



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής
Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας

Μεταπτυχιακή Μελέτη

Βιολογική αντιμετώπιση του μύκητα *Verticillium dahliae*
στη καρπουζιά με το φυτοπροστατευτικό παράγοντα
K165 σε 6 διαφορετικά είδη εδάφους.



Άννα Ι. Δούκα

Επιβλέπων: Τζάμος Σωτήρης, Επίκουρος Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ 2018



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής
Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας

Μεταπτυχιακή Μελέτη

Βιολογική αντιμετώπιση του μύκητα *Verticillium dahliae*
στη καρπουζιά με το φυτοπροστατευτικό παράγοντα
K165 σε 6 διαφορετικά είδη εδάφους.



Άννα Ι. Δούκα

Επιβλέπων: Τζάμος Σωτήρης, Επίκουρος Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ 2018

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παράγωγης
Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας

Μεταπτυχιακή Μελέτη
που υποβλήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Βιολογική αντιμετώπιση του μύκητα *Verticillium dahliae* στη
καρπουζιά με το φυτοπροστατευτικό παράγοντα K165 σε 6
διαφορετικά είδη εδάφους.

Άννα Ι. Δούκα

Επιβλέπων: Τζάμος Σωτήρης, Επίκουρος Καθηγητής

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1. Επαμεινώνδας Παπλωματάς, Διευθυντή του Εργαστηρίου
Φυτοπαθολογίας
2. Σωτήρης Τζάμος, Επίκουρος Καθηγητής
3. Κωνσταντίνος Οιχαλίωτης, Αναπληρωτής Καθηγητής

*Στην οικογένεια μου,
για τη συνεχή υποστήριξη τους*

Ευχαριστίες

Η μεταπτυχιακή μου μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης μου δέχτηκα πολλή και χρήσιμη βοήθεια από τους ανθρώπους του εργαστηρίου που με βοήθησαν για την ολοκλήρωσή της και θα ήθελα να τους ευχαριστήσω ιδιαίτερα.

Πρώτα απ' όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Επίκουρο Καθηγητή Σωτήριο Τζάμο τόσο για την ανάθεση της μελέτης όσο για την καθημερινή καθοδήγηση και συμβολή του σ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου μελέτης. Επίσης θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τις χρήσιμες συμβουλές και τις εύστοχες παρατηρήσεις που με βοήθησαν να ολοκληρώσω τη μελέτη αυτή.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας Επαμεινώνδα Παπλωματά όπως επίσης σε όλους του Καθηγητές του εργαστηρίου για την πάντα άμεση βοήθειά τους και συμβουλές τους σε οποιαδήποτε απορία και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Κωνσταντίνο Οικαλιώτη για την συμβολή του στη μελέτη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους μεταπτυχιακούς και υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου που ήταν δίπλα μου και πάντα πρόθυμοι να συμβάλουν με τις πολύτιμες γνώσεις τους αλλά και για το ευχάριστο κλίμα που δημιούργησαν και εργάστηκα μέσα σε αυτό.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	8
1. Εισαγωγή.....	10
1.1 Καρπουζιές και ασθένειες	10
1.2 Ο μύκητας <i>Verticillium dahliae</i> και ο βιολογικός κύκλος του	14
1.3 Συμπτώματα του μύκητα <i>Verticillium dahliae</i>	17
1.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη του μύκητα και την εξέλιξη της ασθένειας	19
1.4.1 Θερμοκρασία εδάφους και αέρα.....	19
1.4.2 Φώς.....	20
1.4.3 Υγρασία εδάφους.....	20
1.4.4 Πυκνότητα μολύσματος	21
1.4.5 Αερισμός εδάφους	22
1.4.6 pH και Δομή Εδάφους	22
1.4.7 Βιοτικοί παράγοντες (νηματώδεις, έντομα κτλ)	23
1.5 Τρόπος μετάδοσης.....	24
1.6 Τρόποι αντιμετώπισης.....	25
1.6.1 Καλλιέργεια ανθεκτικών ποικιλιών.....	26
1.6.2 Απολύμανση του εδάφους με ατμό, χημική, ηλιοαπολύμανση.....	26
1.6.3 Με αμειψισπορά.....	30
1.6.4 Εφαρμογή κατάλληλων καλλιεργητικών φροντίδων.....	31
1.6.5 Βιολογικοί παράγοντες	34
1.7 Βιολογικός παράγοντας <i>Paenibacillus alvei</i> (K165).....	35
2. Σκοπός της Μελέτης.....	37
3. Υλικά και μέθοδοι.....	38
3.1 Φυτά καρπουζιάς και εδαφικά υποστρώματα	38
3.2 Μικροβιολογικό υλικό	39
3.3 Θρεπτικό υλικό PDA.....	39
3.4 Θρεπτικό υλικό SSN	40
3.5 Θρεπτικό υλικό NG.....	41
3.6 Προετοιμασία του παθογόνου <i>Verticillium dahliae</i>	41
3.7 Προετοιμασία του Βιολογικού παράγοντα <i>Paenibacillus alvei</i> (K165).....	42
3.8 Πείραμα 1ο μέρος.....	42
3.9 Πείραμα 2ο μέρος.....	45

3.9.1 Καταγραφή Συμπτωμάτων	45
3.10 Πείραμα 3ο μέρος: Μοριακές τεχνικές	46
3.10.1 Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων β-1,3-glucanase και class V chitinase	46
3.10.2 Απομόνωση RNA	46
3.10.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης	48
3.10.4 Εφαρμογή της DNase I	48
3.10.5 Εφαρμογή αντιστροφής μεταγραφάσης.....	49
3.10.6 Real-time PCR	49
4. Αποτελέσματα	51
4.1 Αποτελέσματα συμπτωμάτων	51
4.2 Αποτελέσματα συγκεντρώσεων του <i>P. alvei</i> (K165)	59
4.3 Αποτελέσματα Real-time PCR.....	63
5. Συζήτηση-Συμπεράσματα	65
Βιβλιογραφία	69

Περίληψη

Το καρπούζι είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα φρούτα παγκοσμίως. Η καρπουζιά είναι ένα φυτό ιδιαίτερα ευαίσθητο και προσβάλλεται από πολλά εδαφογενή παθογόνα. Ένα από αυτά είναι και ο μύκητας *Verticillium dahliae* που είναι ένας εδαφογενής μύκητας και προκαλεί αδρομυκώσεις στα φυτά. Έχει επίσης εκτεταμένη γεωγραφική εξάπλωση και εντοπίζεται και στην Ελλάδα. Λόγω της δυσκολίας που έχει στην αντιμετώπιση του καθώς δεν υπάρχουν χημικά σκευάσματα μια ελπιδοφόρα μέθοδος είναι η χρήση βιολογικών παραγόντων. Ο βιολογικός παράγοντας *Paenibacillus alvei* ανήκει στη κατηγορία των αυξητικών ριζοσφαιρικών βακτηρίων και τα τελευταία χρόνια έχει απομονωθεί ένα στέλεχος του το K165 όπου έχει δείξει ότι μπορεί να φέρει θετικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση της Βερτισιλλίουσης.

Στη παρούσα εργασία μελετήθηκε η φυτοπροστατευτική δράση του στελέχους K165 ενάντια στον μύκητα *Verticillium dahliae* σε φυτά καρπουζιάς που φυτεύτηκαν σε 6 διαφορετικά υποστρώματα και η έκφραση των γονιδίων β -1,3-glucanase και class V chitinase. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε κάποιες εφαρμογές η συγκέντρωση του K165 ήταν μεγαλύτερη και υπήρξε προστασία στα φυτά και πιο συγκεκριμένα στις εφαρμογές όπου υπήρχε και ο μύκητας (*V.dahliae*+K165). Και στις 2 εφαρμογές που παρουσιάστηκε μια μικρή προστασία στα φυτά το μεγαλύτερο ποσοστό του εδαφικού υποστρώματος που είχαν τα φυτά ήταν άμμος. Τέλος τα αποτελέσματα της RT-PCR έδειξαν ότι τα ποσοστά έκφρασης του γονιδίου της γλουκανάσης ήταν μικρότερα σε σχέση με τη χιτινάση, η οποία στην εφαρμογή με τον μύκητα *V.dahliae*+K165 παρουσίασε τη μεγαλύτερη έκφραση γονιδίων απ' όλες τις εφαρμογές στις 8 μέρες από τη μόλυνση.

Abstract

Watermelon is one of the most well-known fruits worldwide. The watermelon plant is really sensitive thus making it susceptible to many soil borne pathogens. One of them is the *Verticillium dahliae* which is also soil borne. In addition it also has a wide area of spreading and it can be located in Greece as well. Since there are no chemical substances to deal with it yet, a promising way to do so is with biological products. The *Paenibacillus alvei* bacteria species belongs to the category of the proliferate rhizosphere bacteria and in the last years the K165 strain has been isolated, which has shown that it can produce a positive outcome in dealing with the verticillium wilt.

The current study was focused on the plant-protective action of the K165 strain against the *Verticillium dahliae* on watermelon vines which were planted in six different subsurfaces/soils and the gene expression of the β -1,3-glucanase and class V chitinase. The results showed that in some applications the accumulation of the K165 was greater, at the same time the plants were protected and more specifically at the applications where the fungi was applied (*V.dahliae*+K165). In both applications where a lesser protection was shown the planting had happened on sand-based soil. Lastly the results of the RT-PCR showed that the percentages of gene expression of glucanase were lesser in comparison to the chitinase, which in the fungi application *V.dahliae*+K165 presented the biggest gene expression from all the applications at the 8dpi.

1. Εισαγωγή

1.1 Καρπουζιές και ασθένειες

Το καρπούζι *Citrullus lanatus* ανήκει στην οικογένεια *Curcubitaceae* και είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα φρούτα παγκοσμίως προέρχεται από την νότια Αφρική και την εμφάνιση του την είχε κάνει και στην αρχαιότητα και ποιά συγκεκριμένα σε ιερογλυφικά της Αρχαίας Αιγύπτου (Strauss, 2015). Καλλιεργήθηκε πρώτη φορά στην Κίνα τον 10ο αιώνα μ.Χ. ενώ στην Ευρώπη εμφανίστηκε τον 13ο αιώνα μέσω των Αράβων. Η ελληνική λέξη για τον καρπό είναι «υδροπέπων». Ο χυμός των καρπουζιών πέρα από γευστικός είναι και πλούσιος σε ζάχαρα ,άλλα θρεπτικά συστατικά, βιταμίνες και ανόργανα συστατικά, συμπεριλαμβανομένων βιταμίνη C, A, B1, B6, το μαγνήσιο, β-καροτένιο, κάλιο και διαλυτές φυτικές ίνες. Αποτελείται από 90% νερό και 5% σε φρουκτόζη επίσης η περιεκτικότητα του χυμού στα διάφορα στοιχεία επηρεάζεται από την ποικιλία, τις καλλιεργητικές συνθήκες αλλά και από το βαθμό ωρίμασης (Παπαδημητρόπουλος, 2018).

Τα κολοκυνθοειδή άρα και οι καρπουζιές είναι μόνοικο και δίκλινο εκτός από μερικές ποικιλίες που είναι ανδρομόνοικες δηλαδή στο ίδιο φυτό βρίσκονται και αρσενικά και ερμαφρόδιτα άνθη. Στο φυτό εμφανίζονται πρώτα τα αρσενικά άνθη και ακολουθούν τα θηλυκά τα οποία εμφανίζονται επί του κεντρικού βλαστού η γονιμοποίηση του φυτού γίνεται με σταυρονιμοποίηση με τη βοήθεια των μελισσών αλλά και άλλων εντόμων. Παρ' όλα αυτά οι καρπουζιές διαφέρουν από τα άλλα κολοκυνθοειδή στα φύλλα και στους καρπούς. Τα φύλλα τους είναι πιο έντονα έλλοβα, (3-4 λοβούς) με πιο πολλές εγκολπώσεις (σαν "σχισμένο") (Εικόνα 1) και το ριζικό τους σύστημα είναι σχετικά βαθύ με πολυάριθμες επιφανειακές διακλαδώσεις. Η διαφορά που έχουν οι καρποί τους σε σχέση με τα άλλα κολοκυνθοειδή είναι ότι δεν έχουν κενό χώρο εσωτερικά καθώς καταλαμβάνεται από τον πλακούντα (το φαγώσιμο τμήμα του καρπουζιού).



Εικόνα 1. Φύλλο καρπουζιάς sugar baby

Όσο αφορά την καλλιέργεια του φυτού, η καρπουζιά αποδίδει καλύτερα σε ελαφράς σύστασης εδάφη (αμμοπηλώδη ή αμμώδη) γόνιμα, βαθιά και καλά αποστραγγιζόμενα εδάφη χωρίς παθογόνα. Το ιδανικό pH που πρέπει να έχει το έδαφος για να μπορέσει να επιβιώσει και αναπτυχθεί σωστά είναι 5,5-6,5. Η καρπουζιά είναι ένα φυτό ιδιαίτερα ευαίσθητο στα παθογόνα του εδάφους και τις βακτηριακές ασθένειες. Μερικές από τις βακτηριολογικές ασθένειες που μπορεί να εμφανιστούν στις καρπουζιές είναι:

1. Η βακτηριακή κηλίδωση των κολοκυνθοειδών όπου πρόκειται για το βακτήριο *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* και προκαλεί πολύ μικρές γωνιώδεις καστανές ή κίτρινες κηλίδες που μπορεί να περάσουν και απαρατήρητες (Βακαλουνάκης, 2006).
2. Η βακτηριακή μάρανση όπου προκαλείται από το βακτήριο *Erwinia tracheiphila* και σαν αρχικό σύμπτωμα παρατηρείτε μια μάρανση σε μεμονωμένα φύλλα στη συνέχεια η ασθένεια εξαπλώνεται στο αγγειακό σύστημα του φυτού όπου μαραίνονται όλο και περισσότερα φύλλα και στο τέλος το στέλεχος μαραίνεται και νεκρώνεται (Βακαλουνάκης, 2006).
3. Η βακτηριακή σήψη του στελέχους όπου προκαλείται από το βακτήριο *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*, *Erwinia chrysanthemi* και *Pseudomonas* sp και προκαλούν μάρανση, ένα κιτρίνισμα στα φύλλα και στους βλαστούς και στο τελικό στάδιο προκαλεί σήψη και νέκρωση.

Τα παθογόνα που προσβάλουν και προκαλούν καταστροφές σε καλλιέργειες είναι :

- 1) Ο περονόσπορος (*Pseudoperonospora cubensis*) με συμπτώματα μικρές κηλίδες οι οποίες στην αρχή είναι χλωρωτικές και στη συνέχεια με γρήγορους ρυθμούς εξελίσσονται σε νεκρωτικές σκουρόχρωμες, κυκλικού σχήματος κηλίδες. Σε περιπτώσεις έντονης προσβολής οι πολυάριθμες κηλίδες ενώνονται μεταξύ τους με αποτέλεσμα να εμφανίζονται έντονες ξηράνσεις και μεγάλη φυλλόπτωση (Βακαλουνάκης, 2006).
- 2) Το ωίδιο (*Sphaerotheca fusca*) όπου παρατηρούνται κυκλικές καλυπτόμενες από αραιή λευκή εξάνθηση, και στις δύο πλευρές του ελάσματος αρχικά στα φύλλα της βάσης και αργότερα στα ανώτερα αυτή η εξάνθηση μπορεί να εμφανιστεί και στους μίσχους και στους βλαστούς. Στη συνέχεια αυτά τα φύλλα γίνονται κίτρινα, μετά καστανά και τελικά ξεραίνονται και πέφτουν (Βακαλουνάκης, 2006).
- 3) Η αδροφουζαρίωση (*Fusarium oxysporum f. sp. niveum*) με συμπτώματα αυτά του μααρασμού, χλώρωση του ελάσματος των φύλλων και τελικά ξήρανση του φυτού. Σε προχωρημένα στάδια της ασθένειας παρατηρείται σήψη των ριζών όπου με υγρό καιρό διακρίνεται μια λευκή εξάνθηση του παθογόνου (Εικόνα 2) (Βακαλουνάκης, 2006).



Clemson University - USDA Cooperative Extension Slide Series, Bugwood.org

Εικόνα 2. Στέλεχος φυτού καρπουζιάς με προσβολή από αδροφουζαρίωση στο στέλεχος (<https://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1436118>)

- 4) Η αλτερναρίωση (*Alternaria alternata f. sp. cucurbitae*) με αρχικά συμπτώματα στις επιφάνειες των φύλλων όπου παρατηρούνται νεκρωτικά στίγματα που αργότερα εξελίσσονται σε κυκλικές διαφόρων μεγεθών κηλίδες. Τα φύλλα που

είναι προσβεβλημένα κιτρινίζουν, ξεραίνονται και τελικά πέφτουν. Τέλος παρατηρείται μια σκούρα καστανόμαυρη εξάνθηση πάνω στα φύλλα που αποτελεί τις καρποφορίες του παθογόνου (Βακαλουνάκης, 2006).

- 5) Η ανθράκωση (*Colletotrichum lagenarium*) όπου η προσβολή ξεκινά με την εμφάνιση χλωρωτικών κηλίδων πάνω σε ένα νεύρο στη συνέχεια επεκτείνεται στους ιστούς των ελασμάτων με τον σχηματισμό ερυθροκαστανών νεκρωτικών κηλίδων κυκλικού ήγωνιώδους σχήματος (Βακαλουνάκης, 2006)..
- 6) Η σκληρωτινίαση (*Sclerotinia sclerotiorum*) όπου η μόλυνση ξεκινά από την περιοχή του λαιμού και εξαπλώνεται προς το στέλεχος του φυτού και τη ρίζα. Σχηματίζεται ένα υδατώδεις, υπόλευκο έλκος που όταν προσβάλει το στέλεχος και το περιβάλλει με αποτέλεσμα τα φύλλα που είναι πάνω από την προσβολή να μαραίνονται και τελικά να ξηραίνονται. Παρατηρείται επίσης σε συνθήκες υψηλής υγρασίας ότι τα προσβεβλημένα μέρη του φυτού παρουσιάζουν μια κάλυψη από λευκό, βαμβακώδες μυκήλιο μέσα στο οποίο μπορεί κανείς να διακρίνει μεγάλα μαύρα σκληρώτια (Εικόνα 3,4) (Βακαλουνάκης, 2006).
- 7) Η τέφρα σήψη (*Botrytis cinerea*) η μόλυνση στα πρώτα στάδια ανάπτυξης των φυτών μπορεί να εμφανιστεί με τη μορφή των τήξεων των σπορίων. Στη συνέχεια παρατηρείται ότι οι προσβεβλημένοι ιστοί συρρικνώνονται, γίνονται μαλακοί, νεκρώνονται και καλύπτονται από την πυκνή τέφρα εξάνθηση του παθογόνου που αποτελείται από τα κονίδια και τους κονιδιοφόρους του μύκητα. Στα ανεπτυγμένα φυτά είναι πιο συχνό να εμφανιστεί σε αυτά όπου μπορεί να έχουν εξασθενημένους φυτικούς ιστούς και πληγές οπότε περνάει στους υγιείς ιστούς προσβάλλοντάς τους.
- 8) Η προσβολή λαιμού, ριζών και καρπών (*Pythium ultimum*, *Phytophthora parasitica*) η μόλυνση προκαλεί σήψεις λαιμού, ριζών και καρπών. Στα σημεία της προσβολής παρατηρούνται υδατώδεις μεταχρωματισμοί οι οποίοι αργότερα γίνονται λευκοκίτρινοι, καστανοί και τέλος οι ιστοί γίνονται μαλακοί και τελικά συρρικνώνονται. Στο λαιμό η προσβολή εμφανίζεται στη βάση του στελέχους ως μια υδατώδεις κηλίδα και ο βλαστός μαλακώνει. Τέλος, οι καρποί οι οποίοι ακουμπούν στο έδαφος σχηματίζουν μια υδατώδεις κηλίδα γκριζοκάστανο ή καστανού χρώματος που σύντομα καλύπτει μεγάλο μέρος του καρπού.



Εικόνα 3. Σκληρώτια στη βάση ενός μαρουλιού Iceberg.
 (<https://www.ipmimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1571737>)



Εικόνα 4. Προσβολή *Sclerotinia sclerotiorum* σε στέλεχος φασολιάς (*Phaseolus vulgaris*) (Ploulec'h, Côtes d'Armor, Bretagne, France).
 (https://en.wikipedia.org/wiki/Sclerotinia_sclerotiorum#/media/File:Sclerotinia_sclerotiorum.jpg)

- 9) Η βερτισιλλίωση (*Verticillium dahliae*, *Verticillium albo-atrum*) τα φυτά τα οποία έχουν προσβληθεί παρουσιάζουν το σύνδρομο του βραδέως μαρασμού. Τα πρώτα συμπτώματα είναι η μάρανση των φύλλων που βρίσκονται στη βάση του φυτού στα ελάσματα από αυτά τα φύλλα παρατηρείται χλώρωση μεταξύ των νευρώσεων και νέκρωση των χλωρωτικών ιστών. Έναν καστανό μεταχρωματισμό εμφανίζει το ξύλο των αγγειακών δεσμίδων και αυτό εκτείνεται από την ρίζα έως ψηλά το στέλεχος. Τέλος τα φυτά παρουσιάζουν νανισμό, καχεξία και τελικά ξηραίνονται (Βακαλουνάκης, 2006).

1.2 Ο μύκητας *Verticillium dahliae* και ο βιολογικός κύκλος του

Ο μύκητας ανήκει στην κλάση Αδηλομύκητες (*Adelomycetes*), στην τάξη *Moniliales* (*Hyphomycetes*) και στην οικογένεια *Moniliaceae*. Πέρα από το *Verticillium dahliae* αναφέρονται και τα εξής είδη: *V. albo-atrum*, *V. longisporum*, *V. nigrescens* και *V. tricornis*. Μεγάλη φυτοπαθολογική σημασία παρουσιάζουν οι μύκητες *Verticillium dahliae* και *V. albo-atrum*. Ο συγκεκριμένος μύκητας είναι

εδαφογενής και προκαλεί αδρομυκώσεις στα φυτά. Είναι από τα σπουδαιότερα παθογόνα που προσβάλλει το αγγειακό σύστημα των φυτών και είναι το πιο σύννηθες παθογόνο στη χώρα μας και αυτό οφείλεται πιθανόν στο γεγονός ότι ο συγκεκριμένος μύκητας ευνοείται από υψηλές μέσες θερμοκρασίες. Παρ όλα αυτά ο μύκητας *Verticillium dahliae* έχει εκτεταμένη γεωγραφική εξάπλωση πέρα από την Ελλάδα για αυτό εντοπίζεται και στον Καναδά, ΗΠΑ και Ευρώπη. Λόγω της δυνατότητας που έχει να προσβάλλει φυτά τόσο στις ψυχρές αλλά και σε θερμές περιοχές με θερμοκρασία που μπορεί να υπερβαίνει τους 24°C για μεγάλο χρονικό διάστημα στις καλλιεργητικές περιόδους, ο μύκητας *Verticillium dahliae* κυριαρχεί στις θερμές περιοχές της νότιας Ευρώπης και της Μεσογείου. Το παθογόνο προσβάλλει περισσότερα από 200 είδη ξενιστών όπου συμπεριλαμβάνονται κηπευτικά(τομάτα, μελιτζάνα κολοκυνθοειδή κτλ), αυτοφυή φυτά ,δενδρώδεις καλλιέργειες (ελιά, αμπέλι, φιστικιά κτλ) και τα πυρηνόκαρπα (αμυγδαλιά, βερικοκιά, κερασιά, δαμασκηνιά και ροδακινιά) (Παναγόπουλος, 2007).

Όταν ο μύκητας καλλιεργηθεί σε θρεπτικό υλικό σχηματίζει λευκές, βαμβακώδεις αποικίες οι οποίες αναπτύσσονται αργά. Στη συνέχεια εμφανίζονται υπόλευκες αποικίες περίπου μια βδομάδα μετά την καλλιέργεια του στο θρεπτικό υλικό και που αργότερα γίνονται μαύρες λόγω σχηματισμού των οργάνων διατήρησης (μικροσκληρωτίων, γλαυδοσπορίων, μυκηλίου ανάπαυσης). Ο μύκητας έχει πολυκύτταρο μυκήλιο με διάμετρο 2-4,5μm που είναι αρχικά υαλώδες και στη συνέχεια καστανό. Σχηματίζει ελεύθερους, ανορθωμένους, υαλώδεις πολυκύτταρους κονidioφόρους που έχουν σαν χαρακτηριστικό τη διακλάδωση κατά σπονδύλους. Στη συνέχεια στα εγκάρσια χωρίσματα (septa) του κονidioφόρου σχηματίζονται 3-4 μονοκύτταρα στηρίγματα (με διαστάσεις 16-35 x 1-2,5μm) τα φιαλίδια με τα κονίδια (φιαλιδοσπόρια). Τα κονίδια που σχηματίζονται είναι μονοκύτταρα, υαλώδη, ωοειδή και έχουν διαστάσεις 2,5-8 x 1,4-3,2 μm. Στην κορυφή κάθε φιαλιδίου παράγονται πολλά διαδοχικά κονίδια που σχηματίζουν μικρές κεφαλές (ομάδες) τα οποία συγκρατούνται όλα μαζί εξαιτίας μιας κολλώδους ουσίας. Η διασπορά των κονιδίων επιτυγχάνεται με το νερό (Παναγόπουλος 2007) (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Μικροσκοπική απεικόνιση κονιδιοφόρων και κονιδίων του *Verticillium*.

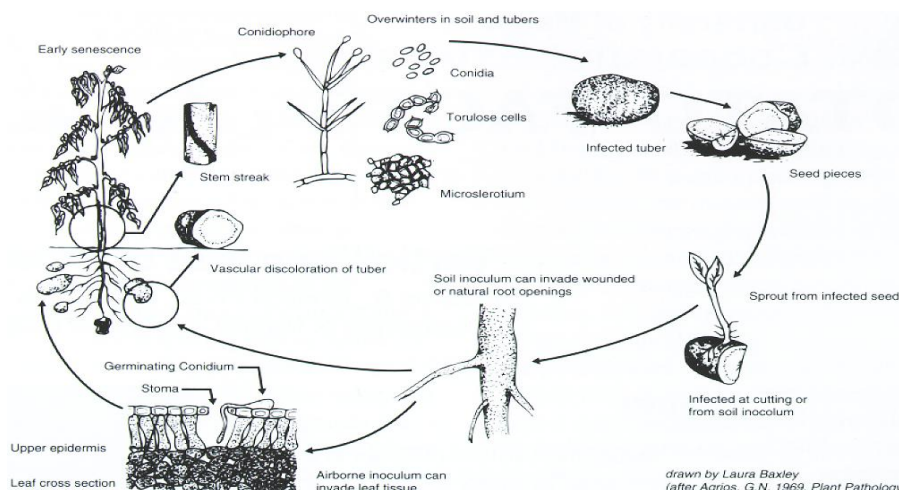
(<https://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5338031>)

Ο μύκητας *Verticillium dahliae* σχηματίζει επίσης μικροσκληρώτια τα οποία έχουν παχιά κυτταρικά τοιχώματα χρώματος σκοτεινό καφέ μέχρι μαύρο που οφείλεται στη συσσώρευση μελαμίνης, ποικίλουν σε σχήμα και μέγεθος διαμέτρου περίπου 15-100μm. Τα μικροσκληρώτια είναι ικανά να διατηρηθούν και να επιβιώσουν στο έδαφος για παραπάνω από 10 χρόνια ακόμα και χωρίς την παρουσία κάποιου ξενιστή. Ευνοούνται από τις μέσες θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 21-27°C για αυτό και θεωρούνται κρίσιμες για την εξέλιξη που θα έχει η ασθένεια στα φυτά. Η μόλυνση των φυτών ξεκινάει με την εισχωρεί του μύκητα στο ριζικό τους σύστημα που προκαλεί μια μονοκυκλική ασθένεια, δηλαδή το παθογόνο απαιτεί μία μόνο καλλιεργητική περίοδο προκειμένου να συμπληρώσει το βιολογικό του κύκλο.

Ο κύκλος του μύκητα μπορεί να διακριθεί σε τρεις φάσεις: τη ληθαργική, τη παρασιτική και τη σαπροφυτική. Η ληθαργική φάση επιτυγχάνεται με τα μικροσκληρώτια τα οποία βρίσκονται σε λήθαργο μέσω μιας ιδιότητας του εδάφους τη μυκόσταση (fungistasis). Αυτή η λειτουργία μπορεί να οφείλεται σε παρεμποδιστικές χημικές ενώσεις του εδάφους. Τα μικροσκληρώτια παραμένουν στο έδαφος έως ότου υπάρξουν περιβαλλοντικές συνθήκες ευνοϊκές για την ανάπτυξη και τη βλάστηση του μύκητα. Επίσης μπορούν να βλαστήσουν πολλές φορές και να αυξήσουν την πιθανότητα μιας επιτυχούς μόλυνσης καθώς κάθε κύτταρο που διαθέτουν έχει την ικανότητα να βλαστήσει έστω και μια φορά. Η απόσταση που διανύουν οι υφές που εξέρχονται από τα μικροσκληρώτια είναι περιορισμένη. Η απόσταση που μπορεί να διανύσουν και να μολυνθεί τελικά η ρίζα του ξενιστή από το *Verticillium dahliae* είναι τα 300μm. Στη συνέχεια ο μύκητας εισέρχεται στη δεύτερη φάση την παρασιτική όπου με την έναρξη της τα ευπαθή φυτά μολύνονται είτε μέσω

του ακροριζίου τους είτε μέσω διάφορων πηγών. Ωστόσο για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί η μόλυνση θα πρέπει ο μύκητας να περάσει τους ιστούς του ξύλου και να διασχίσει την ενδοδερμίδα που λειτουργεί σαν φυσικός φραγμός στη προσβολή του φυτού.

Αρχικά ο μύκητας με την είσοδο του στο φυτό αποικίζει στα αγγεία του ξύλου και σχηματίζει τα κονίδια, στη συνέχεια με την πρόοδο της προσβολής παρατηρείται η αποίκιση του μύκητα και σε άλλους φυτικούς ιστούς με αποτέλεσμα τη γήρανση και τελικά τη σταδιακή νέκρωση του φυτού. Τέλος το φυτό περνά στην τρίτη φάση, τη σαπροφυτική όπου ο μύκητας σχηματίζει πάνω στους ιστούς τα μικροκληρώτια τα οποία καταλήγουν στο έδαφος μαζί με τους νεκρούς ιστούς του φυτού όπου τα μικροκληρώτια έχουν την ικανότητα να επιβιώσουν στο εκεί για 10-15 χρόνια (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Στάδια του βιολογικού κύκλου *Verticillium dahliae*
(<https://extension.umaine.edu/publications/5041e/>)

1.3 Συμπτώματα του μύκητα *Verticillium dahliae*

Τα συμπτώματα της ασθένειας εμφανίζονται συνήθως στα κατώτερα φύλλα και μέρη του φυτού και στη συνέχεια με την πρόοδο της ασθένειας νοσούν και τα υπόλοιπα φύλλα. Η ασθένεια συνήθως εμφανίζεται στα ανεπτυγμένα φυτά τα οποία εμφανίζουν το σύνδρομο του βραδέως μαρασμού και πολλές φορές η ασθένεια εμφανίζεται με τη μορφή ημιπληγίας. Τα συμπτώματα μοιάζουν με αυτά των

φουζαριώσεων (*Fusarium wilt*), των αδροβακτηριώσεων και των ασθενειών του ριζικού συστήματος των φυτών.

Τα κύρια συμπτώματα της ασθένειας είναι ο μαρασμός όπου τις ζεστές μέρες είναι πιο έντονος, οι χλωρωτικές κηλίδες που στη συνέχεια γίνονται νεκρωτικές και ο μεταχρωματισμός των αγγείων όπου το ξύλο των αγγειωδών δεσμίδων εμφανίζει ένα κίτρινο ή καστανό μεταχρωματισμό που αρχίζει από τη ρίζα του φυτού και φτάνει μέχρι και ψηλά στο στέλεχος του. Επίσης στα ελάσματα των φύλλων παρατηρείται χλώρωση μεταξύ των νευρώσεων και τέλος νέκρωση των χλωρωτικών ιστών. Τέλος τα προσβεβλημένα φυτά μπορεί να παρουσιάσουν νανισμό, καχεξία και τέλος μπορεί και ξήρανση (Εικόνα, 7, 8). Επειδή τα συμπτώματα πολλές φορές είναι εύκολο να παρερμηνευτούν και να συσχετιστούν με κάποιο άλλο παθογόνο πρέπει να υπάρχει επιβεβαίωση της διάγνωσης μέσω ενός εργαστηριακού ελέγχου (Heimann *et. al.* 1997).



Howard F. Schwartz, Colorado State University, Bugwood.org

Εικόνα 7. Φυτά Ηλίανθου που παρουσιάζουν μόλυνση από *Verticillium dahliae*
(<https://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5365934>)



Penn State Department of Plant Pathology & Environmental Microbiology Archives, Penn State University, Bugwood.org

Εικόνα 8. Μεταχρωματισμός σε Σφένδαμο από *Verticillium dahliae*
(<https://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1634205>)

1.4 Παράγοντας που επηρεάζουν την ανάπτυξη του μύκητα και την εξέλιξη της ασθένειας

Όπως όλες οι ασθένειες έτσι και η βερτισιλλίωση επηρεάζεται από διάφορους παράγοντας όπως: η θερμοκρασία του εδάφους, ο αερισμός του εδάφους, η υγρασία, το φως, η θερμοκρασία αέρα, η πυκνότητα του μολύσματος, το pH του εδάφους, η δομή του και τέλος η παρουσία νηματωδών αλλά και εντόμων στο έδαφος. Όλοι αυτοί οι παράγοντες επηρεάζουν και διευκολύνουν την εκδήλωση και εξάπλωση της ασθένειας στα φυτά.

1.4.1 Θερμοκρασία εδάφους και αέρα

Η θερμοκρασία είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας για την ανάπτυξη της βερτισιλλίωσης που επηρεάζεται πολύ από τους κλιματικούς παράγοντες. Η σοβαρότητα της ασθένειας, η ανάπτυξη της αλλά και η διασπορά που έχει το παθογόνο φαίνεται να συνδέεται με τη θερμοκρασία (Brinkerhoff 1973). Έχει παρατηρηθεί ότι το παθογόνο προκαλεί συμπτώματα προσβολής στα φυτά σε θερμοκρασίες 12°C και 30°C για αυτό θεωρείται επικίνδυνος καθώς είναι οι πιο σύνηθες θερμοκρασίες που αναπτύσσονται οι καλλιέργειες στις παραμεσόγειες χώρες (Θανασουλόπουλος 1992). Λόγω του μεσογειακού κλίματος που έχουμε στη χώρα μας ο συγκεκριμένος μύκητας θεωρείται πολύ σοβαρός και επικίνδυνος. Όσο αφορά τις καρπουζιές είναι πολύ επιρρεπής στο παθογόνο και ένας από τους λόγους είναι ότι η καρπουζιά είναι ένα φυτό θερμής εποχής και για το φύτεμα του η ιδανική θερμοκρασία είναι 21°C ενώ η ιδανική θερμοκρασία εδάφους είναι 24°C-30°C.

Η σοβαρότητα της ασθένειας γίνεται πιο εμφανείς και πιο έντονη με την αύξηση της θερμοκρασίας. Πειράματα σε θερμοκήπια έχουν ότι δείξει ότι όταν η θερμοκρασία του εδάφους και του αέρα είναι μεγαλύτερη από τους 28°C-30°C τότε η ανάπτυξη της βερτισιλλίωσης μειώνεται αισθητά (Παναγόπουλος 1993). Επίσης έδειξαν ότι σε ελεγχόμενες συνθήκες σε θερμοκήπια όταν η θερμοκρασία του αέρα μειωθεί από τους 29,4°C σε 23,9°C χρειάστηκε μεγαλύτερη ποσότητα μολύσματος από το μύκητα για να μπορέσει τελικά να προκαλέσει σοβαρή προσβολή των φυτών πατάτας που χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα. Τέλος έχει παρατηρηθεί ότι τον μεγαλύτερο αριθμό παραγωγής των κονιδίων τον έχουμε στους 20°C-25°C ενώ στους 5°C δεν υπάρχει καμία παραγωγή μικροσκληρωτίων.

1.4.2 Φώς

Το φώς παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του μύκητα όπως επίσης και στην αύξηση του μύκητα. Η ποιότητα που έχει το φώς επιδρά στην εξέλιξη της βερτισιλλίωσης. Για παράδειγμα, κάτω από κυανό φώς μια απομόνωση του μύκητα *Verticillium dahliae* παρήγαγε σπόρια ενώ κάτω από ερυθρό, υπέρυθρο φώς και στο σκοτάδι παρήγαγε άφθονα μικροσκληρώτια. Έχει επίσης την ικανότητα να καταστέλλει τον σχηματισμό μικροσκληρωτίων και μελανίνης του μύκητα *Verticillium dahliae*. Η καταστολή αυτή είναι οριστική όταν υπάρχει υψηλή ένταση φωτός (Brandt 1964). Έχει παρατηρηθεί ότι όσο αυξάνεται η ένταση του φωτός τόσο παράγονται λιγότερα μικροσκληρώτια. Αντίθετα η μείωση της έντασης του φωτός μπορεί να προκαλέσει κακή ανάπτυξη των φυτών και αυξάνει την ευπάθεια στις προσβολές από διάφορους μύκητες.

Σημαντικές επιδράσεις στην εξέλιξη της ασθένειας και στην παραγωγή σπορίων έχει η φωτοπερίοδος καθώς και η ποιότητα του φωτός. Υπάρχουν είδη μυκήτων που δεν παράγουν σπορία, ενώ υπάρχουν και άλλα που απαιτούν μια βραχεία έκθεση στο φώς πριν από την έναρξη παραγωγής σπορίων.

1.4.3 Υγρασία εδάφους

Η βλαστικότητα των μικροσκληρωτίων του μύκητα *Verticillium dahliae* που υπάρχουν σε ένα αγρό επηρεάζονται από την υγρασία του εδάφους. Παρατηρήθηκε ότι τα μικροσκληρώτια δεν επιβίωσαν στο έδαφος μετά από την παραμονή τους επί 6 εβδομάδες σε υγρό έδαφος. Ωστόσο η υγρασία δεν είναι ένας σοβαρός περιοριστικός παράγοντας στην επιβίωση των μικροσκληρωτίων του μύκητα έκτος και αν είναι στο επίπεδο κορεσμού και συνδυάζεται και με θερμοκρασία στους 28°C (Green 1980). Η υγρασία του εδάφους είναι ευνοϊκή για την ύπαρξη αλλά και την εξάπλωση της ασθένειας για ποσοστά υγρασίας 60 έως και 70%. Όταν όμως υπάρχουν «βαρείες» αρδεύσεις που συντελούν στην μερική έλλειψη του διαθέσιμου οξυγόνου του εδάφους έχουν ως αποτέλεσμα την καταστροφή των μικροσκληρωτίων τα οποία υπάρχουν στα υπολείμματα από τις καλλιέργειες και έχουν ενσωματωθεί στο έδαφος. Επίσης θανάτωση των μικροσκληρωτίων επέρχεται και όταν τα ποσοστά υγρασίας υπερβούν τα 70% , αυτό συμβαίνει λόγω των αναερόβιων συνθηκών που επικρατούν.

Παρ' όλα αυτά η άρδευση και το νερό της βροχής επηρεάζουν αρνητικά την ικανότητα που έχει ένας ξενιστής να αντισταθεί στην ασθένεια και αυτό οφείλεται στη μείωση την θερμοκρασίας του εδάφους εξαιτίας τους, κατά τη διάρκεια της θερμής περιόδου. Η υγρασία του εδάφους, η εξάπλωση και εκδήλωση της ασθένειας συνδέεται με την θερμοκρασία του εδάφους.

1.4.4 Πυκνότητα μολύσματος

Η βερτισιλλίωση θεωρείται μια μονοκυκλική (single cycle) ασθένεια, η φύτευση αλλά και η πυκνότητα του μολύσματος κατά τη σπορά παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της ασθένειας και συσχετίζεται αρνητικά με το ύψος της παραγωγής πολλών ειδών των φυτών (Ashworth *et al.* 1972). Έχει παρατηρηθεί συσχέτιση της πυκνότητας του μολύσματος αλλά και της έντασης της βερτισιλλίωσης σε διάφορα είδη φυτών όπως για παράδειγμα η τομάτα. Η εκδήλωση της ασθένειας εξαρτάται από το επίπεδο μικροσκληρωτίων στο έδαφος, το είδος του φυτού, την ποικιλία, τις τοπικές, εδαφικές και κλιματικές συνθήκες. Επίσης όταν υπάρξει αύξηση της πυκνότητας του μολύσματος στο έδαφος η αναλογία των μολυσμένων φυτών εξαρτάται από το είδος και την ποικιλία του φυτού.

Σε πειράματα που έγινε σε τομάτες 0,5ms/g εδάφους προκάλεσαν 50% συχνότητα προσβολής των φυτών ενώ 6ms/g εδάφους το αποτέλεσμα ήταν ότι προκάλεσαν 100% συχνότητα μόλυνσης προς το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου (Grogan *et al.* 1979). Επίσης σε άλλο πείραμα που έγινε σε τομάτες τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν ότι η αναλογία προσβολής σε τομάτες από *Verticillium dahliae* εντάθηκε με αύξηση της πυκνότητας μολύσματος σε συνθήκες φυσικής μόλυνσης του εδάφους και διαπιστώθηκε ότι όλα τα φυτά είχαν μολυνθεί προς το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου άσχετα με την πυκνότητα του μολύσματος στο έδαφος κυμάνθηκε μεταξύ 0,1 και 27 ms/g. Όμως τα συμπτώματα που εμφανίστηκαν στα φυτά ήταν μόνο εξωτερικά που αναπτύσσονταν σε πυκνότητα μολύσματος μεταξύ 0,1 και 9ms/g εδάφους. Η μέγιστη απώλεια της παραγωγής κάτω απ' αυτές τις συνθήκες ήταν περίπου 40%.

Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι μετά τη παρέλευση 3 εβδομάδων το δυναμικό του μολύσματος των κονιδίων μειώνεται από 100% σε μηδέν ενώ μετά από 7 εβδομάδες δεν υπάρχει μείωση του δυναμικού του μολύσματος των μικροσκληρωτίων (Green

1969). Ο ελάχιστος αριθμός των κονιδίων του μύκητα *Verticillium dahliae* σε τομάτες για προσβολή 100% είναι 50000 κονίδια/g εδάφους, ενώ ο ελάχιστος αριθμός μικροσκληρωτίων είναι 100.

1.4.5 Αερισμός εδάφους

Δεν υπάρχουν πολλές λεπτομερείς μελέτες στο θέμα του αερισμού του εδάφους στην ανάπτυξη και επιβίωση της ασθένειας. Παρ' όλα αυτά πολλοί ερευνητές όπως οι Green, 1980, Menzies, 1962, Ioannou, 1977, Brinkerhoff, 1973 και άλλοι αναφέρθηκαν στη σχέση που έχει ο αερισμός με την ανάπτυξη της ασθένειας. Από τις μελέτες που έγιναν προκύπτει ότι το πλημμυρισμένο έδαφος, το μεγάλο βάθος εδάφους, οι χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου αλλά και χαμηλότερο διοξείδιο του άνθρακα από εκείνο του αέρα είναι καταστάσεις που ευνοούν τον μικρότερο αποικισμό των μικροσκληρωτίων στο έδαφος.

Οι Ioannou *et al.* (1977) παρατήρησαν πως η ασθένειας παρουσίασε μέγιστη γραμμική ανάπτυξη και παραγωγή σπορίων σε 1,9% και 2,7% O₂ αντίστοιχα. Ενώ όσον αφορά την ανάπτυξη ήταν μηδενική σε συγκέντρωση 0,06% O₂ όταν ο *V. dahliae* καλλιεργήθηκε σε συγκεντρώσεις μειωμένου O₂ (20,9% έως 0,06%) και σχεδόν σταθερού CO₂ (0,03%). Τέλος η παραγωγή μικροσκληρωτίων ήταν μέγιστη σε 20,9% O₂ ενώ μειώθηκε προοδευτικά με κάθε μείωση της συγκέντρωσης του O₂. Από την άλλη η γραμμική αύξηση σε 20,9% CO₂ ήταν ίδια όπως σε 0,03%, όμως η σπορίωση μειώθηκε σε 20% περίπου της μέγιστης.

1.4.6 pH και Δομή Εδάφους

Μελέτη που έγινε *in vitro* έδειξε ότι το *V. dahliae* αναπτύσσεται καλύτερα σε όξινο και αλκαλικό έδαφος (pH 5,5-7,2) ενώ η μεγαλύτερη ανάπτυξη του μύκητα παρατηρήθηκε σε pH 5,5. Η σοβαρότητα της ασθένειας ήταν μεγαλύτερη σε αλκαλικά εδάφη σε σύγκρισή με τα όξινα (Dutta, 1979). Ενώ σε μελέτες που έγιναν στη φύση ο *V. dahliae* και το *V. albo-atrum* αναπτυσσόταν καλά σε pH από 4 έως 8. Αριστη τιμή pH για την ανάπτυξη του *V. dahliae* θεωρείται 5,5-7,2, από την άλλη για το *V. albo-atrum* είναι 8-8,6. Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι το υψηλό pH ευνοεί την ασθένεια.

1.4.7 Βιοτικοί παράγοντες (νηματώδεις, έντομα κτλ)

Πέρα από τους εδαφικούς παράγοντες, την υγρασία και άλλους, υπάρχουν και οι βιοτικοί παράγοντες που βοηθούν στην εξέλιξη της ασθένειας. Οι κυριότεροι είναι :

a) Νηματώδεις:

Σκωληκόμορφοι οργανισμοί μικρού μεγέθους, μήκους 0,3-8mm. Το σώμα τους δεν έχει δακτυλίους είναι λεπτό σαν νήμα γι αυτό και ονομάστηκαν νηματώδεις. Είναι η πολυπληθέστερη ομάδα μετά τα αρθρόποδα. Ο βαθμός προσβολής παίζει σημαντικό καθώς ανάλογα με το βαθμό έχουμε και αντίστοιχη μείωση της ευρωστίας των φυτών. Συγχρόνως έχουμε και προσβολή των ριζών από μύκητες όπως: *Fysarium spp.*, *Verticillium spp.*, *Rhizoctonia spp.*, κ.α ή από βακτήρια όπως: *Corynebacterium spp.*, *Pseudomonas spp.* κ.α.

Οι κυριότεροι νηματώδεις που προσβάλουν τα φυτά προκαλώντας πληγές στις ρίζες των φυτών και βοηθούν στην αύξηση της συχνότητας προσβολής τους από τη βερτισιλλώση είναι:

 **Νηματώδεις του γένους *Meloidogyne*:** Οι νηματώδεις αυτού του γένους προσβάλουν πάνω από 2000 είδη όπως η καρπουζιά, τομάτα κ.α. Τα είδη: *Meloidogyne arenaria*, *M. halpa*, *M. incognita*, *M. javanica* βρέθηκαν να προσβάλλουν την τομάτα. Τα θηλυκά είναι μόνιμα προσκολλημένα στις ρίζες και παίρνουν σφαιρικό σχήμα. Κάθε θηλυκό γεννά 300-500 αυγά που τα περιβάλλει με μια ζελατινώδη προστατευτική ουσία. Μόλις βρουν τη ρίζα αρχίζουν με το στίλετο τους να καταβάλλουν πολλά χτυπήματα σε ένα σημείο πάνω στη ρίζα, την τρυπούν και εισέρχονται. Εκεί με τα ένζυμα που βγάζουν από το στόμα τους διαλύουν την κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να σχηματίζονται τεράστια που ονομάζονται κοινικύτταρα και μέσα στα οποία τοποθετούν το στίλετο απορροφώντας τις θρεπτικές ουσίες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εξάντληση των φυτών. Τα κοινικύτταρα που αυξάνουν τη ζημία στο φυτό με αποτέλεσμα τη μείωση ή και μηδενισμό της παραγωγής, αυτά συνεχώς μεγαλώνουν και οι ρίζες τελικά γεμίζουν με εξογκώματα. Αυτό είναι το χαρακτηριστικό εξωτερικό γνώρισμα της προσβολής από *Meloidogyne spp.* (Εικόνα 9.)



Εικόνα 9. nematode *Meloidogyne incognita*
(<https://www.ipmimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5562119>)

- ✚ **Νηματώδης *Pratylenchus penetrans*:** Τραυματίζει τις ρίζες των φυτών όπως η τομάτα, η φραουλιά, η πατάτα κ.α. Οι τραυματισμένες ρίζες συχνά προσβάλλονται από το *V. dahliae* και *V. albo atrum* (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Καρότο προσβεβλημένο από το νηματώδη *Pratylenchus penetrans*
photo Sarah Collins (<https://www.agric.wa.gov.au/carrots/pratylenchus-penetrans-horticulturally-significant-root-lesion-nematode?page=0%2C1>)

- ✚ **Νηματώδεις *Globodera rostochiensis* (χρυσονηματώδης της πατάτας):** Ανήκουν στη κλάση Secernentea, τάξη Tylechida και οικογένεια Heteroderidae. Προσβάλλουν ντομάτες, πατάτες, μελιτζάνες κ.α. Προτιμούν τις περιοχές και χώρες με εύκρατο κλίμα. Εισέρχονται εντός των φυτικών ιστών του φυτού, ζουν σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους σε ένα συγκεκριμένη θέση που επιλέγουν και από κει λαμβάνουν την τροφή τους από συγκεκριμένα φυτικά κύτταρα.

1.5 Τρόπος μετάδοσης

Η εξάπλωση της βερτισιλλίωσης γίνεται με τους εξής τρόπους:

- Με σπόρους:** Και οι δύο μύκητες (*V. dahliae* και *V. albo-atrum*) βρίσκονται με τη μορφή μυκηλίου ή μικροσκληρωτίων στο μολυσμένο σπόρο (Sackston &

Martens 1959, Snyder & Wilhelm 1962, Evans et al. 1966). Η ικανότητα που έχει ο μύκητας να προσβάλει το σπόρο εξαρτάται από τη παθογόνο ικανότητα του στελέχους και από το χρόνο προσβολής του φυτού (Sherf & MacNab 1986)

- II. **Επαφή των ριζών ασθενούς και υγιούς φυτού:** Η ασθένεια μπορεί να εξαπλωθεί σε όλο τον αγρό από μια αρχική εστία μόλυνσης, καθώς με την επαφή που έχουν οι ρίζες ενός υγιούς φυτού (καλλιεργούμενου, αυτοφυούς) με τις ρίζες ενός μολυσμένου φυτού επιτυγχάνεται η μετάδοση της ασθένειας από τα μολυσμένα σημεία στα αμόλυντα. Ο τραυματισμοί των ριζών μπορεί να αυξήσουν την πιθανότητα προσβολής από την ασθένεια καθώς και τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων.
- III. **Διασπορά μολυσμένου φυτικού υλικού και μολυσμένου εδάφους με διάφορους φορείς:** Η εξάπλωση του μύκητα *V. dahliae* μπορεί να γίνει με διάφορους μεταφορείς οι κυριότεροι είναι με τον άνθρωπο, τα γεωργικά μηχανήματα και εργαλεία, τα φυτοφάγα ζώα ακόμα και με τα έντομα. Τα κονίδια του μύκητα διασπείρονται πολύ εύκολα με το νερό αλλά και με τον αέρα. Βέβαια η διασπορά με τον αέρα είναι περιορισμένη.

1.6 Τρόποι αντιμετώπισης

Τα μικροσκληρώτια βρίσκονται σε φυτικά υπολείμματα και βρίσκονται στην επιφάνεια του εδάφους ή ακόμα και σε κάποιο βάθος αποτελούν ιδιαίτερο πρόβλημα στην αντιμετώπιση του *V. dahliae*. Η χρήση διαδυστηματικών μυκητοκτόνων δεν είναι δυνατή στην αντιμετώπιση της βερτισιλλίωσης (Θανασουλόπουλος 1992, Παναγόπουλος 1995). Οι κυριότεροι τρόποι αντιμετώπισης της βερτισιλλίωσης είναι οι εξής:

-  καλλιέργεια ανθεκτικών ποικιλιών
-  απολύμανση του εδάφους με ατμό, χημική, ηλιοαπολύμανση
-  με αμειψισπορά
-  Εφαρμογή κατάλληλων καλλιεργητικών φροντίδων
-  διάφοροι βιολογικοί παράγοντες

1.6.1 Καλλιέργεια ανθεκτικών ποικιλιών

Για να αντιμετωπιστούν οι ασθένειες που οφείλονται σε εδαφογενή παθογόνα χρησιμοποιούνται ανθεκτικοί ή ανεκτικοί γενότυποι. Η μέθοδος αυτή είναι οικονομική και προστατεύει το περιβάλλον (Krikun *et al.* 1982). Πιο συγκεκριμένα, για τη βερτισιλλίωση έχουν δημιουργηθεί ανθεκτικές ή ανεκτικές ποικιλίες και υβρίδια διαφόρων κηπευτικών αλλά και διάφορων καρποφόρων δένδρων που χρησιμοποιούνται ως υποκείμενα. Όμως στις περισσότερες περιπτώσεις δεν έχει βρεθεί οικονομικά αποδεκτή αντοχή στο μύκητα *V. dahliae* (Fravel 1989) για αυτό η αντιμετώπιση της ασθένειας βασίζεται κυρίως σε προληπτικές επεμβάσεις.

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι αυτό της τομάτας όπου η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς τρόπους στην αποφυγή της προσβολής των μυκήτων που προκαλούν τη βερτισιλλίωση. Στην Ελλάδα η φυλή 1 είναι η πιο διαδεδομένη παρ' όλα αυτά όμως οι περισσότερες ποικιλίες ή υβρίδια τομάτας που καλλιεργούνται δεν προσβάλλονται λόγω του γονιδίου αντοχής στη φυλή 1 που έχουν.

1.6.2 Απολύμανση του εδάφους με ατμό, χημική, ηλιοαπολύμανση

Η απολύμανση του εδάφους έχει σαν σκοπό την εξάλειψη των παθογόνων μικροοργανισμών που ζουν σε αυτό. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στις καλλιέργειες σε θερμοκήπια είναι η απολύμανση με ατμό, με χημικά σκευάσματα και τέλος η αξιοποίηση της ηλιακής ενέργειας (ηλιοαπολύμανση).

A. Με ατμό

Η μέθοδος της απολύμανσης με ατμό χρησιμοποιείται για την απαλλαγή του εδάφους από τους μύκητες, τα βακτήρια, τους νηματώδεις, τα έντομα, τα ζιζάνια και τους ιούς. Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στη θέρμανση του εδάφους σε βάθος 20-30cm και σε θερμοκρασίες από 90°C μέχρι 100°C επί 31min. Οι παθογόνοι μύκητες καταστρέφονται στους 57°C, τα παθογόνα βακτήρια στους 60°C, οι σπόροι των ζιζανίων στους 80°C ενώ οι παθογόνοι ιστοί στους 93°C. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι:

1. Η αποτελεσματικότητα που έχει είναι μεγαλύτερη από τα χημικά απολυμαντικά.

2. Ενεργοποιεί ωφέλιμα βακτήρια που έχουν την ικανότητα να διασπών και να αποδίδουν στο εδαφικό διάλυμα τα λιπαντικά στοιχεία του εδάφους και της οργανικής ουσίας.
3. Εξαιτίας της θέρμανσης του εδάφους το φύτευμα το σπόρων γίνεται με ταχύτερο ρυθμό άρα και πρωιμότερη παραγωγή
4. Συμβάλλει στη προστασία του περιβάλλοντος καθώς δεν αφήνει τοξικά κατάλοιπα στο έδαφος(σε αντίθεση με τα χημικά απολυμαντικά).
5. Μετά την απολύμανση το έδαφος μπορεί να χρησιμοποιηθεί αμέσως.
6. Η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να αποδώσει ικανοποιητικά και σε χαμηλές θερμοκρασίες εδάφους .
7. Σε σχέση με τη χημική απολύμανση έχει μικρότερο κόστος εφαρμογής.
8. Από την επέμβαση οι πόροι τους εδάφους έχουν διασταλεί άρα το νερό άρδευσης συκρατείται ευκολότερα.

Τα μειονεκτήματα της μεθόδου της ατμοαπολύμανσης:

1. Είναι χρονοβόρο και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί εύκολα σε μεγάλες εκτάσεις όπως επίσης είναι μεγάλο το κόστος αγοράς του μηχανήματος.
2. Απαιτείται ξέπλυμα του εδάφους μετά την εφαρμογή καθώς ελευθερώνει υπερβολικά επίπεδα αμμωνίας, μαγγανίου και διαλυτών αλάτων στο έδαφος.

B. Χημική απολύμανση

Η βερτισιλλώση αντιμετωπίζεται αποτελεσματικά με την απολύμανση του εδάφους με διάφορα χημικά απολυμαντικά (Gordon *et al.* 1997). Η δόση που θα χρησιμοποιηθεί το απολυμαντικό εδάφους εξαρτάται από το είδος του, τη δομή του αλλά και τα είδη των παθογόνων που υπάρχουν στο έδαφος (Malathrakis 1985). Με την εφαρμογή των απολυμαντικών εδάφους που έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε καλλιέργειες υπό κάλυψη έχει παρατηρηθεί ότι δημιουργεί διάφορα προβλήματα όπως τοξικότητα στα θηλαστικά, μόλυνση του περιβάλλοντος κ.α. (Τζάμος 1989). Παρ' όλα αυτά η χημική απολύμανση έχει και μερικά πλεονεκτήματα όπως:

1. Εξοντώνονται όλοι οι ανεπιθύμητοι μικροοργανισμοί του εδάφους.
2. Στο έδαφος απελευθερώνονται διάφορα χημικά στοιχεία που είναι απαραίτητα για τη θρέψη του φυτού όπως το άζωτο, το ασβέστιο, ο χαλκός, ο σίδηρος, το κάλιο, το μαγνήσιο, ο φώσφορος κ.α.

3. Μετά την απολύμανση του εδάφους υπάρχει μια δραστηριοποίηση των ωφέλιμων οργανισμών που επιβιώνουν.

Το πόσο αποτελεσματική θα είναι η χημική απολύμανση εξαρτάται από τα φυσικά αλλά και τα χημικά χαρακτηριστικά του εδάφους όπως η χημική σύσταση, η μηχανική σύσταση, η περιεκτικότητα σε νερό, η θερμοκρασία κ.α. Αλλά και από το είδος του απολυμαντικού που χρησιμοποιείται (χημική δράση, σταθερότητα, διαλυτότητα κ.α.).

C. Ηλιοαπολύμανση

Μια πρόσφατη τεχνική απολύμανσης του εδάφους για την αντιμετώπιση της βερτισιλλίσωσης αλλά και άλλων παθογόνων είναι η ηλιοαπολύμανση. Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στην αξιοποίηση της ηλιακής ακτινοβολίας και τη χρήση διάφανων πλαστικών φύλλων κατά τη θερμή περίοδο του χρόνου. Κατά την εφαρμογή της μεθόδου το έδαφος καλύπτεται με διάφανα ή έγχρωμα (πράσινα) φύλλα πλαστικού (πολυαιθυλενίου) για ένα μήνα τουλάχιστον. Με αυτό το τρόπο η ηλιακή θερμότητα εγκλωβίζεται με τη μορφή υγρής θερμότητας και η οποία τελικά συμβάλλει στην αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών του εδάφους. Βασικός σκοπός της ηλιοαπολύμανσης είναι να αυξηθεί η θερμοκρασία του εδάφους στους 36-50°C στο βάθος των 10-30cm όπου και συναντιούνται τα περισσότερα μολύσματα των παθογόνων μικροοργανισμών.

Πριν την τοποθέτηση των πλαστικών φύλλων θα πρέπει να απομακρυνθούν τα υπολείμματα από τις προηγούμενες καλλιέργειες, οι πέτρες, το έδαφος να είναι ποτισμένο (στο ρώγο του), οργωμένο και τέλος ισοπεδωμένο. Μετά απ αυτά θα ακολουθήσει προσεκτική κάλυψη του εδάφους. Οι άκρες του πλαστικού θα πρέπει να παραχωθούν καλά στο έδαφος έτσι ώστε να μην υπάρχουν απώλειες της θερμοκρασίας (Εικόνα 11). Η κάλυψη με τα πλαστικά μπορεί να διαρκέσει 4-5 βδομάδες. Μικρότερη διάρκεια κάλυψης από αυτές τις βδομάδες δεν θα θανατώσει όλο το φάσμα των παθογόνων οργανισμών. Κάτω από το πλαστικό κάλυψης υπάρχει το δίκτυο άρδευσης που αυξάνει τη δράση της ηλιοαπολύμανσης επειδή αξιοποιείται η δράσης της υγρής θερμότητας.



Εικόνα 11. Ηλιοαπολύμανση εδάφους. Πλαστικά διάφανα φύλλα.
(<http://www.ecotimes.gr>)

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ηλιοαπολύμανση και την αποτελεσματικότητά της είναι η δομή που έχει το έδαφος, η θερμοαγωγημότητα του και τέλος η ηλιοφάνεια της περιοχής. Η συγκεκριμένη μέθοδος ενδείκνυται για θερμές χώρες όπου αν γίνει σωστά η εφαρμογή της δεν χρειάζεται να επαναληφθεί για 1-2 χρόνια. Σε πείραμα που έγινε σε φράουλες και βατόμουρα σε περιοχή με θαλάσσιο κλίμα και πιο συγκεκριμένα με μέγιστη ημερήσια θερμοκρασία 25 έως 40°C και συχνές συννεφίες κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού τα αποτελέσματα ήταν θετικά. Μειώθηκαν σημαντικά τα συμπτώματα στις φράουλες όπως η νέκρωση της ρίζας αλλά και η λοίμωξή της που προκλήθηκαν από παθογόνα όπως *P. fragariae*, *Pythium*, *Rhizoctonia* και *Cylindrocarpon spp.* (Subbarao *et al.* 2007). Επίσης πειράματα έχουν γίνει και στη Ελλάδα όπου και εδώ υπήρξαν θετικά αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα στη δυτική Πελοπόννησο (Αχαΐα, Ηλία και Μεσσηνία) όπου εφαρμόστηκε η ηλιοαπολύμανση προτού φυτευτούν φράουλες, μαρούλια και καρπούζια τα αποτελέσματα ήταν ότι τα συμπτώματα στα φυτά από *Fusarium oxysporum f.sp fragariae*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora sp.*, *Pythium sp.*, *Sclerotinia sclerotiorum* κ.α. είχαν μειωθεί ή αντιμετωπιστεί. Τέλος θετικά αποτελέσματα έχουν δείξει και οι καλλιέργειες μελιτζάνας και πατάτας (Katan 1975).

Τα πλεονεκτήματα που έχει αυτή η μέθοδος απολύμανσης σε σχέση με τη χημική απολύμανση και την απολύμανση με τον ατμό είναι τα εξής :

1. Το κόστος είναι χαμηλότερο σε σχέση με τις άλλες μεθόδους.
2. Είναι φιλική προς το περιβάλλον γιατί δεν αφήνει τοξικά υπολείμματα στο έδαφος, στο νερό ή στα φυτικά προϊόντα.

3. Μπορεί να εφαρμοστεί το ίδιο εύκολα σε μεγάλες αλλά και σε μικρές εκτάσεις.
4. Θεωρείται ολοκληρωμένη μέθοδος αντιμετώπισης των παθογόνων και αυτό γιατί μπορεί να συνδυάσει φυσικοχημικούς αλλά και βιολογικούς μηχανισμούς.

Τα μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι:

1. Εφαρμόζεται και έχει αποτελέσματα σε περιοχές με μεγάλη ηλιοφάνεια και θερμοκρασία αέρα.
2. Έχει περιορισμένο χρόνο εφαρμογής. Εφαρμόζεται μόνο από τον Ιούνιο έως το Σεπτέμβριο για το βόρειο ημισφαίριο.
3. Το έδαφος πρέπει να μείνει ακαλλιέργητο για μεγάλο χρονικό διάστημα(τουλάχιστον ένα μήνα).
4. Δεν είναι πάντα αποτελεσματική σε όλα τα παθογόνα εδάφους.
5. Υπάρχουν και σκέψεις για μελλοντικούς κινδύνους μετά από παρατεταμένη χρήση. Οι οποίοι είναι η εμφάνιση ανθεκτικών φυλών των παθογόνων στην υψηλή θερμοκρασία.

1.6.3 Με αμειψισπορά

Η αμειψισπορά είναι η εναλλαγή καλλιεργειών διαφόρων φυτικών ειδών στον αγρό. Θεωρείται μια σημαντική μέθοδος για την αντιμετώπιση της βερτισιλλώσης όπου χρησιμοποιείται στα είδη των φυτών στα οποία δεν υπάρχουν ανθεκτικές ποικιλίες και υβρίδια. Όμως επειδή ο μύκητας *V. dahliae* επιβιώνει στο έδαφος με τη μορφή των μικροσκληρωτίων για μεγάλο χρονικό διάστημα οι αμειψισπορές μικρής διάρκειας δεν είναι αποτελεσματικές (Scholte 1990). Οι παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η επιτυχία ενός πολυετούς προγράμματος αμειψισποράς είναι:

1. η πυκνότητα που έχει το μόλυσμα στο έδαφος
2. καλλιεργητικές φροντίδες
3. την ικανότητα που έχει ο μύκητας να επιβιώνει σε ασυμπτωματικούς φορείς
4. η ικανότητα του μύκητα με τη μορφή των μικροσκληρωτίων να παραμένει για πολλά χρόνια στο έδαφος ή σε φυτικά υπολείμματα.

5. η ύπαρξη μικροοργανισμών στο έδαφος που καταστρέφουν τα μικροσκληρώτια
6. Οι κλιματικές συνθήκες που έχει κάθε περιοχή (πχ.σε εδάφη με περιεκτικότητα σε άμμο μεγαλύτερη από 50% θα πρέπει να υπάρχει υποχρεωτικά φυτοκάλυψη κατά την διάρκεια του χειμώνα).

Παρ' όλα αυτά λόγω της πολυετής επιβίωσης του μύκητα μέσω των μικροσκληρωτίων και η ικανότητα που έχει να μολύνει μεγάλο εύρος ξενιστών μπορεί να μειωθεί η αποτελεσματικότητα της αμειψισποράς (Subbarao *et al.* 2007). Για αυτό θα πρέπει να αποφεύγεται η δημιουργία πληγών με καλλιεργητικά εργαλεία στο λαιμό και τις ρίζες των φυτών, να καταστρέφονται και να εκριζώνονται τα μολυσμένα φυτά και υπολείμματα από προηγούμενες καλλιέργειες και τέλος θα πρέπει να χρησιμοποιείται υγιές πολλαπλασιαστικό υλικό(σπόροι, υποκείμενα). Σε πείραμα που έγινε στην Αμερική σε καλλιέργειες κουνουπιδιού και μπρόκολου (κάθε άνοιξη καλλιεργούνταν μπρόκολα και ακολουθούσε το καλοκαίρι με καλλιέργειες κουνουπιδιού) τα αποτελέσματα ήταν ότι το μπρόκολο δεν προσβλήθηκε εν τέλει από βερτισιλλίωση. Όπως επίσης και το κουνουπίδι που με αυτή την εναλλαγή των καλλιεργειών είχε εξίσου θετικά αποτελέσματα (Xiao *et al.* 1998). Η αμειψισπορά πέρα από τα θετικά αποτελέσματα που έχει για τη μείωση και καταπολέμηση διάφορων παθογόνων έχει και άλλα πλεονεκτήματα όπως:

-  Βελτιώνεται η γονιμότητα και η φυσική σύσταση του εδάφους
-  προστατεύει το έδαφος από πιθανή διάβρωση
-  Μεγαλύτερες αποδόσεις
-  Αξιοποιούνται τα θρεπτικά συστατικά του εδάφους καλύτερα
-  Καταστρέφονται τα ζιζάνια

1.6.4 Εφαρμογή κατάλληλων καλλιεργητικών φροντίδων

Η εφαρμογή καλλιεργητικών πρακτικών όπως η **λίπανση**, **άρδευση**, η **ζιζανιοκτονία**, η **νηματωδοκτονία**, η **καταστροφή των υπολειμμάτων των φυτών με φωτιά** κ.α. είναι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της βερτισιλλίωσης. Αυτές οι μέθοδοι έχουν σαν σκοπό τη μείωση και όχι την εξάλειψη της ασθένειας καθώς η αντιμετώπισή της είναι πολύ δύσκολη (Λιγοξυγκάκης,

1998). Πολλοί ερευνητές έχουν αναφέρει (Green, 1967; Green & Papavizas, 1968; Sewell & Wilson, 1967; 1969; 1974; Tolm-soff & Young, 1959; Wilhelm, 1951) ότι με τη χρήση ορισμένων εδαφοβελτιωτικών, λιπασμάτων διαφόρων ειδών και ποσοτήτων και κάποιες καλλιεργητικές πρακτικές υπάρχει μείωση της συχνότητας της Βερτισιλλίδωσης στις επόμενες καλλιέργειες. Βεβαία αυτό δεν είναι σίγουρο αν οφείλεται στο παθογόνο, τον ξενιστή ή και στα δύο.

Η λίπανση των καλλιεργειών θα πρέπει να γίνεται με μέτρο, να είναι ισορροπημένη και να αποφεύγεται η εφαρμογή υπερβολικής ποσότητας αζώτου. (Δημητριάδης 1970). Έχει βρεθεί συσχέτιση μεταξύ της σοβαρότητας και τη προσβολή της Βερτισιλλίδωσης στην τομάτα (Roberts, 1943), το λυκίσκο (Keyworth & Hewitt, 1948) και της διαθεσιμότητας του αζώτου (N). Στο λυκίσκο διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρχε κάποια συσχέτιση της ασθένειας με κάποιο άλλο μακροστοιχείο, εκτός του αζώτου.

Στις πατάτες όσο αυξανόταν η διαθεσιμότητα του N τόσο υπήρχε μείωση του αποικισμού του φυτού από το μύκητα. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο αποικισμό των στελεχών της πατάτας από το *V.dahliae* είναι αρνητικά συσχετισμένος με τα επίπεδα του αμμωνιακού αζώτου στους μίσχους των φύλλων. Στη ποικιλία πατάτας Russet Burbank η ασθένεια ήταν πιο έντονη όταν παρουσίαζε τροφопενία από άζωτο στους μίσχους της. Από την άλλη όσο η διαθεσιμότητα σε N πλησίαζε στο άριστο, τόσο η σοβαρότητα της ασθένειας ήταν μικρότερη και η σχέση αυτή ήταν αντίστροφα συσχετισμένη με τη παραγωγή των φυτών. Παρ' όλα αυτά αυτή η σχέση δεν βρέθηκε στη ποικιλία πατάτας Norgold Russet άρα αυτό δείχνει ότι στη πατάτα η αντίδραση του αζώτου είναι συνδεδεμένη ανάλογα με το γονότυπο της ποικιλίας (Davis & Eversori, 1986).

Σε πείραμα που έγινε, η χημική ένωση που χρησιμοποιήθηκε στο *V. dahliae in vitro* και είχε ανταγωνιστική επίδραση ήταν το θειικό αμμώνιο. Στο αντίρρινο (*Antirrhinum majus* L.) παρατηρήθηκε αξιόλογη μείωση της σοβαρότητας της ασθένειας ύστερα από προσθήκη θειικού αμμωνίου (0,25%), νιτρικού ασβεστίου (0,25% και 0,5%) και συνδυασμένων εδαφοβελτιωτικών NPK (0,25%) στο έδαφος. Η επίδραση αυτή θα μπορούσε να είχε προκληθεί εξαιτίας του ανταγωνιστικού περιβάλλοντος που μπορεί να δημιουργήθηκε όταν προστέθηκε το νιτρικό ασβέστιο στο έδαφος, της μυκητοτοξικής φύσης της χημικής ουσίας (θειικού αμμωνίου) και

τέλος εξαιτίας της ανάπτυξης ανταγωνιστικών ακτινομυκήτων στη ριζόσφαιρα μετά από την εφαρμογή των συνδυασμένων NPK στο έδαφος (Dutta & Isaac, 1979).

Στο έδαφος εφαρμόστηκαν διάφορα οργανικά εδαφοβελτιωτικά όπως η χητίνη και η πράσινη κοπριά. Τα οποία είχαν ως αποτέλεσμα τόσο ποσοτικές αλλά και ποιοτικές αλλαγές στη μικροχλωρίδα της ριζόσφαιρας φυτών αντίρρινου τα οποία είχαν προσβληθεί από *V. dahliae*. Στη συνέχεια η πράσινη κοπριά (κομμένα φύλλα και πράσινα στελέχη μηδικής) ανακατεύθηκε με έδαφος σε αναλογία 1% κατά βάρος. Τέλος, παρατηρήθηκε μείωση της σοβαρότητας της ασθένειας με χητίνη και πράσινη κοπριά, η οποία μπορεί και να συσχετισθεί και με την αύξηση του πληθυσμού ακτινομυκήτων στη ριζόσφαιρα των φυτών αντίρρινου (Dutta & Isaac, 1979).

Η άρδευση των καλλιεργειών με τη χρήση αυλακιών θεωρείται ότι αυξάνει τη σοβαρότητα της ασθένειας σε σχέση με τη μέθοδο της άρδευσης με σταλακτήρες (Easton *et al*, 1969; Thanassouloupoulos *et al*, 1980; Davis & Eversori, 1986). Αυτό είναι πολύ πιθανό να συμβαίνει λόγω της πιθανής διασποράς των αναπαραγωγικών μονάδων του μύκητα. Επίσης αναφέρθηκε ότι το νερό άρδευσης το οποίο ήταν καθαρό στην αρχή των αυλακιών όταν έφτασε στο τέρμα περιείχε αναπαραγωγικές μονάδες του μύκητα. Αυτό δείχνει ότι το καθαρό νερό των αυλακιών όταν διέρχεται μέσω μολυσμένων χωραφιών μεταφέρει αναπαραγωγικές μονάδες του μύκητα (Easton *et al*, 1969). Για αυτό το λόγο στην άρδευση με αυλάκια θα πρέπει το νερό να μη διέρχεται μέσω των μολυσμένων χωραφιών (Θανασουλόπουλος, 1992).

Η ζιζανιοκτονία θα πρέπει να γίνεται έγκαιρα και με τη χρήση των κατάλληλων χημικών σκευασμάτων και να είναι και αποτελεσματική (Tjamos, 1989). Επίσης, θα πρέπει στους μολυσμένους αγρούς να καταστρέφονται τα αυτοφυή φυτά στα πρώτα στάδια ανάπτυξης τους ώστε να μην αποτελούν νέες εστίες μόλυνσης. Η μέθοδος για τη καταστροφή των αυτοφυών φυτών θα πρέπει να επιλεγεί προσεκτικά. Για παράδειγμα στις καλλιέργειες με επιφανειακό ριζικό σύστημα θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν ζιζανιοκτόνα επειδή η μηχανική κατεργασία του εδάφους μπορεί να προκαλέσει πληγές στο ριζικό σύστημα των φυτών άρα και μόλυνση αφού το παθογόνο θα είναι πιο εύκολο να εισέλθει στο φυτό.

Η νηματωδοκτονία όπως και η ζιζανιοκτονία θα πρέπει να γίνεται έγκαιρα και με τα κατάλληλα απολυμαντικά εδάφους ώστε να είναι και αποτελεσματική η καταπολέμηση των φυτοπαθογόνων νηματωδών του εδάφους.

Η καταστροφή των προσβλημένων φυτών και των υπολειμμάτων των καλλιεργειών με φωτιά θα πρέπει να γίνεται αμέσως μετά τη συγκομιδή (Δημητριάδης,1970).

1.6.5 Βιολογικοί παράγοντες

Η χρήση βιολογικών παραγόντων είναι μια μελλοντική ,ελπιδοφόρα και αποτελεσματική μέθοδος για την αντιμετώπιση της Βερτισιλλίσωσης αν ληφθεί υπόψη ότι δεν υπάρχουν αποτελεσματικά χημικά σκευάσματα για την καταπολέμηση της ασθένειας. Σαν βιολογικούς παράγοντες θεωρούμε τη χρησιμοποίηση βακτηρίων και ανταγωνιστικών μυκήτων. Οι σπουδαιότεροι για την αντιμετώπιση τους γένους *Verticillium* είναι:

α) ανταγωνιστές μύκητες ή βακτήρια που έχουν την ικανότητα να εμποδίζουν τη προσβολή των φυτών από τα μικροσκληρώτια που βρίσκονται στο έδαφος (Tjamos, 1997)

β) οι ανταγωνιστές μύκητες που επηρεάζουν την επιβίωση των μικροσκληρωτίων που έχουν εξασθενήσει από την ηλιοαπολύμανση και τη χημική απολύμανση του εδάφους.

Ο *Talaromyces flavus* (ατελής μορφή *Pencillium dangeardii* Pitt) είναι ένας ασκομύκητας που είναι ιδιαίτερα διαδεδομένος στις εύκρατες περιοχές του κόσμου. Είναι ένας υποσχόμενος παράγοντας της βιολογικής αντιμετώπισης καθώς είναι ανταγωνιστής του μύκητα *V.dahliae* και σε πειράματα που έχουν γίνει έχει δείξει ότι καταστέλλει τη Βερτισιλλίσωση.

Ο ανταγωνισμός, ο παρασιτισμός και η αντιβίωση είναι οι μηχανισμοί βιολογικής αντιμετώπισης που χρησιμοποιεί ο *T. flavus* έναντι του μύκητα *V. dahliae*. Σε πειράματα που έγιναν παρατηρήθηκε ότι ο *T. flavus* νέκρωσε τα μικροσκληρώτια του μύκητα *V.dahliae*. Τα μικροσκληρώτια ήταν από δυο απομονώσεις του μύκητα *V.dahliae* από μελιτζάνα και πατάτα και το αποτέλεσμα ήταν ότι τα μικροσκληρώτια

νεκρώθηκαν σε λιγότερο από 3 ώρες *in vitro* (Fravel *et al.* 1986). Ο *T. flavus* θεωρείται ένας σημαντικός παράγοντας για την αντιμετώπιση του μύκητα *V. dahliae* καθώς έχει την ικανότητα να αποικίζει τη ριζόσφαιρα διαφόρων ξενιστών του μύκητα και τελικά να παρεμποδίζει τη βλάστηση μικροσκληρωτίων ή ακόμα να προκαλεί και νέκρωσή τους (Marois *et al.*, 1982; 1984).

Πέρα από τους μύκητες, υπάρχουν και διάφορα βακτήρια της ριζόσφαιρας και ενδοριζόσφαιρας, που βρέθηκε ότι *in vitro* δρουν εναντίον του μύκητα *V. dahliae* και αντιμετωπίζουν την Βερτισιλλίωση λόγω της ικανότητας που έχουν να εγκαθίστανται στα άκρα των ριζών ή ενδοφυτικά. Όπως για παράδειγμα τα είδη των γενών: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus* και *Streptomyces* (Azad *et al.*, 1985; 1987) όπως επίσης και είδη που δεσμεύουν ατμοσφαιρικό άζωτο, των γενών *Azotobacter* και *Azotomonas* που βρέθηκε ότι *In vitro* είναι ανταγωνιστές του μύκητα *V. dahliae* (Azad *et al.*, 1985; 1987). Επίσης ως βιολογικοί παράγοντες αντιμετώπισης και ανταγωνιστές του μύκητα *V. dahliae* θεωρούνται και οι *Actinobacillus lignieresii*, *Comamonas acidovorans*, *Enterobacter intermedius*, *Paenibacillus macerans*, *Serratia grimesii*, *Sphingobacterium heparinum*, *Stenotrophomonas maltophilia*, και *Yersinia frederiksenii* (Lottmann *et al.*, 1997).

Από το γένος *Bacillus* τα είδη που έχουν αποτελεσματική επίδραση στην εμφάνιση των συμπτωμάτων του μύκητα *V. dahliae* είναι τα K-165 και S-127. Τα είδη αυτά βρέθηκε ότι έχουν την ικανότητα να καταλαμβάνουν τη ριζόσφαιρα και να αναπτύσσονται ενδοφυτικά σε καλλιέργειες μελιτζάνας στο θερμοκήπιο όπως επίσης και σε είδη της οικογενείας *Solanaceae* (Tjamos, 1997).

1.7 Βιολογικός παράγοντας *Paenibacillus alvei* (K165)

Το είδος *Paenibacillus alvei* ανήκει στη κατηγορία των αυξητικών ριζοσφαιρικών βακτηρίων τα οποία βρίσκονται στα ακρορίζια των φυτών αλλά και ενδοφυτικά αυτών. Τα αυξητικά ριζοσφαιρικά βακτήρια έχουν την ικανότητα να προάγουν την ανάπτυξη των φυτών και αυτό συμβαίνει εξαιτίας της ικανότητας που έχουν να μεταβάλλουν ολόκληρη την μικροβιακή κοινότητα στη ριζόσφαιρα μέσω της παραγωγής διαφόρων ουσιών (Kloepper & Schroth, 1981). Επίσης μπορούν να συμβάλουν και με άλλους τρόπους είτε άμεσα είτε έμμεσα. Άμεσα διευκολύνοντας

την απόκτηση διαφόρων στοιχείων όπως άζωτο, φώσφορο και βασικά μέταλλα ή με τη ρύθμιση των επιπέδων των ορμονών των φυτών. Και, έμμεσα στη ανάπτυξη των φυτών με τη μείωση των ανασταλτικών επιδράσεων των διαφόρων παθογόνων (Glick, 2012).

Τα ριζοβακτήρια τα οποία αποικίζουν τη ρίζα και επάγουν τη διασυστηματική αντοχή των φυτών ανήκουν στα είδη *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus pumilus*, *Serratia marcescens*, *Paenibacillus alvei*, *Chryseobacterium balustinum* (Van Loon, 2007). Επίσης η επαγωγή της διασυστηματικής αντοχής εξαρτάται από το επαρκές ύψος αποικίσεως από το ριζοσφαιρικό βακτήριο στο ριζικό σύστημα των φυτών. Αυτό επιτυγχάνεται με τη προσθήκη ενός αιωρήματος (βακτήρια) πριν από τη σπορά ή με την επιφανειακή κάλυψη του σπόρου με μεγάλο αριθμό βακτηρίων πριν τη φύτευση. Αυτό γίνεται για να εγκατασταθεί και να επικρατήσει πιο εύκολα το βακτήριο έναντι των μικροοργανισμών που υπάρχουν ήδη στο έδαφος.

Κάποια από τα ριζοβακτήρια έχουν την ικανότητα να αποικίζουν ενδοφυτικά το φυτό καθώς εισέρχονται από τις ρίζες του. Το είδος *P. alvei* επάγει τη διασυστηματική άμυνα των φυτών καθώς παράγει πολλά ένζυμα (χιτινάση κ.α), ινδολοξικό οξύ (IAA) και φαινιλικές ενώσεις. Το 2004 αναφέρθηκε η απομόνωση του στελέχους K165 του βακτηρίου *P.alvei* από τους Tjamos *et al* από τα ακροορίζια φυτών *Lycopersicum esculentum* (τομάτα) τα οποία είχαν καλλιεργηθεί σε έδαφος που είχε υποστεί ηλιοαπολύμανση. Μετά από διάφορα πειράματα που έγιναν αποδείχτηκε ότι έχει θετική επίδραση στην ανάπτυξη των φυτών *Solanum melongena* (μελιτζάνα)και *Solanum tuberosum* (πατάτα) όπως επίσης και η συμβολή που έχει το βακτήριο στη προστασία των φυτών σε φυσική αλλά και τεχνική μόλυνση από το μύκητα *V. dahliae* σε πειράματα θερμοκηπίου και αγρού (Tjamos *et al.*, 2004). Πειράματα έχουν δείξει ότι το στέλεχος K165 επάγει τους αμυντικούς μηχανισμούς του φυτού *A. thaliana* εναντίον της Βερτισιλλίωσης όπως επίσης ότι μειώνει τη βλαστική ικανότητα που έχουν τα μικροσκληρώτια του μύκητα *V. dahliae* (Antonopoulos *et al*, 2007).

2. Σκοπός της Μελέτης

Ο εδαφογενής μύκητας *Verticillium dahliae* είναι ένας καταστροφικός μικροοργανισμός για περισσότερα από 200 είδη φυτών. Η ασθένεια επηρεάζει παγκοσμίως την αγροτική παραγωγή καθώς πολλά από τα είδη που καταστρέφονται είναι υψηλής εμπορικής σημασίας και δεν υπάρχουν αποτελεσματικά χημικά μέτρα για την αντιμετώπισή του. Η βιολογία του παθογόνου δεν βοηθάει στην ανακάλυψη και χρήση διαφόρων σκευασμάτων για την αντιμετώπισή του καθώς ο μύκητας ζει στο έδαφος, εισέρχεται από τις ρίζες στο αγγειακό σύστημα των φυτών και επιβιώνει με τη μορφή των μικροσκληρωτίων για περισσότερα από 10 χρόνια. Αυτοί είναι οι λόγοι που καθιστούν τόσο δύσκολη την αντιμετώπιση του παθογόνου με τη χρήση φυτοπροστατευτικών ουσιών. Για αυτό το λόγο ερευνώνται εναλλακτικές μέθοδοι για την αντιμετώπιση της ασθένειας.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης ήταν η μελέτη της φυτοπροστατευτικής δράσης του στελέχους K165 του ριζοβακτηρίου *Paenibacillus alvei* εναντίον του μύκητα *Verticillium dahliae* σε φυτά καρπουζιάς που αναπτύχθηκαν σε 6 διαφορετικούς συνδυασμούς εδαφικών υποστρωμάτων. Τα φυτά της καρπουζιάς που χρησιμοποιήθηκαν φυτεύτηκαν σε θερμοκήπια και μετά από τη καταγραφή των συμπτωμάτων του μύκητα *Verticillium dahliae* παρατηρήθηκε ο πληθυσμός του παθογόνου και του K165 σε κάθε έναν συνδυασμό από τα εδαφικά υποστρώματα. Τέλος, η μελέτη μεταφέρθηκε στο εργαστήριο όπου μελετήθηκε η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Φυτά καρπουζιάς και εδαφικά υποστρώματα

Για την πραγματοποίηση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν φυτά καρπουζιάς, ποικιλίας sugar baby (Εικόνα 12). Τα χαρακτηριστικά που έχει η συγκεκριμένη ποικιλία είναι:

- Οι καρποί που έχουν μικρό μέγεθος 4-7kg και σφαιρικό σχήμα.
- Έχει πολύ καλά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά
- Ποικιλία με πολύ καλή περιεκτικότητα ζαχάρων
- Το χρώμα της επιδερμίδας είναι πολύ βαθύ πράσινο σχεδόν μαύρο και της σάρκας βαθύ κόκκινο.
- Πρώιμη ποικιλία 75-80 ημερών



Εικόνα 12. Καρπούζι ποικιλίας sugar baby.

Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 3 είδη χωμάτων σε συνδυασμό μεταξύ τους δημιουργώντας 6 διαφορετικούς τύπους εδαφικών υποστρωμάτων όπου και φυτεύτηκαν τα φυτά καρπουζιάς. Αυτά ήταν:

- **Βερμικουλίτης:** Είναι ένα διογκωμένο ανόργανο ορυκτό και έχει την ικανότητα να μετατρέπει το νερό σε ατμό και να δημιουργείται μια επιφάνεια που θυμίζει σφουγγάρι με μικρούς πόρους (Wright 1989). Με τη χρήση του βερμικουλίτη στα φυτά εξασφαλίζονται ευνοϊκές συνθήκες για την πρόσβαση των θρεπτικών ουσιών και του αέρα στο ριζικό σύστημα. Επίσης μια ακόμα σημαντική ιδιότητα του βερμικουλίτη είναι η διατήρηση μεγάλης ποσότητας

υγρασίας στο έδαφος. Αυτή η ιδιότητα επιτρέπει στις ρίζες να αποκτήσουν σταδιακά υγρασίας χωρίς να επιτρέπουν την υπερχειλίση.

✚ **Άμμος:** Η άμμος είναι ένα ανόργανο υλικό και αποτελείται από κόκκους διαφόρων διαμέτρων που προέρχονται από την αποσάθρωση πετρωμάτων. Το pH της είναι ουδέτερο και η φαινομενική της πυκνότητα είναι ιδιαίτερα υψηλή. Επίσης έχει μικρή υδατοικανότητα στο έδαφος προσφέρει καλό αερισμό και καλή στράγγιση από την υγρασία και το νερό.

✚ **Οργανική ύλη:** Είναι οργανικά υπολείμματα φυτικής και ζωικής προέλευσης και παράγουν πολύπλοκες ενώσεις με την επίδραση βιολογικών, χημικών αλλά και φυσικών παραγόντων. Η οργανική ύλη εφοδιάζει τα φυτά με θρεπτικά στοιχεία που τους είναι απαραίτητα. Στα πιο ελαφρά εδάφη όταν χρησιμοποιηθεί τα κάνει πιο συνεκτικά με καλύτερη πλαστικότητα. Επίσης έχει την ικανότητα να επηρεάζει τόσο τις φυσικές όσο και τις χημικές ιδιότητες που έχουν τα εδάφη καθώς βελτιώνει την δομή του εδάφους, συμβάλει σημαντικά στην γονιμότητα των εδαφών μιας και είναι πηγή αζώτου, φωσφόρου και θείου. Επίσης η οργανική ουσία δημιουργεί υποστρώματα ανάπτυξης μικροοργανισμών και βοηθάει στον εμπλουτισμό του εδάφους με θρεπτικά στοιχεία.

3.2 Μικροβιολογικό υλικό

Στο πείραμα που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιήθηκαν οι εξής μικροοργανισμοί:

- *Verticillium dahliae*
- *Paenibacillus alvei* K165

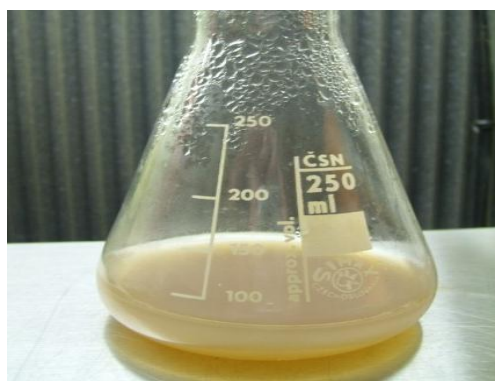
3.3 Θρεπτικό υλικό PDA

Για την παρασκευή 1L θρεπτικού υλικού, PDA χρησιμοποιήθηκαν:

Πατάτα	200 gr
Δεξτρόζη	20 gr
Agar	20 gr

Για την παρασκευή του θρεπτικού υλικού, PDA οι πατάτες καθαρίζονται και κόβονται σε πολύ μικρά κομμάτια και τοποθετούνται σε μια κωνική φιάλη 2L όπου

και προσθέτεται 1L απεσταγμένο νερό. Στη συνέχεια η κωνική φιάλη μπαίνει σε υδατόλουτρο για 45min. Αφού βράσει βγαίνει η φιάλη και σουρώνεται από τα κομμάτια πατάτας και ξανά τοποθετείται το υγρό πίσω στη φιάλη όπου και προσθέτονται τα 20gr δεξτρόζης και 20gr από το Agar και ανακινείται καλά. Τέλος κλείνει η κωνική φιάλη με βαμβάκι και αλουμινόχαρτο και την τοποθετείται στον κλίβανο για αποστείρωση (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Κωνική φιάλη με το θρεπτικό υλικό PDA.

3.4 Θρεπτικό υλικό SSN

Για την παρασκευή 1L SSN χρησιμοποιήθηκαν:

Σακχαρόζη ή Σουκρόζη	15gr
NaNO_3	2gr
KH_2PO_4	1gr
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 gr
KCl	0,5 gr
Ιχνοστοιχεία	1 ml

Σε 1L απιονισμένου νερού σε μια κωνική προστέθηκαν όλα τα υλικά μαζί και έγινε ανάδευση μέχρι να διαλυθούν όλα τα υλικά πλήρως. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε η φιάλη στον κλίβανο για αποστείρωση.

3.5 Θρεπτικό υλικό NG

Για 1L νερού χρησιμοποιήθηκαν:

Nutrient Broth	8 gr
Glycerol	20 gr

Η φιάλη με τα υλικά τοποθετείται στον κλίβανο για αποστείρωση.

3.6 Προετοιμασία του παθογόνου *Verticillium dahliae*

Αρχικά έγινε η μεταφορά μικρών κομματιών από *Verticillium dahliae* από ένα έτοιμο φυλαγμένο σε κατάλληλες συνθήκες και θερμοκρασίες τρυβλίο που ήταν στρωμένο με PDA σε ένα νέο τρυβλίο με το ίδιο στρωμένο θρεπτικό υλικό (PDA). Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν τα τρυβλία για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου 20-25°C.

Τα τρυβλία παρακολουθούνταν μέχρι να εμφανιστεί το μυκήλιο του Βερτισιλλίου και να καλύψει μεγάλο μέρος του τρυβλίου. Μόλις ήταν έτοιμο το μυκήλιο μεταφέρθηκαν κομμάτια από τα τρυβλία του μύκητα *Verticillium dahliae* στις κωνικές φιάλες που περιείχαν το θρεπτικό υλικό SSN. Οι φιάλες τοποθετήθηκαν στον περιστρεφόμενο επωαστικό θάλαμο για 5 μέρες στους 22-25°C. Τέλος οι κωνικές φιάλες βγήκαν μετά από 5 μέρες στον περιστρεφόμενο επωαστικό θάλαμο όπου παρατηρήθηκε ότι είχε σχηματιστεί στις κωνικές φιάλες ένα πυκνό αιώρημα κονιδίων μαζί με μυκήλιο.

Οι κωνικές φιάλες με το αιώρημα κονιδίων μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο όπου και φλιταρίστηκαν σε τούλι σε ποτήρι ζέσεως. Στη συνέχεια ετοιμάστηκαν 2 φιαλίδια των 9ml το καθένα και με την πιπέτα έγινε παραλαβή 1 ml από το πυκνό αιώρημα και μεταφέρθηκε στο πρώτο φιαλίδιο με τα 9 ml. Έπειτα αφού ανακινήθηκε καλά το πρώτο φιαλίδιο έγινε παραλαβή από αυτό 1 ml και προστέθηκε στο δεύτερο μαζί με 9 ml νερού για να γίνει η δεύτερη δεκαδική αραιώση (10^{-2}) ώστε να εξασφαλιστεί ευκολότερη μέτρηση των κονιδίων. Τέλος, έγινε παραλαβή από το δεύτερο φιαλίδιο 25 μ l και τοποθετήθηκε σε ειδική αντικειμενοφόρο πλάκα μέτρησης κονιδίων (αιματοκυτταρόμετρο) για να εκτιμηθεί η τελική πυκνότητα του αιωρήματος. Η μέτρηση των κονιδίων στα τετραγωνάκια τους αιματοκυτταρόμετρου έγινε σε μικροσκόπιο και υπολογίστηκε ο Μ.Ο (μέσος όρος) των σπορίων

τετραγωνάκι. Για να γίνει ο υπολογισμός πόσα ml από το αρχικό αιώρημα V_x θα χρησιμοποιηθούν για να προκύψει ο τελικός αριθμός κονιδίων/ml να είναι 10^7 χρησιμοποιήθηκε ο τύπος $C_1V_x=C_2V_2$.

3.7 Προετοιμασία του Βιολογικού παράγοντα *Paenibacillus alvei* (K165)

Για την προετοιμασία του K165 χρησιμοποιήθηκαν οι κωνικές φιάλες με το NG. Η μεταφορά του K165 στο NG έγινε σε Laminar όπου από το τρυβλίο με τον βιολογικό παράγοντα αφαιρέθηκαν κομμάτια και προστέθηκαν στις κωνικές φιάλες που περιείχε το θρεπτικό υλικό NG και στη συνέχεια σφραγίστηκαν καλά με μπαμπάκι και αλουμινόχαρτο. Τέλος, οι κωνικές τοποθετήθηκαν για επώαση στον ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο για 2 μέρες στους 25°C .

3.8 Πείραμα 1ο μέρος

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε δύο επαναλήψεις. Οι σπόροι των φυτών φυτεύτηκαν αρχικά σε μικρά γλαστράκια και σε μια λεκάνη αναμείχθηκαν οι τύποι εδαφικών υποστρώματων μαζί με το παθογόνο μύκητα *Verticillium dahliae* αλλά και σκέτα χωρίς κάποιο παθογόνο (Εικόνα 14). Οι συνδυασμοί των χωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- 5% Βερμικουλίτης, 95% Άμμος
- 20% Βερμικουλίτης, 80% Άμμος
- 40% Βερμικουλίτης, 60% Άμμος
- 5% Βερμικουλίτης, 40% Οργανική ύλη(φυτόχωμα), 55% Άμμος
- 20% Βερμικουλίτης, 40% Οργανική ύλη, 40% Άμμος
- 40% Βερμικουλίτης, 40% Οργανική ύλη, 20% Άμμος



Εικόνα 14. Εδαφικά υποστρώματα

Πάνω σε αυτούς τους συνδυασμούς βασίστηκε το πρώτο μέρος του πειράματος. Οι εφαρμογές που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε εδαφικό υπόστρωμα από τα παραπάνω ήταν:

- φυτά με τον μύκητα *Verticillium dahliae*
- φυτά με τον μύκητα *Verticillium dahliae* και K165
- φυτά με K165
- φυτά μάρτυρες

Στα φυτά που θα χρησιμοποιούνταν και θα είχαν μόνο το K165 προστέθηκε προσεχτικά με μια σύριγγα 5ml από το έτοιμο NG που του είχε προστεθεί το K165. Μετά από μια βδομάδα τα φυτά μεταφτεύθηκαν στα υποστρώματα και ελεγχόντουσαν για πιθανά συμπτώματα από το παθογόνο.

Μετά από 4 μέρες ξεκίνησαν οι προετοιμασίες για την συλλογή χόματος για τη μέτρηση του μύκητα *V.dahliae* στα φυτά. Αρχικά προετοιμάστηκε 1L από το θρεπτικό υλικό PDA σύμφωνα με τη συνταγή και στη συνέχεια σε 24 μικρές κωνικές φιάλες προστέθηκαν 50ml απεσταγμένου νερού. Στη συνέχεια το PDA και οι 24 κωνικές φιάλες μπήκαν στο κλίβανο για αποστείρωση. Μόλις το PDA ήταν έτοιμο προστέθηκε σε αυτό 12,5ml ριφαμπικίνη (rifampicin) για να μην υπάρξουν μολύνσεις στα τρυβλία καθώς η ριφαμπικίνη δρα ως αντιβιοτικό (Εικόνα 15).



Εικόνα 15. Τρυβλία με θρεπτικό υλικό PDA και ριφαμπικίνη

Από τα φυτά με τον μύκητα *V.dahliae* στο θερμοκήπιο συλλέχτηκε μέσα σε αλουμινόχαρτο 0,50gr χόματος από την κάθε εφαρμογή και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο. Τα χόματα ζυγίστηκαν για να υπάρχει ακρίβεια στην ποσότητα και στη συνέχεια χωρίστηκαν οι κωνικές φιάλες ανάλογα με τον τύπο εδαφικού υποστρώματος που θα περιείχαν (Εικόνα 16) σε 2 συγκεντρώσεις στα 10^{-2} και στα

10^{-4} . Έπειτα τα 0,50gr προστέθηκαν στις κωνικές φιάλες και τοποθετήθηκαν στον αναδευτήρα για λίγο για να αναμειχτεί καλύτερα το χώμα. Τέλος με την πιπέτα προστέθηκαν 0,50ml στα πρώτα τρυβλία για το 10^{-2} και στη συνέχεια ξανά με τη χρήση της πιπέτας μεταγγίστηκε από τις πρώτες κωνικές φιάλες 0,5ml στις δεύτερες για να βγει η συγκέντρωση 10^{-4} για να προστεθεί εν τέλει στα τρυβλία. Τα τρυβλία σφραγίστηκαν και σημειώθηκαν ανάλογα με την συγκέντρωση και το εδαφικό υπόστρωμα και αποθηκεύτηκαν στον επωαστικό θάλαμο.



Εικόνα 16. Αλουμινόχαρτα με την ποσότητα του χώματος που συλλέχτηκε από τα φυτά.

Για τον έλεγχο του K165 στα φυτά η προετοιμασία έγινε μετά από μια βδομάδα όπου φτιάχτηκε ξανά PDA μόνο που αυτή τη φορά προστέθηκε 1ml από ακτιδιόνη και τοποθετήθηκαν στο Laminar μέχρι να κρυώσει και να σταθεροποιηθεί το PDA (Εικόνα 17). Στη συνέχεια ετοιμάστηκαν πάλι 24 κωνικές φιάλες με 50ml απεσταγμένο νερό και συλλέχτηκαν 0,50gr από κάθε εφαρμογή που περιείχε το K165. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν ίδια με αυτή για τον μύκητα *V.dahliae*. Τα τρυβλία αποθηκεύτηκαν στον επωαστικό θάλαμο.



Εικόνα 17. Τρυβλία με ακτιδιόνη

3.9 Πείραμα 2ο μέρος

Το 2ο μέρος του πειράματος έγινε με τη χρήση φυτοχώματος αντί για τα 6 διαφορετικά εδαφικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στο 1ο μέρος. Το φυτόχωμα αποστειρώθηκε στον κλίβανο για να υπάρξουν όσο το δυνατόν λιγότερες απώλειες από πιθανές μολύνσεις στα φυτά. Οι εφαρμογές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- 22 φυτά με τον μύκητα *V.dahliae*
- 22 φυτά με τον μύκητα *V.dahliae* και K165
- 20 με K165
- 15 αρνητικοί μάρτυρες

Στο εργαστήριο φτιάχτηκε SSN,NG και PDA όπως και στο 1ο μέρος του πειράματος. Για να γίνει η μόλυνση στο χώμα προστέθηκαν 10ml ανά γλαστράκι για τα 44 φυτά από τον μύκητα *V.dahliae*. Τέλος, στα φυτά προστέθηκαν 5ml από το K165 πριν μεταφυτευτούν.

Όπως και στο 1ο μέρος του πειράματος συλλέχτηκε χώμα 2 φορές από τα γλαστράκια. Την πρώτη για να μετρηθεί ο πληθυσμός του μύκητα *V.dahliae* και τη δεύτερη για το πληθυσμό του K165. Τέλος, συλλέχτηκαν φυτά από τις 8dpi και από τις 16 dpi.

3.9.1 Καταγραφή Συμπτωμάτων

Και στα δύο μέρη του πειράματος (διαφορετικά εδαφικά υποστρώματα και χρήση φυτοχώματος) έγινε ο προσδιορισμός του βαθμού προσβολή των φυτών από το μύκητα. Η καταγραφή των συμπτωμάτων έγινε με βάση τη μέτρηση του ποσοστού των ασθενών φύλλων προς το συνολικό αριθμό φύλλων για κάθε φυτό καρπουζιάς. Τα συμπτώματα καταγραφόντουσαν ανά τακτά χρονικά διαστήματα (2-4 μέρες) και σταματούσαν όταν το φυτό παρουσίαζε ποσοστό ασθενών φύλλων 70-100%.

3.10 Πείραμα 3ο μέρος: Μοριακές τεχνικές

Το 3ο μέρος του πειράματος πραγματοποιήθηκε σε εργαστήριο απομονώθηκε το RNA των φυτών, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του RNA, εφαρμόστηκε Real-time PCR και μελετήθηκε η έκφραση γονιδίων σε 2 διαφορετικές dpi (8 dpi και 16dpi). Τα φυτά καρπουζιάς που συλλέχθηκαν από το θερμοκήπιο μετατράπηκαν σε σκόνη με τη χρήση του υγρού αζώτου και αποθηκεύτηκαν σε μικρά tubes.

3.10.1 Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων β -1,3-glucanase και class V chitinase

Για να διαπιστωθεί αν η προστασία των φυτών που είχαν μολυνθεί από τον μύκητα *V.dahliae* οφείλεται στην επαγωγή των αμυντικών μηχανισμών από το φυτοπροστατευτικό παράγοντα K165 πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων χιτινάσης (chitinase) και γλουκανάσης (glucanase). Για να γίνει αυτό συλλέχτηκε ιστός από το υπέργειο μέρος των φυτών που υπήρχε το παθογόνο αλλά και από αυτά που υπήρχε και ο φυτοπροστατευτικός παράγοντας. Τα δείγματα συλλέχτηκαν στις 8 και 16 μέρες μετά από τη μόλυνση. Από κάθε εφαρμογή συλλέχτηκαν 3 φυτά και αφού έγιναν ένα μείγμα με τη χρήση του υγρού αζώτου αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -80°C.

3.10.2 Απομόνωση RNA

Η απομόνωση του RNA των φυτών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Oñate-Sánchez, και Vicente-Carbajosa 2008 ύστερα από κάποιες κατάλληλες τροποποιήσεις. Οι ενέργειες που έγιναν για την απομόνωση ήταν οι ακόλουθες:

- Τα φυτικά δείγματα έγιναν ένα μείγμα "σκόνης" με τη χρήση του υγρού αζώτου. Το μείγμα αυτό έγινε μέσα σε πορσελάνινο γουδί και τοποθετήθηκε σε μικρά tubes χωρητικότητας 1,5ml.
- Προσθήκη 300μl διαλύματος λύσης κυττάρων (Cell lysis solution).
- Χρήση vortex για 20 λεπτά για έντονη ανάμειξη και ύστερα ανάμειξη με αναστροφή των tubes.

- Επώαση των tubes σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min και αναστροφή για να ανακινηθούν καλά.
- Προσθήκη 100μl διαλύματος (που έχει προψυχθεί σε πάγο) καθίζησης πρωτεϊνών και DNA (protein- DNA precipitation solution) και ελαφριά ανάμειξη των tubes.
- Επώαση για 10 min σε θερμοκρασία 4°C (σε πάγο).
- Φυγοκέντρηση για 20 min σε ταχύτητα 14.000 rpm και σε θερμοκρασία 4°C.
- Μεταφορά υπερκείμενου (300μl) σε καινούρια tube. Εάν υπάρχουν υπολείμματα μετά την μεταφορά, ακολουθεί και δεύτερη φυγοκέντρηση για 5min και σε ταχύτητα 14.000 rpm και ξανά γίνεται μεταφορά του υπερκείμενου.
- Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης για την κατακρήμνιση του RNA
- Επώαση στο πάγο για 10 min (Εικόνα 18).
- Φυγοκέντρηση για 10 min σε ταχύτητα 14.000 rpm και σε θερμοκρασία 4°C.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Προσθήκη 300μl αιθανόλης 70% για καθαρισμό του ιζήματος
- Φυγοκέντρηση σε 16.000g για 1 min
- Απομάκρυνση υπερκείμενου
- Επαναίωση του ιζήματος σε 25μl α.α H₂O.
- Προσδιορισμός της συγκέντρωσης RNA με τη χρήση του Nanodrop.

Οι δοσολογίες που χρησιμοποιήθηκαν για τη παρασκευή 10μl διαλύματος λύσης κυττάρων (Cell lysis solution) ήταν:

Διάλυμα	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση
10% SDS	2 ml	2%
0,5 M sodium citrate	1,36 ml	68 mM
1 M citric acid	1,32 ml	132 mM
0,5 M EDTA	20 μl	1 mM

Το pH του διαλύματος πρέπει να είναι 4-4,5. Το χαμηλό pH είναι σημαντικό για την απενεργοποίηση των ενζύμων που καταστρέφουν το RNA (RNases).

Οι δοσολογίες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή 10 ml διαλύματος καθίζησης πρωτεϊνών και DNA (protein- DNA precipitation solution) ήταν:

Διάλυμα	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση
5 NaCL	8 ml	4 M
0,5 M sodium citrate	320 μ l	16 mM
1 M citric acid	320 μ l	32 mM



Εικόνα 18. Επώαση στο πάγο

3.10.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης

Για να υπολογιστεί η συγκέντρωση του RNA και να εκτιμηθεί η ποιότητα και η καθαρότητα του απομονωμένου υλικού, χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο Nanodrop. Η απορρόφηση στα 260 nm μετράει τη συγκέντρωση του RNA ενώ η απορρόφηση στα 280 nm μετράει τις δευτερεύουσες ουσίες που απομονώθηκαν μαζί με το RNA (πχ πρωτεΐνες).

3.10.4 Εφαρμογή της DNase I

Ο χειρισμός του RNA με ένζυμο δεοξυριβονουκλεάσης είχε σαν αποτέλεσμα την καταστροφή των εναπομεινάντων μορίων DNA. Τα βήματα που πραγματοποιήθηκαν ήταν:

- Σε κάθε δείγμα προστέθηκε 1 μ l DNase I
- Τοποθετήθηκαν για επώαση σε θερμοκρασία 37°C για 15 min
- Σε κάθε δείγμα προστέθηκε 1 μ l EDTA

- Τέλος, τα δείγματα τοποθετήθηκαν για επώαση σε υδατόλουτρο στους 65°C για 10 min

3.10.5 Εφαρμογή αντιστροφής μεταγραφάσης

Για να γίνει η μετατροπή του mRNA σε cDNA χρησιμοποιήθηκε το reagent kit της εταιρείας TAKARA BIO INC. Σε κάθε δείγμα RNA προστέθηκαν από 3μl σε κάθε tube από τα εξής αντιδραστήρια:

- 2 μl buffer
- 0,5 μl oligo dT primer (ολιγονουκλεοτίδια θυμίνης)
- 0,5 μl prime script RT enzyme(αντίστροφη μεταγραφάση)

Χρόνος	Θερμοκρασία
15 min	37°C

3.10.6 Real-time PCR

Η RT-PCR έγινε σε θερμοκυκλοποιητή και για τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε ένα master mix Fast Green Nippon Genetic. Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν β-1,3-glucanase και class V chitinase.

<u>Reference gene</u>	18S <u>rRNA</u>	ACCATAAACGATGCCGACCAG CAGCCTTGCGACCATACTCCC
β-1,3-glucanase <u>class V chitinase</u>		TTGAGGGCGTCTGGGAGT GAGAAGGTTGGCGGAGCA TTTACCCAATGGACAGAT GGTTGTGGCAGAATAAGT

Το γονίδιο αναφοράς στη RT-PCR που χρησιμοποιήθηκε ήταν το 18SrRNA.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

Fast Green Reagent	5 μ l	Τελική Συγκέντρωση
Forward Primer	0,16 μ l	25 μ M
Reverse Primer	0,16 μ l	25 μ M
H ₂ O	3,68 μ l	
Δείγμα cDNA	1 μ l	
Σύνολο	10 μ l	

Το πρόγραμμα που απεικονίζονται οι θερμοκρασίες που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις RT-PCR:

Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
95°C	2 min	1
95°C	5 sec	40
60°C	30 sec	40

Στο 1^ο στάδιο στα 2min και στους 95°C το αποτέλεσμα που δίνει η RT-PCR είναι η ενεργοποίηση της πολυμεράσης στη συνέχεια στο 2^ο στάδιο στα 5sec και στους 95°C προκαλείται η αποδιάταξη του DNA και τέλος στο 3^ο στα 30sec και σε θερμοκρασία 60°C προκαλείται ο υβριδισμός των εκκινητών και η επιμήκυνση της αλυσίδας.

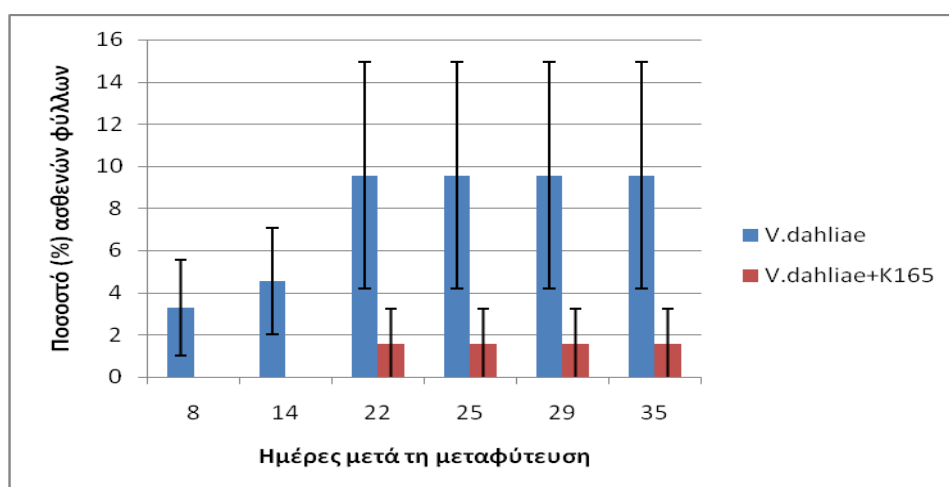
4. Αποτελέσματα

4.1 Αποτελέσματα συμπτωμάτων

Στην εφαρμογή 1 χρησιμοποιήθηκε ένα μεγάλο ποσοστό άμμου (95%) και το υπόλοιπο βερμικουλίτης (5%) για τη δημιουργία του εδαφικού υποστρώματος όπου και φυτεύτηκαν τα φυτά καρπουζιάς. Η άμμος χρησιμοποιήθηκε καθώς προσφέρει καλό αερισμό και καλή στράγγιση από το νερό και την υγρασία ενώ ο βερμικουλίτης είναι πηγή αργίλου και προσφέρει στα φυτά ευνοϊκές συνθήκες για την πρόσβαση των θρεπτικών ουσιών και του αέρα στο ριζικό σύστημα. Επίσης διατηρεί μεγάλη ποσότητα υγρασίας του εδάφους άρα επιτρέπει στις ρίζες να αποκτήσουν σταδιακά υγρασία. Τα συμπτώματα που καταγράφηκαν ήταν για τις 2 επαναλήψεις μαζί.

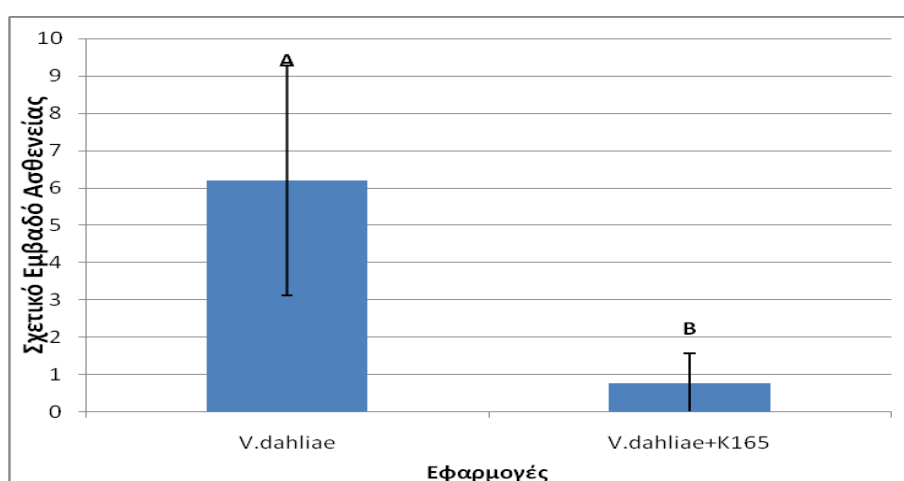
Στο γράφημα 1Α παρατηρούμε ότι τα φυτά που είχαν το παθογόνο *V.dahliae* παρουσίασαν μια πολύ μικρή αύξηση των συμπτωμάτων από τις πρώτες μέρες μετά την μεταφύτευση των φυτών στα γλαστράκια. Πιο συγκεκριμένα αυτή η μικρή αύξηση ξεκίνησε από τις 8 μέρες μετά την μεταφύτευση μέχρι τις 14 μέρες και από τις 14 υπήρξε μια μεγαλύτερη αύξηση των συμπτωμάτων μέχρι τις 22 μέρες όπου εκεί ο μέσος όρος των συμπτωμάτων έμεινε αμετάβλητος μέχρι τις τελευταίες μέρες που καταγράφηκαν τα συμπτώματα (35 μέρες μετά τη μεταφύτευση).

Στα φυτά που είχαν το παθογόνο *V.dahliae*+K165 ένα πολύ μικρός μέσος όρος συμπτωμάτων εμφανίστηκε στις 22 μέρες όπου και έμεινε σταθερός μέχρι και την τελευταία μέρα μετρήσεις των συμπτωμάτων (35 μέρες από τη μεταφύτευση).



Γράφημα 1Α. Μέσος όρος συμπτωμάτων (95% Άμμος, 5% Βερμικουλίτης)

Στο επόμενο γράφημα παρατηρείται το σχετικό εμβαδό ασθενείας (Relative AUDPC) που είναι η τιμή του εμβαδού ασθενείας εκφρασμένο ως ποσοστό του μεγίστου δυνατού εμβαδού ασθενείας για όλη τη χρονική περίοδο που καταγράφηκαν τα συμπτώματα. Στο **γράφημα 1B** παρατηρήθηκε ότι το σχετικό εμβαδό ασθενείας στην εφαρμογή με το μύκητα είναι αυξημένο σε αντίθεση με την εφαρμογή του *V.dahliae*+K165 όπου παρατηρήθηκε μια θετική επίδραση του K165 και προστασία καθώς το σχετικό εμβαδό ασθενείας ήταν πολύ μικρότερο και αυτό μπορεί να θεωρηθεί λογικό καθώς η εφαρμογή με το K165 είχε πολύ μικρό ποσοστό συμπτωμάτων.

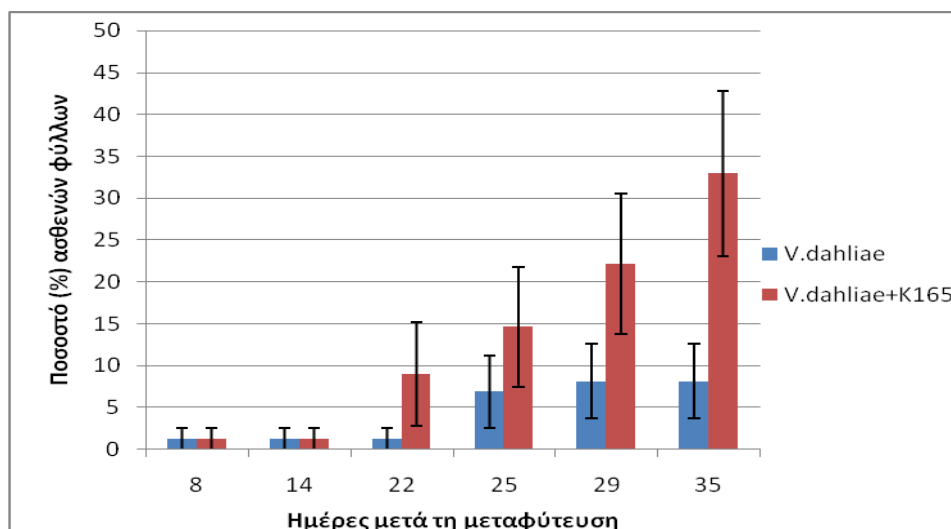


Γράφημα 1B. Σχετικό εμβαδό ασθενείας (95% Άμμος, 5% Βερμικουλίτης)

Στην **εφαρμογή 2** χρησιμοποιήθηκε ξανά σαν εδαφικό υπόστρωμα η άμμος με το Βερμικουλίτη. Η άμμος ήταν πάλι σε μεγαλύτερη αναλογία απ' ότι ο βερμικουλίτης μόνο που αυτή τη φορά ήταν περισσότερη η ποσότητα του σε σχέση με την εφαρμογή 1 (80% Άμμος, 20% Βερμικουλίτης).

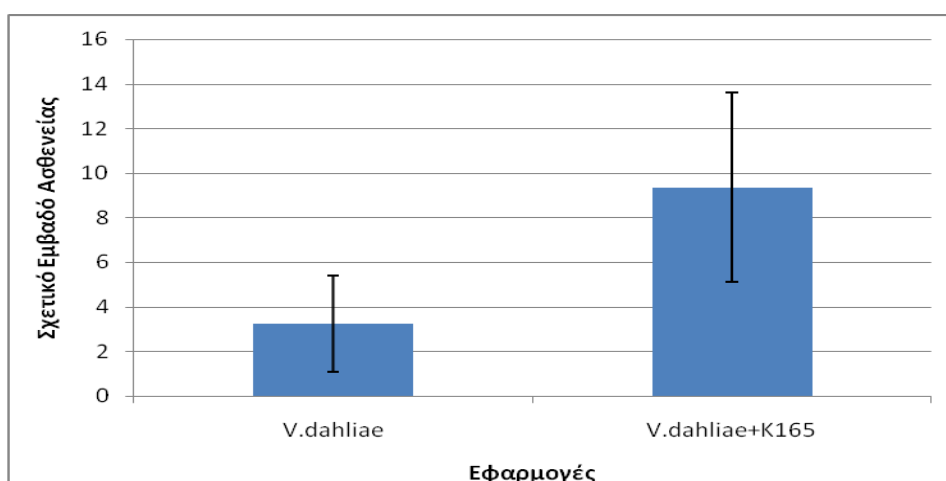
Στο **γράφημα 2A** παρατηρήθηκε ότι στην εφαρμογή που ήταν μόνο το παθογόνο υπήρξε μια πολύ μεγάλη αύξηση συμπτωμάτων από τις 8-22 μέρες από την μεταφύτευση. Ενώ από τις 25-35 μέρες υπήρξε ακόμα μια μικρή αύξηση ωστόσο τα ποσοστά των φυτών εμφάνισαν συμπτώματα ήταν πολύ λίγα και για αυτό το λόγο παρατηρείται αυτή η μικρή αύξηση σε όλη την διάρκεια καταγραφής των συμπτωμάτων. Από την άλλη στην εφαρμογή με το παθογόνο και το K165 ενώ στις πρώτες μετρήσεις υπήρξε μια μικρή καταγραφή των συμπτωμάτων από τις 22-35 μέρες από τη μεταφύτευση υπήρξε μια έντονη αύξηση των συμπτωμάτων με τις 35

μέρες να έχουν ένα μεγάλο ποσοστό φυτών που είχαν προσβληθεί και εμφανίσει συμπτώματα από τον μύκητα *V.dahliae*.



Γράφημα 2Α. Μέσος όρος συμπτωμάτων (80% Άμμος, 20% Βερμικουλίτης)

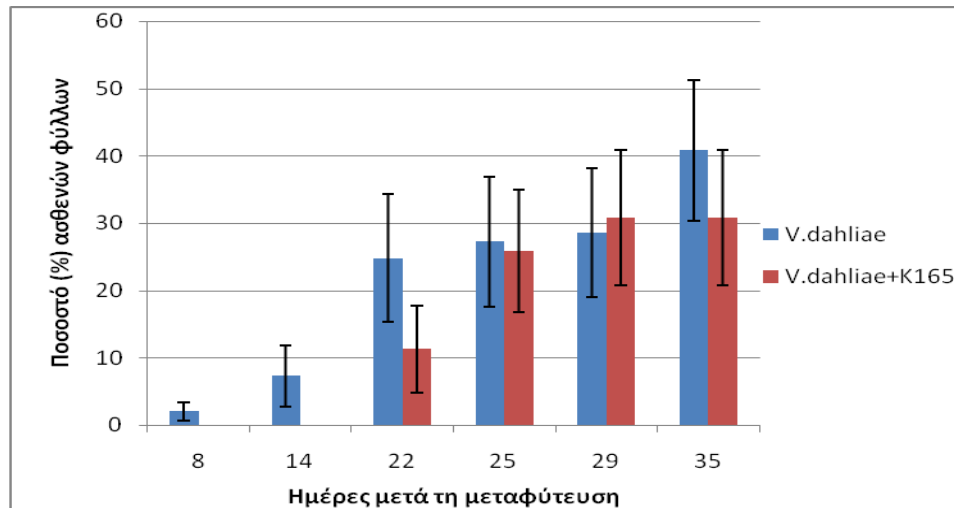
Στο **γράφημα 2B** όπως ήταν λογικό η εφαρμογή με το K165 εμφάνισε ένα μεγάλο εμβαδό ασθενείας καθώς στα φυτά καταγράφηκαν αρκετά συμπτώματα σε όλες τις ημέρες του πειράματος. Ενώ η εφαρμογή με τον μύκητα *V.dahliae* παρουσίασε ένα μικρότερο εμβαδό της ασθένειας καθώς καταγράφηκαν λιγότερα συμπτώματα σε όλες τις ημέρες που πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις.



Γράφημα 2B. Σχετικό εμβαδό ασθενείας (80% Άμμος, 20% Βερμικουλίτης)

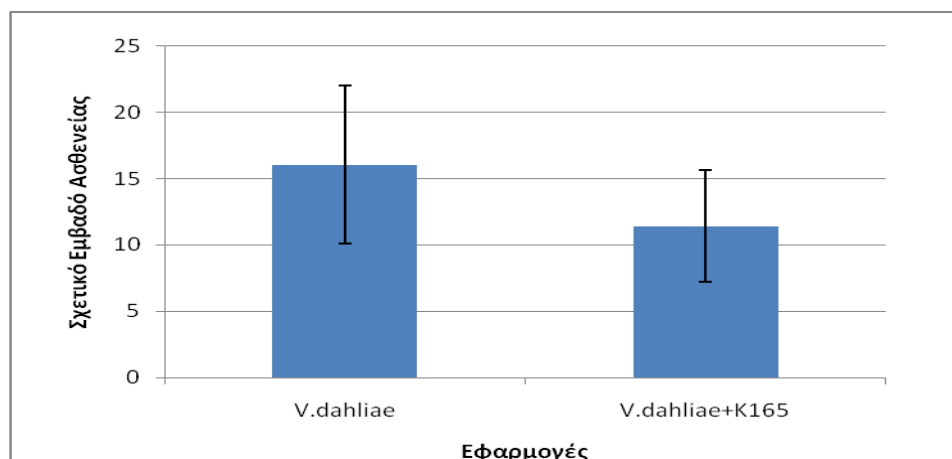
Στην **εφαρμογή 3** χρησιμοποιήθηκε για το εδαφικό υπόστρωμα ξανά άμμος σε μεγάλο ποσοστό αυτή τη φορά οργανική ύλη και ο βερμικουλίτης (55% Άμμος, 40% Οργανική ύλη, 5% Βερμικουλίτης).

Στο **γράφημα 3Α** υπήρξε αύξηση των συμπτωμάτων στα φυτά καρπουζιάς σε όλες τις μέρες. Η αύξηση μέχρι τις 14 μέρες ήταν μικρή όμως από τις 14-35 μέρες υπήρξε μια διαρκεί αύξηση των φυτών που παρουσίασαν συμπτώματα της ασθένειας. Στην εφαρμογή με τον μύκητα *V.dahliae*+K165 υπήρξε μικρότερη αύξηση καθώς μέχρι τις 22 μέρες δεν είχαν εμφανιστεί συμπτώματα. Από τις 22-35 μέρες εμφανίστηκαν και αυξήθηκαν, όμως ήταν μικρότερη η αύξηση απ' ότι στην εφαρμογή με τον μύκητα *V.dahliae*.



Γράφημα 3Α. Μέσος όρος συμπτωμάτων (55% Άμμος, 40% Οργανική ύλη, 5% Βερμικουλίτης)

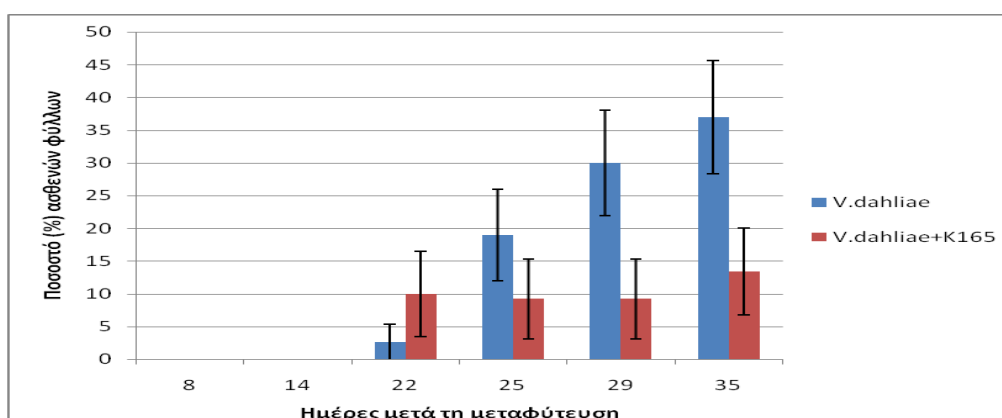
Στο **γράφημα 3Β** το σχετικό εμβαδό των ασθενών φύλλων στις δύο εφαρμογές είναι στατιστικά παρόμοιο.



Γράφημα 3Β. Σχετικό εμβαδό ασθενείας (55% Άμμος, 40% Οργανική ύλη, 5% Βερμικουλίτης).

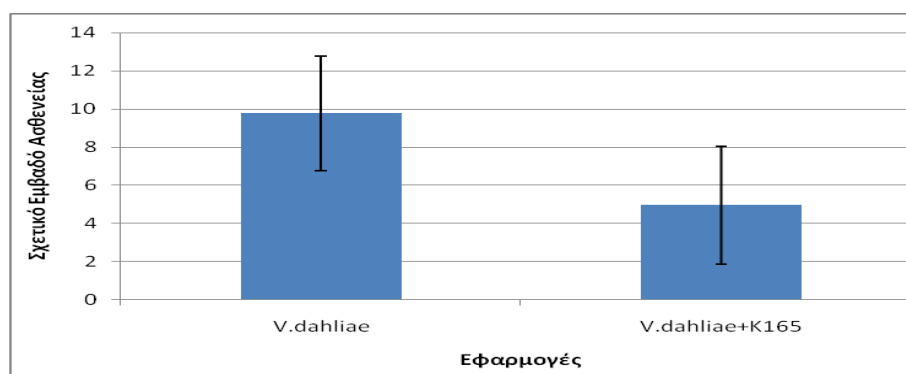
Στην **εφαρμογή 4** το μείγμα για τη δημιουργία εδαφικού υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν ισόποση ποσότητα άμμου και οργανικής ύλης και το υπόλοιπο ποσοστό βερμικουλίτης (40% Άμμος, 40% Οργανική ύλη, 20% Βερμικουλίτης).

Στο **γράφημα 4Α** τα συμπτώματα των ασθενών φύλλων εμφανίστηκαν μετά τις 22 μέρες από τη μεταφύτευση ενώ στις 29-35 υπήρξε η μεγαλύτερη αύξηση. Στην εφαρμογή με τον μύκητα *V.dahliae*+K165 τα ασθενή φύλλα εμφανίστηκαν και αυτά στις 22 μέρες μετά από τη μεταφύτευση και υπήρξε μια πολύ μικρή αύξηση των ασθενών φύλλων μέχρι το τέλος της καταγραφής των συμπτωμάτων.



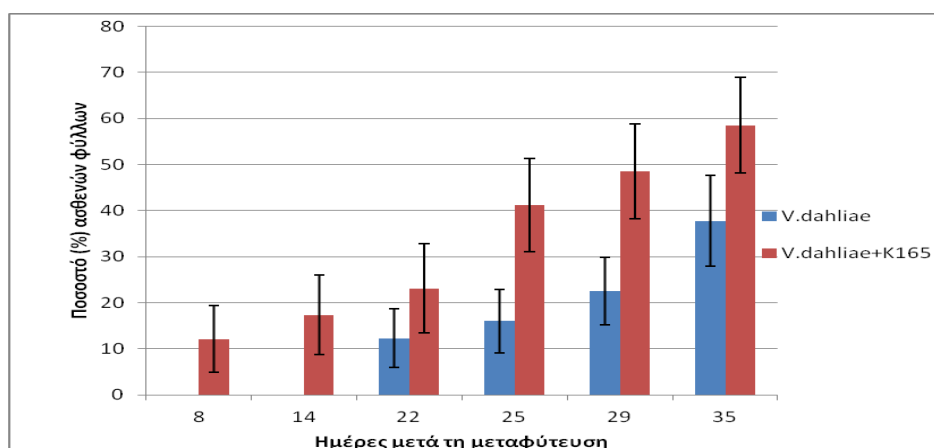
Γράφημα 4Α. Μέσος όρος συμπτωμάτων (40% Άμμος, 40% Οργανική ύλη, 20% Βερμικουλίτης)

Στο **γράφημα 4Β** το σχετικό εμβαδό των ασθενών φύλλων στην εφαρμογή με τον μύκητα *V.dahliae* είναι μεγαλύτερο σε σχέση με την εφαρμογή με το K165. Όπου η συγκεκριμένη εφαρμογή στο γράφημα της δείχνει ότι παρουσιάζει μια μικρή προστασία στα φυτά που όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική.



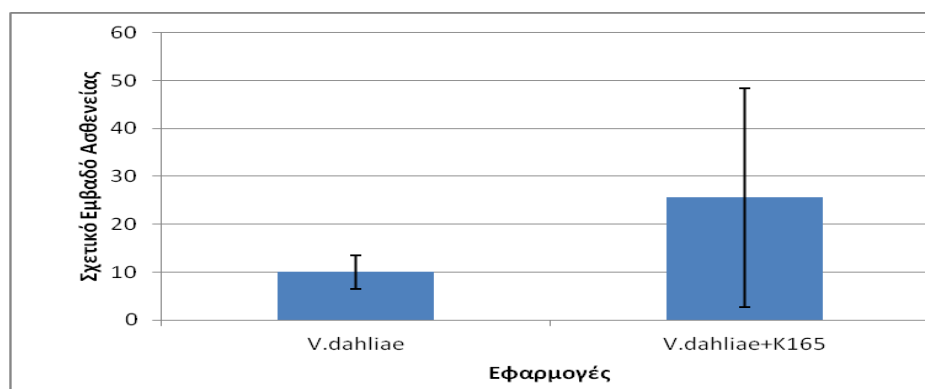
Γράφημα 4Β. Σχετικό εμβαδό ασθενείας (40% Άμμος, 40% Οργανική ύλη, 20% Βερμικουλίτης).

Στην **εφαρμογή 5** χρησιμοποιήθηκε ισόποση ποσότητα βερμικουλίτη και οργανικής ύλης ενώ η άμμος χρησιμοποιήθηκε σε μικρότερη ποσότητα (40% Βερμικουλίτης, 40% Οργανική ύλη, 20% Άμμος). Στο **γράφημα 5Α** τα ασθενή φύλλα εμφανίστηκαν από τις 22 μέρες μέχρι το τέλος τις 35 μέρες ενώ στην εφαρμογή *V.dahliae*+K165 τα συμπτώματα ήταν εμφανή από τις πρώτες μέρες ενώ υπήρξε αύξηση μέχρι και το τέλος.



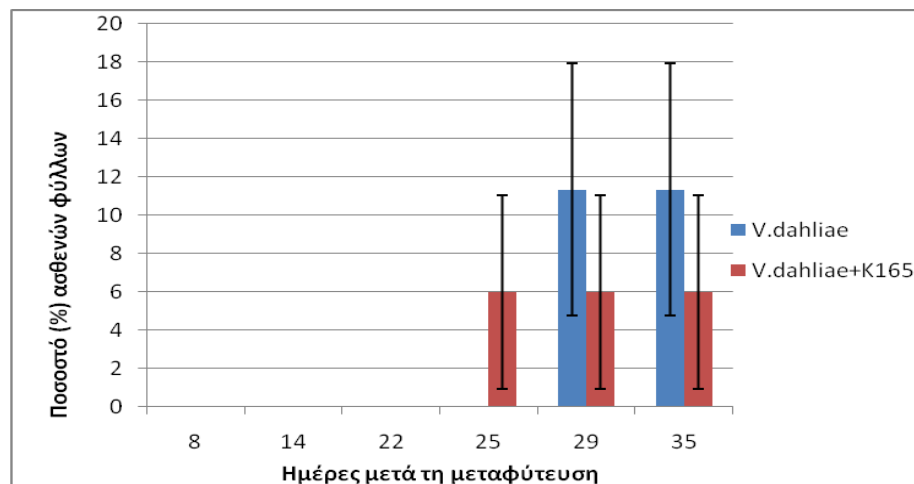
Γράφημα 5Α. Μέσος όρος συμπτωμάτων (40%Βερμικουλίτης,40% Οργανική ύλη, 20% Άμμος).

Στο **γράφημα 5Β** το σχετικό εμβαδό των ασθενών φύλλων στην εφαρμογή με τον μύκητα *V.dahliae* δεν ήταν μεγάλο ενώ σε αντίθεση με το K165 το σχετικό εμβαδό ήταν πολύ μεγαλύτερο δείχνοντας ότι δεν υπήρξε προστασία στα φυτά. Αυτό θεωρείται λογικό καθώς στο γράφημα με των μέσο όρο των ασθενών φύλλων η συγκεκριμένη εφαρμογή με το K165 είχε ασθενή φυτά από τις πρώτες μέρες μέχρι και το τέλος.



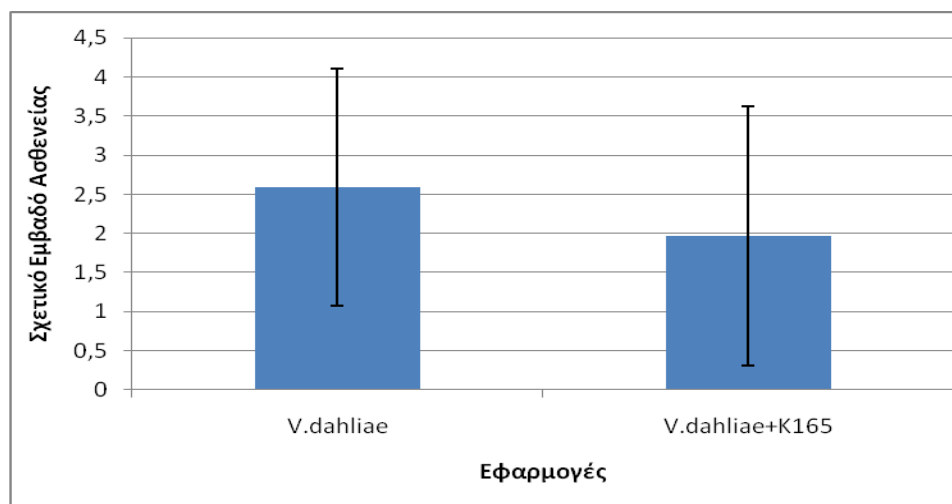
Γράφημα 5Β. Σχετικό εμβαδό ασθενείας (40%Βερμικουλίτης,40% Οργανική ύλη, 20% Άμμος).

Στην **εφαρμογή 6** χρησιμοποιήθηκε ξανά μεγαλύτερη ποσότητα άμμου και λιγότερη βερμικουλίτη (60% Άμμος, 40% Βερμικουλίτης). Στο **γράφημα 6Α** υπήρξαν ασθενή φύλλα από τις 29 μέρες μέχρι και τις 35 μέρες αν και τα ασθενή φυτά δεν ήταν πολλά. Στην εφαρμογή με το K165 τα ασθενή φυτά ήταν ελάχιστα και εμφάνισαν συμπτώματα τα οποία έμειναν σταθερά από τις 25 μέρες μέχρι και τις 35 μέρες.



Γράφημα 6Α. Μέσος όρος συμπτωμάτων (60%Άμμος,40%Βερμικουλίτης).

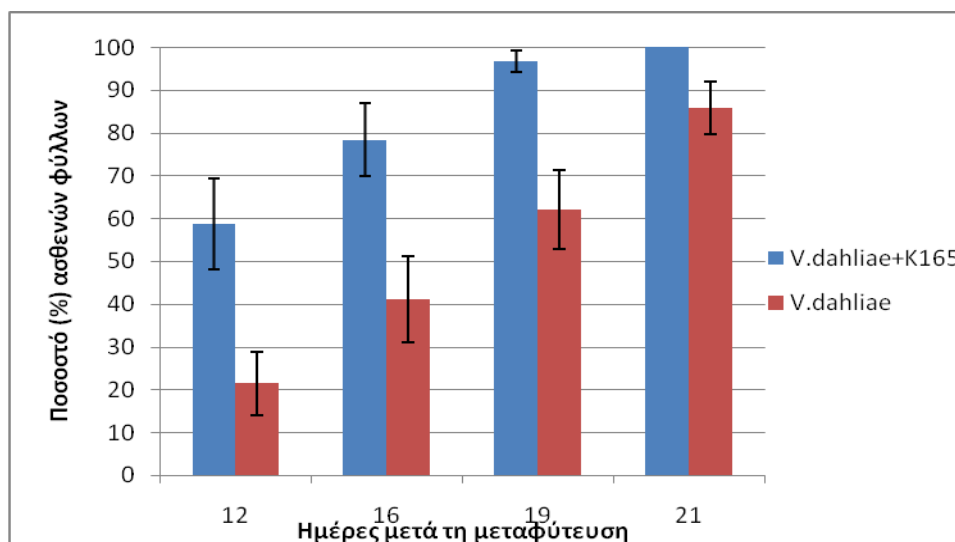
Στο **γράφημα 6Β** το σχετικό εμβαδό ασθενείας και ήταν μικρό λόγω του περιορισμένου αριθμού ασθενών φυτών στις δύο επεμβάσεις, ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 3 εφαρμογών



Γράφημα 6Β. Σχετικό εμβαδό ασθενείας (60%Άμμος,40%Βερμικουλίτης).

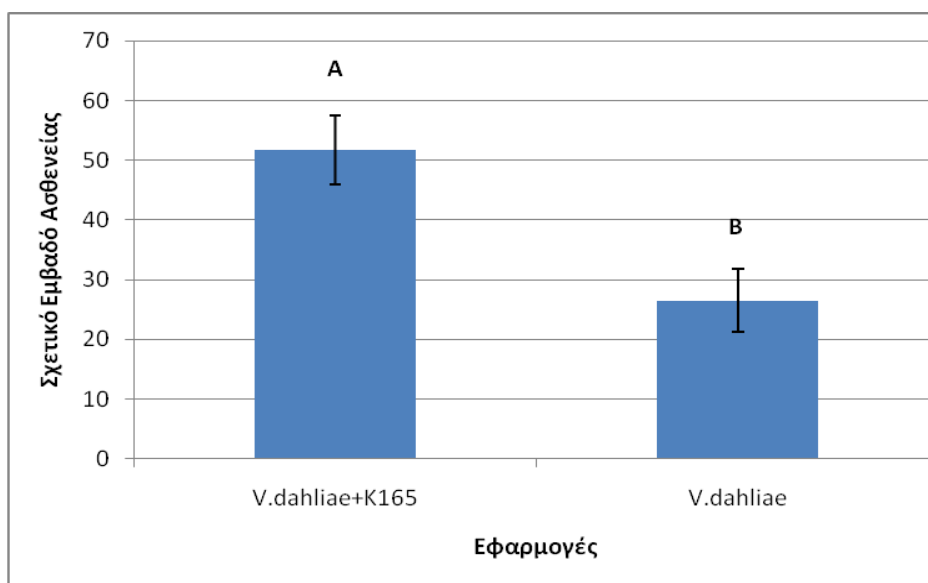
Στην **εφαρμογή 7** χρησιμοποιήθηκε μόνο αποστειρωμένο φυτόχωμα. Στο **γράφημα 7Α** από τις πρώτες μέρες υπήρχαν ασθενή φύλλα και υπήρξε μια σταδιακή

αύξηση από την αρχή τις 12 μέρες δηλαδή από τη μεταφύτευση μέχρι και το τέλος τις 21 μέρες. Από την άλλη η εφαρμογή με το K165 είχε πολλά ασθενή φυτά από την αρχή μέχρι και το τέλος με μεγαλύτερη αύξηση απ' ό τι η εφαρμογή με τον μύκητα *V.dahliae*.



Γράφημα 7Α. Μέσος όρος συμπτωμάτων (Φυτόχωμα).

Τέλος, στην **εφαρμογή 7B** διαπιστώθηκε ότι το σχετικό εμβαδό των ασθενών φύλλων στην εφαρμογή με τον μύκητα *V.dahliae* ήταν μικρότερο σε σχέση με το K165 καθώς τα ασθενή φύλλα και τα συμπτώματα που παρουσιάστηκαν σε αυτή την εφαρμογή ήταν πολλά περισσότερα στην εφαρμογή με τον μύκητα *V.dahliae*+K165.



Γράφημα 7B. Σχετικό εμβαδό ασθενείας (Φυτόχωμα)

4.2 Αποτελέσματα συγκεντρώσεων του *P. alvei* (K165)

Για την καταγραφή των συγκεντρώσεων του K165 έγινε συλλογή από τα εδαφικά υποστρώματα στις 10 και 20 μέρες μετά την μεταφύτευση των φυτών στα γλαστράκια. Από κάθε γλαστράκι συλλέχθηκαν 0,50gr από το χώμα και μεταφέρθηκε στο εργαστήριο όπου με διαδοχικές αραιώσεις με νερό και με τη χρήση της πιπέτας προστέθηκε σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό PDA. Τέλος τοποθετήθηκαν τα τρυβλία στον επωαστικό θάλαμο και μετά από 2 μέρες έγινε η καταγραφή των συγκεντρώσεων (Εικόνα 19).

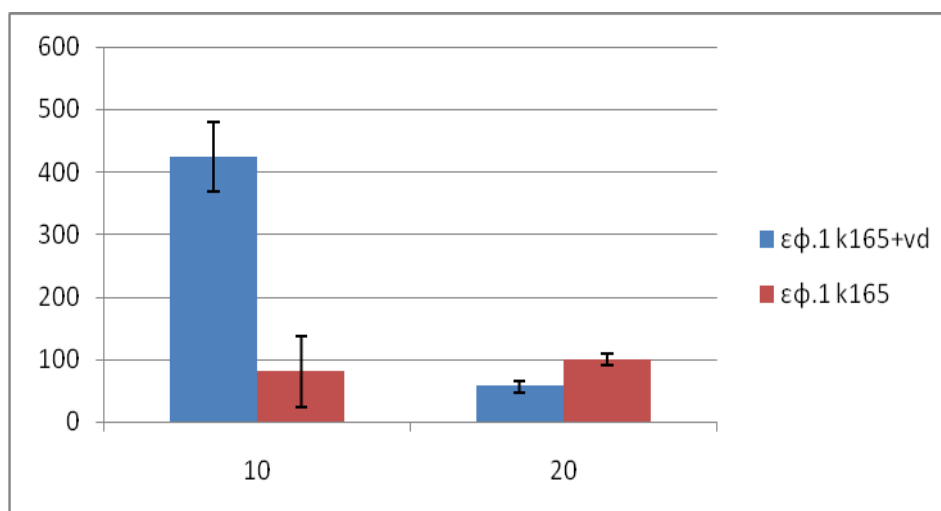


Εικόνα 19. Τρυβλία για καταγραφή συγκεντρώσεων K165

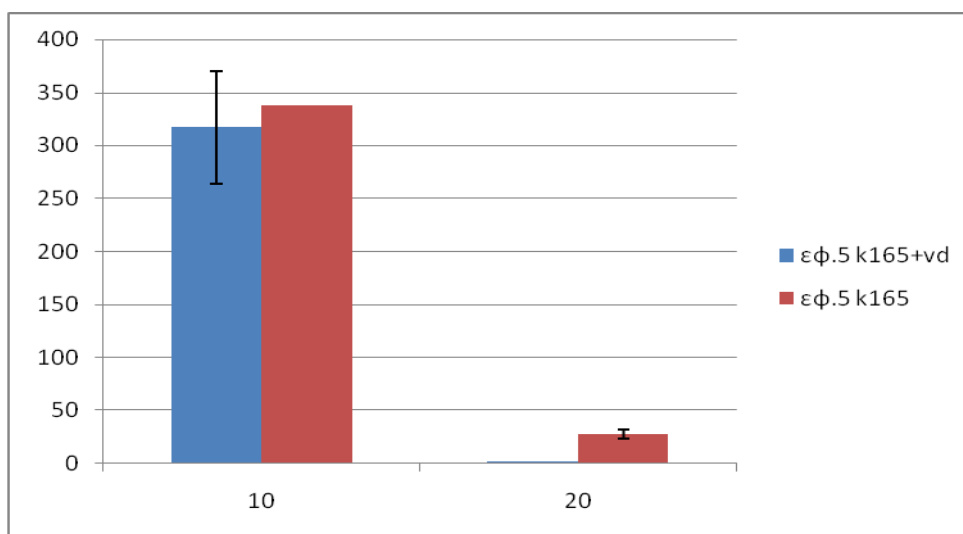
Στα γραφήματα των **εφαρμογών 1 και 5** παρατηρείται ότι η συγκέντρωση του K165 στις 10dpi είναι πιο μεγάλη απ' ό τι στις 20dpi. Πιο συγκεκριμένα για στην **εφαρμογή 1** όπου τα εδαφικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν το μεγαλύτερο ποσοστό ήταν άμμος, μετά οργανική ύλη και τέλος βερμικουλίτης. Παρατηρούμε στο γράφημα της ότι στις 10 dpi τα φυτά που είχαν το παθογόνο μύκητα *V.dahliae* αλλά και το K165 είχαν πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση απ' ό τι στις 20dpi. Ενώ σε αντίθεση με τα φυτά που δεν περιείχαν το παθογόνο αλλά μόνο το K165 οι συγκεντρώσεις ήταν πολύ μικρότερες και στις 2 μετρήσεις σε σχέση με τις συγκεντρώσεις με τον μύκητα *V.dahliae*+ K165. Τέλος παρατηρήθηκε ότι στις 10dpi η συγκέντρωση ήταν μεγαλύτερη απ' ό τι στις 20dpi στα φυτά.

Στην **εφαρμογή 5** τα εδαφικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το μεγαλύτερο ποσοστό πάλι άμμος αλλά αυτή τη φορά χρησιμοποιήθηκε μόνο

βερμικουλίτης και όχι οργανική ύλη. Στο γράφημα της εφαρμογής παρατηρήθηκε ότι στις 10dpi τα φυτά που είχαν πάλι τον μύκητα *V.dahliae* και το K165 είχαν πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση απ' ό,τι τα φυτά στις 20dpi. Επίσης τα φυτά που είχαν μόνο το K165 παρατηρήθηκε και σε αυτά ότι στις 10dpi είχαν μια πολύ μεγάλη συγκέντρωση σε σχέση με τις 20dpi που ήταν μικρότερη.



Γράφημα της εφαρμογής 1. (Συγκεντρώσεις του K165 σε εδαφικό υπόστρωμα 55% Άμμος, 40% Οργανική ύλη, 5%Βερμικουλίτης.)

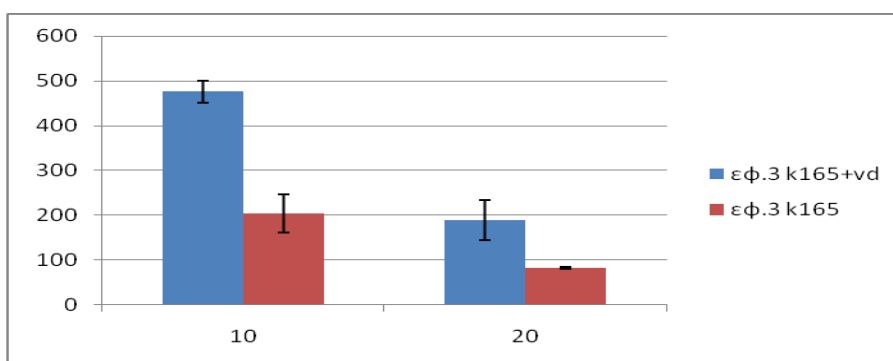


Γράφημα της εφαρμογής 5. (Συγκεντρώσεις του K165 σε εδαφικό υπόστρωμα 80% Άμμος, 20% Βερμικουλίτης)

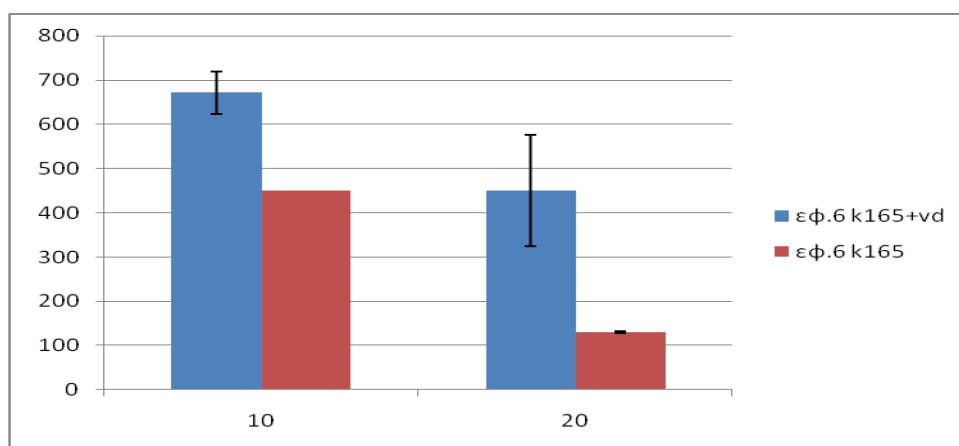
Στα γραφήματα των εφαρμογών 3 και 6 παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση του K165 ήταν μεγαλύτερη στις 10dpi απ' ό,τι στις 20dpi και στην εφαρμογή που υπήρχε το παθογόνο *V.dahliae* αλλά και στην εφαρμογή με το K165 χωρίς το παθογόνο. Στην εφαρμογή 3 χρησιμοποιήθηκε σαν εδαφικό υπόστρωμα ένα μείγμα από άμμο που

ήταν η μικρότερη ποσότητα σε σχέση με τον βερμικουλίτη και την οργανική ύλη που είχαν μεγαλύτερη ποσότητα στο μείγμα. Στο γράφημα παρατηρήθηκε ότι στις 10dpi υπήρχε ξανά μεγαλύτερη συγκέντρωση του K165 απ' ότι στις 20dpi και στην εφαρμογή με τον μύκητα *V.dahliae*+ K165 αλλά και στην εφαρμογή που ήταν το K165 χωρίς το παθογόνο.

Στην **εφαρμογή 6** χρησιμοποιήθηκε μεγαλύτερη ποσότητα άμμου και μικρότερη βερμικουλίτη στο μείγμα του εδαφικού υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκε για τα φυτά. Στο γράφημα παρατηρήθηκε πάλι ότι στις 10dpi υπήρξε πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση απ' ότι στις 20dpi στην εφαρμογή με τον μύκητα *V.dahliae*+ K165. Όπως επίσης και στην εφαρμογή με το K165 όπου η συγκέντρωση ήταν πολύ μεγαλύτερη στις 10dpi απ' ότι στις 20dpi.



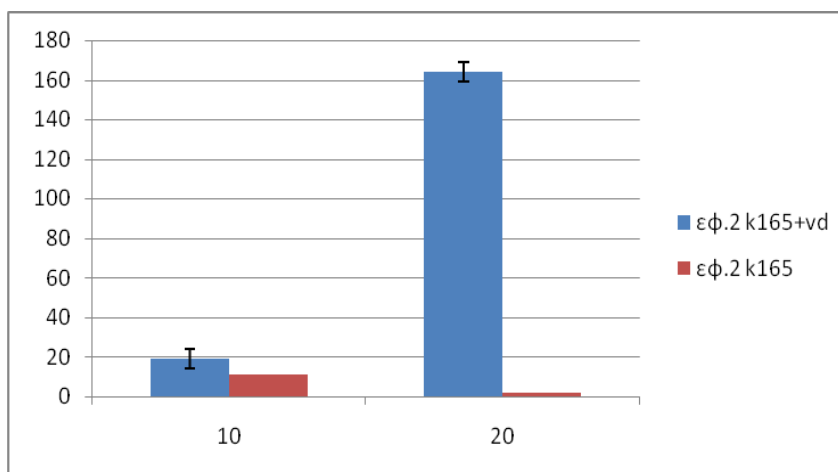
Γράφημα της εφαρμογής 3. (Συγκεντρώσεις K165 σε εδαφικό υπόστρωμα 40% Οργανική ύλη, 40% Βερμικουλίτης, 20% Άμμος)



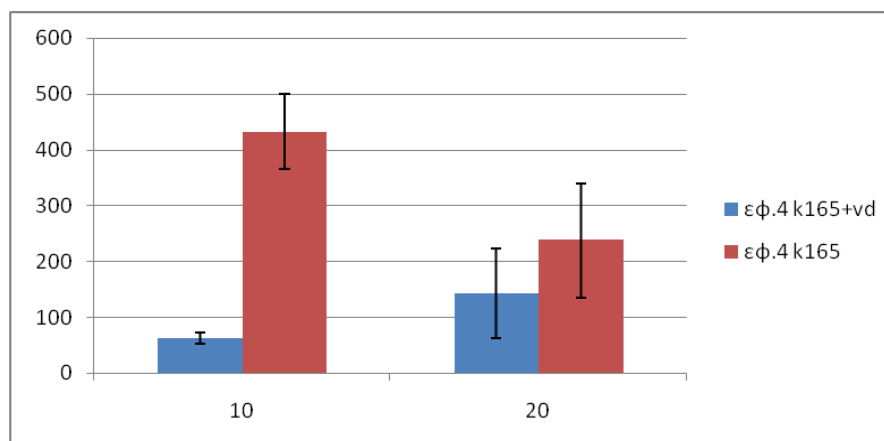
Γράφημα εφαρμογής 6. (Συγκεντρώσεις K165 σε εδαφικό υπόστρωμα 60% Άμμος, 40% Βερμικουλίτης)

Στα γραφήματα των **εφαρμογών 2 και 4** παρατηρήθηκε ότι στην εφαρμογή με τον μύκητα *V.dahliae*+ K165 στις 10dpi υπήρχε μικρότερη συγκέντρωση σε σχέση με τις 20dpi ενώ στην εφαρμογή με το K165 στις 10dpi υπήρχε μεγαλύτερη συγκέντρωση. Πιο συγκεκριμένα στην **εφαρμογή 2** χρησιμοποιήθηκε σαν εδαφικό υπόστρωμα άμμος σε ίση ποσότητα με το βερμικουλίτη και λιγότερη οργανική ύλη. Στο γράφημα παρατηρείται ότι στις 20 dpi στην εφαρμογή με τον μύκητα *V.dahliae*+K165 υπήρχε πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σχέση με τις 10dpi. Ενώ στην εφαρμογή με το K165 στις 10dpi η συγκέντρωση ήταν μεγαλύτερη απ' ότι στις 20dpi.

Στην **εφαρμογή 4** χρησιμοποιήθηκε σαν εδαφικό υπόστρωμα μεγάλη ποσότητα άμμου και μικρότερη βερμικουλίτη χωρίς τη χρήση οργανικής ύλης αυτή τη φορά. Στο γράφημα της **εφαρμογής 4** παρατηρήθηκε ξανά ότι στις 20 dpi στην εφαρμογή όπου υπήρχε τον μύκητα *V.dahliae*+ K165 η συγκέντρωση ήταν πάλι μεγαλύτερη απ' ότι στις 10dpi. Σε αντίθεση με την εφαρμογή με το K165 όπου πάλι στις 10dpi υπήρχε μεγαλύτερη συγκέντρωση απ' ότι στις 20dpi.



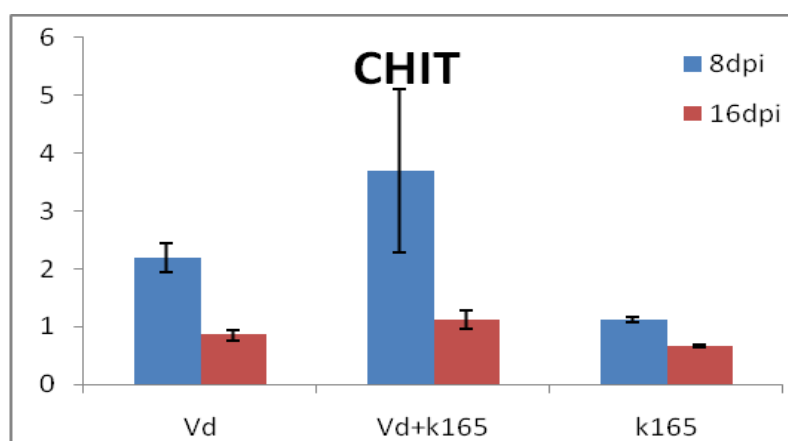
Γράφημα εφαρμογής 2. (Συγκεντρώσεις K165 σε εδαφικό υπόστρωμα 40% Άμμος, 40% Οργανική ύλη, 20% Βερμικουλίτης)



Γράφημα εφαρμογής 4. (Συγκεντρώσεις K165 σε εδαφικό υπόστρωμα 95% Άμμος, 5% Βερμικουλίτης)

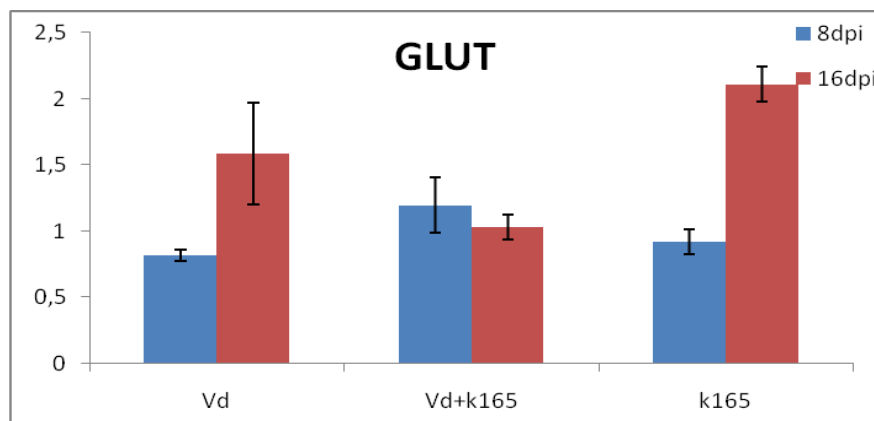
4.3 Αποτελέσματα Real-time PCR

Για να γίνει ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων χιτινάσης (class V chitinase) και γλουκανάσης (ήταν β -1,3-glucanase) χρησιμοποιήθηκε η Real-time PCR. Οι μετρήσεις έγιναν 2 φορές. Τα αποτελέσματα για να διαπιστωθεί αν υπήρξε επαγωγή της έκφρασης τη χιτινάση έδειξαν ότι στις 8dpi σε όλες τις εφαρμογές υπήρξε μεγαλύτερη έκφραση απ' ότι στις 16dpi. Πιο συγκεκριμένα για την εφαρμογή με τον μύκητα *V.dahliae* στις 8 dpi υπήρξε μεγαλύτερη έκφραση του γονιδίου της χιτινάσης σε σχέση με τις 16dpi. Στην εφαρμογή με τον μύκητα *V.dahliae*+K165 υπήρξε μεγαλύτερη έκφραση του γονιδίου στις 8dpi απ' ότι στις 16dpi. Τέλος στην εφαρμογή με το K165 η έκφραση του γονιδίου χιτινάσης ήταν πολύ μικρότερη σε σχέση με τις μετρήσεις των υπολοίπων εφαρμογών



Προσδιορισμός έκφρασης γονιδίων (class V chitinase)

Τα αποτελέσματα για το προσδιορισμό της έκφρασης του γονιδίου της γλουκανάσης έδειξαν ότι σε 2 εφαρμογές υπήρξε μεγαλύτερη έκφραση του γονιδίου στις 16 μέρες από τη μόλυνση απ'ότι στις 8. Πιο συγκεκριμένα η εφαρμογή με τον μύκητα *V.dahliae* είχε μεγαλύτερη έκφραση της γλουκανάσης στις 16 απ'ότι στις 8 μέρες από τη μόλυνση όπως επίσης η συγκεκριμένη εφαρμογή είχε μεγαλύτερη έκφραση στις 16dpi απ'ότι η εφαρμογή με τον μύκητα *V.dahliae*+K165. Τέλος η εφαρμογή με το 165 παρουσίασε ακριβώς τα ίδια αποτελέσματα με την εφαρμογή με το παθογόνο.



Προσδιορισμός έκφρασης γονιδίων (β -1,3-glucanase)

5. Συζήτηση-Συμπεράσματα

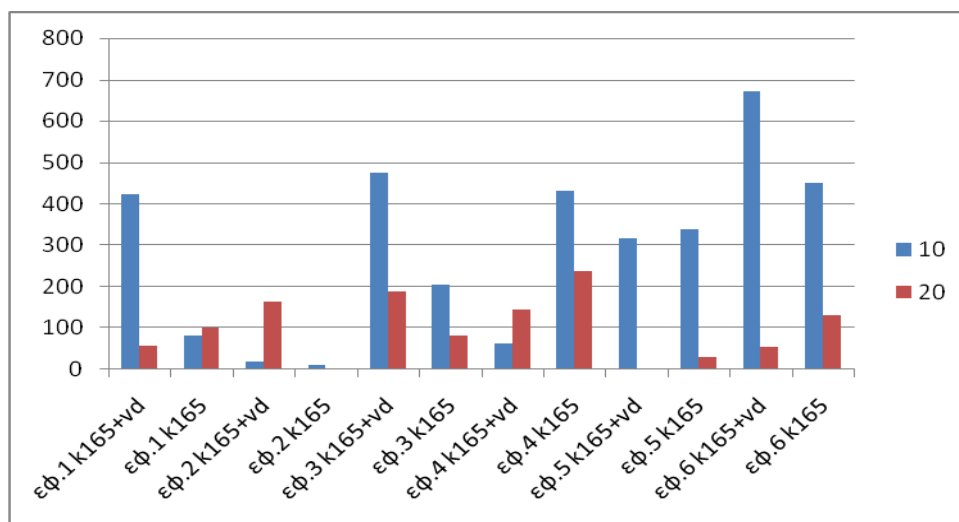
Ο μύκητας *V.dahliae* έχει μεγάλη γεωγραφική εξάπλωση σε πολλές χώρες παγκοσμίως όπως ο Καναδάς, ΗΠΑ και η Ευρώπη. Η Ελλάδα είναι μία από αυτές τις που ο μύκητας ευδοκίμει και προκαλεί μεγάλες οικονομικές καταστροφές. Το παθογόνο προσβάλλει πάνω από 200 είδη ξενιστών όπως κηπευτικά, αυτοφυή φυτά, δενδρώδεις καλλιέργειες κτλ. Είναι ένα από τα σπουδαιότερα παθογόνα που προσβάλλουν το αγγειακό σύστημα των φυτών και είναι πολύ δύσκολο να ελεγχθούν. Η δυσκολία αυτή βασίζεται σε διάφορους παράγοντες όπως η αδυναμία ελέγχου της ασθένειας με τα μυκητοκτόνα από τη στιγμή που ο μύκητας εισέλθει και αποικίσει τα αγγεία του ξύλου, το μεγάλο χρονικό διάστημα ζωής που έχει μέσω των κατασκευών επιβίωσης, μικροσκληρώτια που έχει το παθογόνο, τα οποία μπορούν να παραμείνουν στο έδαφος για μεγάλο χρονικό διάστημα και τέλος το μεγάλο εύρος ξενιστών που προσβάλλει.

Η ανάγκη εύρεσης νέων εναλλακτικών μεθόδων αντιμετώπισης της ασθένειας οδήγησε στη διενέργεια πολλών ερευνητικών εργασιών. Τα τελευταία χρόνια προσπαθούν μέσα από μελέτες και πειράματα να βρουν εναλλακτικούς τρόπους και μεθόδους για την αντιμετώπιση του παθογόνου. Κάποιοι από αυτούς του εναλλακτικούς τρόπους αντιμετώπισης είναι η καλλιέργεια ανθεκτικών ποικιλιών, με την απολύμανση του εδάφους (ηλιοαπολύμανση) και η χρήση βιολογικών παραγόντων. Η χρήση βιολογικών παραγόντων βακτήρια και μύκητες είναι μια μελλοντική, ελπιδοφόρα και αποτελεσματική μέθοδος για την αντιμετώπιση της Βερτισιλλίου καθώς δεν υπάρχουν αποτελεσματικά χημικά σκευάσματα για την καταπολέμηση της ασθένειας. Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες με διάφορους βιολογικούς παράγοντες όπως τα στελέχη *Paenibacillus alvei* K165, *Fusarium oxysporum* F2 κ.α. Σε πολλές από αυτές τις μελέτες τα αποτελέσματα ήταν θετικά παρουσιάζοντας κάποια προστασία ενάντια στο παθογόνο μύκητα *V.dahliae* όπως για παράδειγμα σε μια μελέτη με το στέλεχος F2 του *Fusarium oxysporum* που χρησιμοποιήθηκε σε φυτά μελιτζάνας (Gizi *et al.* 2011).

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη της φυτοπροστατευτικής δράσης του στελέχους *Paenibacillus alvei* K165 εναντίον του μύκητα *Verticillium dahliae* σε φυτά καρπουζιάς που αναπτύχθηκαν σε 6 διαφορετικούς συνδυασμούς εδαφικών υποστρωμάτων. Το στέλεχος K165 ανήκει στη κατηγορία των αυξητικών

ριζοσφαιρικών βακτηρίων τα οποία βρίσκονται στα ακρορίζια των φυτών αλλά και ενδοφυτικά αυτών. Τα αυξητικά ριζοσφαιρικά έχουν την ικανότητα να μεταβάλλουν ολόκληρη την μικροβιακή κοινότητα στη ριζόσφαιρα μέσω της παραγωγής διαφόρων ουσιών. Πειράματα έχουν δείξει ότι το στέλεχος K165 μπορεί να μειώσει τη βλαστική ικανότητα που έχουν τα μικροσκληρώτια του μύκητα *V. dahliae*. Προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι σε δένδρα ελιάς το στέλεχος K165 είχε θετικά αποτελέσματα παρουσιάζοντας προστασία ενάντια του μύκητα *V. dahliae* (Antoniou *et al.* 2015) όπως επίσης και σε φυτά *Arabidopsis thaliana* (Tjamos *et al.* 2005). Τέλος, στη παρούσα εργασία μελετήθηκε, ο πληθυσμός του K165 σε 6 διαφορετικά υποστρώματα και η έκφραση γονιδίων άμυνας στα φυτά των διαφορετικών πειραματικών εφαρμογών.

Τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις των συγκεντρώσεων του K165 ήταν ότι μόνο 2 από τις 6 εφαρμογές (**εφαρμογή 2** 40% Άμμος, 40% Οργανική ύλη, 20% Βερμικουλίτης και η **εφαρμογή 4** (95% Άμμος, 5% Βερμικουλίτης) έδειξαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του K165 στην εφαρμογή με τον μύκητα *V.dahliae*+K165. Πιο αναλυτικά η **εφαρμογή 2 και 4** έδειξαν αύξηση των συγκεντρώσεων από τις 10dpi μέχρι και τις 20dpi, η **εφαρμογή 2** (40% Άμμος, 40% Οργανική ύλη, 20% Βερμικουλίτης) είχε μια πολύ ικανοποιητική αύξηση όπως φαίνεται και στο γράφημα στην εφαρμογή με το μύκητα *V.dahliae*+K165 όπως επίσης και η **εφαρμογή 4** (95% Άμμος, 5% Βερμικουλίτης) . Όσο αφορά την εφαρμογή τώρα που υπήρχε μόνο το K165 στα φυτά τα αποτελέσματα ήταν ότι στις 10dpi έδειξαν θετικά αποτελέσματα ενώ στις 20dpi υπήρξε μείωση της συγκέντρωσης και στις 2 εφαρμογές. Τέλος στις **εφαρμογές 6** (60% Άμμος, 40% Βερμικουλίτης) **εφαρμογή 5** (80% Άμμος, 20% Βερμικουλίτης) η συγκέντρωση μειώθηκε αρκετά.



Συνολικό γράφημα. Συγκεντρώσεις του K165 σε όλες τις εφαρμογές.

Τα πειράματα παθογένειας έδειξαν ότι όπου υπήρχε μεγάλη ποσότητα άμμου τα αποτελέσματα ήταν θετικά. Πιο συγκεκριμένα θετικά αποτελέσματα και σχετική προστασία από τον μύκητα *V.dahliae* έδειξαν η **εφαρμογή 1,3,4 και 6**. Με την **εφαρμογή 1** να δίνει πολύ θετικό αποτέλεσμα στα φυτά έχοντας σαν εδαφικό υπόστρωμα 95% Άμμος, 5% Βερμικουλίτης. Τα συμπτώματα που σημειώθηκαν ήταν ελάχιστα σε όλη τη διάρκεια της παρακολούθησης και των 35 ημερών δηλαδή. Όπως επίσης και η **εφαρμογή 4** με εδαφικό υπόστρωμα 40% Άμμος, 40% Οργανική ύλη και 20% Βερμικουλίτης είχε θετικά αποτελέσματα καθώς τα συμπτώματα των φυτών με το K165 παρέμειναν σταθερά ως το τέλος της καταγραφής των συμπτωμάτων. Πολύ λίγα συμπτώματα έδειξε επίσης και η **εφαρμογή 6** (60% Άμμος, 40% Βερμικουλίτης) στους δίσκους με τη χρήση του K165, όπου παρατηρείται πάλι ότι εκεί όπου υπήρξε μεγάλη ποσότητα άμμου τα αποτελέσματα έδειξαν προστασία στα φυτά καρπουζιάς. Τέλος, θετικά αποτελέσματα έδειξε και η **εφαρμογή 3** (55% Άμμος, 40% Οργανική ύλη, 5% Βερμικουλίτης) η οποία σε σχέση με την εφαρμογή με το παθογόνο όπου τα συμπτώματα ήταν πολλά, στην εφαρμογή με το K165 παρατηρήθηκε μικρή θετική επίδραση. Τέλος στις εφαρμογές που η άμμος ήταν σε πολύ μικρά ποσοστά τα συμπτώματα των ασθενών φύλλων ήταν περισσότερα όπως επίσης και στην εφαρμογή που είχε χρησιμοποιηθεί μόνο αποστειρωμένο φυτόχομα.

Στις μετρήσεις της έκφρασης του γονιδίου της χιτινάσης παρατηρήθηκε ότι και στις 3 εφαρμογές η έκφραση του γονιδίου της χιτινάσης ήταν μικρότερη στις 16dpi απ' ότι στις 8dpi, με την εφαρμογή *V.dahliae*+K165 να έχει την υψηλότερη έκφραση απ' όλες τις άλλες εφαρμογές. Τέλος ,σχετικά με την έκφραση του γονιδίου της

γλουκανάσης παρατηρήθηκε ότι σε 2 εφαρμογές υπήρξε αύξηση στην έκφραση των γονιδίων στις 16 μέρες μετά από την μόλυνση σε σχέση με τις 8. Αυτές οι εφαρμογές ήταν η εφαρμογή με το μύκητα *V.dahliae* και αυτή με το K165 παρατηρήθηκε ότι η εφαρμογή που είχε και το παθογόνο και το K165 παρουσίασε μικρότερη αύξηση του γονιδίου. Συνοπτικά η έκφραση του γονιδίου της γλουκανάσης ήταν μικρότερη σε σχέση με τη χιτινάση.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν την δυνατότητα του στελέχους K165 να προστατεύει φυτά καρπουζιού από το μύκητα *V. dahliae*. Η δράση αυτή φαίνεται ότι εξαρτάται από το εδαφικό υπόστρωμα, όπως επίσης εξαρτάται και η μολυσματική δράση του μύκητα *V. dahliae*.

Βιβλιογραφία

1. **Agrios, G.N (2004)** Plant Pathology (Amsterdam etc., Elsevier Academic Press)
2. **Antoniou, P., Tsitsigiannis, D., Tjamos, S., Kountouri, S., Paplomatas, E., Tjamos, E. 2013** Soil Solarization in combination with grafting. Laboratory of Plant Pathology Departement of crop Science, Argicultural University of Athens
3. **Antoniou, P., Tsitsigiannis, D., Tjamos, S., Kountouri, S., Paplomatas, E., Tjamos, E. 2013** Soil solarization. Laboratory of Plant Pathology Departement of crop Science, Agricultural University of Athens
4. **Antoniou, P, Tjamos E.C., Markakis, E., 2015** Biological control of Verticillium wilt of olive by *Paenibacillus alvei*, strain K165. Biol Control 61:293-303
5. **Antonopoulos DF, Tjamos SE, Antoniou PP, Rafeletos P, Tjamos EC (2008)** Effect of *Paenibacillus alvei*, strain K165, on the germination of *Verticillium dahliae* microsclerotia in planta. Biol Control 46:166-170
6. **Azad, H.R, J.R. Davis, W.C. Schnathorst, and C.I. Kado. 1985.** Relationships between rhizoplane and rhizosphere bacteria and *Verticillium* wilt resistance in potato. Arch. Microbiol., 140: 347-351.
7. **Azad,H R., J.R. Davis, W.C. Schnathorst, and C.I. Kado 1987.** Influence of *Verticillium* wilt resistant and susceptible potato genotypes on populations of antagonistic rhizosphere and rhizoplane bacteria and free nitrogen fixers. Appl. Microbiol. Biotechnol., 26: 99-104.
8. **Βακαλουνάκης, Δ.Ι. 2006** Ασθένειες των κολοκυνθοειδών, Διάγνωση και αντιμετώπιση.

9. **Βακαλουνάκης, Δ.Ι. και Φραγκιαδάκης, Γ.Α. 2003** Φυτοπαθοβελτίωση με έμφαση στην τομάτα και τα κολοκυνθοείδη. Εκδόσεις Τυποκρετα α.ε. σελ. 356-363.και 367-369.
10. **Brandt, W.H. 1964.** Morphogenesis in *Verticillium*: effects of light and ultraviolet radiation on microsclerotia and melanin. *Can. J. Bot.* 42: 2017-2023.
11. **Brinkerhoff, L.A. 1973.** Effect of environment on the Pathogen and the disease. Pages 78-79 in: *Verticillium wilt of Cotton*. Proc. Work Conf., Aug.30–Sept. 1, 1971.
12. **Cole, H., W.R. Wills, and L.B. Massie. 1972.** Influence of chemical seed and soil treatments on *Verticillium*-induced yield reduction and tuber defects. *Am. Pot. J.* 48: 79-92.
13. **Davis, J.R. and D.O. Everson. 1986.** Relation of *Verticillium dahliae* in soil and potato tissue, irrigation method, and N-fertility to *Verticillium* wilt of potato. *Phytopathology*. 76: 730-736.
14. **Davis, J.R. and D.O. Everson. 1986.** Relation of *Verticillium dahliae* in soil and potato tissue, irrigation method, and N-fertility to *Verticillium* wilt of potato. *Phytopathology*. 76: 730-736
15. **Davis, J.R. and G.M. MacMaster. 1979.** Irrigation and nutritional relationship associated with *Verticillium* wilt of Russet Burbank potato. (Abstr.) *Phytopathology*, 69: 915.
16. **Δημητριάδης, Σ.Α. 1970.** Μαθήματα Φυτοπαθολογίας. Τόμος Β' Ειδική Φυτοπαθολογία (Νοσολογία). Αθήνα, σελ. 395.

- 17. Dutta, B.K. and I. Isaac. 1979.** Effects of inorganic amendments (N, P and K) to soil on the rhizosphere microflora of antirrhinum plants infected with *Verticillium dahliae* Kleb. Plant and Soil, 52: 561-56
- 18. Easton, G.D., M.E. Nagle, and D.L. Bailey. 1969.** A method of estimating *Verticillium albo-atrum* propagules in field soil and irrigation wastewater. Phytopathology, 50: 1171-1172.
- 19. Edgington, L.V., and J.C. Walker. 1957.** Influence of soil and air temperature of *Verticillium albo-atrum* in soil. Phytopathology 47: 594-598.
- 20. Emmatty, D.A., and R.J. Green Jr. 1969.** Fungistasis and the behavior of the microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* in soil. Phytopathology 57:810-811
- 21. Fravel, D. R. and J. J. Marois. 1986.** Edaphic parameters associated with establishment of the biocontrol agent *Talaromyces flavus*. Phytopathology, 76: 643-646
- 22. Fravel, D.R. 1989.** Biocontrol of *Verticillium* wilt of eggplant and potato. In: Vascular Wilt Diseases of Plants. E.C. Tjamos and C.H. Beckman, eds. NATO ASI Series, Vol. H28: 487-492. Springer - Verlag, 590 pp.
- 23. Fravel, D.R. 1989.** Biocontrol of *Verticillium* wilt of eggplant and potato. In: Vascular Wilt Diseases of Plants. E.C. Tjamos and C.H. Beckman, eds. NATO ASI Series, Vol. H28: 487-492. Springer - Verlag, 590 pp.
- 24. Fravel, D.R., J.R. Davis, and L.H. Sorensen. 1986a.** Biological control of *Verticillium* wilt of potato in the field by *Talaromyces flavus*. (Abstr.) Phytopathology, 76: 563.
- 25. Gizi,D., Stringlis, A.I., Tjamos, E.S.,C Paplomatas, J.E 2011.** Seedling vaccination by stem injecting a conidial suspension of F2, a non-pathogenic

- Fusarium oxysporum strain, suppresses Verticillium wilt of eggplant. Biological Control 58 (2011) 387–392
26. **Glick, B.R. (2012)** Plant Growth- Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Hindawi Publishing Corporation, Scientifica
 27. **Gordon, T.R., J.M. Duniway, A.O. Paulus, M. Vilchez, and F. Westerlund. 1997.** The effect of chemical fumigants and cover crops on soilborne pathogens of strawberries in California. Page 82 in: Abstr. 7th International Verticillium Symposium, Oct. 6-10, Athens, Hellas.
 28. **Green R.J.Jr 1967.** Control of Verticillium wilt of peppermint by crop rotation sequences. Plant Dis. Rep.51:449-453
 29. **Green, R.J. and G.C Papavizas 1968.** The effect of carbon source, carbon to nitrogen ratios and organic amendments on survival of propagules of *Verticillium albo-atrum* in soil. Phytopathology, 58:567-570
 30. **Green, R.J. Jr. 1969.** Survival and inoculum potential of conidia and microsclerotia of *Verticillium-albo-atrum* in soil. Phytopathology 59: 874-876.
 31. **Green, R.J.Jr. 1980.** Soil factors affecting survival of microsclerotia of *Verticillium dahliae*. Phytopathology 70: 353-355.
 32. **Heimann, M.F., Wolf, G.L. 1997.** Maple and other trees disorder: Verticillium wilt. University of Wisconsin.
 33. **Henis, 1971.** Factors affecting germination of microsclerotia of *Verticillium dahliae*. (Abstr.) Page 17 in: Proc. 1st Internl. Verticillium Symposium, Sept. 19-23, Wye College, England.
 34. **Ingold, C.T. 1962.** The reaction of fungi to light and the problem of protoreception. Symposium Soc. Exptl. Biol., 16:154-169

- 35. Ioannou, N.R., W. Schneider, and R.G. Grogan. 1977.** Effect of oxygen, carbon dioxide, and ethylene on growth, sporulation, and production of microsclerotia by *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 67: 645-650.
- 36. Kadow, K.J. 1934.** Seed transmission of *Verticillium* wilt of eggplants and tomatoes. *Phytopathology* 24: 1265-1268.
- 37. Keyworth, W.G., and E.J. Hewitt. 1948.** *Verticillium* wilt of the hop. V. The influence of nutrition on thereaction of the hop plant to infection with *V. albo-atrum*. *J. Hort. Sci.* 24: 219-227.
- 38. Kloepper, J.W., and Schroth, M.N. (1981)** Relationship of in vitro antibiosis of plant growth promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. *Phytopathology* 71: 1020-1024
- 39. Krikun, J., D. Orion, A. Nachmias, and R. Reuveni. 1982.** The role of soil-borne pathogens under conditions of intensive agriculture. *Phytoparasitica* 10: 247-258.
- 40. Ligoxigakis E.K, and D.J. Vakalounakis. 1994.** The incidence and distribution of races of *Verticillium dahliae*. *Plant Pathology* 43: 755-758.
- 41. Ligoxigakis, E.C. 1991.** Identification of physiological races of *Verticillium dahliae* Kleb. On tomato in Crete. Master thesis, M.A.I.Ch., pp. 64.
- 42. Ligoxigakis, E.C., and D.J. Vakalounakis. 1992.** Occurrence of race 2 of *Verticillium dahliae* on tomatoes in Crete. *Plant Pathology* 41: 774-776.
- 43. Ligoxigakis, E.K., and D.J. Vakalounakis. 1997.** Hosts of *Verticillium dahliae* Race 2 in Greece. Page 49 in: Abstr. 7th Internl *Verticillium* Symposium, Oct. 20-24, Athens, Hellas.
- 44. Λιγοξυγκάκης, Ε.Κ. και Δ.Ι. Βακαλουνάκης 1996.** Νέοι ξενιστές του μύκητα *Verticillium dahliae* στην Ελλάδα και παγκοσμίως. Σελίδα 86 στις:

Περιλήψεις 8ου Πανελληνίου Φυτοπαθολογικού Συνεδρίου (22-24 Οκτ.),
Ηράκλειο Κρήτης

- 45. Λιγοξυγκάκης, E.K. 1998** Μελέτη των Βερτισιλλιώσεων των φυτών στη νήσο Κρήτη. Διδακτορική Διατριβή, Σχολή Γεωτεχνικών Επιστημών, Τμήμα Γεωπονίας, Θεσσαλονίκη
- 46. Lottmann, J., H. Hener, K. Smalla, and G. Berg. 1997.** Beneficial bacteria in microenvironments of underground organs of potato. In: Abstr. 7th International Verticillium Symposium, Oct. 6-10, Athens, p. 69.
- 47. Malandraki, I., Tjamos, S.E., Pantelides, I.S., and Paplomatas, E.J. (2008).** Thermal inactivation of compost suppressiveness implicates possible biological factors in disease management. *Biological Control* 44, 180-187
- 48. Malathrakis, N. 1985.** Chemical disinfections of the soil. Pages 36-37 in: Abstr. 3th National Phytopath. Conf. Oct. 16-18, Volos, Greece.
- 49. Marois, J.J., S.A. Johnston, M.T. Dunn, and G.C. Papavizas. 1982.** Biological control of Verticillium wilt of eggplant in the field. *Plant Dis.*, 66: 1166-1168.
- 50. Marois. J.J., D.R. Fravel, and G.C. Papavizas. 1984.** Ability of *Talaromyces flavus* to occupy the rhizosphere and its interaction with *Verticillium dahliae*. *Soil Biol, and Biochem.*, 16: 387-39
- 51. Menzies, J.D. 1962.** Effect of anaerobic fermentation in soil on survival of sclerotia of *Verticillium dahliae* (Abstr.) *Phytopathology* 52: 743.
- 52. Menzies, J.D., and G.E. Griebel. 1967.** Survival and saprophytic growth of *Verticillium dahliae* in uncropped soil. *Phytopathology* 57: 703-709.

53. **Παναγόπουλος, Χ.Ι. 2000.** Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών Β' Έκδοση. Εκδόσεις Α. Σταμούλης Αθήνα σελ. 71- 73 και 254-263.
54. **Παναγόπουλος, Χ.Γ. 1993.** Ασθένειες καρποφόρων δένδρων και αμπέλου. Β' Έκδοση Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα, σελ: 463.
55. **Παπαδημητρώπουλος, Γ. 2018** Η φλούδα από το καρπούζι και οι...μαγικές της ιδιότητες!, site: itrofi 9 Αυγούστου 2018
56. **Pegg, G.F. 1974.** Verticillium diseases. Rev. Pl. Pathol. 53:157-182. Commonwealth Mycological Institute.
57. **Pegg, G.F. 1984.** The impact of Verticillium diseases in agriculture. Phytopath. medit. 23:176-192.
58. **Roberts, F.M. 1943.** Factors influencing infection of tomato by Verticillium albo-atrum. Ann. appl. Biol., 30:327-331.
59. **Sackston, W.E., and J.W. Martens. 1959.** Dissemination of *Verticillium albo-atrum* on seed of sunflower (*Helianthus annuus*). Can. J. Bot. 37: 759-768
60. **Sackston, W.E., W.C. McDonald, and J. Martens. 1957.** Leaf mottle or Verticillium wilt of sunflower. Plant Dis. Reprt., 41: 337-343.
61. **Saeed, M.A.I, Macquidwin, A.E. and Rouse, D.I. 1998** Effect of initial Nematode population Density on the Interaction of *Pratylenchus penetrans* and *Verticillium dahliae* on 'Russet Burbank' Potato. Journal of Nematode 30(1): 100-107
62. **Scholte, K. 1990.** Causes of differences in growth pattern, yield and quality of potatoes (*Solanum tuberosum* L.) in short rotation on sandy soil as affected by crop rotation, cultivar and application of granular nematicides. Potato Research 33: 181-190.

- 63. Sewell, G.W.F and J.F Wilson 1967.** Verticillium wilt of the hop: Field studies on wilt in a resistant cultivar in relation to nitrogen fertilizer applications. Ann. appl. Biol 59:265-273
- 64. Sewell, G.W.F and J.F Wilson 1969.** Verticillium wilt of the hop: disease control by reduced nitrogen fertilizer applications. Rep. E. Malling Res. Stn for 1968(1969) pp.175-177.
- 65. Sewell, G.W.F and J.F Wilson 1974.** Hop wilt soil temperature and nitrogen. Rep. E.Malling Res. Stn for 1973(1974) pp.203-204
- 66. Sherf, A.F., and A.A. MacNab. 1986.** Vegetable Diseases and their Control. (2nd ed.). John Wiley & sons, eds. New York, USA, pp. 728.
- 67. Sherf, A.F., and A.A. MacNab. 1986.** Vegetable Diseases and their Control. (2nd ed.). John Wiley & sons, eds. New York, USA, pp. 728.
- 68. Slusarski, C., Ciesielska, J., Malusa, E., Meszk, B., Sobiczewski, P. 2012** Dazomet (MITC generator formulations) and beneficial microorganisms for soil fumigation. Skierniewice
- 69. Steven B. Johnson, Ph.D** Verticillium Wilt of Potatoes University of Maine Cooperative Extension.<https://extension.umaine.edu/publications/5041e/>
- 70. Strauss, M. 2015** The 5,000-Year Secret History of the Watermelon. NATIONAL GEOGRAPHIC, PUBLISHED AUGUST 21, 2015
- 71. Subbarao, K.V., and J.C. Hubbart. 1966.** Effect of broccoli residue and temperature on *Verticillium dahliae* in soil. (Abstr.) Phytopathology 86:S14
- 72. Subbarao, K.V., Kabir, Z., Martin, F.N., and Koike, S.T. (2007).** Management of soilborne diseases in strawberry using vegetable rotations. Plant Dis 91:964-972

- 73. Termorshuizen, A. J. 1997.** Sporulation of *Verticillium dahliae*. Page 34 in: Abstr. 7th Internl Verticillium Symposium (Oct. 6-10) Athens, Hellas
- 74. Thanassouloupoulos, C.C., and G.T. Kitsos. 1972.** Verticillium wilt in Greece. Plant Dis. Rep. 56: 264-267
- 75. Thanassouloupoulos, C.C., D.A. Biris, and E.C. Tjamos. 1980.** Dissemination of Verticillium propagules in olive orchards by irrigation water. In: Proe. 5th Congr. Medit. Phytopath. Union, Sept. 21-27, Patras, Greece, pp. 52-53.
- 76. Θανασουλόπουλος, Κ. 1992.** Μυκητολογικές ασθένειες δένδρων και αμπέλου. Μαθήματα Ειδικής Φυτοπαθολογίας. Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη, σελ. 247.
- 77. Tjamos E.S, Flemetakis, E., Paplomatas, E., Katinakis, P. 2005.** Induction of Resistance to *Verticillium dahliae* in *Arabidopsis thaliana* by the Biocontrol Agent K-165 and Pathogenesis-Related Proteins Gene Expression. Agricultural University of Athens, Laboratory of Plant Pathology and Laboratory of Molecular Biology,
- 78. Tjamos, E.C. 1989.** Problems and prospects in controlling Verticillium wilt. In: Vascular Wilt Diseases of Plants. E.C. Tjamos and C.H. Beckman, eds. NATO ASI Series, Vol. H28: 441-456. Springer-Verlag, pp 590.
- 79. Tjamos, E.C., and E. Vellios. 1997.** Studies on the effect of biocontrol agents on *Verticillium dahliae* microsclerotia formation, survival and germination in infected host tissues and soil. Page 37 in: Abstr. 7th Internl Verticillium Symposium, Oct. 6-10, Athens, Hellas.

- 80. Tjamos. E.C. 1997.** Strategies in developing methods and applying techniques for the biological control of *Verticillium dahliae*. In: Abstr. 7th Internantional Verticillium Symposium, Oct. 6-10, Athens, Hellas, p.60.
- 81. Τζάμος. Ε.Κ. 1989.** Μυκητολογικές ασθένειες κηπευτικών και ετήσιων καλλιεργειών που συνιστούν φυτοπαθολογικά προβλήματα στην Ελλάδα. Εισήγηση στο 5^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, 11 -13 Οκτ. 1989. Θεσσαλονίκη. Δελτίο Ελληνικής Φυτοπαθολογικής Εταιρείας, 3:28-35, 1994.
- 82. Tolmsoff, W.J and R.A.Young 1959.** The influence of crop residues and fertilizer on the development and severity of *Verticillium* wilt of potatoes. (Abstr.) Phtopathology 49:114.
- 83. Van-Loon,L.C.,2007** Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. Plant Pathol 119:243-254
- 84. Wilhelm, S. 1951.** Is *Verticillium albo-atrum* a soil invader or soil inhabitant? (Abstr.) Phytopathology, 41:944-945
- 85. Wright, R., 1989.** Evaluation of propagation mediums trough rooting response of *Hedera helix* 'Ivalace'. Ivy Journal. 1989, 15: 28-32.