* κωδικοποιεί το ένζυμο της χιτινάσης.

Λέξεις κλειδιά : Καρπούζι, Φουζαρίωση καρπουζιάς, βιολογικός παράγοντας K165, Χιτινάση, Γλουκανάση.

ABSTRACT

The fungus *Fusarium oxysporum* is one of the world's most important pathogenic microorganisms, with more than a hundred specific host-specific forms. In this study, the

possibility of biological treatment of fungus *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* with the competing microorganism *Paenibacillus alvei* K165. In previous work, the protective effect of the strain *Paenibacillus alvei* K165 against the fungus *Fusarium oxysporum* has been identified. The purpose of this study was to investigate the mechanism of action of the K165 strain on 6 different types of substrate. For this purpose the K165 strain was prepared in liquid form blended with the 6 different types of substrates where watermelon plants were grown. The plants were transferred to the second leaf stage on six artificially infested substrates with 10³ yeast fungi / g of substrate and on days 8 and 16 after transplantation to the contaminated substrates, samples were collected to detect the expression of genes related to plant defense. The results of the experiments showed that the plant protection activity of the K165 strain depends on the substrate composition, as the analysis of the expression of the CHIT1 and GLUC genes showed that the application of the K165 strain leads to an increase in their expression. The CHIT1 gene encodes the enzyme of chitinase.

Key-words : Watermelon, Fusarium f.sp. niveum ,biological factor K165 , Chitinase , Gluconase .

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. *Citrullus lanatus* ή *Citrullus vulgaris*(καρπουζιά)

1.1.1. Βοτανική Ταξινόμηση

Η καλλιέργεια της καρπουζιάς έχει μεγάλη οικονομική σημασία και η καλλιέργεια του φυτού έχει εξαπλωθεί διεθνώς. Η ταξινόμηση των καρπουζιών σε κατηγορίες με βάση τα χαρακτηριστικά του καρπού θα θεωρούνταν ενίοτε αυθαίρετη καθώς δεν είναι στην πραγματικότητα βοτανικά υποείδη. Μεγάλη μορφολογική ποικιλομορφία χαρακτηρίζει το φρούτο όπως το μέγεθος, το σχήμα, το χρώμα, η υφή και η γεύση. Οι ποικιλίες που καλλιεργούνται κυρίως είναι διπλοειδές με $2n=22$ αριθμό χρωμοσωμάτων, ωστόσο υπάρχουν και οι τριπλοειδείς ποικιλίες με $3n=33$ αριθμό χρωμοσωμάτων μπορεί να είναι και χωρίς σπέρματα. Το *Citrullus lanatus* είναι ετήσιο είδος. (Ολύμπιος, 2001).

Βασίλειο	Φυτά
Υποβασίλειο	Αγγειόσπερμα
Υποδιαίρεση	Σπερματοφύτα
Διαίρεση	Ανθόφυτα
Κλάση	Δικοτυλύδονα
Υποκλάση	Dilleniidae
Τάξη	Violales
Οικογένεια	Cucurbitaceae - Κολοκυνθοειδή
Γένος	<i>Citrullus</i> Schrad
Είδος	<i>Citrullus Lanatus</i>

(Πηγή: Iowa State University Horticulture Guide)

1.1.2 Καταγωγή- Ιστορικό

Τα καρπούζια έχουν κάνει μεγάλη ιστορική διαδρομή τόσο στη γεύση όσο και στη γεωγραφική τους εξάπλωση. Είναι φυτό της Κεντρικής και Νότιας Αφρικής και καλλιεργούνταν στην Αρχαία Αίγυπτο και την Αρχαία Ελλάδα. Ο Γαληνός το αναφέρει με το όνομα “μηλοπέπων” και ο Διόσκουρος με το όνομα “Σίκυος ο ήμερος”. Η καρπουζιά μεταφέρθηκε στην Κίνα από την Ινδία και εισήχθη στην Αμερική μετά την ανακάλυψη της από τον Κολόμβο. Το όνομα “Καρπούζι” προέρχεται από την τούρκικη λέξη “Karpuz”.(Ολυμπίος 2001). Σήμερα το καρπούζι καλλιεργείται σε όλα τα μήκη και πλάτη της υφελίου. Η παραγωγή του παγκοσμίως ανέρχεται σε περίπου 40.000.000 τόνους από ένα σύνολο περίπου 24.000.000 στρεμμάτων καλλιεργούμενης έκτασης. Το 76% περίπου της παγκόσμιας παραγωγής προέρχεται από την Ασία, ενώ η Ευρώπη συμμετέχει κατά 10%. Η Αμερική επίσης συμμετέχει κατά 10% περίπου. Σε επίπεδο κρατών η Κίνα είναι η πρώτη παραγωγός χώρα, συμμετάσχουσα κατά 44% στο παγκόσμιο σύνολο, ακολουθούμενη από την Τουρκία(9%), το Ιράν(6.5%) και τις Η.Π.Α.(4,5%). Σε επίπεδο Ευρωπαϊκής Ένωσης, η πρώτη παραγωγός χώρα είναι η Ισπανία με 800.000 τόνους, ακολουθούμενη από την Ελλάδα(670.000 τόνοι) και την Ιταλία(600.000 τόνοι). (Κανάκης 2004,β)

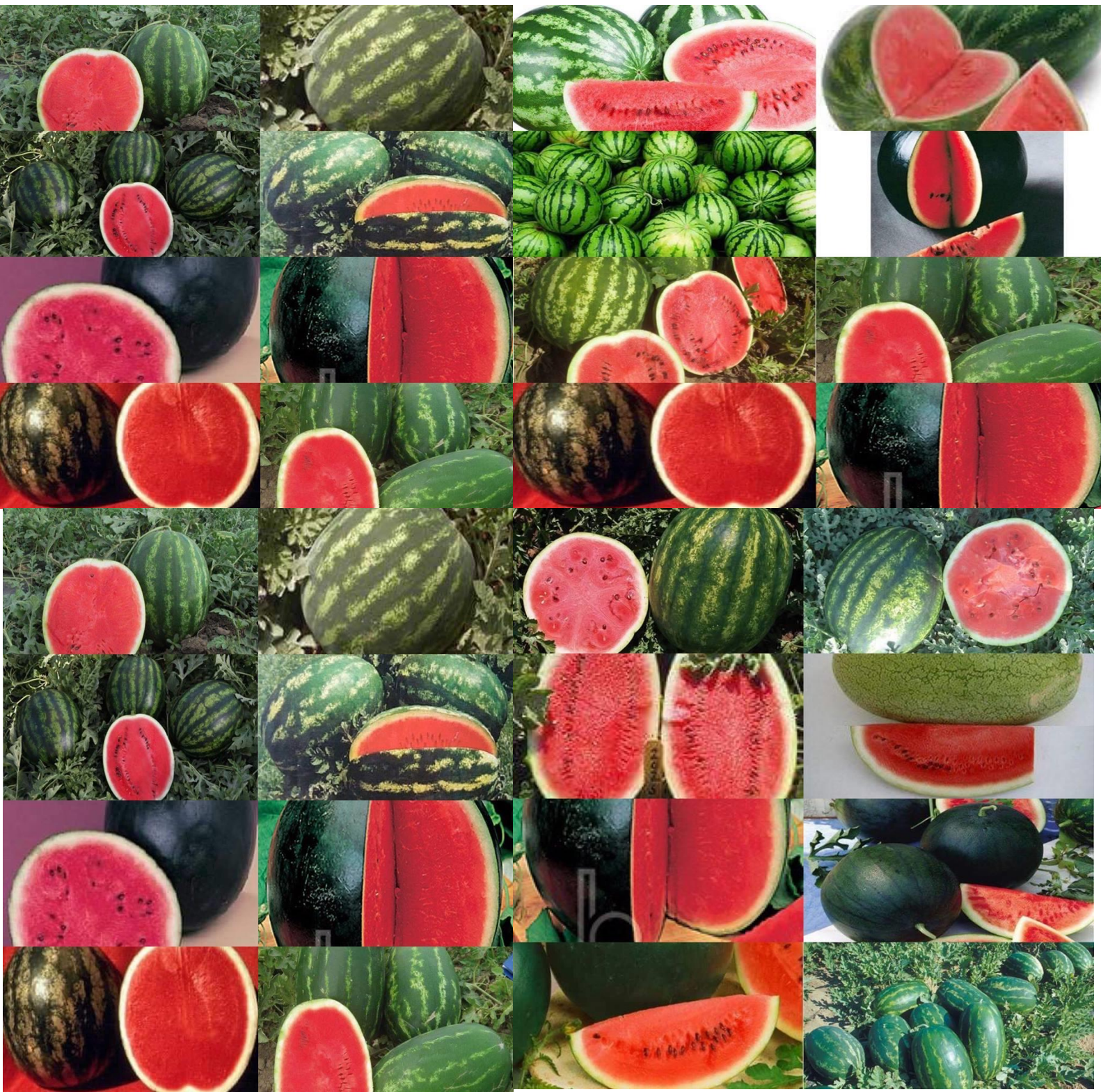
1.1.3 Βοτανικοί Χαρακτήρες



Η καρπούζια είναι φυτό ετήσιο, έρπον , δικοτυλήδονο με σχετικά βαθύ ριζικό σύστημα. Οι βλαστοί είναι μακριοί από 2 έως 4μέτρα, διακλαδιζόμενοι, γωνιώδεις σε αντίθεση με τους κυλινδρικούς της πεπονιάς. Τα φύλλα διαιρούνται σε 3-4 λοβούς και αυτοί πάλι σε μικρότερες εγκολπώσεις, ώστε το φύλλο τελικά να φαίνεται “σχισμένο”. Τα άνθη φέρονται στις μασχάλες των φύλλων

στους κόμβους των βλαστών. Το φυτό είναι μόνοικο-δίκλινο ή ανδρομόνικο σε μερικές ποικιλίες, δηλαδή είτε φέρει χωριστά αρσενικά και θηλυκά άνθη πάνω στο ίδιο φυτό ή φέρει αρσενικά και ερμαφρόδιτα άνθη. Το χρώμα των ανθέων είναι κιτρινοπράσινο και το άνθος φέρει κάλυκα με 5 σέπαλα, στεφάνη με 5 πέταλα και 3-4 στήμονες. Τα θηλυκά ή αρρενοθήλεα άνθη βρίσκονται σε βλαστό ανώτερης τάξης και σε θέσεις πιο απομακρυσμένες από τη βάση του φυτού, ενώ τα αρσενικά άνθη βρίσκονται σε βλαστούς μικρότερης τάξης και πιο χαμηλά στον κεντρικό βλαστό και εμφανίζονται πιο νωρίς πάνω στο φυτό. Το αρσενικό άνθος φέρει λεπτό, σχετικά μικρό μίσχο, ενώ το θηλυκό φέρει εξογκωμένη ωθήκη (υποτυπώδης καρπός – υποφυής ωθήκη) και σχετικά μακρύ και δυνατό μίσχο. (Ολυμπίος 2001).

Ο καρπός είναι ράγα ή πέπων, σφαιροειδής ή επιμήκης, ωσειδής ή κυλινδρικός, με χονδρό αλλά εύθραυστο φλοιό και με βάρος το οποίο μπορεί να κυμαίνεται από 2-12 ή και περισσότερα κιλά. Το εξωκάρπιο είναι λείο με χρωματισμό ομοιόμορφο πράσινο βαθύ, πράσινο ανοικτό ή ταινιωτό. Ο καρπός της καρπουζιάς διαφέρει από τα άλλα κολοκυνθώδη, γιατί δεν έχει κενό χώρο εσωτερικά, καθώς αυτός καταλαμβάνεται από τον πλακούντα (μέσα στον οποίο βρίσκονται τα σπέρματα) που αποτελεί και το φαγώσιμο τμήμα του καρπού, για παράδειγμα στο πεπόνι, το εδώδιμο τμήμα είναι το περικάρπιο. Η σάρκα των καλλιεργούμενων ποικιλιών είναι βαθύ ροζ ή κόκκινη κατά την ωρίμανση. Τα σπέρματα είναι μαύρα ή ανοικτότερου χρώματος, ομοιογενή ή στικτά, πεπλατυσμένου ή ελλειψοειδούς σχήματος. Άσπερμοι καρποί αποκτούνται ή με χρήση ορμονών ή με εκφυλισμό του εμβρύου σε τριπλοειδή άτομα. Στην πραγματικότητα υπάρχουν στη σάρκα άδεια περιβλήματα σπερμάτων λευκά και μαλακά. Τα τριπλοειδή άτομα (3n) προέρχονται από διασταύρωση ενός τετραπλοειδούς φυτού (4n), το οποίο προήλθε από χρήση κολχικίνης με ένα διπλοειδές φυτό (2n). (Ολυμπίος 2001)



ΕΙΚΟΝΑ 2 : Ποικιλίες του είδους *Citrullus lanatus*

1.1.4 Απαιτήσεις σε κλίμα και έδαφος

Η καρπουζιά είναι φυτό θερμής εποχής και απαιτεί τουλάχιστον 4 μήνες περίοδο υψηλών θερμοκρασιών με μέση θερμοκρασία μεγαλύτερη από 21°C για να μπορεί να αποδώσει. Είναι φυτό ουδέτερο όσον αφορά το φωτοπεριοδισμό. Μοιάζει σε αρκετά σημεία με την πεπονιά, διαφέρει όμως και σε μερικά σημαντικά σημεία όπως : 1) είναι περισσότερο απαιτητικό σε νερό και 2) αντέχει περισσότερο στα όξινα εδάφη pH:5,5 ως 6,5. (Ολύμπιος, 2001)

Η καρπούζια αποδίδει καλύτερα σε εδάφη γόνιμα , βαθιά και καλά αποστραγγιζόμενα . Για πρώιμη καλλιέργεια, θα πρέπει να προτιμώνται τα ελαφρά αμμώδη εδάφη. Χρειάζεται πολλή προσοχή στα παθογόνα εδάφους και ιδίως στη φουζαρίωση. Όταν καλλιεργούνται ποικιλίες που δεν είναι ανθεκτικές θα πρέπει ή να εφαρμόζεται αμειψισπορά, καλλιέργεια μια φορά στα 4-6 χρόνια , ή να γίνεται εμβολιασμός σε ανθεκτικά υποκείμενα ή της φύτευσης να προηγείται απολύμανση, εφόσον είναι οικονομικά και τεχνικά εφικτή. (Ολύμπιος 2001)

1.1.5 Η σημερινή εξάπλωση της καλλιέργειας

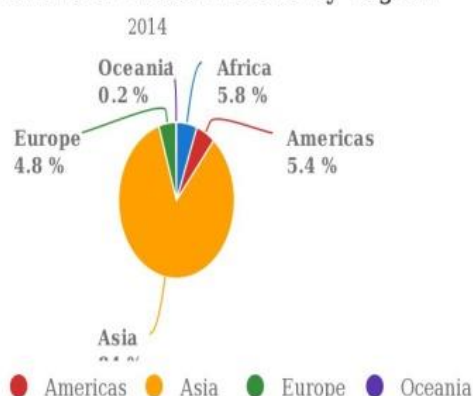
Η σημερινή διεθνής εξάπλωση της καλλιέργειας παρουσιάζεται στον ακόλουθο πίνακα 1-1. Στην Ασία παράγεται το 84% , ενώ στην Ευρώπη το 4,8 % της παγκόσμιας παραγωγής.

Ήπειρος	% του συνόλου της παραγωγής	Παραγωγή (ton)
ΑΦΡΙΚΗ	5,8%	6.386.898
ΑΜΕΡΙΚΗ	5,4%	5.947.703
ΑΣΙΑ	84%	93.205.753
Ε.Ε.	4,8%	2.684.992
ΑΥΣΤΡΑΛΙΑ	0,2%	166.843

ΠΙΝΑΚΑΣ 1-1 Παραγωγή καρπουζιού ανά ήπειρο

Production share of Watermelons by region

Πηγή: FAOSTAT YEARBOOK(2014)



Κυριότερες χώρες παραγωγής σε διεθνές επίπεδο είναι η Κίνα , η Τουρκία, το Ιράν, η Βραζιλία και η Αίγυπτος, ενώ σε επίπεδο Ε.Ε., η Ρωσία, η Ισπανία και η Ελλάδα.

Κυριότερες χώρες Παγκοσμίως	Παραγωγή (ton)	Χώρες Ε.Ε.	Παραγωγή (ton)
ΚΙΝΑ	75.054.330	ΡΩΣΙΑ	1.427.743
ΤΟΥΡΚΙΑ	3.885.617	ΙΣΠΑΝΙΑ	858.575
ΙΡΑΝ	3.568.134	ΕΛΛΑΔΑ	543.230
ΒΡΑΖΙΛΙΑ	2.171.448	ΙΤΑΛΙΑ	453. 233
ΑΙΓΥΠΤΟΣ	2.014.722	ΟΥΓΓΑΡΙΑ	218.510
Η.Π.Α.	1.508.780		
ΙΣΠΑΝΙΑ	858.575		
ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ ΤΗΣ ΚΟΡΕΑΣ	686.883		
ΕΛΛΑΔΑ	543.230		

ΠΙΝΑΚΑΣ 1-2 Κυριότερες χώρες παραγωγής καρπουζιού

Πηγή:FAO Production Yearbook (2014)

1.2. Fusarium oxysporum f. sp niveum

1.2.1 Αδρομυκώσεις

Ένα από τα σημαντικότερα μυκητολογικά προβλήματα στην καλλιέργεια της καρπουζιάς είναι η φουζαρίωση, μια ασθένεια που προκαλείται από τον μύκητα *Fusarium oxysporum f.sp. niveum*. Το παθογόνο που είναι μύκητας εδάφους, ανήκει στην κατηγορία των αδρομυκώσεων , οι οποίες είναι πολύ καταστροφικές , με παγκόσμια εξάπλωση σε πλήθος καλλιεργούμενων φυτών χωρίς να υπάρχουν μέχρι σήμερα θεραπευτικά χημικά μέσα. Οι αδρομυκώσεις προκαλούνται από τα εξής γένη μυκήτων : *Ophiostoma*, *Ceratocystis*, *Phoma*, *Verticillium* και *Fusarium*. Τα δύο πρώτα προσβάλουν δασικά είδη (φτελιές και δρύες αντίστοιχα). Στο γένος *Phoma* ανήκει το *Phoma tracheiphila*, που προκαλεί την κορυφοξύρα των εσπεριδοειδών. Οι περισσότερες και οι πιο διαδεδομένες είναι οι ασθένειες που οφείλονται σε μύκητες των γενών *Fusarium* (φουζαριώσεις) και *Verticillium* (βερτισιλλιώσεις). Οι μύκητες του γένους *Verticillium*

προσβάλλουν ποώδη και δενδρώδη είδη ενώ του γένους *Fusarium* ποώδεις ξενιστές και ουδέποτε καρποφόρα δένδρα και αμπέλια. (Παναγόπουλος,2007).

Ο μύκητας διαθέτει εξειδικευμένες φυλές , γνωστές ως φυλή 0 , φυλή 1 και φυλή 2. Ο μύκητας προσβάλλει σχεδόν αποκλειστικά τις ευαίσθητες ποικιλίες καρπουζιάς. Οι προσβολές αρχίζουν μέσα Απριλίου και σταδιακά αναλόγως με το αν επικρατούν υψηλές θερμοκρασίες, παρατηρείται μόλυνση μεγάλου αριθμού φυτών. Τα κυριότερα συμπτώματα της αδροφουζαριώσεως της καρπουζιάς είναι η μάρανση, χλώρωση, νέκρωση και η καχεκτική ανάπτυξη. Χαρακτηριστικός είναι ο κίτρινος-πορτοκαλόχρους μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου που εμφανίζεται σε επιμήκη ή εγκάρσια τομή του στελέχους και των ριζών. Ο μεταχρωματισμός αυτός μπορεί να εμφανίζεται σε όλη την έκταση των αγγείων ή μόνο στη μία πλευρά του στελέχους. Τα φυτά μπορεί ακόμη και να νεκρωθούν, ενώ σε ηπιότερες προσβολές έχουμε σημαντική μείωση της παραγωγής και υποβάθμιση της ποιότητας. Ο μύκητας διατηρείται στα νεκρά υπολείμματα των φυτών ως σαπροφυτικό μυκήλιο ή ως χλαμυδοσπόρια. Μεταδίδεται με το έδαφος με το νερό. Μολύνει τα φυτά από τις λεπτές ρίζες και τα ακρορρίζια και εγκαθίσταται στα αγγεία του ξύλου. Η ασθένεια αντιμετωπίζεται κυρίως με εμβολιασμό των επιθυμητών ποικιλιών σε ανθεκτικά στην αδροφουζαρίωση υποκείμενα κολοκυθιάς και με εφαρμογή ηλιοαπολυμάνσεως. (Τζάμος,2007).

Τα φυτά που έχουν προσβληθεί εμφανίζουν το σύνδρομο του βραδέος μαρασμού. Πολλές φορές εμφανίζεται με μορφή ημιπληγίας. Στα αρχικά στάδια η ασθένεια εκδηλώνεται με μαρμασμό μεμονωμένων φυλλιδίων ή φύλλων. Στο έλασμα των κατώτερων φύλλων εμφανίζεται αρχικά χλώρωση μεταξύ των νευρώσεων και εν συνεχεία νέκρωση των χλωρωτικών ιστών, μαρμασμών και πτώση των φύλλων. Τα συμπτώματα αυτά εκδηλώνονται αργότερα και στα ανώτερα φύλλα. Τα προσβεβλημένα φυτά γίνονται καχεκτικά και τελικά μπορεί να ξηραθούν. Ακόμα τα φυτά μπορεί να εμφανίσουν νανισμό. (Παναγόπουλος, 1995)



Εικόνα3 (Γ.Π.Α.) : Χαρακτηριστικά συμπτώματα χλώρωσης&νέκρωσης σε φύλλα φυτών καρπουζιάς που προκαλούνται από τον μύκητα *Fusarium*

Το σύνδρομο του βραδέος μαρασμού είναι ένα σύνολο ορατών ή μικροσκοπικών συμπτωμάτων τα οποία προκαλούνται από τα παραπάνω προαναφερθέντα παθογόνα της ομάδας των αδρομυκώσεων, και αφορά στη βραδεία εξάπλωση μίας ασθένειας που εντάσσεται συμπτωματολογικά στα γενικότερα συμπτώματα της μάρανσης (φύλλο σημαίας, χλωρώσεις, κιτρινίσματα, νεκρώσεις και φυλλόπτωση), που χαρακτηρίζονται από βραδεία εξέλιξη. Το σύνδρομο της ημιπληγίας αφορά στην εκδήλωση πλευρικών συμπτωμάτων, δηλαδή τα συμπτώματα εμφανίζονται στο μισό φυτό, ενώ το άλλο μισό παραμένει υγιές (Τζάμος, 2007).

Τα συμπτώματα των αδρομυκώσεων οφείλονται στην εγκατάσταση και δράση των παθογόνων μέσα στα αγγεία του ξύλου, εμποδίζοντας τη διακίνηση του ανοδικού ρεύματος χυμού. Όσο προχωράει η ανάπτυξη του μύκητα μέσα στους ιστούς του ξενιστή, τα συμπτώματα εντείνονται λόγω αδυναμίας του φυτού να απορροφήσει νερό και θρεπτικά στοιχεία από το έδαφος. Έτσι προκαλείται μάρανση και χλώρωση του φυτού έλλειψης νερού και ελλιπούς θρέψης αλλά και ως επακόλουθο της δράσης ενζύμων και τοξινών. Στο τελευταίο στάδιο τα παθογόνα αποκλείουν και καταστρέφουν εντελώς το αγγειακό σύστημα του φυτού προκαλώντας τη θανάτωση του τελευταίου (Παναγόπουλος, 1995).

Σε μικροσκοπική εξέταση εγκαρσίων τομών του στελέχους από προσβεβλημένα φυτά παρατηρούνται άφθονες μυκηλιακές υφές μέσα στα αγγεία του ξύλου καθώς και σπόρια των μυκήτων. Για την απόφραξη των αγγείων ευθύνεται κυρίως η ανάπτυξη του μυκηλίου μέσα σε αυτά, αλλά και ουσίες που παράγονται από τον ξενιστή ως αντίδραση στην παρουσία του παθογόνου. (Παναγόπουλος, 1995).

Τα φυτά που προσβάλλονται συχνά ενεργοποιούν μηχανισμούς άμυνας, όπως η εναπόθεση λιγνίνης και καλλόζης και η δημιουργία τυλώσεων. Οι τυλώσεις ή θηλίδες είναι διατάσεις και διογκώσεις της κυτταρικής μεμβράνης των παρεγχυματικών κυττάρων των αγγειωδών δεσμίδων στα σημεία των πλάγιων δεσμίδων στα σημεία των πλάγιων βοθρίων προς το εσωτερικό των αγγείων. Προκαλούνται από ορμονικές διαταραχές στο φυτό ή από επίδραση ορμονικών ουσιών των

παθογόνων στις κυτταρικές μεμβράνες του ξενιστή. Θεωρείται ότι η παρουσία πολλών τυλώσεων σχετίζεται με την αντοχή φυτών στις αδρομυκώσεις, διότι δυσχεραίνει την αποίκιση και προέλαση του παθογόνου στα αγγεία του ξύλου. Οι ευπαθείς ποικιλίες σχηματίζουν τυλώσεις με βραδύτητα και σε περιορισμένο αριθμό, ώστε να μη διασφαλίζεται παρεμπόδιση της προελάσεως του παθογόνου (Τζάμος, 2007). Η εναπόθεση της λιγνίνης ως μηχανισμού αντοχής αυξάνει τη μηχανική αντοχή των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών και παραλλήλως μειώνει την ευαισθησία τους στην αποδιοργανωτική δράση υδρολυτικών ενζύμων. Περιορίζει τη διάχυση των τοξινών των παθογόνων και τη διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων για το παράσιτο. Παρεμποδίζει επίσης την ανάπτυξη του παθογόνου με τη λιγνιτοποίηση των κυτταρικών τοιχωμάτων του ίδιου του μύκητα. Ένας ακόμα μηχανισμός αντοχής είναι η εναπόθεση καλλόζης στις θέσεις διεισδύσεως μυκηλιακών υφών στα φυτικά κύτταρα (Τζάμος, 2007).

	Fusarium oxysporum	Verticillium dahliae
Τύπος καλλιέργειας που μολύνεται		
• Αγρός	+	+
• Προστατευμένες καλλιέργειες	+	+/-
Συμπτώματα στο στέλεχος		
• Αγγεία κίτρινα – ελαφριά καστανά	-	+
• Αγγεία βαθιά καστανά	+	-
• Σήψη ιστών κοντά στα αγγεία	+	-
Κολλώδη εκκρίματα και σήψη στελέχους	+	-
Ανάρρωση ασθενών φυτών	-/+	+

ΠΙΝΑΚΑΣ 2 :Σύγκριση των μυκήτων F.oxysporum και V. dahliae

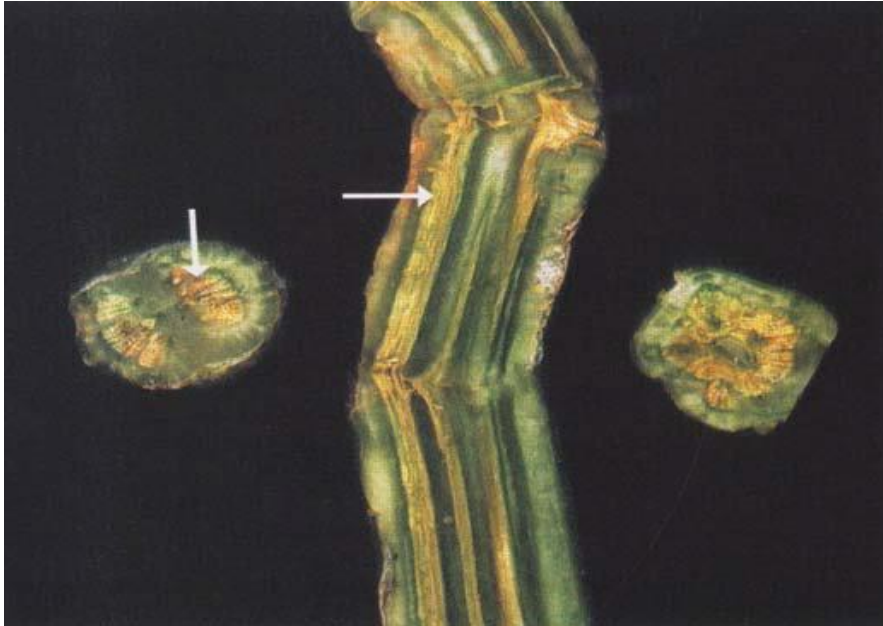
Πηγή : D.Blancard H.Lecoq M.Pitrat, 1994



Εικόνα 4 : Καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου των βλαστών *Fusarium oxysporum f.sp. niveum*.



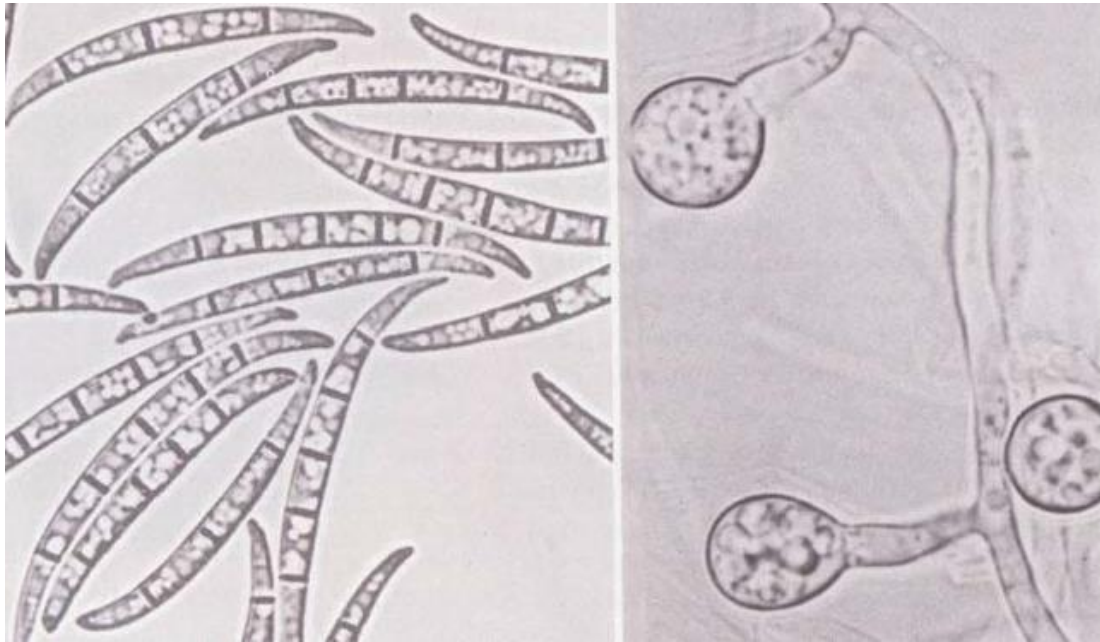
Εικόνα 5 : Από αριστερά είναι τα φυτά μας με το φουζάριο και τα άλλα είναι οι μάρτυρες χωρίς καμία μόλυνση.



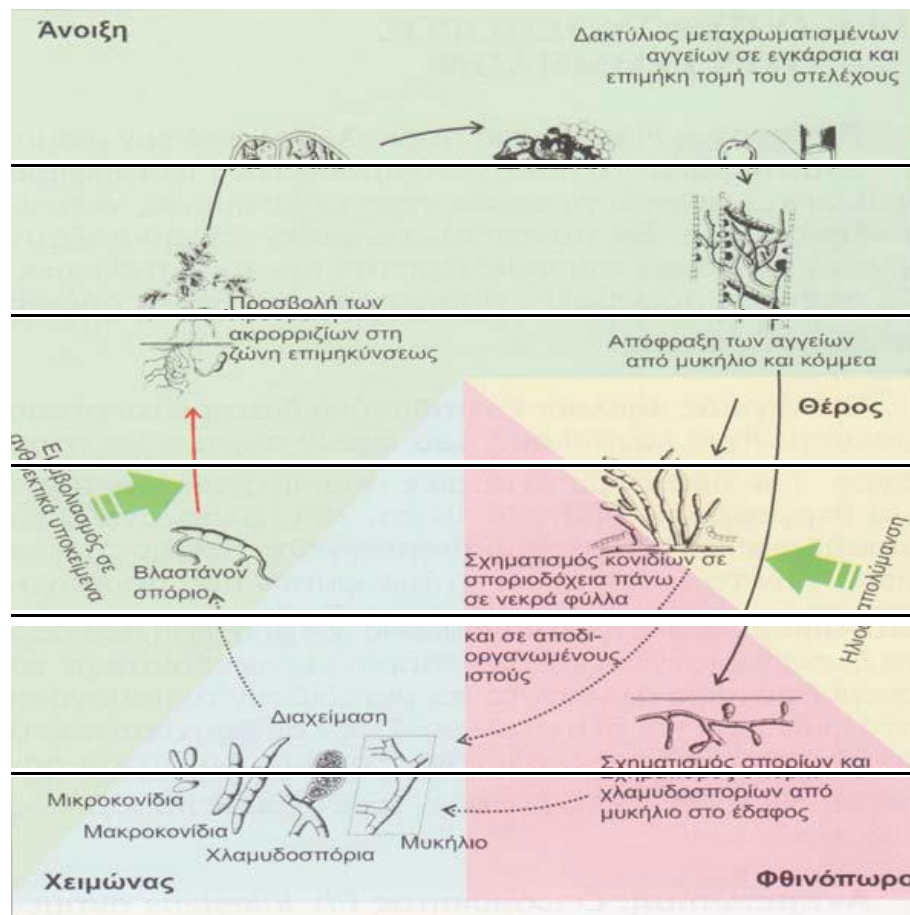
Εικόνα 6: Στέλεχος φυτού καρπουζιάς με προσβολή από αδροφουζαρίωση. Μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου σε κατά μήκος και κατά πλάτος τομές στελέχους. (<http://nefeli.lib.teicrete.gr>)



Εικόνα7: Αδροφουζαρίωση καρπουζιάς (*Fusarium oxysporum f.sp. niveum*) (μεταχρωματισμός αγγείων). (<http://nefeli.lib.teicrete.gr>)



Εικόνα 8: Ο μύκητας *Fusarium oxysporum*. Αριστερά μακροκονίδια ,δεξιά χλαμυδοσπόρια (επάκρια). Φωτογραφίες οπτικού μικροσκοπίου. (<http://nefeli.lib.teicrete.gr>)



Εικόνα 9: Η αδροφουζαρίωση της καρπουζιάς : Βιολογικός κύκλος (<http://nefeli.lib.teicrete.gr>)

1.2.2. Αδροφουζαριώσεις

Οι αδροφουζαριώσεις προκαλούνται από διάφορα στελέχη του *Fusarium oxysporum*, τα οποία μπορούν να θεωρηθούν ως παθότυποι που προσβάλουν αποκλειστικά είτε ορισμένα είδη (*forma speciales*, διάφορες φυσιολογικές μορφές) ή μερικές ποικιλίες μέσα σ' ένα είδος (*races*, φυλές). Ο μύκητας *Fusarium oxysporum f.sp. niveum* προκαλεί τήξεις και αδρομύκωση στις καρπουζιές. Αναφέρεται ότι μερικές απομονώσεις του παθογόνου *Fusarium oxysporum f.sp. melonis* μπορεί να μολύνει και νεαρά φυτά καρπουζιάς. Το παθογόνο είναι ευρύτατα διαδεδομένο σε πολλές χώρες στην Αμερική , Ασία και την Ευρώπη. Η ασθένεια μπορεί να δημιουργήσει σοβαρά προβλήματα στην καλλιέργεια ενώ δεν είναι σπάνιες οι περιπτώσεις καταστροφής όλων των φυτών της καλλιέργειας (Παναγόπουλος,1995).

1.2.3 Ταξινόμηση του μύκητα

Βασίλειο : Mycota

Φύλο: Deuteromycetes

Κλάση: Hyphomycetes

Τάξη: Moniliales

Οικογένεια: Moniliaceae

Γένος: *Fusarium*

1.2.4. Μορφολογία του μύκητα

Το μυκήλιο του μύκητα *Fusarium oxysporum* αρχικά είναι άσπρο αλλά αργότερα αποκτά ένα ροζ-ερυθροκυανό χρωματισμό και είναι διακριτά τα ροδόχροα σποριοδόχεια που σχηματίζει ο μύκητας (Booth, 1977). Τα μικροκονίδια δημιουργούνται πάνω σε ένα φιαλίδιο, που σχηματίζεται στην υφή ή αποτελεί διακλάδωση του κονιδιοφόρου. Είναι ωοειδή-ελλειψοειδή, κυλινδρικά και διαστάσεων 5-12 X 2,2-3,5 μm. Τα μακροκονίδια σχηματίζονται είτε στους κονιδιοφόρους είτε στα

σποριοδόχεια. Έχουν λεπτά τοιχώματα με 3-5 εγκάρσια τοιχώματα, οξυκατάληκτα άκρα και διαστάσεων 27-46 X 3-5 μm(των 3 χωρισμάτων), 35-60 X 3-5 μm (των 5 χωρισμάτων) και 50-66 X 3,5-5μm (των 6-7 χωρισμάτων). Τα χλαμυδοσπόρια είναι επάκρια ή ενδιάμεσα και σχηματίζονται συνήθως μεμονωμένα και περιστασιακά κατά ζεύγη ή και σε αλυσίδες (Τζάμος, 2007).

1.2.5. Επιβίωση – Διασπορά – Μόλυνση

Ο μύκητας σε συνθήκες υψηλής υγρασίας σχηματίζει ροδόχροα σποριοδόχεια πάνω στις νεκρωτικές ζώνες στα στελέχη των φυτών. Μπορεί να επιβιώσει στο έδαφος σχηματίζοντας άφθονα χλαμυδοσπόρια τα οποία είναι πολύ ανθεκτικές μυκηλιακές κατασκευές και αποτελούν τα όργανα επιβίωσης και διαχείμασης του μύκητα στο έδαφος. Τα χλαμυδοσπόρια δεν σχηματίζονται σε ζωντανό ιστό, είναι αποτέλεσμα σαπροφυτικής αναπτύξεως σε διάφορους τύπους οργανικής ύλης και αποτελούν τι μεγάλες ποσότητες του μολύσματος (D. Blancard H. Lecoq M. Potrat, 1994). Το παθογόνο με τη μορφή των χλαμυδοσπορίων διατηρείται στο έδαφος και επιβιώνει ακόμα και χωρίς την παρουσία ευπαθών ξενιστών. Τα χλαμυδοσπόρια αποτελούν την πολλαπλασιαστική μονάδα και είναι υπεύθυνα για την αρχική μόλυνση του ξενιστή. Τα κονίδια δεν φαίνεται να παίζουν κάποιο ρόλο στη μακροχρόνια επιβίωση του παθογόνου(Παναγόπουλος, 1995). Η τοπική διασπορά των μολυσμάτων γίνεται με το νερό , με τα υπολείμματα της καλλιέργειας και με το έδαφος που μεταφέρεται με τα εργαλεία και τα μηχανήματα κατεργασίας του εδάφους. Σε μεγάλες αποστάσεις το παθογόνο μεταφέρεται κυρίως με το πολλαπλασιαστικό υλικό (σπόρους, εμβόλια , μοσχεύματα, φυτάρια). Η μόλυνση των φυτών γίνεται από το ριζικό τους σύστημα με απευθείας είσοδο του παθογόνου. Οι πληγές στις ρίζες διευκολύνουν τις μολύνσεις (Παναγόπουλος, 1995).

Ο μύκητας επιβιώνει και σε εναλλακτικούς ξενιστές όπως είναι η τομάτα και η μηδική (Banhashemi and Dezeuw,1973). Τα συμπτώματα της ασθένειας μειώνονται δραματικά πάνω από τους 30 °C. Σε μεγάλες εδαφικές θερμοκρασίες τα φυτά μολύνονται αλλά μπορεί να μην

εμφανίσουν συμπτώματα μάρανσης, ενώ χλωρώσεις και νανισμός μπορεί να εμφανιστούν. Έτσι εμφανίζονται τα πρώτα συμπτώματα στα φυτά νωρίς κατά την καλλιεργητική περίοδο. Την ασθένεια ευνοούν η πλούσια αζωτούχος λίπανση (ιδιαίτερα η αμμωνία -NH_4) και τα χαμηλά επίπεδα ασβεστίου και καλίου στο έδαφος (Παναγόπουλος, 1995). Υπάρχει σημαντική διακύμανση μεταξύ της *in vitro* άριστης θερμοκρασίας για το παθογόνο ($28\text{-}30^\circ\text{C}$) και της θερμοκρασίας στην οποία το παθογόνο αποκτά την μέγιστη ικανότητα μολυσματικότητας και παρουσιάζει τα πλέον έντονα συμπτώματα ($18\text{-}22^\circ\text{C}$). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι συνθήκες που ευνοούν την εμφάνιση συμπτωμάτων ποικίλουν. Τα συμπτώματα μααρασμού είναι πιο έντονα όταν η θερμοκρασία αυξάνεται και η σχετική υγρασία μειώνεται. Αυτό συμβαίνει τις ζεστές ώρες της ημέρας συνήθως με ηλιοφάνεια. Τα προσβεβλημένα φυτά συνήθως αναλαμβάνουν την νύκτα ή τις νεφосκεπείς μέρες. Η θρεπτική κατάσταση των φυτών επηρεάζει την ευαισθησία τους στην ασθένεια. (Blancard, 1994).

1.2.6. Αντιμετώπιση του παθογόνου

Κατά την διάρκεια της καλλιέργειας δεν υπάρχει αποτελεσματικός τρόπος καταπολέμησης της ασθένειας. Ο πιο αποτελεσματικός τρόπος αντιμετώπισης της φουζαρίωσης είναι με τη λήψη προληπτικών μέτρων πριν την εγκατάσταση της καλλιέργειας, η οποία μπορεί να γίνει με διάφορα καλλιεργητικά μέτρα. Μεγάλη σημασία έχει η όσο το δυνατόν γρηγορότερη επισήμανση των πρώτων ασθενών φυτών μέσα σε μία καλλιέργεια. Τα ασθενή φυτά πρέπει να ξεριζώνονται επιμελώς μαζί με το ριζικό τους σύστημα και να καταστρέφονται, ώστε το παθογόνο να μην μεταδοθεί και στα υπόλοιπα φυτά της καλλιέργειας. Μετά από τέτοιους χειρισμούς θα πρέπει να γίνεται επιμελημένο πλύσιμο των χεριών των εργαζομένων. Ακόμα, κατά το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου, πρέπει να γίνει απαραίτητως καταστροφή των υπολειμμάτων της καλλιέργειας, που λειτουργούν σαν θέσεις επιβίωσης του μύκητα και να μην εγκαταλείπονται έξω από το θερμοκήπιο ή δίπλα στην καλλιέργεια (Παναγόπουλος, 1995).

Απαραίτητη είναι η λήψη μέτρων υγιεινής για αποφυγή μετάδοσης της ασθένειας. Συνιστάται ο καθαρισμός και απολύμανση των γεωργικών μηχανημάτων και των εργαλείων που χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια του εδάφους και τις καλλιεργητικές εργασίες αντίστοιχα. Επιπλέον, πρέπει να αποφεύγεται η δημιουργία πληγών με τα καλλιεργητικά εργαλεία στην περιοχή του λαιμού και των ριζών καθώς και ο τραυματισμός των ριζών κατά την μεταφύτευση φυταρίων (Παναγόπουλος, 1995). Η ασθένεια ευνοείται από τη χρήση μεγάλης ποσότητας αμμωνιακών αζωτούχων λιπασμάτων, επομένως προτιμάται η χορήγηση νιτρικών παρά αμμωνιακών λιπασμάτων. Γενικά η ισορροπημένη λίπανση επηρεάζει τόσο την ευαισθησία όσο και την αντοχή των φυτών. Η χρησιμοποίηση προϊόντων κομποστοποίησης για την λίπανση του εδάφους μπορεί να γίνεται μόνο εφόσον τα προϊόντα είναι απαλλαγμένα από το παθογόνο. Η αποθήκευση του λιπάσματος δεν πρέπει να γίνεται κοντά στις θερμοκηπιακές κατασκευές ούτε να αναμιγνύεται με άμμο ή έδαφος προερχόμενο από αγρό. Αναφέρεται ότι η αύξηση του pH του εδάφους στο 6.5-7.0 συντελεί επίσης στην καταπολέμηση του *Fusarium*. Εν τούτοις δεν θα πρέπει να αυξάνεται το pH , διότι αυτό ευνοεί την ανάπτυξη του μύκητα *Verticillium* (Παναγόπουλος, 1995). Ένα ακόμα καλλιεργητικό μέτρο είναι και η αποφυγή υπερβολικής εδαφικής υγρασίας, η ισοπέδωση του εδάφους για καλή αποστράγγιση και η άρδευση με συστήματα που ευνοούν τη μετάδοση του μολύσματος (π.χ. σύστημα στάγδην) (Παναγόπουλος, 2000). Η εφαρμογή ενδεδειγμένης αμειψισποράς, σε αντίθεση με παρατεταμένη μονοκαλλιέργεια, συμβάλλει στην βελτίωση της δομής του εδάφους και στην αύξηση της περιεκτικότητας του σε οργανική ουσία, βελτιώνοντας έτσι τα γενικά βιολογικά του χαρακτηριστικά με αποτέλεσμα τη διέγερση της ανάπτυξης προς ωφέλιμων οργανισμών του εδάφους. Η εφαρμογή της αμειψισποράς συνεισφέρει στη διακοπή των κύκλων πολλαπλασιασμού και ανάπτυξης διαφόρων παθογόνων και ζιζανίων που συνδέεται με τη συνεχή μονοκαλλιέργεια (Παναγόπουλος 2000).

Η ηλιοαπολύμανση είναι μια μέθοδος που εκμεταλλεύεται την ηλιακή ακτινοβολία, η οποία προκαλεί αύξηση της θερμοκρασίας του εδάφους, του οποίου η επιφάνεια καλύπτεται με ειδικά διάφανα

πλαστικά φύλλα πολυαιθυλενίου, αφού προηγουμένως έχει εφαρμοστεί άρδευση. Στόχος αυτής της μεθόδου είναι η θανάτωση φυτοπαθογόνων οργανισμών που υπάρχουν στο έδαφος, κυρίως στα ανώτερα 5-10cm του εδάφους, λόγω ανάπτυξης απαγορευτικών για την επιβίωση τους θερμοκρασιών και υψηλής υγρασίας. Η θερμότητα που προέρχεται από την ηλιακή ακτινοβολία, παγιδεύεται με αποτέλεσμα η θερμοκρασία στα πρώτα 5cm του εδάφους να φθάνει μέχρι και τους 52-53 °C, ενώ στο ακάλυπτο έδαφος η μέγιστη θερμοκρασία του εδάφους είναι 37-38 °C. Η μέθοδος αυτή μειώνει σημαντικά την ποσότητα του μολύσματος στο έδαφος συνεπώς και τις πιθανότητες να εκδηλωθεί η ασθένεια. Η αποτελεσματικότητα της ηλιοαπολύμανσης δεν έγκειται μόνο στη μείωση του πληθυσμού των παθογόνων αλλά και την αύξηση της συγκέντρωσης και της δραστηριότητας των ανταγωνιστικών προς τα παθογόνα μικροοργανισμών. Έχει ευρύ φάσμα δράσης εναντίον μυκήτων, βακτηρίων, νηματωδών, αρθροπόδων και ζιζανίων. Ιδιαίτερα αποτελεσματική μέθοδος κυρίως σε περιοχές της εύκρατης ζώνης κατά τους καλοκαιρινούς μήνες όπου επικρατούν υψηλές θερμοκρασίες και υψηλή ηλιοφάνεια (Elena and Tjamos,1992). Ταυτόχρονη εφαρμογή ηλιοαπολύμανσης και ενός χημικού απολυμαντικού εδάφους όπως το metham sodium (Benyehet et al.1988) ή ενός θερμοανθεκτικού βιολογικού παράγοντα όπως το βακτήριο *Raenibacillus alvei* K165, μπορεί να δώσει καλύτερα αποτελέσματα και να καθυστερήσει την επανεγκατάσταση του παθογόνου (Antonίου et al.1993 ; Rodrigo et al 2009). Τα ειδικά μέτρα αντιμετώπισης της ασθένειας είναι ο εμβολιασμός σε ανθεκτικά υποκείμενα όπως το *Benincasa cerifera*, *Cucurbita ficifolia* και *Cucurbita pepo var medullosa*. Το *Benincasa cerifera* όμως είναι ευπαθές στα παθογόνα *Pyrenochaeta lycopersici* και *Verticillium albo-atrum* (Παναγόπουλος, 1995). Η επιλογή ανθεκτικών ποικιλιών είναι από τους σημαντικότερους τρόπους αποφυγής της ασθένειας της φουζαρίωσης και η χρήση τους δίνει άριστα αποτελέσματα. Σήμερα διατίθενται στο εμπόριο αρκετές ποικιλίες που περιέχουν γονίδια ανθεκτικότητας ανάλογα με τη φυλή του μύκητα που αποτελεί πρόβλημα στην περιοχή που πρόκειται να εγκατασταθεί η καλλιέργεια. (Παναγόπουλος 1995).

Τα εδαφογενή παθογόνα δημιουργούν προβλήματα σε πολλές καλλιέργειες ανά τον κόσμο και παραμένουν το αντικείμενο ενδιαφέροντος πολλών ερευνητών όχι μόνο λόγω των οικονομικών επιπτώσεων τους αλλά και της μεγάλης δυσκολίας αντιμετώπισης τους. Η δυσκολία στην αντιμετώπιση τους έγκειται κυρίως στην πολυπλοκότητα του εδαφικού περιβάλλοντος σε σύγκριση με της αερομεταδιδόμενες ασθένειες. Η αποτελεσματικότητα των εφαρμογών μυκητοκτόνων μειώνεται καθώς το παθογόνο βρίσκεται προφυλαγμένο μέσα στο έδαφος και επιπλέον οι δραστικές ουσίες μεταφέρονται με δυσκολία προς και μέσω του ριζικού συστήματος των φυτών. Επιπλέον πολλά σκευάσματα που χρησιμοποιούνταν για την σπολύμανση των εδαφών όπως το βρωμιούχο μεθύλιο , έχουν καταργηθεί κάνοντας ακόμα πιο σημαντική την έρευνα πάνω στη βιολογική αντιμετώπιση.

1.3. Βιολογική αντιμετώπιση των ασθενειών

Οι νέες τάσεις στη γεωργική παραγωγή καθώς και η ανησυχία όσον αφορά τη χρήση φυτοφαρμάκων έχει οδηγήσει στην αναθέρμανση του ενδιαφέροντος για φιλικότερες προς το περιβάλλον μεθόδους αντιμετώπισης ασθενειών. Οι πιο διαδεδομένες εναλλακτικές πρακτικές έναντι της χρήσης φυτοφαρμάκων είναι η ανάπτυξη ανθεκτικών φυτών καθώς και η έρευνα πάνω στην εφαρμογή βιολογικών παραγόντων. Μέχρι πρόσφατα η ανάπτυξη ανθεκτικών φυτών παρουσίαζε μεγαλύτερη επιτυχία στην πράξη σε σύγκριση με την ανάπτυξη βιολογικών παραγόντων. Η βιολογική αντιμετώπιση των εδαφογενών παθογόνων είναι μια ιδιαίτερος περίπλοκη διαδικασία , όπου εκδηλώνεται στο δυναμικό περιβάλλον αλληλεπίδρασης της ρίζας και τους εδάφους, που ονομάζεται ριζόσφαιρα. Το έδαφος της ριζόσφαιρας χαρακτηρίζεται από ραγδαίες μεταβολές, συνεχή μικροβιακή δραστηριότητα και υψηλούς πληθυσμούς βακτηρίων συγκριτικά με το έδαφος που βρίσκεται πέραν της ζώνης του 1mm(Τζάμος,2007). Στα περισσότερα γνωστά παραδείγματα επιτυχούς βιολογικής αντιμετώπισης έχει χρησιμοποιηθεί ένας βιολογικός παράγοντας εναντίον ενός συγκεκριμένου παθογόνου. Συχνά οι

μικροοργανισμοί που δρουν ως βιολογικοί παράγοντες έχουν ένα σχετικά στενό φάσμα δραστηριότητας σε σχέση με τα συνθετικά φυτοφάρμακα ενώ μπορεί να εμφανίσουν ασυνέπεια στην απόδοση τους στην γεωργική πράξη με αποτέλεσμα την περιορισμένη εμπορική χρήση των βιολογικών παραγόντων για την αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων (Raupach and Kloepper, 1998). Η επιτυχία των βιολογικών παραγόντων μπορεί να περιορίζεται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες καθώς το περιβάλλον έχει σημαντική επίδραση στην επιβίωση και στη δραστηριότητα των μικροοργανισμών. Παρ'όλα αυτά συνεχίζεται η έρευνα πάνω στην αντιμετώπιση παθογόνων με τη χρήση βιολογικών παραγόντων προκειμένου να ενισχυθεί η αποτελεσματικότητά τους. Στις προσπάθειες αυτές συμπεριλαμβάνεται η γενετική μηχανική και η διερεύνηση των μηχανισμών εισόδου και εγκατάστασης των παθογόνων στο φυτό (Cook,1993)

1.3.1. Μηχανισμοί δράσης βιολογικών παραγόντων

Γενικά η βιολογική αντιμετώπιση στηρίζεται στη χρήση μικροοργανισμών που περιορίζουν ή παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των παθογόνων. Οι μικροοργανισμοί αυτοί που ονομάζονται βιολογικοί παράγοντες, δρουν με τους εξής τρόπους: ανταγωνισμός για θέση και θρεπτικά στοιχεία, αντιβίωση, παρασιτισμός και επαγωγή της άμυνας του φυτού. Σε πολλά συστήματα βιολογικής αντιμετώπισης που έχουν μελετηθεί η αντιβίωση φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην καταστολή της ασθένειας. Ο μηχανισμός της αντιβίωσης στηρίζεται στην παραγωγή εξειδικευμένων τοξικών μεταβολιτών μικροβιακής προέλευσης, μυκοτοξινών εδάφους, ενζυμικών λυτικών παραγόντων ή άλλων ενζύμων. Τα περισσότερα αντιβιοτικά παράγονται από εδαφογενείς μικροοργανισμούς, επομένως η αντιβίωση επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την ανταγωνιστική δράση βακτηρίων που παράγουν αντιβιοτικά κατά των εδαφογενών παθογόνων. Ο ρόλος των αντιβιοτικών στην βιολογική αντιμετώπιση ασθενειών των φυτών έχει μελετηθεί με τη δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών, τα οποία δεν

παράγουν αντιβιοτικά. Η παραγωγή αντιβιοτικού ενδεχομένως να προσφέρει στο μικροοργανισμό πλεονεκτήματα στον ανταγωνισμό για θρεπτικά στοιχεία και χώρο σε διάφορες θέσεις οικολογικής σημασίας (Τζάμος , 2007). Μία ελκυστική ιδιότητα των στρατηγικών βιολογικής αντιμετώπισης είναι ότι η πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικού πληθυσμού στα αντιβιοτικά που παράγονται από τους βιολογικούς παράγοντες είναι πολύ χαμηλή. Αυτό συμβαίνει για δύο λόγους. Πρώτον στα περισσότερα συστήματα ξενιστή – παθογόνου η βιολογική καταπολέμηση συμβάλει με περισσότερα από ένα αντιβιοτικά στον ανταγωνισμό και δεύτερον η συνολική έκθεση του πληθυσμού του παθογόνου στα αντιβιοτικά είναι χαμηλή καθώς γενικά ο πληθυσμός του βιολογικού παράγοντα εντοπίζεται στη ρίζα του φυτού και επομένως η πίεση φυσικής επιλογής ελαχιστοποιείται (Handelsman and Stabb, 1996).

Οι μικροοργανισμοί ανταγωνίζονται μεταξύ τους για τροφή και για βασικά θρεπτικά στοιχεία στο έδαφος αλλά και στην περιοχή της ριζόσφαιρας και της φυλλόσφαιρας. Ο ανταγωνισμός μεταξύ των βιολογικών παραγόντων και του παθογόνου με την αποστέρηση των θρεπτικών του συστατικών μπορεί να οδηγήσει στη μείωση των δραστηριοτήτων του παθογόνου. Μεγάλοι βακτηριακοί πληθυσμοί εγκαθίστανται στο ριζικό σύστημα των φυτών και καταναλώνουν ποσότητες άνθρακα και αζώτου που είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση των μορφών διαχειμάσεως των παθογόνων ή και για τον αποικισμό της ριζόσφαιρας (Τζάμος, 2007). Το πλέον χαρακτηριστικό παράδειγμα ανταγωνισμού μεταξύ βιολογικών παραγόντων και παθογόνων αποτελεί ο θρεπτικός ανταγωνισμός για το σίδηρο. Ο σίδηρος βρίσκεται σε άφθονες ποσότητες στο έδαφος, αλλά η μεγαλύτερη του ποσότητα υπάρχει ως αδιάλυτη μορφή του υδροξειδίου του σιδήρου και επομένως είναι διαθέσιμος στους οργανισμούς σε συγκεντρώσεις της τάξεως 10^{-18} M ή και χαμηλότερες στα εδαφικά διαλύματα σε ουδέτερο pH. Αυτό αποτελεί πρόκληση για τα βακτήρια τα οποία απαιτούν για την ανάπτυξη σίδηρο σε συγκεντρώσεις μmol. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος τα βακτήρια έχουν αναπτύξει υψηλής συγγένειας συστήματα πρόσληψης για τη δέσμευση του σιδήρου μέσα στο κύτταρο τους. Ο τυπικός

μηχανισμός περιλαμβάνει ένα σιδηροφόρο που δεσμεύει το σίδηρο και μια πρωτεΐνη που τον μεταφέρει μέσα στο κύτταρο (Handelsman and Stabb, 1996). Οι σιδηροφόροι συμβάλλουν στον περιορισμό των ιόντων σιδήρου στη ριζόσφαιρα , αποστερώντας τον από τα παθογόνα και μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο την ανάπτυξη τους. Εκτός του ρόλου της μεταφοράς του τρισθενούς σιδήρου , οι σιδηροφόροι βοηθούν στην ανάπτυξη του φυτού και μερικοί εξ αυτών είναι δυνητικά αντιβιοτικά (Τζάμος, 2007).

Εκτός από τον μηχανισμό της αντιβίωσης και του ανταγωνισμού ορισμένοι βιολογικοί παράγοντες μπορούν να μειώσουν την ένταση της ασθένειας παρασιτώντας το παθογόνο. Οι μικροοργανισμοί που προκαλούν κυτταρόλυση άλλων οργανισμών είναι ευρέως διαδεδομένοι στα φυσικά οικοσυστήματα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι μύκητες του γένους *Trichoderma* spp οι οποίοι έχουν την ικανότητα να παρασιτούν άλλους φυτοπαθογόνους μύκητες όπως ο μύκητας *Rhizoctonia solani*. Το παράσιτο αναπτύσσεται με διακλαδώσεις των υφών του προς τον ξενιστή μύκητα, περιελίσσεται και προσκολλάται σε αυτόν με κατασκευές, όπως οι πλάκες συγκρατήσεως, οι οποίες διατρύπουν το μυκήλιο του παθογόνου(Chet et al., 1981 ; Goldman et al., 1994). Η πέψη των κυτταρικών τοιχωμάτων του μύκητα πραγματοποιείται από μια συστοιχία εκκρινόμενων ενζύμων(πρωτεάσες, χιτινάσες , και γλουκανάσες) (Τζάμος , 2007). Άλλα μυκοπαράσιτα όπως τα *Coniothyrium minitans* (Jones et al., 2004) και *Sporidesmium sclerotivorum* (Adams and Fravel, 1993) είναι αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση παθογόνων που σχηματίζουν σκληρώτια.

Το φαινόμενο της επαγόμενης διασυστηματικής αντοχής (induced systemic resistance, ISR) διεγείρεται από βιολογικούς παράγοντες (π.χ. ριζοβακτήρια) που δραστηριοποιούν λανθάνοντες μηχανισμούς αντοχής με αποτέλεσμα σημαντικές βιοχημικές αλλαγές μέσα στο φυτό, ώστε να αυξάνουν την αντοχή του και να το προετοιμάζουν σε ενδεχόμενη μόλυνση από ένα δυνητικό παθογόνο (Τζάμος, 2007). Σε ορισμένες περιπτώσεις φαίνεται ότι η επαγωγή του μηχανισμού άμυνας των φυτών από βιολογικό παράγοντα οδηγεί στην ενεργοποίηση

γονιδίων που εμπλέκονται και στον μηχανισμό της επίκτητης διασυστηματικής αντοχής(systemic acquired resistance, SAR), αλλά δεν είναι πάντα αυτή η περίπτωση (Handelsman and Stabb, 1996). Η επίκτητη διασυστηματική αντοχή είναι η άμυνα των φυτών σε <<δεύτερο χρόνο>> και επάγεται μετά το σχηματισμό αντίδρασης υπεραισθησίας στο παθογόνο. Αρχικά η επαγόμενη ανθεκτικότητα παρατηρείται 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 και αναπτύσσεται σε απομακρυσμένα, μη προσβεβλημένα μέρη του φυτού οπότε καλείται επίκτητη διασυστηματική αντοχή (Agrios, 2005). Ο βιολογικός παράγοντας *Pseudomonas fluorescens* CHAO επάγει την παραγωγή πρωτεϊνών παθογένεσης συμβάλλοντας στην άμυνα του φυτού εναντίων του ιού TNV (tobacco necrosis virus) και επάγει τη συσσώρευση σαλικυλικού οξέος, το οποίο παίζει ρόλο σήματος στην ανοσοποίηση (Maurhofer et al., 1994a). Μεταλλαγμένα στελέχη του CHAO τα οποία δεν παράγουν τον σιδηροφόρο ργοverdine δεν επάγουν την επίκτητη διασυστηματική αντοχή, υποδηλώνοντας το σημαντικό ρόλο των βακτηριακών μεταβολιτών στην αντιμετώπιση των ασθενειών (Maurhofer et al.,1994a). Επειδή πολλά από τα ριζοβακτήρια έχουν και την ικανότητα να παράγουν αντιβιοτικά, καθώς βρίσκονται πάνω στις ρίζες και να περιορίζουν την ανάπτυξη του παθογόνου, η εξακρίβωση της ενεργοποίησης των μηχανισμών αντοχής για εδαφογενή παθογόνα επιβάλλει το χωροταξικό διαχωρισμό του διεγέρτη βακτηρίου από το παθογόνο (Τζάμος,2007). Όσον αφορά εδαφογενή παθογόνα προκειμένου να αποδοθεί η οποιαδήποτε μείωση του ποσοστού ασθενείας στην επαγόμενη διασυστηματική αντοχή , έχουν γίνει πειράματα όπου το ριζικό σύστημα είναι χωρισμένο και το μη παθογόνο στέλεχος εφαρμόζεται σε διαφορετικές ρίζες από το παθογόνο (split-root system) ή απευθείας στο στέλεχος, ώστε να μην υπάρξει καμία επαφή μεταξύ τους (Mandeel and Baker,1991 ; Kroon et al., 1992; Olivain et al.,1995 ;Fuch et al., 1997; Larkin and Fravel, 1999). Στην αντιμετώπιση της φουζαρίωσης με το βακτήριο *P. fluorescens*, η χρήση παρασκευάσματος λιποπολυσακχαριτών από την κυτταρική επιφάνεια του βακτηρίου προκάλεσε την επαγωγή του αμυντικού συστήματος στο

ίδιο βαθμό αποτελεσματικότητας όπως και τα ζωντανά βακτήρια, δείχνοντας ότι η βιολογική αντιμετώπιση δεν οφείλεται αναγκαστικά στην μεταφορά του βακτηρίου ή ενός αντιβιοτικού μέσα στο φυτό (Leeman et al., 1995a, 1995b). Προστασία με ενεργοποίηση της επαγόμενης διασυστηματικής αντοχής με εφαρμογή βακτηρίων του γένους *Bacillus* spp. έχει αναφερθεί εναντίον μυκήτων και βακτηρίων που προκαλούν κηλίδες στα φύλλα, ίων, σήψη στελέχους από μυκητολογικές ασθένειες και κομβοηματώδων (Klopper et al., 2004). Στις περισσότερες περιπτώσεις φαίνεται ότι εκτός από την ενεργοποίηση της επαγόμενης διασυστηματικής αντοχής, είδη του γένους *Bacillus* επιπλέον προωθούν την ανάπτυξη των φυτών. Έρευνες έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση της επαγόμενης διασυστηματικής αντοχής από ορισμένα στελέχη του *Bacillus* spp. ακολουθεί ανεξάρτητο μονοπάτι από το σαλικυλικό οξύ, αλλά εξαρτάται από το ιασμονικό οξύ, το αιθυλένιο και το ρυθμιστικό γονίδιο NPR1 – αποτελέσματα που συμφωνούν με το μοντέλο της επαγόμενης διασυστηματικής αντοχής που ενεργοποιείται από το γένος *Pseudomonas* spp. Ωστόσο σε άλλες περιπτώσεις η επαγόμενη διασυστηματική που ενεργοποιείται από το γένος *Bacillus* spp. εξαρτάται από το σαλικυλικό οξύ και είναι ανεξάρτητη από το ιασμονικό. Επιπλέον, ενώ η επαγόμενη διασυστηματική αντοχή από το γένος *Pseudomonas* spp. δεν οδηγεί σε συσσώρευση του γονιδίου άμυνας PR1 στα φυτά, σε ορισμένες περιπτώσεις στην επαγόμενη διασυστηματική αντοχή από *Bacillus* spp. γίνεται. (Klopper et al., 2004).

Η αποίκιση του ξενιστή-μύκητα από το βιολογικό ανταγωνιστή του θεωρείται ότι είναι απαραίτητη για τη βιολογική αντιμετώπιση μιας ασθένειας. Επισημαίνεται όμως ότι σε αλληλεπιδράσεις που απαιτείται αποικισμός του βιολογικού παράγοντα για την καταστολή της ασθένειας μπορεί να μην χρειάζονται πληθυσμοί υψηλής πυκνότητας. Ορισμένοι δραστικοί ανταγωνιστές όπως στελέχη του βακτηρίου *Bacillus cereus* και *Burkholderia ceparacia*, επιτυγχάνουν μέτριες συγκεντρώσεις πληθυσμών στο ριζικό σύστημα των φυτών, που αναπτύσσονται στον αγρό και φαίνεται να υποκαθιστούν και όχι να αυξάνουν τον πληθυσμό των ενδογενών μελών αυτών των ειδών (Halverson et al., 1993 ; King and Parke, 1996). Επομένως φαίνεται ότι οι

ρίζες έχουν συγκεκριμένο όριο ως προς τον μικροβιακό πληθυσμό που μπορούν να υποστηρίξουν για ορισμένα είδη βακτηρίων (Handelsman and Stabb, 1996).

1.3.2. Το βακτήριο *Raenibacillus alvei* K165 ως βιολογικός παράγοντας

Το στέλεχος K-165 ανήκει στα βακτήρια που προωθούν την ανάπτυξη των φυτών (plant-growth-promoting rhizobacterium, PGPR). Τα βακτήρια αυτά μπορεί να προωθούν την ανάπτυξη των φυτών απλά και μόνο προστατεύοντας τα από τα παθογόνα, όμως σε πολλές περιπτώσεις αυτό μπορεί να συμβεί και απουσία παθογόνου (Van Loon & Bakker, 2003). Ένας από τους πιο καλά μελετημένους μηχανισμούς, με τους οποίους προωθείται η ανάπτυξη των φυτών, είναι η αύξηση της διαθεσιμότητας του N, από τα βακτήρια του γένους *Rhizobium*. Τα βακτήρια που προωθούν την ανάπτυξη των φυτών διευκολύνουν την απορρόφηση και άλλων στοιχείων, κάνοντας διαθέσιμα για τα φυτά εκτός από το άζωτο, όπως P, Fe και διάφορων ιχνοστοιχείων (Dobbelaere et al 2003 : Vessey 2003). Ένας άλλος μηχανισμός είναι η παραγωγή ορμονών και ουσιών, που ρυθμίζουν την ανάπτυξη των φυτών, όπως οι αυξινές (Barbieri and Galli 1993). Ακόμα, επηρεάζουν τη συγκέντρωση του αιθυλενίου στις ρίζες, το οποίο σε μεγάλες ποσότητες προωθεί την γήρανση των φυτών και την αποκοπή των οργάνων. Κάποια βακτήρια διαθέτουν το ένζυμο απαμινάση του 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), που είναι η πρόδρομη ουσία στη σύνθεση του αιθυλενίου στα φυτά και το χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα. Έτσι τα φυτά δεν μπορούν να συσσωρεύσουν αιθυλένιο στις ρίζες τους, που παραμένουν υγιείς (Glick 2005). Οι τρόποι με τους οποίους τα ριζοβακτήρια αυτά προστατεύουν τα φυτά από τα παθογόνα είναι η αντιβίωση, ο ανταγωνισμός για τροφή, η επαγωγή διασυστηματικής αντοχής (ISR), αλλά και μέσω της ίδιας της προώθησης της ανάπτυξης των φυτών. Πολλές φορές τα φυτά είναι ευαίσθητα σε παθογόνα, όταν είναι σε νεαρή ηλικία. Μειώνοντας αυτό το διάστημα μειώνονται και οι πιθανότητες το φυτό να προσβληθεί από

το παθογόνο(Visker et al.2003). Επίσης η μείωση του αιθυλενίου μειώνει την καταπόνηση του φυτού και έτσι το καθιστά πιο ανθεκτικό απέναντι στα παθογόνα (Wang et al. 2000)

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο βιολογικός παράγοντας *Raenibacillus alvei* στέλεχος K165, για την αντιμετώπιση της αδρομύκωσης που προκαλείται από τον μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*. Το βακτήριο απομονώθηκε από τα ακρορρίζια φυτών τομάτας που είχαν καλλιεργηθεί σε ηλιοαπολυμανθέν έδαφος (Tjamos et al., 2004). Η μελέτη έδειξε ότι το βακτήριο έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα, τόσο σε πειράματα θερμοκηπίου όσο και σε πειράματα αγρού, σε φυτά μελιτζάνας και πατάτας εναντίον του μύκητα *V.dahliae*. Το στέλεχος προωθεί την αύξηση των φυτών, παράγει χιτινάσες και είναι ικανό να αποικίσει όχι μόνο τη ριζόσφαιρα αλλά και την ενδοριζόσφαιρα φυτών τομάτας και μελιτζάνας. Ο βιολογικός παράγοντας προστατεύει το φυτό *Arabidopsis thaliana* εναντίον του μύκητα *V.dahliae* επάγοντας την άμυνα των φυτών μέσω του μονοπατιού του σαλικυλικού οξέος (Tjamos et al., 2005).

Το στέλεχος K165 ανήκει στα βακτήρια που προωθούν την ανάπτυξη των φυτών (plant growth- promoting rhizobacteria, PGPR). Τα PGPR βρίσκονται μεταξύ άλλων ομάδων μικροοργανισμών που σχετίζονται με τα φυτά και μπορούν να ενεργοποιήσουν την άμυνα των φυτών. Σύμφωνα με τους van Loon and Glick (2004) χρησιμοποιείται ο όρος επαγόμενη διασυστηματική αντοχή για την αντοχή που αποκτούν τα φυτά μέσω της χρήσης PGPR , η οποία ενεργοποιεί την άμυνα των φυτών με αποτέλεσμα τη μείωση της έντασης ή τη συχνότητα εμφάνισης ασθενειών που προκαλούνται από παθογόνα που είναι χωρικά διαχωρισμένα (split root system) από τον βιολογικό παράγοντα.. Τα βακτήρια αυτά μπορεί να προωθούν την ανάπτυξη των φυτών απλά και μόνο προστατεύοντας τα από τα παθογόνα, όμως σε πολλές περιπτώσεις αυτό μπορεί να συμβεί και απουσία παθογόνου (Van Loon and Bakker,2003).

1.4 Η άμυνα των φυτών

Τα φυτά εκτίθενται συνεχώς σε ένα μεγάλο αριθμό πιθανών παθογόνων. 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. Στη φύση τα φυτά είναι ανθεκτικά σε ορισμένα παθογόνα και έχουν την ικανότητα να μειώνουν την ένταση της ασθένειας παθογόνων (βασικό ανοσοποιητικό σύστημα). Και οι δύο μηχανισμοί περιλαμβάνουν ως πρώτο βήμα την αναγνώριση των δυνητικών παθογόνων μέσω χημικών σημάτων που έχουν ονομαστεί διεγέρτες (elicitors) (Τζάμος, 2007). Μια πρώτη γραμμή ανθεκτικότητας παρέχεται από ένα σύστημα που αναγνωρίζει ευρείες κατηγορίες παθογόνων. Οι διεγέρτες περιλαμβάνουν μόρια παθογόνου προέλευσης (εξωγενείς διεγέρτες) και ενώσεις που απελευθερώνονται από τα φυτά κατά την επαφή τους με τα παθογόνα (ενδογενείς διεγέρτες) (Boller,1995; Ebel and Cosio,1994). Οι διεγέρτες κατατάσσονται σε γενικούς (general) που έχουν την ικανότητα διεγέρσεως του βασικού ανοσοποιητικού συστήματος σε ξενιστές και μη ξενιστές του παθογόνου και τους εξειδικευμένους σε φυλή παθογόνου (race-specific) διεγέρτες που οδηγούν σε ανάπτυξη αντοχής μόνο σε φυτά ξενιστές μέσω του ανοσοποιητικού συστήματος των γονιδίων ανθεκτικότητας. Οι περισσότεροι διεγέρτες είναι συστατικά στοιχεία των κυτταρικών τοιχωμάτων των παθογόνων όπως η γλουκάνη, η χιτίνη και τα λιποπολυσακχαρίδια καθώς και η φλατζελλίνη που αποτελεί δομικό συστατικό του βακτηριακού μαστιγίου και ονομάζονται από κοινού PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) (Nurnberg & Brunnen, 2002). Μεταξύ των διεγερτών που έχουν μελετηθεί περισσότερο στη κατηγορία αυτή είναι ο pep13, μια αλληλουχία από 13 αμινοξέα μιας τρανσγλουταμινάσης (transglutaminase) που βρίσκεται στο κυτταρικό τοίχωμα του ωομύκητα *Phytophthora* και ο flg22, ένα πεπτίδιο 22 αμινοξέων που προέρχεται από τη βακτηριακή πρωτεΐνη φλατζελλίνη (flagellin) (Taiz and Zeiger, 2010). Δεδομένου ότι αυτά τα μόρια υπάρχουν τόσο σε ωφέλιμους όσο και σε ουδέτερους και όχι μόνο σε παθογόνους μικροοργανισμούς στην

πραγματικότητα θα χαρακτηρίζονταν ως γενικά μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με μικρόβια(microbe-associated general molecular patterns. MAMPs).(Pascal and Silke, 2007).

Είναι πιθανό ότι τα MAMPs των ωφέλιμων και των παθογόνων μικροοργανισμών αναγνωρίζονται από το φυτό σε μεγάλο βαθμό με παρόμοιο τρόπο, οδηγώντας τελικά σε μία ενισχυμένη αμυντική ικανότητα του φυτού. Σε αλληλεπιδράσεις του φυτού με ωφέλιμους μικροοργανισμούς, η ενεργοποίηση της άμυνας από τα MAMPs δεν αποκρούει τις ωφέλιμες αλληλεπιδράσεις καθώς εξακολουθεί να μπορεί να χρησιμοποιηθεί από το φυτό. Αυτό υποδηλώνει υψηλό βαθμό συντονισμού και συνεχή μοριακό διάλογο μεταξύ του φυτού και του ωφέλιμου μικροοργανισμού. Οι τοπικές και διασυστηματικές αντιδράσεις άμυνας που ενεργοποιούνται τόσο από τους βιολογικούς παράγοντες όσο και από τους παθογόνους μικροοργανισμούς ελέγχονται από ένα δίκτυο σημάτων στο οποίο οι φυτικές ορμόνες σαλικυλικό οξύ (SA), ιασμονικό οξύ (JA), και αιθυλένιο (ET), παίζουν σημαντικό ρόλο (Van Wees et al.,2008). Κάποια παθογόνα παράγουν ειδικούς διεγέρτες, τους τελεστές ή αλλιώς γόνους αμολυσματικότητας (Avr) που μπορούν να παρέμβουν στη βασική ανοσοποίηση οδηγώντας σε ευαισθησία του φυτού στο παθογόνο. Αυτοί οι εξειδικευμένοι διεγέρτες των παθογόνων συμπεριλαμβάνουν πρωτεΐνες και πεπτίδια που προέρχονται από το κυτταρικό τοίχωμα του παθογόνου ή την εξωτερική μεμβράνη του ή από διεργασία έκκρισης (Boller,1995). Τα ανθεκτικά φυτά διαθέτουν γονίδια ανθεκτικότητας (R genes) τα οποία χρησιμεύουν στο να αναγνωρίσει το φυτό παθογόνα τα οποία διαθέτουν το αντίστοιχο Avr γονίδιο (Staskawicz, 2001 ; Dang et al., 2013). Η αλληλεπίδραση μεταξύ των προϊόντων ενός γονιδίου avr(διεγέρτης) είναι πολύ εξειδικευμένη και συχνά αναφέρεται ως ανθεκτικότητα γονιδίου προς γονίδιο (gene resistance) (Taiz and Zeiger,2010).

1.4.1. Ο ρόλος του σαλικυλικού οξέος στην άμυνα των φυτών

Το σαλικυλικό οξύ παράγεται στους χλωροπλάστες των φυτών και έχει φυσικές ιδιότητες που το καθιστούν ιδανικό για τη μεταφορά του

μέσα στον ηθμό. Αυτό το παράγωγο του βενζοϊκού οξέος συσσωρεύεται στη ζώνη μόλυνσης μετά την αρχική προσβολή και πιστεύεται ότι εγκαθιστά την επίκτητη διασυστηματική αντοχή σε άλλα μέρη του φυτού.(Taiz and Zeiger,2010). Μπορεί να μετακινηθεί ταχέως από το σημείο της αρχικής εφαρμογής ή συνθέσεως του σε απομακρυσμένους φυτικούς ιστούς. Θεωρείται ότι το σαλικυλικό οξύ αποτελεί το ενδογενές σήμα της «ανοσοποίησης» ή ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη διάχυση-μεταφορά του σήματος μετά τη μόλυνση από το παθογόνο. Εξωγενής εφαρμογή σαλικυλικού οξέος επάγει τη σύνθεση πρωτεϊνών παθογενέσεως (PR πρωτεϊνών), κυρίως στη θέση εφαρμογής, εν αντιθέσει με τα παθογόνα που επάγουν τη σύνθεση των πρωτεϊνών παθογενέσεως διασυστηματικά (Τζάμος , 2007).

Για να διερευνηθεί εάν ο βιολογικός παράγοντας *Raenibacillus alvei* K165 επάγει την επαγόμενη διασυστηματική αντοχή μελετήθηκε η έκφραση του γονιδίου PAL1 ως δείκτη ενεργοποίηση του μονοπατιού του σαλικυλικού οξέος (Shoresh et al.,2005). Οι περισσότερες διαδεδομένες ομάδες φαινολικών δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά προέρχονται από τη φαινυλανίνη μέσω απομάκρυνσης ενός μορίου αμμωνίας για το σχηματισμό κινναμωμικού οξέος. Αυτή η αντίδραση καταλύεται από την αμμωνιακή λυάση της φαινυλαλανίνης (phenylalanine ammonia lyase PAL). Η ενεργότητα της PAL συξάνεται υπό την επίδραση περιβαλλοντικών παραμέτρων όπως χαμηλά επίπεδα θρεπτικών, φως(μέσω της επίδρασης του στα φυτοχρώματα) και προσβολές από μύκητες. Το σημείο ελέγχου φαίνεται να είναι η έναρξη της μεταγραφής του αγγελιαφόρου RNA που κωδικοποιεί την PAL , αυξάνοντας έτσι την ποσότητα της PAL στο φυτό, που με τη σειρά της διεγείρει τη σύνθεση των φαινολικών ενώσεων στο φυτό. Η ρύθμιση της ενεργότητας της PAL σε πολλά είδη φυτών γίνεται περισσότερο πολύπλοκη λόγω της ύπαρξης πολλαπλών γονιδίων που κωδικοποιούν την PAL , μερικά από τα οποία εκφράζονται μόνο σε εξειδικευμένους ιστούς ή κάτω από συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες (Logemann et al., 1995).

1.4.2. Ο ρόλος του ιασμονικού οξέος/ αιθυλενίου στην άμυνα των φυτών

Το ιασμονικό οξύ (Jasmonic Acid, JA), παράγεται κατά το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων από το λινολενικό οξύ και ανήκει στην ομάδα των κυκλοπεντανονών. Εξωγενής εφαρμογή ιασμονικού οξέος προωθεί τη γήρανση και ρυθμίζει την ανάπτυξη. Μπορεί να τροποποιήσει την έκφραση γόνων και κατά την δημιουργία πληγής ή υπάρξεως κατάλληλων διεγερτών να έχουμε συσσώρευση ιασμονικού οξέος μέσα στους φυτικούς ιστούς. Το ιασμονικό οξύ πρέπει πρώτα να ενεργοποιηθεί μέσω της μετατροπής του σε συζευγμένη ένωση με το αμινοξύ ισολευκίνη. Μικρές ποσότητες ιασμονικού οξέος επάγουν πρωτεϊνικούς παρεμποδιστές, όπως η θειονίνη, η ωσμοτίνη, η προλίνη των κυτταρικών τοιχωμάτων, ένα σουλφιδρικό παρεμποδιστή πρωτεΐνασων και διάφορα ένζυμα που εμπλέκονται στους μηχανισμούς άμυνας του φυτού. Το ιασμονικό οξύ θεωρείται δευτερογενής επαγωγέας της ανοσοποίησης (Τζάμος, 2007). Το αιθυλένιο (Ethylene, ET) είναι μια πτητική φυτική ορμόνη που επηρεάζει τον ρυθμό ανάπτυξης των φυτών και τη γήρανση. Στις περιπτώσεις ασθενών φυτών το αιθυλένιο παράγεται όταν το παθογόνο διεισδύει στο φυτικό ιστό. Επάγει τη σύνθεση PR πρωτεϊνών, όπως β-1,3 γλουκανάση, χιτινάση και β-γλουκανάση και η παρουσία του δημιουργεί δομικές αλλαγές που αυξάνουν την αντοχή του κυτταρικού τοιχώματος όπως εναπόθεση λιγνίνης και συσσώρευση υδροξυπρολινοπρωτεϊνών. Φαίνεται ότι το αιθυλένιο είναι σήμα της ανοσοποίησης αλλά δεν αποτελεί την ουσία διέγερσης των μηχανισμών άμυνας στα φυτά (Τζάμος, 2007). Το ιασμονικό οξύ και το αιθυλένιο δρουν συνεργαστικά για την ρύθμιση και έκφραση πολλών γονιδίων και τουλάχιστον ορισμένα γονίδια που επάγονται από το ιασμονικό οξύ δεν ενεργοποιούνται σε φυτά που δεν μπορούν να παράγουν ή να αναγνωρίζουν το αιθυλένιο (Xu et al., 1994 ; O'Donnel et al., 1996).

1.5. Θρέψη φυτών

Η θρέψη των φυτών καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την αντοχή ή την ευαισθησία σε ασθένειες. Επηρεάζει την ιστολογική ή τη μορφολογική δομή των φυτών και επομένως την ικανότητα των φυτών να εμποδίσουν ή όχι την είσοδο του παθογόνου. Επιπλέον επιδρούν στην μολυσματικότητα και στην ικανότητα επιβίωσης του παθογόνου. Η έλλειψη θρεπτικών στοιχείων που απαιτούνται για τη σύνθεση χημικών και φυσικών εμποδίων ή θρεπτικών που μεταφέρονται στη θέση μόλυνσης για τη δημιουργία μεταβολικών αδιεξόδων, μπορεί να οδηγήσει στην ευαισθησία σε κάποια ασθένεια. Αντιθέτως η απουσία θρεπτικών που απαιτούνται για την δραστηριότητα του παθογόνου μπορεί να προσδώσει ανθεκτικότητα. Τα ανόργανα στοιχεία επηρεάζουν άμεσα πολλούς μηχανισμούς άμυνας των φυτών ως συστατικά κυττάρων, υποστρωμάτων και ενζύμων. Ακόμα δρουν ως μεταφορείς ηλεκτρονίων, αναστολείς και ρυθμιστές μεταβολισμού. (Huber and Wilhelm,1988).

1.6. Σκοπός εργασίας

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα του βιολογικού παράγοντα *Paenibacillus alvei* στελέχους K165 στην προστασία και την αντιμετώπιση του μύκητα *Fusarium oxysporum f.sp. niveum* σε φυτά καρπουζιού σε διαφορετικούς τύπους υποστρωμάτων. Επίσης αξιολογήθηκε η δυνατότητα του στελέχους K165 να ενεργοποιεί την άμυνα φυτών καρπουζιάς εναντίον του μύκητα *Fusarium oxysporum f.sp. niveum*.

2. Υλικά & Μέθοδοι

2.1 φυτικό υλικό

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν αποκλειστικά σπόροι καρπουζιού της ποικιλίας (Baby sugar).

2.2. Θρεπτικά υλικά

Για την καλλιέργεια του μύκητα χρησιμοποιήθηκαν τα εξής θρεπτικά υλικά:

- Εκχύλισμα πατάτας με δεχτρόση και άγαρ (Potato Dextrose Agar, PDA)
- Διάλυμα σουκρόζης και νιτρικού νατρίου (Sucrose Sodium Nitrate, SSN)

Σακχαρόζη	15g				
K ₂ HPO ₄ (όξινο φωσφορικό κάλιο)	1g				
MgSO ₄ (Θειικό μαγνήσιο)	0,5g				
NaNO ₃ (νιτρικό νάτριο)	2g				
KCl (χλωριούχο κάλιο)	0,5g				
Διάλυμα ιχνοστοιχείων	1ml				
Απιονισμένο νερό	μέχρι	τελικό	όγκο		1lt

- Θρεπτικός ζωμός και γλυκερόλη (Nutrient broth and glycerol, NG)

Χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός σε μορφή σκόνης και γλυκερόλη

Θρεπτικός ζωμός Nutrient Broth 8g
Glycerol 20g

Απιομισμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 1L

Τα θρεπτικά υλικά αποστειρώθηκαν σε κλίβανο στους 120°C για 20min.

Για την παρασκευή 100ml διαλύματος ιχνοστοιχείων απαιτούνται:

FeSO₄ 7H₂O 249mg

CuSO₄ 5H₂O 40mg

ZnSO₄ 7H₂O 44mg

MnSO₄ 4H₂O 41mg

Na₂MoO₄ 2H₂O 51mg

2.3 Διαλύματα για εξαγωγή RNA

Για την εξαγωγή RNA από τους φυτικούς ιστούς χρησιμοποιήθηκαν τα εξής διαλύματα:

- Διάλυμα λύσης κυττάρων
2% SDS (pH7,2)
68 m.M κιτρικό νάτριο
132 m.M κιτρικό οξύ
1 m.M EDTA
- Διάλυμα καθίζησης πρωτεϊνών και DNA
4M χλωριούχο νάτριο
16mM κιτρικό νάτριο
32mM κιτρικό οξύ

Πυκνά διαλύματα

- 1M κιτρικό οξύ:
Για 100ml απαιτούνται 21,04 g κιτρικού οξέος (M.B.= 210,14 g/mol)
- 0,5 M κιτρικό νάτριο:
Για 100ml απαιτούνται 14,706g κιτρικού νατρίου (M.B.=294,10 g/mol)
- 5M NaCl:
Για 100 ml απαιτούνται 29,22g χλωριούχου νατρίου (M.B.=58,44

g/mol)

2.4 Προετοιμασία μολύσματος του μύκητα *Fusarium oxysporum f.sp. niveum*

Αρχικά ο μύκητας διατηρούνταν σε αποστειρωμένο χώμα μέσα σε φιαλίδιο McCartney στους 4°C. Ο μύκητας μεταφέρθηκε σε τρυβλία Petri με PDA υπό ασηπτικές συνθήκες. Στη συνέχεια τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό θάλαμο για επώαση σε σταθερή θερμοκρασία 28°C για 2 ημέρες, έπειτα μεταφέρθηκε ένα τριγωνικό κομμάτι του μυκηλίου από τη ζώνη ανάπτυξης του μύκητα, σε κωνική φιάλη που περιείχε υγρό θρεπτικό υλικό SSN. Η κωνική τοποθετήθηκε σε περιστροφικό επωαστικό θάλαμο στους 28°C για 2 μέρες στις 100rpm. Μέτα από τις 2 μέρες και προκειμένου να απομακρυνθούν οι υφές του μύκητα, έγινε διήθηση με τούλι τούλι και η συγκέντρωση του μολύσματος ρυθμίστηκε σε 10⁴ κονίδια/ml.

2.5 Προετοιμασία του βιολογικού παράγοντα *Raenibacillus alvei* K165

Η μεταφορά του στελέχους K165 έγινε από τους -80 °C, όπου διατηρούνταν σε υδατικό διάλυμα 20% γλυκερόλης, σε τρυβλία Petri με θρεπτικό υλικό NAG, υπό ασηπτικές συνθήκες. Στη συνέχεια, αποικίες του βακτηρίου μεταφέρθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες σε κωνική φιάλη με θρεπτικό υλικό NG. Η κωνική φιάλη τοποθετήθηκε σε περιστροφικό επωαστικό θάλαμο στους 28°C και στις 180rpm για 48 ώρες.

2.6. Πείραμα 1^ο:

Βιολογική αντιμετώπιση του φουζαρίου (παθογόνο *Fusarium oxysporum f.sp. niveum*) στο καρπούζι σε 6 διαφορετικούς τύπους εδαφών με την χρήση του βιολογικού παράγοντα *Raenibacillus alvei* K165.

2.6.1 Πειράματα παθογένειας

Προκειμένου να μελετηθεί η αποτελεσματικότητα του βιολογικού παράγοντα *Raenibacillus alvei* K165 έναντι του μύκητα FON και ο παράγοντας των 6 διαφορετικών υποστρωμάτων, έγινε σπορά φυτών καρπουζιάς στους παρακάτω τύπους υποστρωμάτων:

- 1^{ος}) 5% βερμικουλίτης – 95% Άμμος
- 2^{ος}) 80% βερμικουλίτης – 20% Άμμος
- 3^{ος}) 40% βερμικουλίτης – 60% Άμμος
- 4^{ος}) 5% βερμικουλίτης – 55% Άμμος - 40% φυτόχωμα (οργανική ύλη).
- 5^{ος}) 20% βερμικουλίτης – 40% Άμμος - 40% φυτόχωμα (οργανική ύλη),
- 6^{ος}) 40% βερμικουλίτης – 20% Άμμος - 40% φυτόχωμα (οργανική ύλη).

Στο στάδιο των 2 πραγματικών φύλλων γίνεται ριζοποτισμά του βιολογικού παράγοντα στελέχους K165 με το φυτό, έγινε ριζοπότισμα 5ml 10⁸ cfu/ml ανά φυτό. Σε κάθε τύπο υποστρώματος είχαμε 4εφαρμόγες(Μάρτυρας, K165+FON, K165 & FON). Μέτα από 7 ημέρες μεταφυτεύουμε τα φυτά στα μολυσμένα χώματα με το παθογόνο του μύκητα *Fusarium oxysporum f.sp. niveum* (FON) όπου η τελική συγκέντρωση του παθογόνου στο χώμα ήταν 10³ χλαμυδοσπόρια ανά γραμμάριο.

Οι εφαρμογές ήταν οι εξής:

1. 5% βερμικουλίτης – 95% Άμμος (Μάρτυρας, K165+FON, K165, FON)
2. 80% βερμικουλίτης – 20% Άμμος (Μάρτυρας, K165+FON, K165, FON)
3. 40% βερμικουλίτης – 60% Άμμος (Μάρτυρας, K165+FON, K165 & FON)
4. 5% βερμικουλίτης – 55% Άμμος 40% φυτόχωμα (οργανική ύλη) (Μάρτυρας, K165+FON, K165 & FON)
5. 20% βερμικουλίτης – 40% Άμμος 40% φυτόχωμα (οργανική ύλη) (Μάρτυρας, K165+FON, K165 & FON)

6. 40%βερμικουλίτης – 20% Άμμος 40% φυτόχωμα (οργανική ύλη)
(Μάρτυρας, K165+FON, K165 & FON)

Η μέτρηση των συμπτωμάτων πραγματοποιήθηκε από τις 15 έως 30 μέρες μετά την μόλυνση και κάθε 2 μέρες. Το ποσοστό της ασθένειας σε αυτό το πείραμα εκφράζει τον λόγο των φύλλων που παρουσίαζαν συμπτώματα της ασθένειας, προς τον συνολικό αριθμό των φύλλων του φυτού. Επίσης, έγινε υπολογισμός του εμβαδού ασθένειας (area under the disease progress curve, AUDPC, Campbell and Madden,1990) Επίσης, υπολογίσθηκε η σχετική τιμή του εμβαδού ασθένειας, relative AUDPC.

2.7. Πείραμα 2^ο

Αξιολόγηση της ικανότητας του στελέχους K165 να επάγει την έκφραση γονιδίων σχετιζόμενων με την άμυνα σε φυτά καρπουζιάς.

2.7.1.Προετοιμασία πειράματος

Το φυτικό υλικό, η διαδικασία προετοιμασίας του μολύσματος και μόλυνσης των φυτών είναι ίδια με αυτή που περιγράφηκε στο πρώτο πείραμα.



Εικόνα.10 Φυτά καρπουζιάς μετά την εκπτυγή τους.

Οι εφαρμογές ήταν οι εξής :

- 1) FON
- 2) FON + k165
- 3) K165
- 4) Αρνητικός Μάρτυρας

Κάθε εφαρμογή αποτελούνταν από 30 φυτά. Δείγματα ελήφθησαν σε 2 χρονικές στιγμές, 8 και 16 ημέρες μετά τη μόλυνση. Για την μελέτη της έκφρασης των γονιδίων συλλέχθηκαν 5cm από το στέλεχος των φυτών από τη βάση του φυτού. Τα στελέχη αυτά, αφού απομακρύναμε το χώμα, τα αποθηκεύσαμε στους -80°C.

2.7.2. Εκκινητές

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

18S ACCATAAACGATGCCGACCAG
rRNA CAGCCTTGCGACCATACTCCC

β-1,3-glucanase TTGAGGGCGTCTGGGAGT
GAGAAGGTTGGCGGAGCA

class V chitinase TTTACCCAATGGACAGAT
GGTTGTGGCAGAATAAGT

2.7.3. Απομόνωση RNA από φυτά καρπουζιάς

Η απομόνωση του ολικού RNA από τους φυτικούς ιστούς έγινε ως εξής (τροποποίηση του πρωτοκόλλου των Onate-Sanchez and Vicente-Carbajosa,2008):

- Κονιορτοποίηση του φυτικού ιστού σε πορσελάνινο γουδί με υγρό άζωτο και τοποθέτηση 80-100mg (300-400 μl) κονιορτοποιημένου φυτικού ιστού σε σωληνάριο τύπου erendorf χωρητικότητας 1,5ml.
- Προσθήκη 300μl διαλύματος λύσης κυττάρων.
- Έντονη ανάμειξη (vortex) για 20sec και ανάμειξη με αναστροφή των σωληναρίων τύπου erendorf.
- Επώαση για 5min σε θερμοκρασία δωματίου σε συνεχή αναστροφή για καλύτερη ανάμειξη.
- Προσθήκη 100μl διαλύματος καθίζησης πρωτεϊνών και DNA, το οποίο έχει προ-ψυχθεί σε πάγο.
- Ελαφριά ανάμειξη, χτυπώντας και αναστρέφοντας τα σωληνάκια τύπου erendorf
- Επώαση για 10 min σε θερμοκρασία 4°C
- Φυγοκέντρηση για 15min στην πλήρη ταχύτητα της φυγοκέντρου (14.000rpm) σε θερμοκρασία 4°C
- Μεταφορά υπερκείμενου (περίπου 300μl) σε καινούριο σωληνάριο τύπου erendorf αποφεύγοντας την ενδιάμεση φάση. Αν υπάρχουν υπολείμματα ιστών στο υπερκείμενο μετά την μεταφορά του ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρηση για 5min σε θερμοκρασία 4°C στην πλήρη ταχύτητα της φυγοκέντρου και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωληνάριο τύπου erendorf
- Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης για κατακρήμνιση του RNA (περίπου 300μl) και ελαφριά ανάδευση με αναστροφή.
- Επώαση για 10min σε θερμοκρασία 4°C
- Φυγοκέντρηση για 5min σε θερμοκρασία 4°C στην πλήρη ταχύτητα της φυγοκέντρου.
- Απομάκρυνση υπερκείμενου
- Προσθήκη 300μl αιθανόλης 70% για καθαρισμό του ιζήματος

- Φυγοκέντρηση για 5min σε θερμοκρασία 4°C στην πλήρη ταχύτητα της φυγοκέντρου
- Απομάκρυνση υπερκείμενου
- Στέγνωμα του ιζήματος
- Επαναιωρηματοποίηση του ιζήματος σε 25μl αποστειρωμένο δισαπεσταγμένο νερό και ανάμειξη μέχρι να διαλυθεί το ίζημα
- Φυγοκέντρηση για ελάχιστα δευτερολεπτα.
-

2.7.4. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA

Μετά την απομόνωση του ολικού RNA από τα φυτά, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της συγκέντρωσης του κάθε δείγματος με τη χρήση φασματοφωτόμετρου Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer.

Στη συνέχεια τα δείγματα RNA, αραιώθηκαν με δις απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικής συγκέντρωσης 70ng/μl (τελικός όγκος 7μl, συνολική ποσότητα RNA 500ng), και πραγματοποιήθηκε καθαρισμός τους από DNA με τη χρήση DNase I (HT BIOTECHNOLOGY LTD).

Ο καθαρισμός των δειγμάτων από DNA έγινε ως εξής :

- Σε κάθε δείγμα προστέθηκε 1μl DNase I (1unit/μl)
- Τα δείγματα τοποθετήθηκαν για επώαση σε θερμοκρασία 37°C για 15min
- Στην συνέχεια σε κάθε δείγμα προστέθηκε 1μl EDTA
- Τα δείγματα τοποθετήθηκαν για επώαση σε υδατόλουτρο στους 65°C για 10min ώστε να απενεργοποιηθεί η DNase I

Πριν την μελέτη της έκφρασης των γονιδίων, έγινε μετατροπή του mRNA σε cDNA με την χρήση του Prime Script RT reagent kit (TAKARA BIO INC) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, ως εξής:

Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν :

- 2μl ρυθμιστικό διάλυμα (prime script buffer)
- 0,5μl αντίστροφη μεταγραφάση (prime script RT enzyme)

- 0,5μl μείγμα εκκινητών θυμίνης (oligo dT primer)

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στις εξής συνθήκες :

- 15min στους 37°C για να γίνει η αντίστροφη μεταγραφή
- 5sec στους 75°C για απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης
- 4°C επ' αόριστον

Εφαρμογή της Real – time PCR:

Η RT-PCR έγινε σε θερμοκυκλοποιητή της Stratagene Mx3005PTM και για τις αντιδράσεις ενίσχυσης χρησιμοποιήθηκε master mix της εταιρίας KAPA SYBR Fast Universal q PCR kit (KAPA Biosystems) ενώ τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό MxPro q PCR.

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου 18S (γονίδιο αναφοράς), χρησιμοποιήθηκε σαν σταθερά για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων Chit I και Pal I. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις της Real-time PCR, σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας της οποίας το master mix χρησιμοποιήθηκε δίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Αντιδραστήρια	Ποσότητα/Αντίδραση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5μl
Rox low	0,2μl
Εκκινητής A	0,5μl
Εκκινητής B	0,5μl
Δείγμα cDNA	1μl
H ₂ O	2,8μl
Τελικός όγκος	10μl

Οι συνθήκες της αντίδρασης RT-PCR δίνονται στον ακόλουθο πίνακα:

	Χρόνος	Θερμοκρασία (°C)	Αποτέλεσμα
Βήμα 1 ^ο	3min	95	Ενεργοποίηση της πολυμεράσης
Βήμα 2 ^ο *	3sec	95	Αποδιάταξη του DNA
	30sec	60	Υβριδισμός εκκινητών/ Επιμήκυνση αλυσίδας
Βήμα 3 ^ο	1min	95	Δημιουργία της καμπύλης διαχωρισμού των προϊόντων της RT-PCR (Dissociation curve)**
	30sec	60	
	30sec	95	

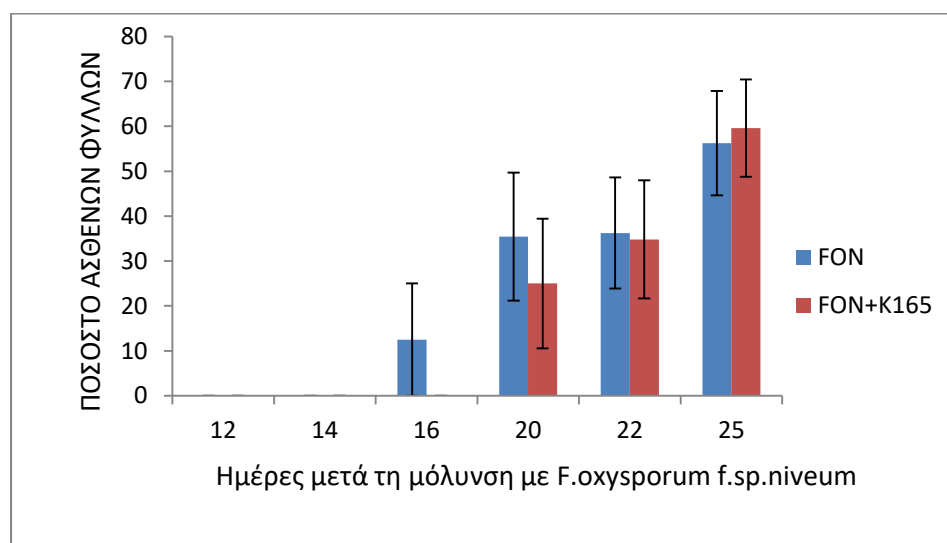
*Το βήμα 2 επαναλήφθηκε για 40 κύκλους.

** Η εξειδίκευση των εκκινητών και ο σχηματισμός των διμέρων των εκκινητών παρακολουθήθηκαν από την καμπύλη διαχωρισμού των προϊόντων της RT-PCR.

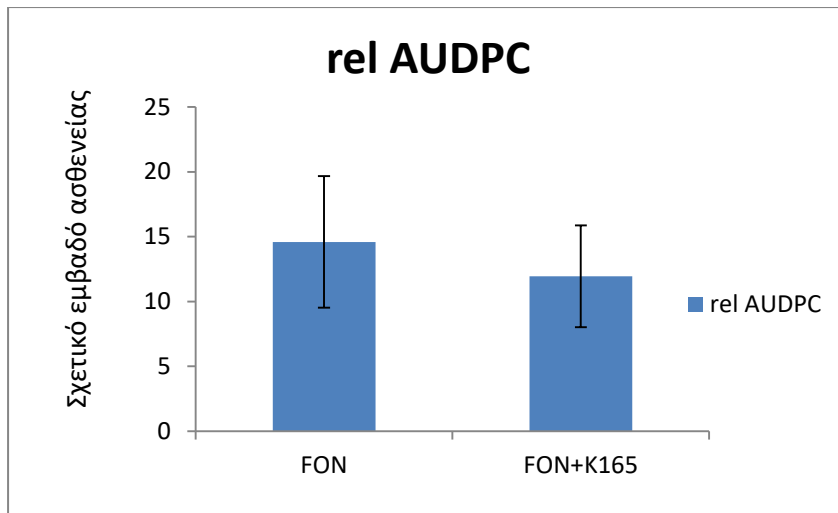
3.Αποτελέσματα

3.1. Πειράματα παθογένειας

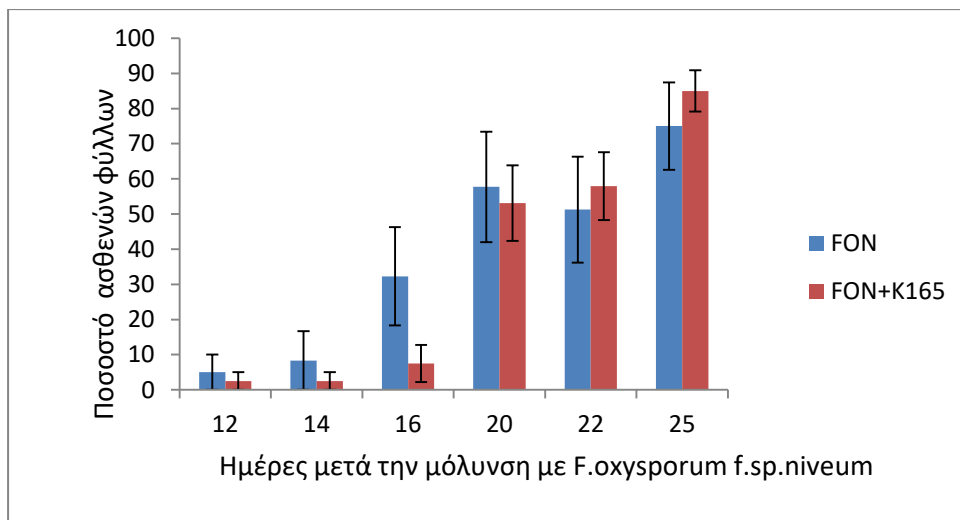
Στο πείραμα παθογένειας συγκρίθηκαν οι εφαρμογές με τα 6 διαφορετικά τεχνητά μολυσμένα υποστρώματα με τον μύκητα *F.oxysporum f.sp. niveum* εναντίον του βιολογικού παράγοντα *P.alvei* K165 .Φυτά στα οποία έγινε εφαρμογή του βιολογικού παράγοντα ανάλογα με το κάθε τύπο υποστρώματος . Σε κάποια υποστρώματα φαίνεται να υπάρχει διαφορά ως προς τα συμπτώματα.



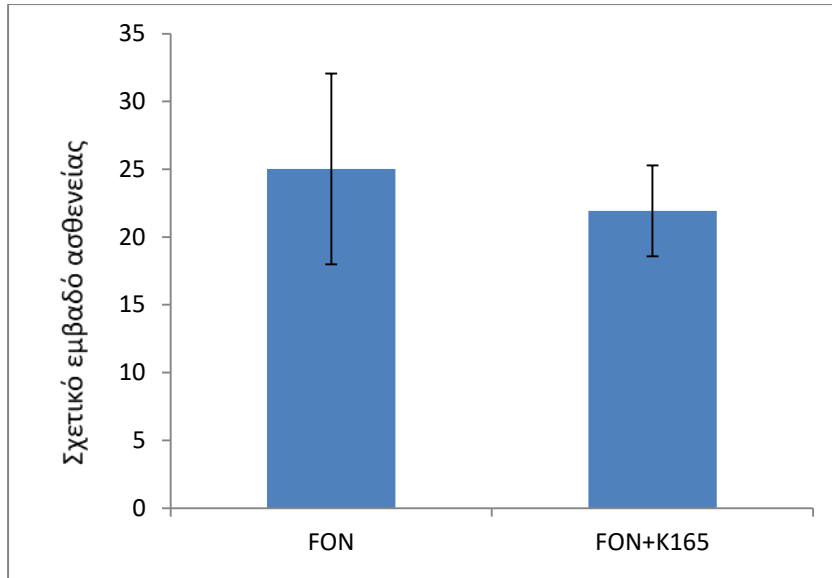
Γράφημα.1. Τύπος υποστρώματος : 5% Βερμικουλίτης, 95% άμμος . Παρατηρούμε ότι τις πρώτες 14 μέρες δεν είχαμε καθόλου συμπτώματα., ενώ παρατηρούμε τα πρώτα συμπτώματα της ασθένειας στις πρώτες 16 μέρες μόνο στην εφαρμογή με τον μύκητα.



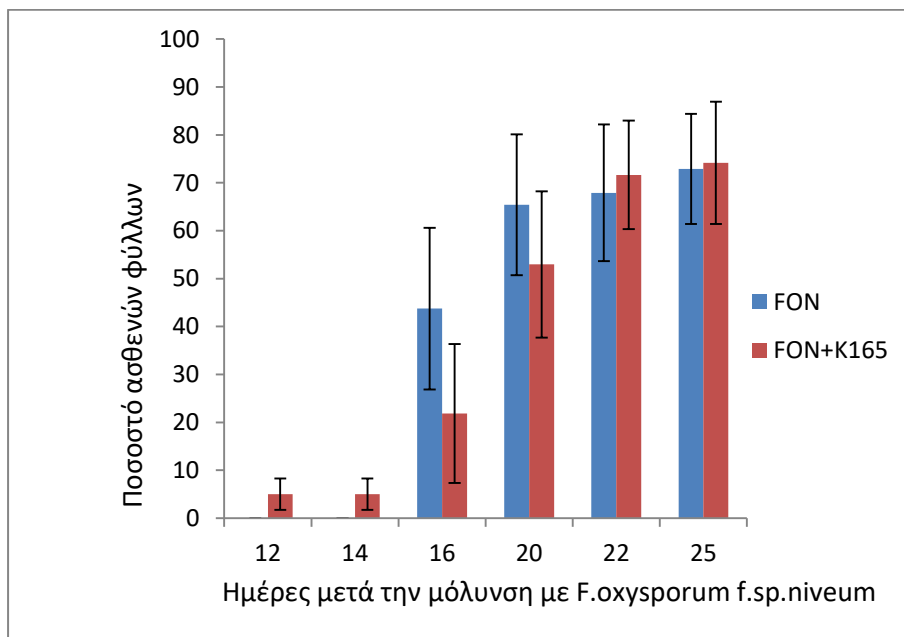
Γράφημα 2. Συγκριτική απεικόνιση του σχετικού εμβαδού ασθενείας (relative AUDPC) για την εφαρμογή FON 5% Βερμικουλίτης 95% Άμμος & FON+K165. Στις τιμές έχει γίνει στατιστική επεξεργασία με τη μέθοδο ANOVA.



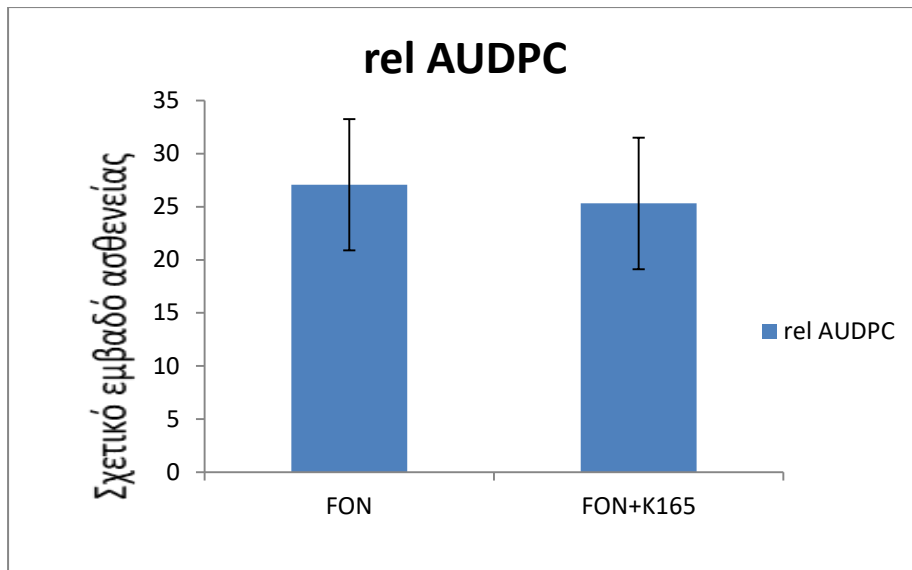
Γράφημα 3. Τύπος υποστρώματος : 20%Βερμικουλίτης, 80%Άμμος. Όπως φαίνεται στο γράφημα 2 που δείχνει την εξέλιξη της ασθένειας, τα πρώτα συμπτώματα παρατηρήθηκαν από τις πρώτες 12 ημέρες μετά την μόλυνση, ενώ στην αρχή τα περισσότερα συμπτώματα τα είχαμε στις εφαρμογές με τον μύκητα μετά την 22^η ημέρα και μέχρι την 25^η τα περισσότερα υπήρχαν στις εφαρμογές με τον βιολογικό παράγοντα.



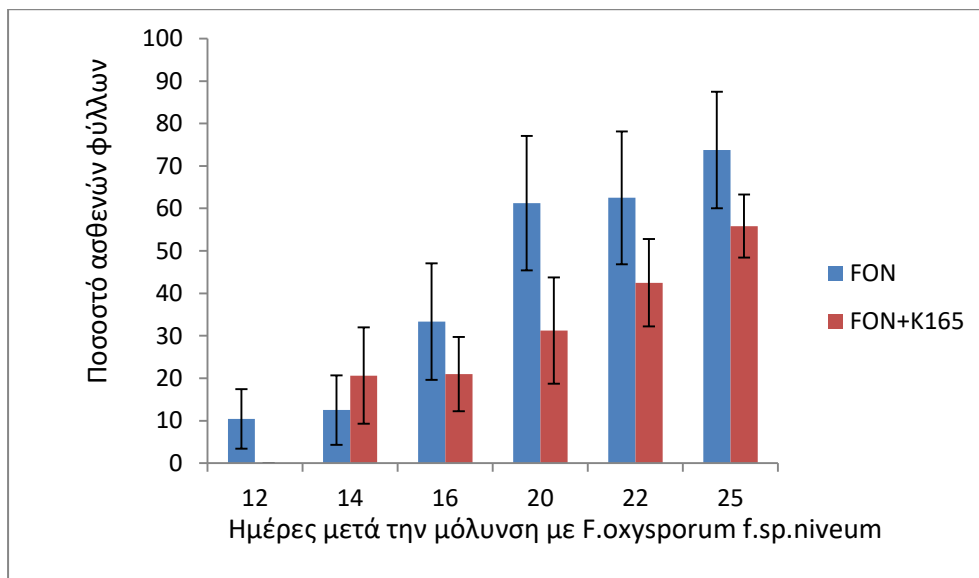
Γράφημα 4. Συγκριτική απεικόνιση του σχετικού εμβαδού ασθeneίας (relative AUDPC) για την εφαρμογή 20% Βερμικουλίτης, 80% Άμμος. Στις τιμές έχει γίνει στατιστική επεξεργασία με τη μέθοδο ANOVA.



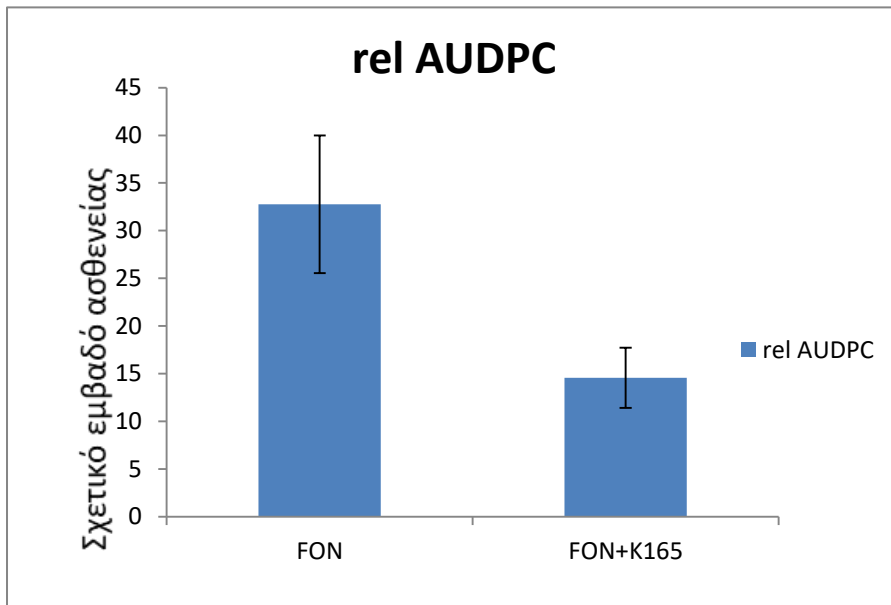
Γράφημα.5. Τύπος υποστρώματος: 55% Άμμος, 40% Οργανική ύλη, 5% Βερμικουλίτης. Όπως φαίνεται στο γράφημα 3 που δείχνει την εξέλιξη της ασθeneίας, τα πρώτα συμπτώματα παρατηρήθηκαν από τις πρώτες 12 ημέρες μετά την μόλυνση στην εφαρμογή με τον μύκητα και τον βιολογικό παράγοντα, ενώ από την 16^η μέχρι και την 25^η είχαμε συμπτώματα και στις 2 εφαρμογές. Με περισσότερα συμπτώματα από την 22^η ημέρα και μέχρι το τέλος στην εφαρμογή με τον βιολογικό παράγοντα.



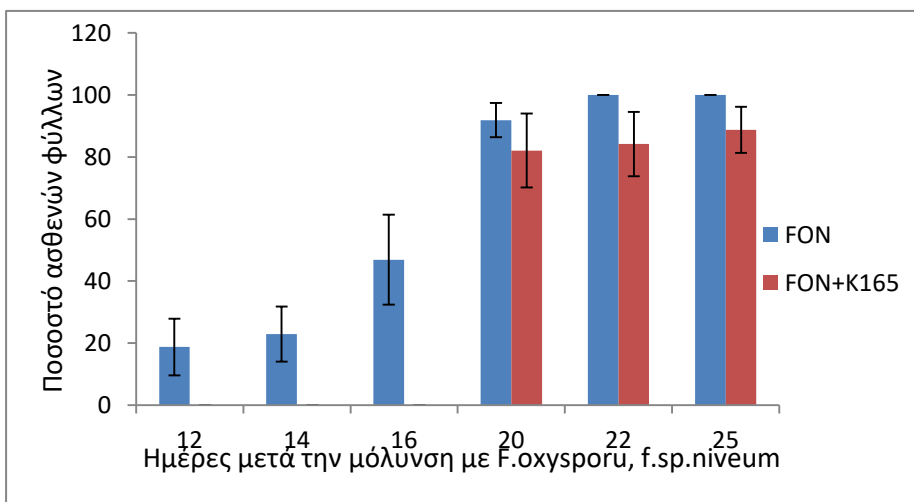
Γράφημα 6. Συγκριτική απεικόνιση του σχετικού εμβαδού ασθενείας (relative AUDPC) για την εφαρμογή 55% Άμμος 40% Οργανική ύλη 5%Βερμικουλίτης. Στις τιμές έχει γίνει στατιστική επεξεργασία με τη μέθοδο ANOVA.



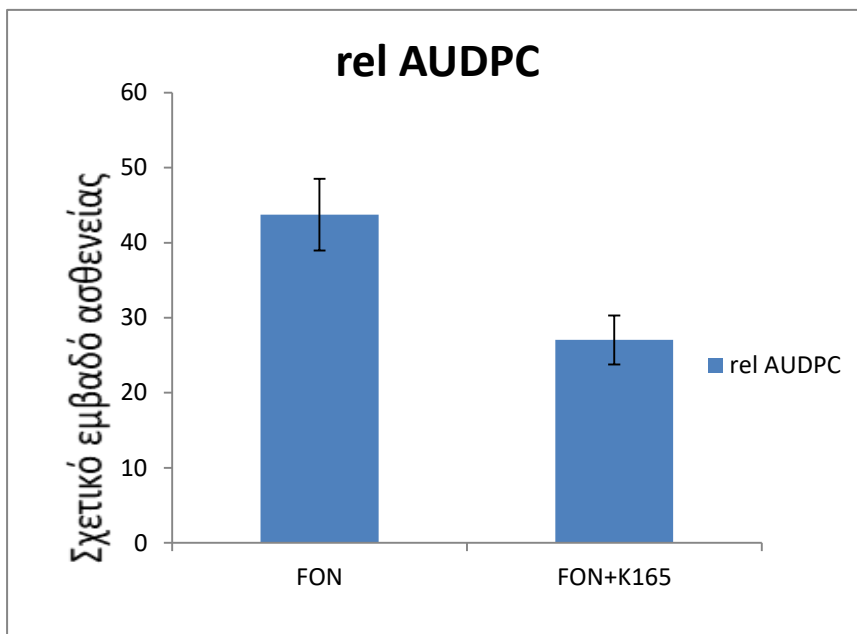
Γράφημα.7. Τύπος υποστρώματος: 40%Άμμος, 40%Οργανική ύλη, 20% Βερμικουλίτης. Όπως φαίνεται στο γράφημα 4 που δείχνει την εξέλιξη της ασθένειας, τα πρώτα συμπτώματα παρατηρήθηκαν στις 12 ημέρες μετά την μόλυνση στην εφαρμογή με σκέτο τον μύκητα. Ενώ παρατηρούμε πως η εφαρμογή με τον βιολογικό παράγοντα είχε λιγότερα συμπτώματα από την 16^η ημέρα και μέχρι το τέλος.



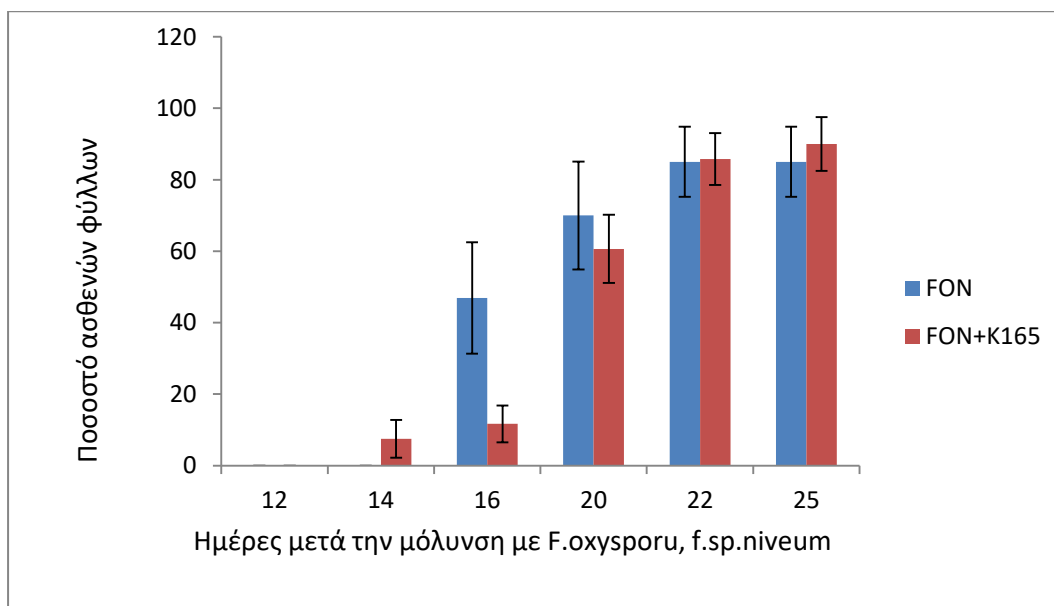
Γράφημα 8 Συγκριτική απεικόνιση του σχετικού εμβαδού ασθeneίας (relative AUDPC) για την εφαρμογή 40%Άμμος,40% Οργανική ύλη, 20%Βερμικουλίτης. Στις τιμές έχει γίνει στατιστική επεξεργασία με τη μέθοδο ANOVA.



Γράφημα.9. Τύπος υποστρώματος: 40%Βερμικουλίτης, 40%Οργανική ύλη,20%Άμμος. Όπως φαίνεται στο γράφημα 5 που δείχνει την εξέλιξη της ασθeneίας, τα πρώτα συμπτώματα παρατηρήθηκαν στις 12 ημέρες μετά την μόλυνση στην εφαρμογή με σκέτο τον μύκητα. Σε όλες τις μετρήσεις η εφαρμογή με τον βιολογικό παράγοντα είχε τα λιγότερα συμπτώματα.

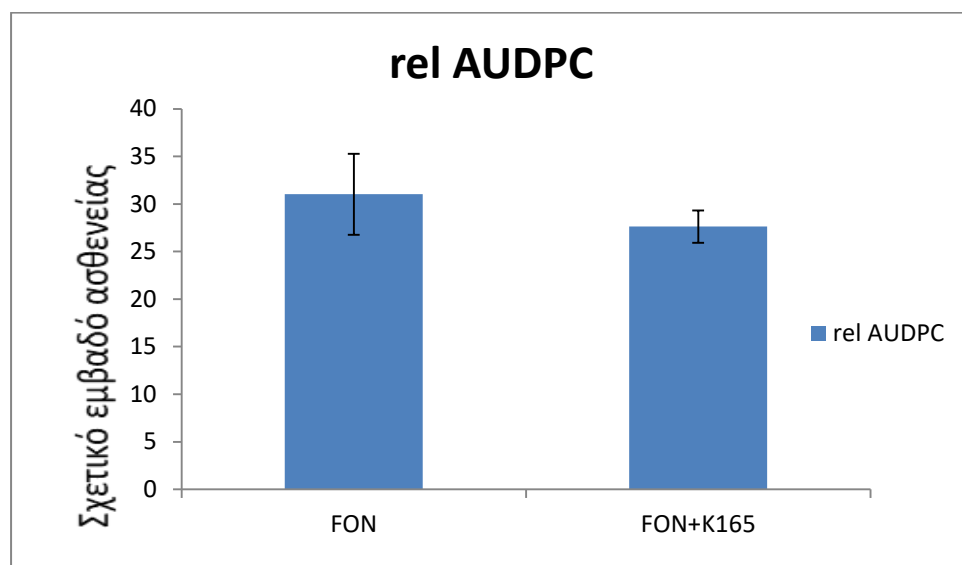


Γράφημα 10. Συγκριτική απεικόνιση του σχετικού εμβαδού ασθeneίας (relative AUDPC) για την εφαρμογή 40%Βερμικουλίτης , 40% Οργανική ύλη,20%Άμμος.Στις τιμές έχει γίνει στατιστική επεξεργασία με τη μέθοδο ANOVA.

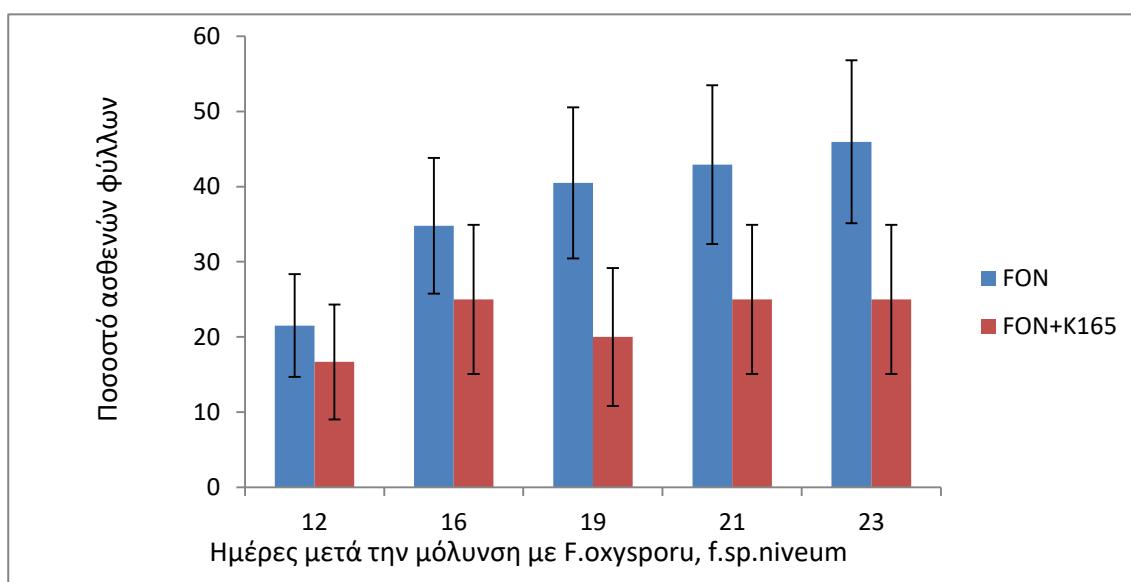


Γράφημα.11. Τύπος υποστρώματος: 40%Βερμικουλίτης, 60%Άμμος. Όπως φαίνεται στο γράφημα 6 που δείχνει την εξέλιξη της ασθeneίας, τα πρώτα συμπτώματα παρατηρήθηκαν στις 14 ημέρες μετά την μόλυνση. Φυτά στα οποία έγινε η εφαρμογή του βιολογικού παράγοντα παρατηρούμε ότι τα συμπτώματα είναι μικρότερα μέχρι και την 20^η ημέρα μετά την μόλυνση από το μύκητα, ενώ από την 22^η ημέρα και μετά αυξάνονται τα συμπτώματα της εφαρμογής με τον βιολογικό

παράγοντα και τα συμπτώματα στην εφαρμογή με τον μύκητα μένουσ σχεδόν σταθερά.

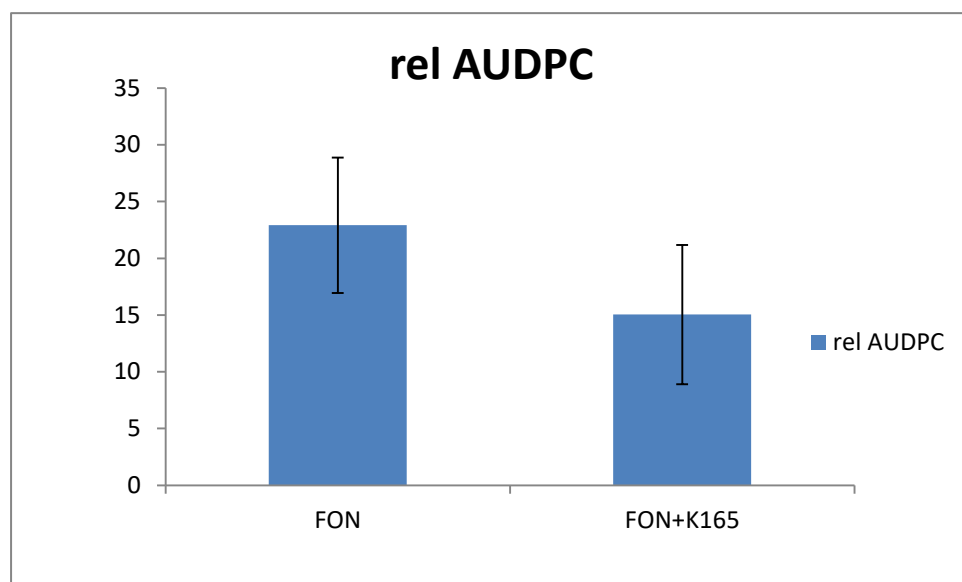


Γράφημα 12. Συγκριτική απεικόνιση του σχετικού εμβαδού ασθeneίας (relative AUDPC) για την εφαρμογή 40% Βερμικουλίτης , 60% Άμμος. Στις τιμές έχει γίνει στατιστική επεξεργασία με τη μέθοδο ANOVA.



Γράφημα.13. Τύπος υποστρώματος: Σκέτο φυτόχωμα. Όπως φαίνεται στο γράφημα 7 που δείχνει την εξέλιξη της ασθeneίας, τα πρώτα συμπτώματα παρατηρήθηκαν στις 12 ημέρες μετά την μόλυνση. Φυτά στα οποία έγινε η εφαρμογή του βιολογικού παράγοντα παρατηρούμε

ότι σε όλη την διάρκεια της καταγραφής των συμπτωμάτων έχουν πολύ μικρότερο ποσοστό συμπτωμάτων από ότι η εφαρμογή με το μύκητα.



Γράφημα 14. Συγκριτική απεικόνιση του σχετικού εμβαδού ασθένειας (relative AUDPC) για την εφαρμογή με σκέτο φυτόχωμα. Στις τιμές έχει γίνει στατιστική επεξεργασία με τη μέθοδο ANOVA.

Στα παραπάνω 14 γραφήματα γίνεται η συγκριτική απεικόνιση της χρονικής εξέλιξης της ασθένειας στα μολυσμένα με τον μύκητα *F. Oxysporum f.sp. niveum* φυτά καρπουζιάς και στα φυτά όπου είχε προηγηθεί εφαρμογή του στελέχους K165 και στους 7 διαφορετικούς τύπους υποστρώματος. Η σοβαρότητα της ασθένειας για κάθε φυτό υπολογίστηκε από τον αριθμό των φύλλων που εμφάνισαν συμπτώματα μάρανσης ως ποσοστό του συνολικού αριθμού φύλλων του αντίστοιχου φυτού. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο για 25 φυτά και οι κάθετες γραμμές το τυπικό σφάλμα.

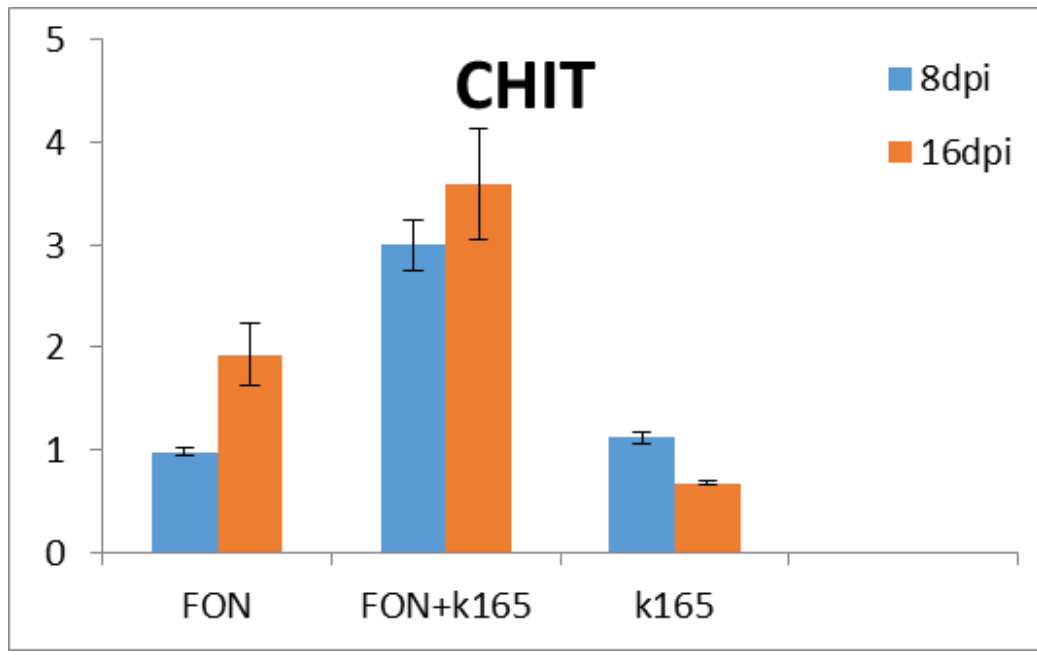


Γράφημα 15. % η ασθένεια FON σε σχέση με τον μάρτυρα.

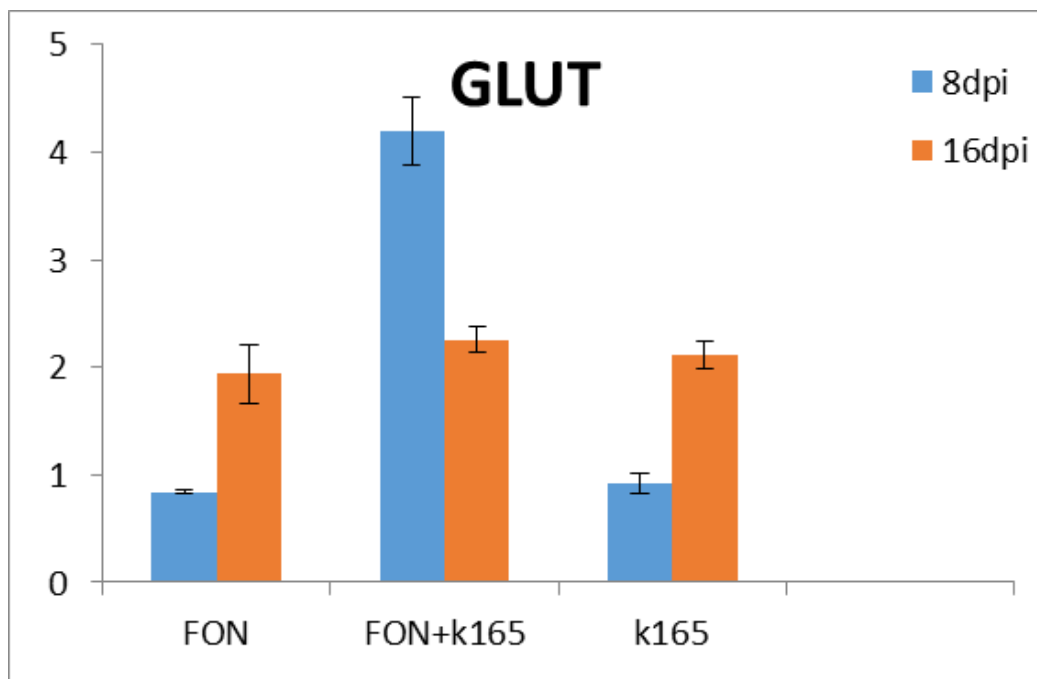
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ	%	ΕΙΔΟΣ ΥΠΟΣΤΡ.
1	81,81669928	5% Βερμικουλίτης, 95% Άμμος FON/k165
2	87,64157229	20% Βερμικουλίτης, 80% Άμμος FON/ K165
3	93,47252747	55% Άμμος, 40% Οργανική ύλη, 5% Βερμικουλίτης FON/K165
4	44,43023256	40% Άμμος, 40% Οργανική ύλη, 20% Βερμικουλίτης FON/K165
5	61,85213415	40% Βερμικουλίτης, 40% Οργανική ύλη, 20% Άμμος FON/K165
6	89,06576329	40% Βερμικουλίτης, 60% Άμμος FON/K165
7	65,66560688	ΦΥΤΟΧΩΜΑ

3.2. Πειράματα γονιδιακής έκφρασης

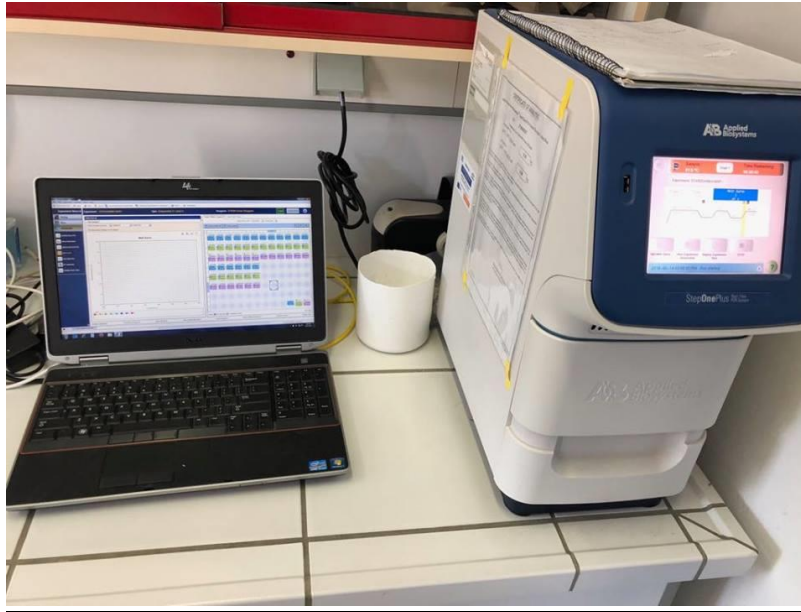
Η έκφραση του γονιδίου CHIT, φαίνεται να είναι πιο αυξημένη στα φυτά που είχε γίνει εφαρμογή με τον βιολογικό παράγοντα K165. Στις 16 ημέρες μετά τη μόλυνση η έκφραση του γονιδίου είναι αμελητέα σε όλες τις επεμβάσεις, εκτός από τις 2 εφαρμογές με τον μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*.



Γράφημα16. Σχετική έκφραση του γονιδίου CHIT σε φυτά που έχει εφαρμοστεί ο βιολογικός παράγοντας k165 και οι μύκητες FON & VD. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει την μέση έκφραση του γονιδίου CHIT σε κάθε επέμβαση.

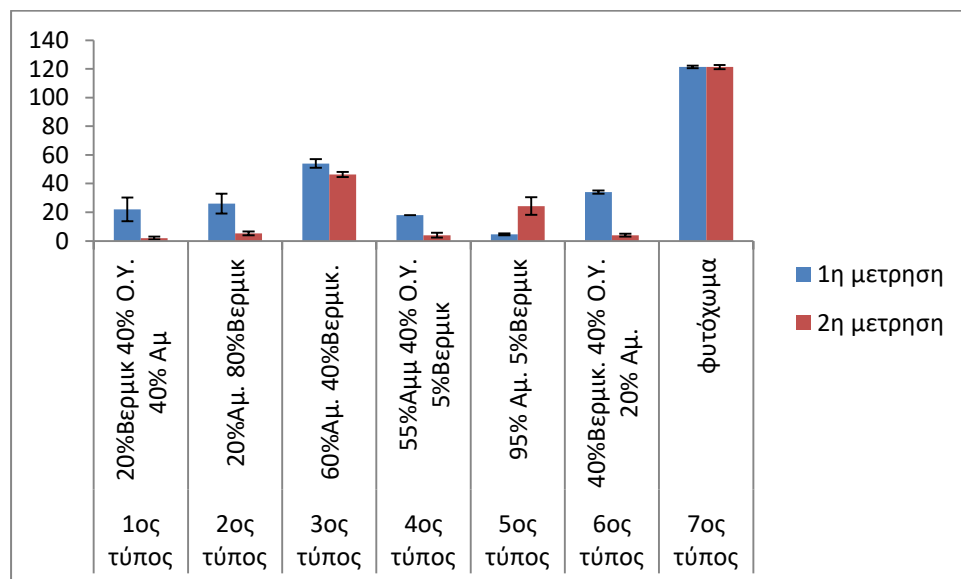


Γράφημα 17. Σχετική έκφραση του γονιδίου GLUT1 σε φυτά που έχει εφαρμοστεί ο βιολογικός παράγοντας k165 και οι μύκητες FON & VD. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει την μέση έκφραση του γονιδίου GLUT σε κάθε επέμβαση .



Εικόνα11. Real time PCR.

3.3. Μέτρηση Συγκεντρώσεων του μύκητα FON



Γράφημα18. 1^η & 2^η μέτρηση FON σε αραιώση10⁻⁵

Μέσος όρος του πληθυσμού του F.o.n. στις 6 διαφορετικές εφαρμογές και στην 7^η εφαρμογή με σκέτο το φυτόχλωμα μετά από 10 ημέρες από την μόλυνση με τον μύκητα

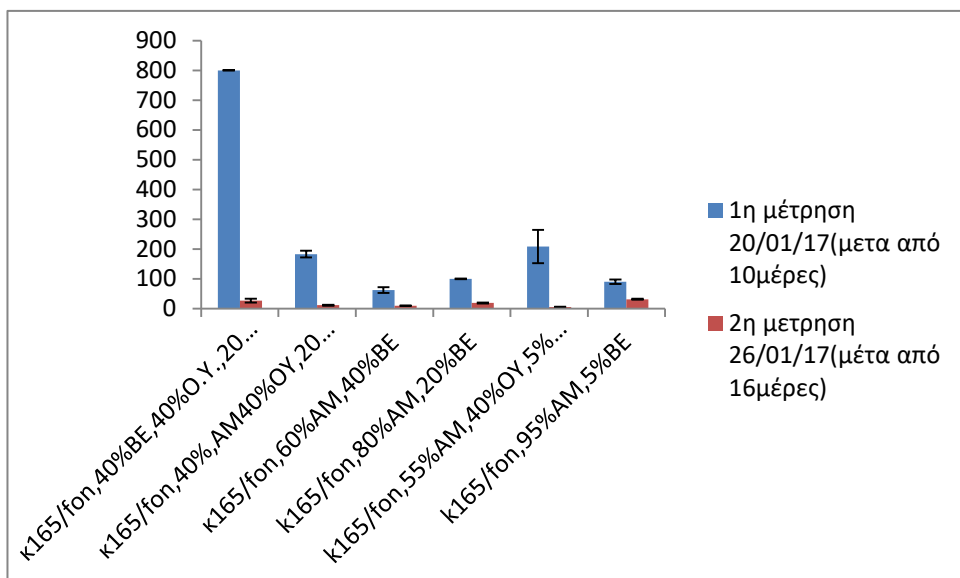


Εικόνα12. Τρυβλιά PDA με rifabasiη και αποικίες του μύκητα *Fon* από την 3^η αραιώση

3.4. Μετρήσεις των συγκεντρώσεων του βιολογικού παράγοντα *Raenibacillus alvei* K165 σε αραιώση 10^{-4}



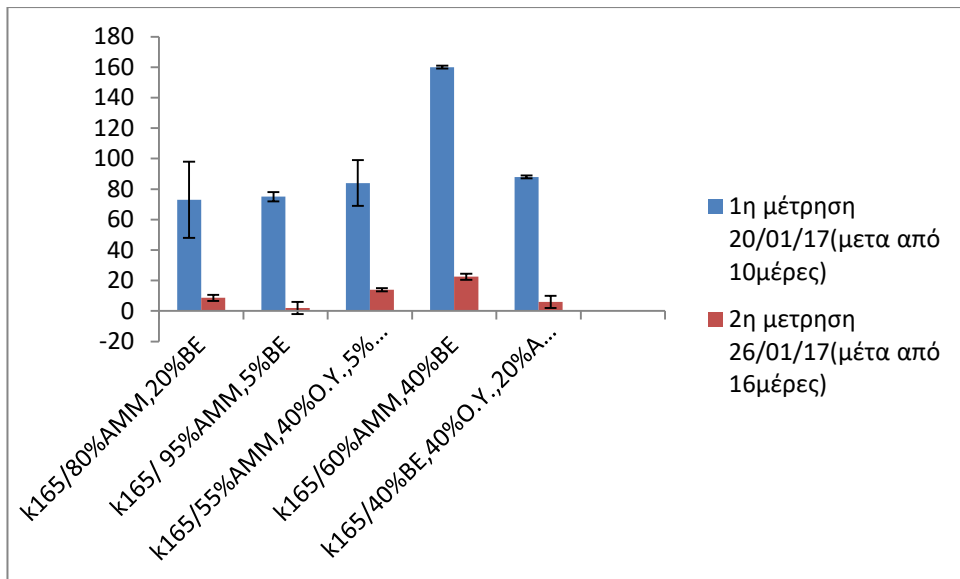
Εικόνα13. Προετοιμασία διαδοχικών αραιώσεων για την ανίχνευση της συγκέντρωσης του βιολογικού παράγοντα στα 6 υποστρώματα.



Γράφημα 21. Μετρήσεις των συγκεντρώσεων του βιολογικού παράγοντα Raenibacillus alvei K165 σε αραιώσεις 10^{-4} στην 1^η επανάληψη 20+26/01/2017 στα υποστρώματα με το μύκητα FON.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές από το μέσο όρο των συγκεντρώσεων του βιολογικού παράγοντα Raenibacillus alvei K165 στα υποστρώματα με το μύκητα FON.

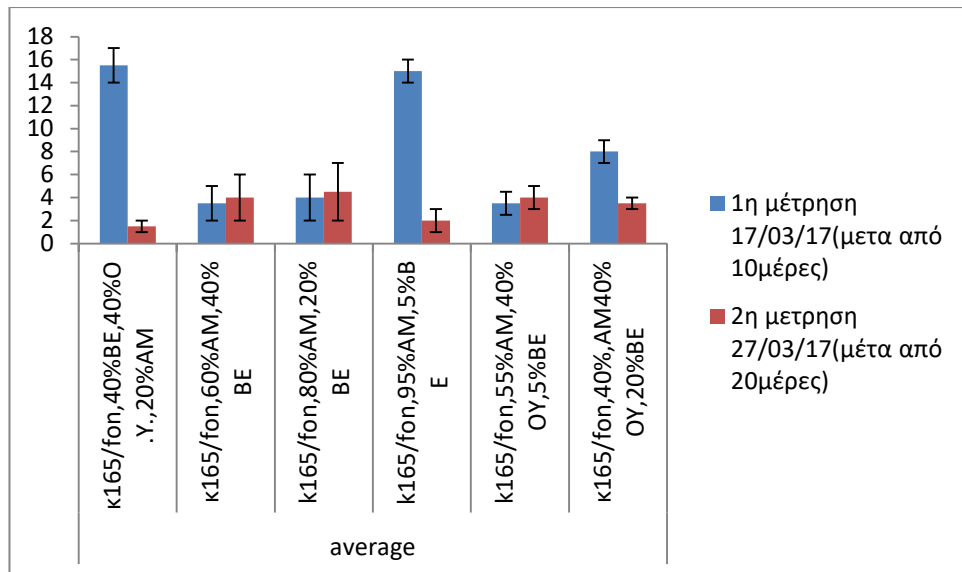
Συγκέντρωση K154	Τύπος υποστρώματος	1η μέτρηση 20/01/17(μετα από 10μέρες)	2η μέτρηση 26/01/17(μετα από 16μέρες)
average	κ165/fon,40%BE,40% O.Y.,20%AM	800	26,66666667
	κ165/fon,40%,AM40% OY,20%BE	183	11,33333333
	κ165/fon,60%AM,40% BE	62	9,33333333
	κ165/fon,80%AM,20% BE	100	18,66666667
	κ165/fon,55%AM,40% OY,5%BE	208	5,33333333
	κ165/fon,95%AM,5% BE	90	31,33333333



Γράφημα 22. Μετρήσεις των συγκεντρώσεων του βιολογικού παράγοντα Raenibacillus alvei K165 σε αραιώσεις 10-4 στην 1η επανάληψη 20+26/01/2017 στα υποστρώματα μόνο με το βιολογικό παράγοντα χωρίς το μύκητα.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές από το μέσο όρο των συγκεντρώσεων του βιολογικού παράγοντα Raenibacillus alvei K165 στα υποστρώματα χωρίς το μύκητα FON.

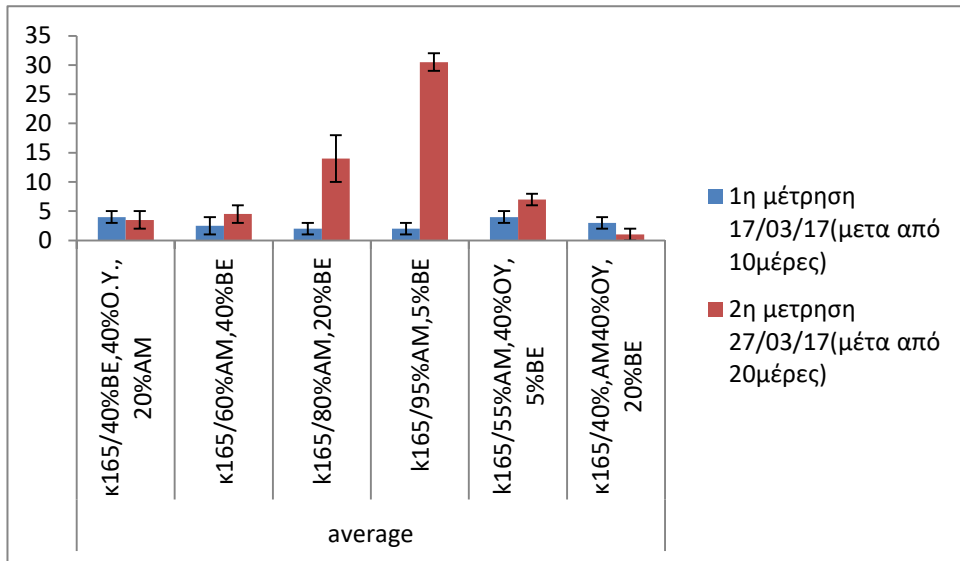
Συγκέντρωση K154	Τύπος υποστρώματος	1η μέτρηση 20/01/17(μετα από 10μέρες)	2η μετρηση 26/01/17(μετα από 16μέρες)
average	k165/40%AMM,40%O.Y.,20%BE	215	6
	k165/80%AMM,20%BE	73	8,666666667
	k165/ 95%AMM,5%BE	75	2
	k165/55%AMM,40%O.Y.,5%BE	84	14
	k165/60%AMM,40%BE	160	22,5
	k165/40%BE,40%O.Y.,20%AMM	88	6



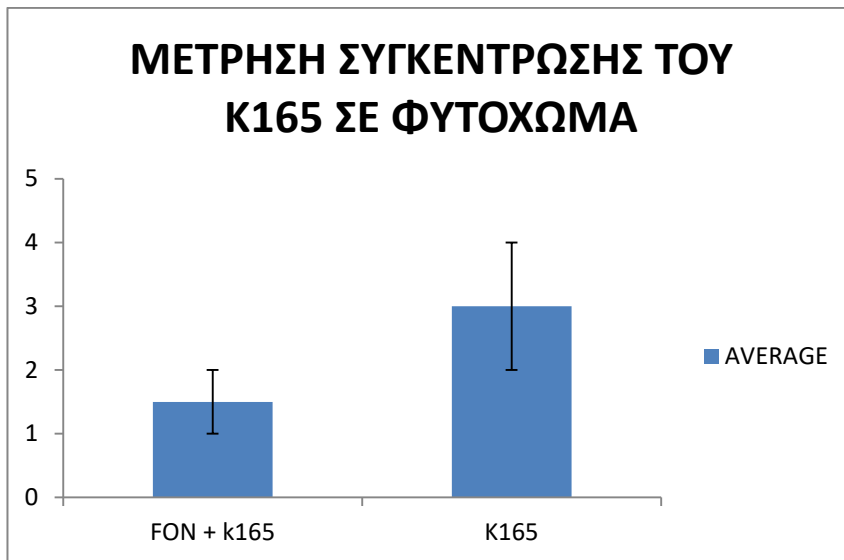
Γράφημα 23. Μετρήσεις των συγκεντρώσεων του βιολογικού παράγοντα *Raenibacillus alvei* K165 σε αραιώσεις 10-4 στην 2η επανάληψη 17+27/03/2017 στα υποστρώματα με το μύκητα FON.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές από το μέσο όρο των συγκεντρώσεων του βιολογικού παράγοντα *Raenibacillus alvei* K165 στα υποστρώματα με το μύκητα FON.

Συγκεντρ. K165	Τύπος υποστρώματος	1η μέτρηση 17/03/17(μετα από 10μέρες)	2η μετρηση 27/03/17(μετα από 20μέρες)
average	κ165/fon,40%BE,40%O.Y.,20%AM	15,5	1,5
	κ165/fon,60%AM,40%BE	3,5	4
	κ165/fon,80%AM,20%BE	4	4,5
	κ165/fon,95%AM,5%BE	15	2
	κ165/fon,55%AM,40%OY,5%BE	3,5	4
	κ165/fon,40%,AM40%OY,20%BE	8	3,5



Γράφημα 24. Μετρήσεις των συγκεντρώσεων του βιολογικού παράγοντα *Raenibacillus alvei* K165 σε αραιώση 10⁻⁴ στην 2η επανάληψη 17+27/03/2017 στα υποστρώματα μόνο με το βιολογικό παράγοντα χωρίς το μύκητα.



Γράφημα 25. 3^η μέτρηση βιολογικού παράγοντα K165 στην 3^η επανάληψη 23/04/18 σε αραιώση 10⁻⁴ σε σκέτο φυτόχωμα.

Μέσος όρος του πληθυσμού του βιολογικού παράγοντα K165 σε εφαρμογή με σκέτο φυτόχωμα και σε εφαρμογή με το μύκητα FON, μετά από 10 ημέρες από την μεταφύτευση στα μολυσμένα χώματα.

4.Συζήτηση

Η αντιμετώπιση των παθογόνων με τη χρήση μικροοργανισμών έχει πλεονεκτήματα, μειονεκτήματα και συγκεκριμένες απαιτήσεις για την αποτελεσματική τους εφαρμογή. Ένα από τα πιο κρίσιμα σημεία είναι ότι για να είναι αποτελεσματική η αντιμετώπιση της ασθένειας, πρέπει ο βιολογικός παράγοντας να αποικίσει και να εγκατασταθεί επιτυχώς στη ριζόσφαιρα (Weller et al.2002).

Η βιολογική αντιμετώπιση των εδαφογενών παθογόνων από διάφορους μικροοργανισμούς άρχισε να ερευνάται τα τελευταία 70 χρόνια, ποτέ όμως η ιδέα αυτή δεν κατάφερε να θεωρηθεί εμπορικά εφικτή. Από το 1965 και μετά το ενδιαφέρον για την έρευνα σε αυτό τον τομέα άρχισε να αυξάνεται, μετά από διάφορες έρευνες που έγιναν. Σταδιακά οι επιστήμονες άρχισαν να πιστεύουν ότι ο βιολογικός έλεγχος των ασθενειών μπορεί να παίξει καθοριστικό ρόλο στο μέλλον της γεωργίας. Ενθαρυντικό είναι το γεγονός ότι πολλές είναι οι εταιρίες που έχουν δημιουργήσει προγράμματα σχετικά με την ανάπτυξη διαφόρων βιολογικών παραγόντων που θα χρησιμοποιηθούν ως εμπορικά σκευάσματα, αντικαθιστώντας την χρήση φυτοφαρμάκων.(Weller 1988). Οι μικροοργανισμοί που μπορούν να αναπτυχθούν στην ριζόσφαιρα είναι και οι ιδανικότεροι για χρήση ως βιολογικών παραγόντων εναντίον εδαφογενών παθογόνων, αφού η ριζόσφαιρα αποτελεί και την πρώτη γραμμή άμυνας για την ρίζα, εναντίον των προσβολών από εδαφογενή παθογόνα. Τα παθογόνα συναντούν ανταγωνισμό από τους μικροοργανισμούς της ριζόσφαιρας πριν και κατά την διάρκεια της πρωτογενούς μόλυνσης, αλλά και μετά την εξάπλωση του παθογόνου εντός του ριζικού συστήματος.

Η δράση των μικροοργανισμών μπορεί να είναι τόσο αποτελεσματική, ώστε να υπάρχει πλήρης έλεγχος της ασθένειας. (Weller 1998). Υπάρχουν εδάφη που διαθέτουν μικροοργανισμούς ικανούς να καταστείλουν την δράση των παθογόνων μέσω του ανταγωνισμού που δημιουργούν. Αν και αυτά τα εδάφη είναι σπάνια , αυτά τα οποία έχουν μελετηθεί είναι σπουδαία παραδείγματα της δυνατότητας ελέγχου εδαφογενών παθογόνων με την χρήση μικροοργανισμών. Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει διάφορες προσπάθειες για την αντιμετώπιση των μυκήτων του γένους *Fusarium* ,

εστιάζοντας στην χρήση διάφορων βιολογικών παραγόντων, σε μια προσπάθεια να μειωθεί η υπέρμετρη χρήση των φυτοφαρμάκων που γίνεται σήμερα.

Ο μύκητας *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* προκαλεί την αδροφουζαρίωση της καρπουζιάς και είναι υπεύθυνος για μεγάλες απώλειες στις περιοχές που καλλιεργούνται φυτά καρπουζιάς. Ο μύκητας πέρα από την ικανότητα όλων των φουζαρίων να επιβιώνουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα στο έδαφος, με τη μορφή χλαμυδοσπορίων, έχει την ικανότητα να αποικίζει αποτελεσματικά στις ρίζες φυτών μη ξενιστών (Gordon et al.1989) καθιστώντας πρακτικές όπως η αμειψισπορά αναποτελεσματικές. Πολλοί βιολογικοί παράγοντες έχουν μελετηθεί μόνοι τους, σε συνδυασμό με άλλους βιολογικούς παράγοντες ή καλλιεργητικές τεχνικές και συνεχώς μελετούνται νέοι, εναντίον του μύκητα *Fusarium*.

Ένα από τα πιο βασικά μειονεκτήματα της χρήσης μικροοργανισμών εναντίον παθογόνων είναι η έλλειψη συνέπειας ως προς την αποτελεσματικότητα τους δηλαδή να υπάρχει επαναληψιμότητα στα αποτελέσματα. Επομένως είναι αναγκαίο να γνωρίζουμε το μηχανισμό της αλληλεπίδρασης, τις καλύτερες συνθήκες για το βιολογικό παράγοντα, τον καλύτερο χρόνο και τρόπο για να εφαρμοστεί.

Η ενεργοποίηση της άμυνας είναι πιθανό να οφείλεται στην παρουσία διεγερτών του κυτταρικού τοιχώματος του στελέχους K165 ή μαστίγια του στελέχους K165. Ένα μελετημένο και καλά χαρακτηρισμένο παράδειγμα είναι η περίπτωση αναγνώρισης της βακτηριακής φλατζελίνης από το φυτό *Arabidopsis thaliana*. Στην αραβίδοψη υπάρχει ένα εξειδικευμένο σύστημα αναγνώρισης του μορίου-διεγέρτη flg22(το οποίο αποτελείται από μια καλά συντηρημένη περιοχή αποτελούμενη από 22 αμινοξέα) της βακτηριακής φλατζελίνης. Το εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα της αραβίδοψης περιλαμβάνει ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που λειτουργεί ως υποδοχέας της flg22. Η προσδεμένη αυτή πρωτεΐνη είναι μια κινάση-υποδοχέας που περιλαμβάνει πεπτιδικά μόρια πλούσια σε λευκίνη (Leucine Rich Repeat, LRR) και ονομάζεται FLS2. Η αναγνώριση flg22-FLS2 οδηγεί στην παραγωγή δραστικών ομάδων οξυγόνου, αλκαλοποίηση του θρεπτικού υποστρώματος καλλιέργειας, δραστηριοποίηση των MAP κινασών, και επαγωγή γονιδίων σχετικά με την άμυνα του φυτού εναντίον παθογόνων (Gomez and Boller 2000). Πρόσφατη μελέτη του μηχανισμού αλληλεπίδρασης του στελέχους K165 σε μεταλλαγμένα φυτά *A.thaliana*, έδειξε ότι απουσία του υποδοχέα FLS2 δεν παρατηρείται προστασία και επομένως είναι αναγκαίος για να μπορεί

το φυτό να αναγνωρίσει το βακτήριο και να ενεργοποιήσει την άμυνα του (Gkizi et al.2016).

Συνοψίζοντας, στην παρούσα εργασία έγινε μια προσπάθεια αξιολόγησης της αποτελεσματικότητας του βιολογικού παράγοντα *Raenibacillus alvei* K165 σε 6 διαφορετικά υποστρώματα. Ταυτόχρονα μελετήθηκε η επίδραση τους στην ενεργοποίηση της άμυνας και στη θρέψη των φυτών. Στην συνέχεια του πειράματος μελετήθηκε ο μηχανισμός δράσης του βιολογικού παράγοντα. Για τον σκοπό αυτό μελετήθηκε η έκφραση δύο γονιδίων, των CHIT1 και PAL1. Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι στις εφαρμογές που είχε χρησιμοποιηθεί το ανταγωνιστικό βακτήριο *Raenibacillus alvei* το ποσοστό έκφρασης των δύο αυτών γονιδίων ήταν υψηλότερο σε σχέση με την έκφραση του μάρτυρα. Η έκφραση των γονιδίων αυτών διεγείρεται από διάφορους εξωγενείς παράγοντες (Parnisce et al.,1991). Πιθανόν η παρουσία του βιολογικού παράγοντα *Raenibacillus alvei* στην ριζόσφαιρα των φυτών να είναι και ο λόγος για τον οποίο η έκφραση των γονιδίων αυτών ήταν υψηλότερη στις επεμβάσεις που δέχθηκαν την επίδραση του βακτηρίου σε σχέση με τον μάρτυρα. Για το γονίδιο CHIT1 σημειώθηκε η υψηλότερη έκφραση του δεκαέξι ημέρες μετά την μεταφύτευση των φυτών στο μολυσμένο με FON χώμα, ενώ για το γονίδιο PAL1 η υψηλότερη έκφραση του σημειώθηκε οκτώ ημέρες μετά την μόλυνση των φυτών. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την έκφραση της PAL1 (Phenylalanine ammonia-lyase), θεωρείται ότι ενεργοποιείται κατά το μονοπάτι σύνθεσης του ιασημονικού οξέος. (Shoresh et al 2005).

Το γονίδιο PAL1 είναι το πρώτο ένζυμο στο μονοπάτι της βιοσύνθεσης των φαινυλοπροπανοειδών και του σαλικυλικού οξέος. Η έκφραση του γονιδίου CHIT1 σχετίζεται με την συσσώρευση του σαλικυλικού οξέος (Sticher et al., 1997). Αυτός είναι πιθανόν και ο λόγος που παρατηρήθηκε πρώτα έκφραση του γονιδίου PAL1 και στην συνέχεια του γονιδίου CHIT1. Σε προηγούμενα πειράματα που έγιναν, παρατηρήθηκε ότι όταν χρησιμοποιήθηκε ο βιολογικός παράγοντας *Pseudomonas fluorescens* σε φυτά μπανάνας, για την βιολογική αντιμετώπιση του μύκητα *Fusarium oxysporum*, η δράση των γονιδίων PAL, CHIT και 1-3 γλουκανάσης αυξήθηκε σε σχέση με τα φυτά που δεν δέχτηκαν την εφαρμογή του βιολογικού παράγοντα. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε και αύξηση των φαινολικών ενώσεων στους ιστούς των φύλλων τρεις ημέρες μετά την εφαρμογή του βιολογικού παράγοντα.(Thaenavela, et al, 2003). Η αύξηση της έκφρασης των γονιδίων αυτών ξεκίνησε τρεις ημέρες αφού έγινε η εφαρμογή του βιολογικού

παράγοντα και έφτασε στο μέγιστο έξι ημέρες μετά. Όταν έγινε η μόλυνση των φυτών η έκφραση των γονιδίων σημείωσε περαιτέρω αύξηση. Η αυξημένη έκφραση αυτών των αμυντικών γονιδίων αλλά και η αύξηση του περιεχομένου των φαινολικών ενώσεων, συνδέονται με την ενεργοποίηση του μηχανισμού άμυνας των φυτών μπανάνας, ενάντια στο παθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum* (Thanavela, et al, 2003).

Η παγκόσμια ανησυχία όσο αφορά την υγεία του ανθρώπου και την προστασία του περιβάλλοντος, εξαιτίας της αλόγιστης χρήσης φυτοφαρμάκων σήμερα, έχει δώσει το έναυσμα για την εξεύρεση νέων εναλλακτικών μεθόδων αντιμετώπισης των διάφορων ασθενειών των φυτών, πιο φιλικών προς τον άνθρωπο και το περιβάλλον. Ο βιολογικός έλεγχος των ασθενειών των φυτών με την βοήθεια διάφορων βιολογικών παραγόντων αποτελεί την πιο υποσχόμενη λύση για την αντιμετώπιση του προβλήματος αυτού (Alfredo, et al 1999).

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams P.B. and Fravel D.R. (1993). Dynamics of *Sporidesmium*, a naturally occurring fungal mycoparasite. In : Lumsden RD and Vaughn JL (eds). Pest management : Biologically based Technologies (pp.189-195) American Chemical Society, Washington, DC.
- Agrios GN. (2005). Plant Pathology. Elsevier, CA, Academy Press.
- Banishami and Dezeew(1973). The effect of soil temperature on survival of *Fusarium oxysporum* . Plant and soil 38, 465 (1973)
- Barbieri, P. , & Galli, E. (1993) . Effect on wheat root development of inoculation with an *Azospirillum brasilense* mutant with altered indole-3-acetic acid production. Research in Microbiology, 144, 69-75.
- Blancard D., Lecoq H., Pitrat M. (1994). A colour atlas of cucurbit diseases: observation, identification & control. London: Manson Pub., 2005.
- Boller T. (1995). Chemoperception of microbial signals in plant cells. Annu. Rev.Plant physiol. Plant Mol. Biol. 46:189-214.
- Booth, C. (1977). *Fusarium*: laboratory guide to the identification of the major species. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- Dangl J.L. (2013). Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. Science 341 : 1175
- Ebel J., Cosio E.G. (1994). Elicitors of plant defense responses. Int. Rev. Cytol. 14:81-36.
- ElenaK. and Tjamos, E.C.,1992. Evaluation of soil solarization singly or in combination with fungal or bacterial biocontrol agents to control *Fusarium* wilt of carnation.In: Biological control of plant diseases : Progress and Challenges of the Future, Tjamos, E.C., Papavizas, G.c. and R.J. Cook(eds)/ NATO ASI series, 230:75-78.
- Fuch J.G., Moenne- Loccoz Y. , Defago G. (1997). Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 induces resistance to *Fusarium* wilt in tomato. Plant Dis 81:492-496.

- Glick, B.R. (2005). Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters*, 251, 1-7
- Halverson L.J., Clayton M.K., and Handelsman J. (1993). Population biology of *Bacillus cereus* UW85 in the rhizosphere of field-grown soybeans. *Soil Biol. Biochem* 25: 485-493
- Handelsman J. and Stabb E.V. (1996). Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. *The plant cell*, 8:1855-1869
- Handelsman J. and Stabb E.V. (1996). Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. *The plant cell*, 8:1855-1869.
- Huber D.M., Wilhelm N.S. (1988). The role of manganese in resistance to plant diseases vol.33 of the series developments in plant and soil sciences pp155-173
- Jeong J., Guerinot M.L. (2009). Homing in on iron homeostasis in plant. *Trends Plant Sci.* 14 : 280-285.
- Jones E.E., Mead A. and Whipps J.M. (2004). Effect of inoculum type and timing of application of *Coniothyrium minitans* on *Sclerotinia sclerotiorum* : control of sclerotinia disease in glasshouse lettuce. *Plant pathology* 53:611-620
- King E.B., and Prake J.L. (1996). Population density of the biocontrol agent *Burkholderia cepacia* AMMDR1 on four pea cultivars. *Soil Biol. Biochem.* 28, 307-312.
- Kloepper J.W., Ryu C.-M., and Zhang S. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94: 1259-1266.
- Kroon B.A., Scheffer R.J. and 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
- Larkin R.P. and Fravel D.R. (1999). Mechanisms of action and dose-response relationships governing biological control of *Fusarium* wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium* spp. *Phytopathology* 89: 1152-1161.
- Leeman M., van Pelt J.A., den Ouden F.M., Heinsbroek M., Bakker P.A.H.M., and Schippers B. (1995b). Induction of systemic

resistance against Fusarium wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* 85, 1021-1027.

- Leeman M., van Pelt J.A., Hendreckx M.J., Scheffer R.J., Bakker P.A.H.M., and Schippers B. (1995a). Biocontrol of Fusarium wilt of radish in commercial greenhouse trials by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *Phytopathology* 85, 1301-1305.
- Logeman E., Parniske M., and Hahlbrock K. (1995). Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 92:5905-5909
- Mandeel Q. and Baker R. (1991). Mechanisms involved in biological control of Fusarium wilt of cucumber with strains of nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 81: 462-469.
- Numberg T. and Brunnen F. (2002). Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general editors and pathogen associated molecular patterns. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:318-324
- Olivain C, Steinberg C and Alabouvette C. (1995). Evidence of induced resistance in tomato inoculated by nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. In Manka M. (ed.) *Environmental*.
- Pascal B., Silke R., (2007). Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Special Issue on Biotic Interactions Current Opinion in Plant Biology.* 4:335-341.
- Raupach G.S. , and Kloepper J.W. (1998). Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology*, 88:1158-11640
- Shores M., Yedidia I., and Chet I. (2005). Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology* 95:76-84
- Staskawicz B.J. (2001). Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. *Plant Physiology* 125:73-76

- Sticher L., Mauch-Mani B., and Mettraux J.P. (1997). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35:235-270
- Taiz L. and Zeiger E. (2010). *Plant Physiology*, Fifth Edition. Sinauer Associates Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts U.S.A.
- Tjamos E.C. , Tsitsigiannis I.D. , Tjamos S.E., Antoniou P. , Katinakis P.(2004). Endorhizosphere Bacteria from Solarized Soils as Biocontrol Agents Against *Verticillium dahlia* of Solanaceous Host. *European Journal of Plant Pathology* 1:35-44.
- Tjamos S.E. , Flemetakis E. , Paplomatas E.J. , Katinakis P., (2005). Induction of resistance to *Verticillium dahlia* in *Arabidopsis thaliana* by the biocontrol agent K-165 and pathogenesis-related proteins gene expression. *Mol Plant Microbe Interact.* 18(6):555-61
- Van Loon L.C. and Bakker P.A.H.M.(2003). Signaling in rhizobacteria-plant interactions. In H.De Kroon & E.J.
- Van Loon L.C. and Glick G.R. (2004). Increased plant fitness by rhizobacteria. Pages 177-205 in : *Molecular Ecotoxicology of Plants*. Vol 170. H.Sandermann, ed. Springer-Verlag, Berlin.
- Van Loon, L. C. , & Bakker, P.A. H.M. (2003). Signalling in rhizobacteria-plant interactions. In H.De Kroon & E.J.W. Visser (Eds.), *Root ecology*, (Ecological studies Vol.168,pp.297-330). Berlin , Heidelberg: Springer-Verlag
- Van Wees S.C.M., Van der Ent S., Pieterse C.M.J. (2008) Plant immune responses triggered by beneficial microbes *Current Opinion in Plant Biology* 11:443-448.
- Vessey, J.K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* , 255, 571-586
- Visker,M.H.P.W., Keizer, L.C.P., Budding, D.J., VanLoon, L.C. , Colon, L.T., & Struik,P.C. (2003). Leaf position prevails over plant age in reflecting resistance to late blight in potato. *Phytopathology*, 93,666-674
- Xu Y., Chang P-FL, Liu D., Narasimhan M.L., Raghothama k.G., Hasegawa P.M., Bressan R.A. (1994). Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell.* 6:1077-1085

- Yruela I. (2009). Copper in plants: Acquisition, transport and interactions. *Functional Plant Biol.* 36:409-430.
- Κανάκης Γ. Ανδρέας, 2004. Καλλιέργεια λαχανικών στο θερμοκήπιο, Τόμος β'. Αθήνα, 2004: Εκδόσεις Σταμούλης.
- O'Donnell P.J., Calveri C., Atzorn R., Wasternack C., Leyser H.M.O., Bowles D.J. (1996). Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science.* 274 : 1914-1917
- ΠΑΝΑΓΟΠΟΥΛΟΣ Γ. Χ. (2000). ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΚΗΠΕΥΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ Εκδότης:ΣΤΑΜΟΥΛΗΣ
- Παναγόπουλος Χ.Γ. (1995). Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών. Αθήνα: εκδόσεις Σταμούλης
- Παναγόπουλος Χ.Γ. (2007) . Ασθένειες καρποφόρων δέντρων και αμπέλου. Αθήνα:εκδόσεις Σταμούλης.
- Παναγόπουλος Χ.Γ., 1995. Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών. Εκδόσεις ΑΘ.Σταμούλης, Αθήνα
- Τζάμος Ε.Κ. (2007). Φυτοπαθολογία . Αθήνα : εκδόσεις Σταμούλης
- ΧΡΗΣΤΟΣ Μ.ΟΛΥΜΠΙΟΣ 2001 Η τεχνική της καλλιέργειας των κηπευτικών στα θερμοκήπια Αθήνα 2001 Εκδόσεις Σταμούλης.
- Broadley M.R., White P.J., Hammond J.P., Zelko I. and Lux A. (2007). Zinc in plants. *New phytol.* 173: 677-702.
- Αλιφραγκής Δ.(2008). Το έδαφος ΓΕΝΕΣΗ-ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ-ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ. ΤΟΜΟΣ Ι. Εκδόσεις ΑΪΒΑΖΗ. Θεσσαλονίκη. Σελ:127,128
- Weller D.M. , Raaijmakers J.M., McSpadden Gardener B.B. and Thomashow L.S. (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Ann Rev Phytopathol* 40: 309-348
- Campbell C.L. and Madden L.V. (1990). *Introduction to Plant Disease Epidemiology.* New York : Wiley.
- D.M. Weller 1998. Biological Control of Soilborne Plant Pathogens in the Rhizosphere with Bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 26: 379-407.
- Gómez-Gomez, L., and Boller, T. 2000. FLS2 : An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Mol. Cell* 5:1003-1011.

- Gkizi D., Lehmann S., L'Haridon F., Serrano M., Paplomatas E.J., Metraux J.P., and Tjamos S.E. (2016). International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions. 29:313-323.
- Parniske, M., Fischer H.-M., Hennecke, H., & Werner, D. (1991). Accumulation of the phytoalexin glyceollin in soybean nodules infected by a Bradyrhizobium japonicum nifA mutant. Zeitschrift für Naturforschung, 46, 318-320.
- Shores, M. Yedidia, I. and Chet, I. 2005. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by Trichoderma asperellum T203. Phytopathology 95:76-84.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., & Metraux, J.-P. (1997). Systemic acquired resistance. Annual Review of Phytopathology, 35, 235-270
- Alfredo Herrera-Estrella and Ilan Chet 1999. Chitinases in biological control. Chitin and Chitinases.

www.forestryimages.org

<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>

<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>

<http://nefeli.lib.teicrete.gr/browse/steg/fp/2008/PapoutsakisLeuteris/attached-document/papoutsakis.pdf>

<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>

<https://openeclass.teimes.gr/modules/document> ((Α.Λιόπα-Τσακαλίδη, εργαστήριο 3 υποστρώματα ανάπτυξης βιβλίο εργαστηρίου ανθοκομίας, ΤΕΙ Μεσολογγίου)

ΕΠΙΣΤ.ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ