

Η επίδραση του ζεόλιθου στην αντιμετώπιση
των μυκήτων
Rhizoctonia solani και *Sclerotinia*
sclerotiorum στο μαρούλι

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΕΙΡΗΝΗ Γ. ΠΟΥΛΑΚΗ

Επιβλέπων: Σωτήρης Τζάμος, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.



Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Φυτικής Παραγωγής-Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας
ΠΜΣ: Ολοκληρωμένα Συστήματα Φυτοπροστασίας και Διαχείρισης
του Περιβάλλοντος
2019

Η επίδραση του ζεόλιθου στην αντιμετώπιση των μυκήτων *Sclerotinia sclerotiorum* και *Rhizoctonia solani* στο μαρούλι

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΕΙΡΗΝΗ Γ. ΠΟΥΛΑΚΗ**

Επιβλέπων: Σωτήρης Τζάμος, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

ΠΜΣ: Ολοκληρωμένα Συστήματα Φυτοπροστασίας και Διαχείρισης του Περιβάλλοντος

Η επίδραση του ζεόλιθου στην αντιμετώπιση των μυκήτων *Sclerotinia sclerotiorum* και *Rhizoctonia solani* στο μαρούλι

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΕΙΡΗΝΗ Γ. ΠΟΥΛΑΚΗ**

Επιβλέπων

Τζάμος Σωτήριος

Εξεταστική Επιτροπή

Παπλωματάς Επαμεινώνδας, Καθηγητής

Τσιτσιγιάννης Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Τζάμος Σωτήριος, Επίκουρος Καθηγητής

*Στην οικογένεια μου,
για την αγάπη και την υποστήριξη τους*

Ευχαριστίες

Για την επιτυχή διεκπεραίωση και ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας πολύτιμη ήταν η βοήθεια ορισμένων ανθρώπων τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Πρώτα από όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Επίκουρο Καθηγητή Τζάμο Σωτήριο τόσο για την ανάθεση της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής μελέτης όσο για την επιστημονική καθοδήγηση και την καθοριστική του συμβολή καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της. Επίσης θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά για τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε, την συμπαράσταση του και τις εύστοχες παρατηρήσεις του που με βοήθησαν στην ολοκλήρωση της μελέτης.

Ακόμη θα ήθελα να απευθύνω ιδιαίτερες ευχαριστίες στον Καθηγητή και διευθυντή του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας Παπλωματά Επαμεινώνδα, στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Χατζιβασιλείου Ελλισσάβη, στον Αναπληρωτή Καθηγητή Τσιτσιγιάννη Δημήτριο, στη Λέκτορα Τζίμα Αλίκη αλλά και στη διδάκτορα Φραγκογεώργη Γαρυφαλλιά για τις γνώσεις που μου προσέφεραν αλλά και που υπήρξαν πρόθυμοι να με βοηθήσουν και να μου λύσουν οποιαδήποτε απορία.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες Δανάη Γκίζη και Σταύρο Παλαβούζη για την πολύτιμη βοήθεια τους καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους φοιτητές του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα που δημιούργησαν στο εργαστήριο καθώς και για το ειλικρινές ενδιαφέρον τους για την πρόοδο της εργασίας μου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές του μεταπτυχιακού για τις καινούριες γνώσεις που μου προσέφεραν και για τις πολύτιμες συμβουλές τους αλλά και όλο το προσωπικό του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών που με βοήθησε σε ό,τι χρειάστηκα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	1
Abstract.....	3
Εισαγωγή	4
1.1 Οικονομική σημασία των εδαφογενών παθογόνων	4
1.2 <i>Rhizoctonia solani</i>	4
1.2.1 Ταξινόμηση του μύκητα <i>R. solani</i>	7
1.2.2 Διαχείμαση του μύκητα <i>R. solani</i>	9
1.2.3 Μετάδοση – Μόλυνση του μύκητα <i>R. solani</i>	10
1.2.4 Συμπτώματα του μύκητα <i>R. solani</i>	11
1.3 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	13
1.3.1 Ταξινόμηση του μύκητα <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	13
1.3.2 Διαχείμαση του μύκητα <i>S. sclerotium</i>	15
1.3.3 Μετάδοση – Μόλυνση του μύκητα <i>S. sclerotium</i>	16
1.3.4 Συμπτώματα του μύκητα <i>S. sclerotium</i>	16
1.4 Αντιμετώπιση παθογόνων	18
1.4.1 Χημική αντιμετώπιση	18
1.4.2 Βιολογική αντιμετώπιση.....	19
1.4.3 Τρόποι αντιμετώπισης του μύκητα <i>R. solani</i>	20
1.4.4 Τρόποι αντιμετώπισης του μύκητα <i>S. sclerotium</i>	21
1.5 Μηχανισμοί άμυνας των φυτών.....	23
1.5.1 Επαγωγή της διασυστηματικής αντοχής των φυτών (Ανοσοποίηση).....	24
1.5.1.1 Παράγοντες διέγερσης της ανοσοποίησης	25
1.5.1.2. Βιοχημικοί παράγοντες της ανοσοποίησης	26
1.5.2 Διεγέρτες που επάγουν τους αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών	29
1.5.3 Μεταγωγή σήματος με έκφραση αντοχής	30
1.6 Ζεόλιθος	31
1.6.1 Χρήση Ζεόλιθου στη γεωργία.....	32
Σκοπός.....	33
Υλικά και μέθοδοι	34
3.1 Βιολογικό υλικό	34

3.2 Φυτικό υλικό	34
3.3 Ζεόλιθος	34
3.4 Θρεπτικό υλικό	35
3.5 Πείραμα όπου ο ζεόλιθος προστέθηκε σε ποσοστό 1% και 10% στη μεταφύτευση των φυτών	35
3.5.1 Σπορά σπόρων φυτών μαρουλιού	35
3.5.2 Παρασκευή μολύσματος	35
3.5.2.1 Παρασκευή εμβολιασμένων τρυβλίων με τους παθογόνους μύκητες.....	35
3.5.2.2 Παρασκευή μολύσματος.....	35
3.5.3 Μεταφύτευση φυτών μαρουλιού σε υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο....	36
3.6 Πείραμα όπου ο ζεόλιθος προστέθηκε σε ποσοστό 1% και 10% στο υπόστρωμα σποράς των φυτών	37
3.6.1 Σπορά σπόρων φυτών μαρουλιού	37
3.6.2 Παρασκευή μολύσματος	37
3.6.2.1 Παρασκευή εμβολιασμένων τρυβλίων με τους παθογόνους μύκητες.....	37
3.6.2.2 Παρασκευή μολύσματος.....	37
3.6.3 Μεταφύτευση φυτών μαρουλιού σε υπόστρωμα με χώμα	38
3.7 Καταγραφή συμπτωμάτων και μέτρηση νωπού βάρους.....	39
3.8 Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων <i>PR1</i>, <i>LOX</i> και <i>ERF1</i>.....	39
3.9 Απομόνωση RNA από τα φυτά μαρουλιού	40
3.10 Μέτρηση νουκλεϊκών οξέων	41
3.11 Σύνθεση cDNA.....	41
3.12 Έκφρασης των γονιδίων <i>PR1</i>, <i>LOX</i> και <i>ERF1</i>	42
Αποτελέσματα	45
4.1 Πειράματα παθογένειας	46
4.1.1 Πείραμα παθογένειας σε φυτά που μολύνθηκαν με το μύκητα <i>R. solani</i> .	46
4.1.2 Πείραμα παθογένειας σε φυτά που μολύνθηκαν με το μύκητα <i>S. sclerotiorum</i>	50

4.2 Πειράματα μέτρησης νωπού βάρους υπέργειου τμήματος.....	55
4.2.1 Φυτά μαρουλιού που μεταφυτεύτηκαν σε υπόστρωμα που περιείχε ζεόλιθο.....	55
4.2.2 Φυτά μαρουλιού που στο υπόστρωμα σποράς περιείχαν ζεόλιθο.....	57
4.3 Διερεύνηση της έκφρασης των γονιδίων <i>PR1</i>, <i>ERF1</i> και <i>LOX</i>.....	61
4.3.1 Έκφραση του γονιδίου <i>PR1</i>	62
4.3.2 Έκφραση του γονιδίου <i>ERF1</i>	64
4.3.3 Έκφραση του γονιδίου <i>LOX</i>	66
Συζήτηση - Συμπεράσματα.....	68
Βιβλιογραφία	73

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα εδαφογενή παθογόνα *R. solani* και *S. sclerotiorum* συγκαταλέγονται στις σημαντικότερες ασθένειες της καλλιέργειας του μαρουλιού. Στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης έγινε αξιολόγηση της βιολογικής αντιμετώπισης των δύο παθογόνων με τη χρήση, ενός ορυκτού, του ζεόλιθου σε ποσοστό 1% και 10%. Ο ζεόλιθος προστέθηκε στο υπόστρωμα σποράς των φυτών τα οποία μεταφύτευτηκαν σε μολυσμένο χώμα, αλλά και στο μολυσμένο υπόστρωμα μεταφύτευσης των φυτών που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα. Παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη ζεόλιθου στο υπόστρωμα της μεταφύτευσης μείωσε το εμβαδό ασθενείας στα φυτά που μολύνθηκαν με το μύκητα *S. sclerotiorum* σε σχέση με τον μάρτυρα. Αντίθετα τα φυτά που μολύνθηκαν με τον μύκητα *R. solani* δεν παρουσίασαν διαφορά με τον μάρτυρα, εκτός από την εφαρμογή που προστέθηκε ζεόλιθος σε ποσοστό 10% όπου τα φυτά παρουσίασαν λιγότερα συμπτώματα σε σχέση με το μάρτυρα. Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη ζεόλιθου στο υπόστρωμα σποράς μείωσε το σχετικό εμβαδό ασθενείας στα φυτά που μολύνθηκαν με το μύκητα *S. sclerotiorum* σε σχέση με τον μάρτυρα. Όμως στα φυτά που μολύνθηκαν με το μύκητα *R. solani* το σχετικό εμβαδό ασθενείας δεν παρουσίασε διαφορά με το μάρτυρα, εκτός από την εφαρμογή όπου ο ζεόλιθος προστέθηκε σε ποσοστό 1% όπου μειώθηκε σε σχέση με το μάρτυρα. Ακολούθησε η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *PR1*, *ERF1* και *LOX* σε φυτά όπου στο υπόστρωμα μεταφύτευσης είχε εφαρμοσθεί ο ζεόλιθος σε ποσοστό 10% σε συνδυασμό με τον μύκητα *S. sclerotiorum* αλλά και σε φυτά όπου στο υπόστρωμα μεταφύτευσης είχε εφαρμοσθεί ο ζεόλιθος σε ποσοστό 10% σε συνδυασμό με τον μύκητα *R. solani*. Τα γονίδια *PR1*, *ERF1* και *LOX* είναι δείκτες της ενεργοποίησης του μηχανισμού άμυνας των φυτών που εξαρτάται από το σαλικυλικό οξύ, το αιθυλένιο και το ιασμονικό οξύ αντίστοιχα. Διαπιστώθηκε ότι στις εφαρμογές όπου έγινε εφαρμογή του ζεόλιθου παρουσία του μύκητα *S. sclerotiorum* υπήρξε επαγωγή των γονιδίων άμυνας *LOX* και *ERF1*. Αντιθέτως, στην περίπτωση των πειραμάτων με το μύκητα *R. solani* δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στην έκφραση των γονιδίων

μεταξύ των διαφορετικών εφαρμογών. Συνεπώς η φυτοπροστατευτική δράση του ζεόλιθου εναντίον του μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum* είναι πιθανό να οφείλεται στην ενεργοποίηση της άμυνας των φυτών.

Λέξεις κλειδιά : ζεόλιθος, *S. sclerotiorum*, *R. solani*, ιασμονικό οξύ

Abstract

The effect of zeolite to control the pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani* in lettuce

Eirini G. Poulaki, Danai Gkizi, Epaminondas J. Paplomatas and Sotirios E. Tjamos
Laboratory of Plant Pathology, Agricultural University of Athens, 75 Iera Odos str.,
11855 Athens, Greece

The soilborne pathogens *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia sclerotiorum* are among the most significant pathogens of lettuce around the world. In the grounds of biological control of *R. solani* and *S. sclerotiorum*, it was evaluated the effect of zeolite as a soil amendment (1 and 10% v/v) of the nursery or field soil. It was observed that the amendment of zeolite in the field soil resulted to reduced disease severity and incidence compared to controls, for both pathogens except of the treatment *R. solani*/1% zeolite. While, the addition of zeolite in the nursery soil resulted to reduced disease severity and incidence compared to controls, for both pathogens except of the treatment *R. solani*/10% zeolite. The transcriptomic analysis of the defense marker genes *PR1*, *EFR1* and *LOX*, in the plants which were transplanted in pathogen's infested soil with 10% zeolite, revealed the significant upregulation of *LOX* in the *S. sclerotiorum*/10% zeolite and the single zeolite treatment. Therefore, it is suggested the implication of the jasmonate dependent defenses in the plant protective activity of zeolite against *S. sclerotiorum*.

Keywords : zeolite, *S. sclerotiorum*, *R. solani*, jasmonic acid

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.2 Οικονομική σημασία των εδαφογενών παθογόνων

Στα περισσότερα αγροοικοσυστήματα τα εδαφογενή παθογόνα μπορεί να είναι ένας σημαντικός περιοριστικός παράγοντας στις αποδόσεις εμπορεύσιμων προϊόντων των καλλιεργειών. Τα εδαφογενή παθογόνα είναι προσαρμοσμένα για επιβίωση και ανάπτυξη στον κύριο όγκο του εδάφους, αλλά η ριζόσφαιρα είναι το σημείο όπου το παθογόνο συναντά το φυτό και ξεκινάει μια παρασιτική σχέση μαζί του. Αυτό είναι επίσης το σημείο όπου το σύστημα ριζόσφαιρα, μικροβιακή κοινότητα, μικροχλωρίδα και μικροπανίδα αλληλοεπιδρά με το παθογόνο και επηρεάζει το αποτέλεσμα της μόλυνσης (Raaijmakers *et al.* 2009).

Η εκτίμηση των απωλειών των καλλιεργειών από τους παθογόνους μικροοργανισμούς είναι μια δύσκολη διαδικασία και υπάρχουν πολύ λίγες καλά τεκμηριωμένες μελέτες (Raaijmakers *et al.* 2009). Σε μια από τις μελέτες φαίνεται ότι από το 2001 έως το 2003 κατά μέσο όρο το 7-15% των απωλειών των καλλιεργειών παγκόσμια (σιτάρι, ρύζι, αραβόσιτος, σόγια) που προέκυψε, οφείλεται σε μύκητες και βακτήρια (Oerke 2005). Το διάστημα 1996-1998 αυτά τα παθογόνα προκάλεσαν μία απώλεια της τάξεως του 9,9%, αλλά η πιθανή απώλεια χωρίς αντιμετώπιση θα ήταν 14,9% (Oerke και Dehne 2004).

1.3 *Rhizoctonia solani*

Ο μύκητας *Rhizoctonia solani* προσβάλλει τα φυτά. Αναφέρεται ότι πάνω από 250 είδη φυτών που ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες προσβάλλονται από τον παθογόνο αυτό μύκητα (Parmeter *et al.*, 1969 ; Ogoshi, 1987 ; Sneh, 1996). Στα είδη φυτών που προσβάλλει περιλαμβάνονται το ρύζι, το σόργο, το καλαμπόκι, η σόγια, το φασόλι, το ζαχαρότευτλο, , ο καπνός, το μπιζέλι, το βαμβάκι, το σιτάρι, το λάχανο, το μαρούλι, το καρότο, το ιαπωνικό ραδίκι, η φράουλα, η μελιτζάνα, η τομάτα, η γλαδιόλα και η τουλίπα (Gonzalez *et al.*, 2006 ; Blancard *et al.*, 2006).

Τα στελέχη του μύκητα σύμφωνα με τη δυνατότητα σχηματισμού αναστομώνσεων μεταξύ υφών των διαφόρων απομονώσεων, διαφοροποιούνται σε ομάδες αναστομώσεως (ομάδες βλαστικής συμβατότητας) διαφόρου φυσιολογικής και γενετικής συστάσεως (Ogoshi, 1987). Μέχρι σήμερα τα στελέχη του μύκητα *R. solani* έχουν χωριστεί σε 13 ομάδες αναστόμωσης (AG-1 έως AG-13), ενώ τα δικάρνα στελέχη του παθογόνου κατατάσσονται σε 19 ομάδες αναστόμωσης (AG-A έως AG-U) (Priyatmojo *et al.*, 2001a). Στο παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι σπουδαιότεροι ξενιστές του μύκητα *Rhizoctonia solani* κατανεμημένοι ανά ομάδα αναστόμωσης (Gonzalez *et al.*, 2006 ; Buntin *et al.*, 2002 ; Baird *et al.*, 1997 ; Carling *et al.*, 2002a ; Kofoet *et al.*, 2001 ; Grosh *et al.*, 2004a).

Ομάδες αναστόμωσης	Ξενιστές
AG 1-IA	Ρύζι
	Σόγια
	Σόργο
AG 1-IA	Φασόλι
	Καλαμπόκι
	Πορφυρό τριφύλλι
	Σπορόφυτα καμφοράς
AG 1-IB	Ρύζι
	Σόγια
	Φασόλι
	Σύκα
	Λάχανο
	Μαρούλι
AG 1-IC	Σόγια
	Καρότο
	Πεύκο
	Λινάρι

Ομάδες αναστόμωσης	Ξενιστές
AG 2-1	Υπόγειο τριφύλλι
	Φράουλα
	Τουλίπα
	Ιαπωνικό ραδίκι
AG2-2IIIB	Ρύζι
	Πιπερόριζα
	Γλαδιόλα
	Χλόη τύρφης
	Καλαμπόκι
	Σακχαρότευτλο
	Σπορόφυτα δέντρων
AG2-2IV	Σακχαρότευτλο
AG3	Μελιτζάνα
	Πατάτες
	Καπνός
	Τομάτα
AG4 (HG I, HGII και HGIII)	Τομάτα
	Μπιζέλι
	Πατάτα
	Σόγια
	Σπορόφυτα πεύκων
	Κρεμμύδι
	Βαμβάκι
	Φυστίκια
AG5	Πατάτα
	Χλόη τύρφης
	Φασόλια
	Σόγια
AG6	-

Ομάδες αναστόμωσης	Ξενιστές
AG7	Βαμβάκι
	Ραπανάκι
	Πατάτα
AG8	Δημητριακά
AG9	Σταυρανθή
	Πατάτα
AG10	-
AG11	Σίτος
AG12	-

1.2.1 Ταξινόμηση του μύκητα *R. solani*

Βασίλειο: *Mycota*

Φύλο : *Basidiomycota*

Κλάση : *Agaricomycetes*

Τάξη : *Cantharellales*

Οικογένεια : *Ceratobasidiaceae*

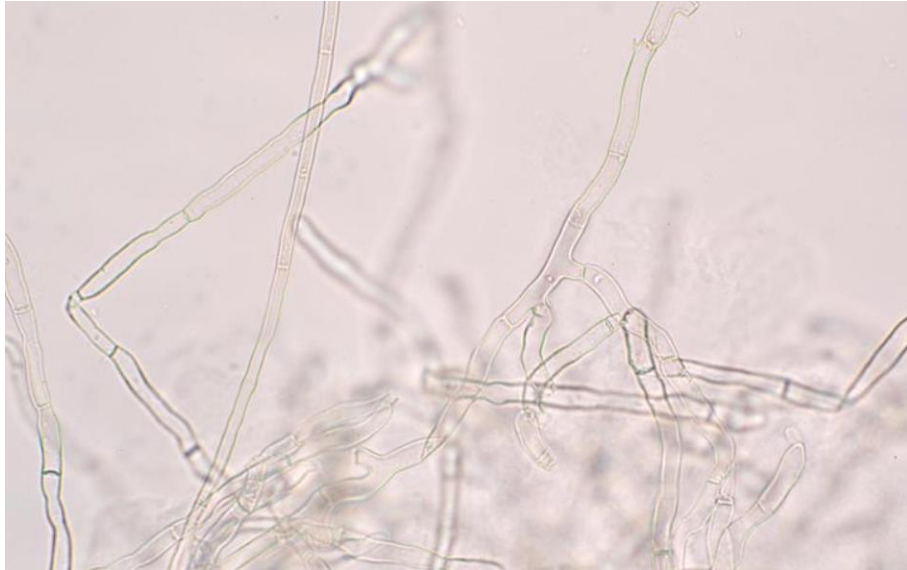
Γένος : *Rhizoctonia*

Είδος : *solani*

Ο μύκητας *Rhizoctonia solani* (*Deuteromycotina*, *Agomomycetes*) είναι η ατελής μορφή του μύκητα *Thanatephorus cucumeris*, συν. *Corticium solani*, *Pellicularia filamentosa* (*Basidiomycetes*, *Tulasnellales*) (Παναγόπουλος, 1995).

Ο μύκητας *R. solani* αποτελείται από υφές μήκους 250μm και σχηματίζει διακλαδώσεις που αναπτύσσονται σε περίπου ορθές γωνίες προς την κύρια υφή, παρουσιάζουν μικρή σύσφιξη και διάφραγμα (septum) κοντά στη διακλάδωση. Η χαρακτηριστική αυτή διακλάδωση του μυκηλίου είναι το συνηθέστερο κριτήριο για την ταυτοποίηση του μύκητα *R. solani* (Παναγόπουλος, 2007). Η ταυτοποίηση του γένους *Rhizoctonia spp.* αποτελούσε πάντα μία πρόκληση εξαιτίας της μη ξεκάθαρης ταξινόμησης του (Cubeta και Vilgalys, 1997).

Η τέλεια μορφή του μύκητα σχηματίζεται στην επιφάνεια των προσβεβλημένων ιστών ή στην επιφάνεια του εδάφους, με συνθήκες πολύ υψηλής υγρασίας σαν λεπτό μυκηλιακό στρώμα. Τα βασίδια που είναι βαρελοειδή ή απιοειδή διαστάσεων 10-25 X 6-19 μm, σχηματίζονται πάνω σε ένα μεμβρανώδες μυκηλιακό στρώμα. Τα παραγόμενα βασιδιοσπόρια είναι υαλώδη, ελλειψοειδή, λεία με λεπτά τοιχώματα και έχουν διαστάσεις 6-14 X 4-8 μm (Παναγόπουλος, 2007).



Εικόνα 1.1: Υφές του μύκητα *R. solani* (www.ipmimages.org).



Εικόνα 1.2: Τρυβλίο με το μύκητα *R. solani* (<http://www.lsuagcenter.com>).

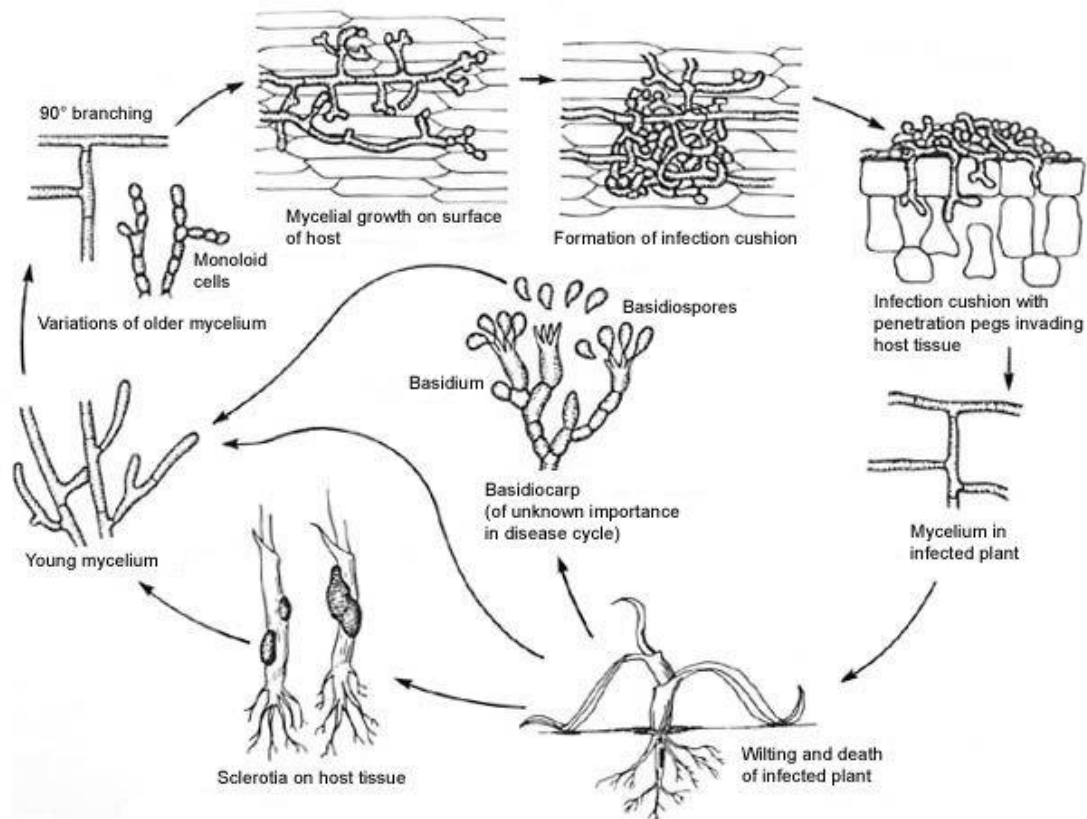
Η ατελής μορφή του μύκητα *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) έχει τα εξής μορφολογικά χαρακτηριστικά μυκηλίου (Parmeter και Whitney, 1970):

- Απουσία καρποφοριών
- Πολυπύρρηνα κύτταρα

- Δημιουργία διαφραγμάτων στις νέες υφές κοντά στη διακλάδωση
- Κύριες υφές με διάμετρο άνω των 7μm
- Απουσία «κρίκων» ή άλλων σχηματισμών που παίρνουν μέρος στον γενετικό ανασυνδιασμό
- Απουσία ριζόμορφων
- Καστανά σκληρώτια (εάν είναι παρόντα) ακανόνιστου σχήματος που δεν παρουσιάζουν διαχωρισμό σε φλοιό και εντεριώνη
- Μυκήλιο χρώματος καφέ ανοιχτού έως σκούρου
- Ύπαρξη δολιπορου διαφράγματος
- Βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης από 20°C έως 30°C
- Διακλαδώσεις υφών κατά 90° ή 45° μοίρες

1.2.2 Διαχείμαση του μύκητα *R. solani*

Το παθογόνο διαχειμάζει σαν μυκήλιο ή σκληρώτια στο έδαφος και μέσα ή πάνω στα προσβεβλημένα φυτά. Σε πολλά φυτά μεταδίδεται και με το σπόρο. Υπάρχουν διάφορα στελέχη του μύκητα που παρουσιάζουν παθογόνο εξειδίκευση (προσβάλλουν ορισμένα είδη φυτών μόνο), διαφορές στην παθογόνο δύναμη και άλλες διαφορές (άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης, ικανότητα να σχηματίζουν σκληρώτια κ.α.) (Παναγόπουλος, 2007).



Εικόνα 1.3: Βιολογικός κύκλος ασθένειας του μύκητα *R. solani* σε χλοοτάπητα (www.apsnet.org).

1.2.3 Μετάδοση – Μόλυνση του μύκητα *R. solani*

Ο μύκητας μεταδίδεται με τη βροχή, το νερό άρδευσης, τα καλλιεργητικά εργαλεία, με το έδαφος και το πολλαπλασιαστικό υλικό.

Η άριστη θερμοκρασία για τις μολύνσεις στα περισσότερα στελέχη, κυμαίνεται μεταξύ 15-22⁰C. Η ασθένεια είναι περισσότερο σοβαρή στα μετρίως υγρά εδάφη παρά στα υπερβολικά υγρά ή ξηρά. Η είσοδος του παθογόνου γίνεται με απευθείας διάτρηση της εφυμενίδας και επιδερμίδας ή από φυσικά ανοίγματα (στομάτια) ή πληγές (Παναγόπουλος, 2007)

1.2.4 Συμπτώματα του μύκητα *R. solani*

Ο μύκητας *Rhizoctonia solani* προκαλεί στα φυτά το γνωστό παθολογικό σύνδρομο τήξεις σπορίων και φυταρίων (damping-off). Προσβάλλει σχεδόν όλα τα κηπευτικά, πολλά καλλωπιστικά και δένδρα στα σπορεία και τα φυτώρια. Στην τομάτα, την πιπεριά, τη μελιτζάνα, την πατάτα και διάφορα άλλα κηπευτικά προκαλεί τήξη φυταρίων και στα μεγαλύτερα φυτά έλκος του λαιμού, προσβολή ριζών, φύλλων και σήψη καρπών (Παναγόπουλος, 2007).



Εικόνα 1.4: Προσβολή από τον μύκητα *R. solani* στο λαιμό μαρουλιού (www.gaiapedia.gr).



Εικόνα 1.5: Προσβολή χλοοτάπητα από το μύκητα *Rhizoctonia solani* (www.xlootapitas.gr)

Η προσβολή του λαιμού στα ανεπτυγμένα φυτά εκδηλώνεται στη βάση του στελέχους και λίγο κάτω από την επιφάνεια του εδάφους, με τη μορφή μικρών

ερυθρωπών κηλίδων οι οποίες εξελίσσονται σε ελαφρά βυθισμένες ερυθροκάστανες μέχρι καστανές νεκρωτικές περιοχές με σαφή όρια ξηρής συστάσεως. Οι κηλίδες αυτές συχνά σχίζονται με αποτέλεσμα το σχηματισμό ανοικτών ελκών, τα οποία συχνά καλύπτονται από αραιό μυκήλιο χρώματος ανοικτού καστανού ή καστανού. Τα προσβεβλημένα φυτά παρουσιάζουν καχεξία, χλώρωση, καρούλιασμα φύλλων και τελικά αν το έλκος περιβάλλει το στέλεχος αποξηραίνονται (Παναγόπουλος, 2007).

Στους καρπούς που βρίσκονται κοντά ή ακουμπούν στο έδαφος, η προσβολή εκδηλώνεται με το σχηματισμό στην αρχή σκληρών κηλίδων χρώματος σκουριάς. Οι κηλίδες μεγαλώνουν, συχνά κατά συγκεντρικούς κύκλους, βαθμιαίους βυθίζονται, γίνονται καστανές, μαλακότερες και σχίζονται ακτινοειδώς στο κέντρο. Συχνά καλύπτονται από αραιή καστανή μυκηλιακή εξάνθηση (Παναγόπουλος, 2007).

Τα συμπτώματα των τήξεων διακρίνονται σε προφυτρωτικά και μεταφυτρωτικά. Στις προφυτρωτικές τήξεις ο σπόρος σαπίζει και καταστρέφεται μέσα στο έδαφος χωρίς να βλαστήσει ή ο σπόρος βλαστάνει αλλά το νεαρό φυτό σαπίζει πριν εξέλθει στην επιφάνεια του εδάφους. Τα συμπτώματα αυτά όμως συνήθως διαφεύγουν της προσοχής και συχνά ένα αραιό φυτόμα αποδίδεται σε μειωμένη βλαστικότητα του σπόρου. Όταν όμως η απουσία φυτών εμφανίζεται στο σπορείο κατά κηλίδες ή κατά θέσεις επί των γραμμών, τότε είναι πολύ πιθανό να πρόκειται για παρασιτική προφυτρωτική τήξη (Παναγόπουλος, 2007).

Στις μεταφυτρωτικές τήξεις, που εμφανίζονται μετά την έξοδο του φυτού από το έδαφος, η προσβολή εκδηλώνεται με μαρασμό των φύλλων και με μία υδατώδη κηλίδα στο στέλεχος του φυτού στη περιοχή του λαιμού. Η κηλίδα αυτή γρήγορα μεγαλώνει και περιβάλλει το στέλεχος του φυτού. Οι προσβεβλημένοι ιστοί γίνονται καστανοί, συρρικνώνονται και νεκρώνονται. Τα φυτά τελικά ξηραίνονται αλλά παραμένουν όρθια. Αυτό συμβαίνει μόνο στα ξυλώδη φυτάρια (εσπεριδοειδή κ.α.). Στη περίπτωση όμως φυταρίων ποωδών φυτών (π.χ. τομάτα, κολοκυθοειδή) η προσβολή εξελίσσεται σε μία μαλακή σήψη των ιστών, αποτέλεσμα της οποίας είναι το λιώσιμο του φυταρίου και η κατάρρευση του επί του εδάφους. Συχνά οι προσβολές φυταρίων μεγαλύτερης ηλικίας εντοπίζονται στο ριζικό σύστημα το οποίο καταστρέφεται. Τα προσβεβλημένα φυτάρια γίνονται καχεκτικά, μαραίνονται και αποξηραίνονται (Φατούρος, 2017).

1.4 *Sclerotinia sclerotiorum*

Ο ασκομύκητας *Sclerotinia sclerotiorum* προκαλεί καταστρεπτικές ασθένειες στα καλλιεργούμενα φυτά σε όλα σχεδόν τα μέρη του κόσμου (Παναγόπουλος, 1995). Επιπλέον ο μύκητας αυτός ανήκει στην κλάση των ασκομυκήτων και προσβάλλει 408 είδη φυτών από 278 γένη και 75 οικογένειες (Bollard και Hall, 1994). Τα περισσότερα είδη φυτών που προσβάλλει είναι δικότυλα (Melvin *et al.*, 2006). Τα φυτά μαρούλι, τομάτα, σταυρανθή, ηλίανθος, φασόλι, καρότο, μελιτζάνα, πιπεριά, πατάτα, σέλινο, αγκινάρα, αρακά είναι από τους πιο συνήθεις ξενιστές του (Παναγόπουλος, 1995; Hoes και Huang, 1976 ; Huang, 1980 ; Lee και Wu, 1986 ; Sharma και Singh, 1990). Ο μύκητας *S. sclerotiorum* είναι ένα από τα πιο προσβλητικά φυτοπαθογόνα των κηπευτικών υπό κάλυψη (Tores, 1990), του ηλίανθου (Hoes και Huang, 1976 ; Huang, 1980 ; Lee και Wu, 1986), του κρεμμυδιού (Abd-El-Moity και Shatla, 1981) και του αρακά (Sharma και Singh, 1990).

1.3.1 Ταξινόμηση του μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum*

Βασίλειο: *Mycota*

Φύλο : *Ascomycota*

Κλάση : *Discomycetes*

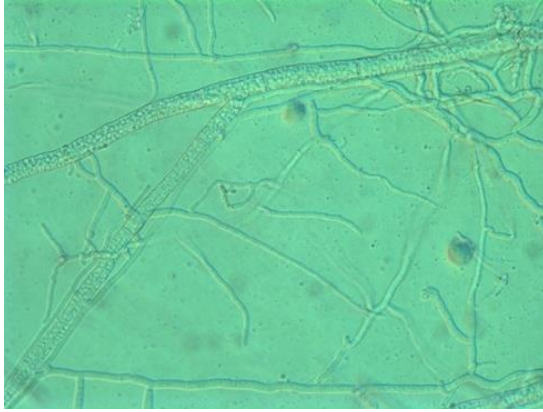
Τάξη : *Helotiales*

Οικογένεια : *Sclerotiniaceae*

Γένος : *Sclerotinia*

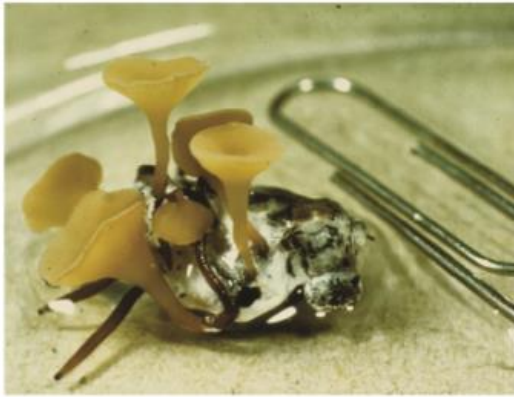
Είδος : *sclerotiorum*

(Melvin *et al.*, 2006)



Εικόνα 1.6: Υφές του μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum* (www.sclerotia.org)

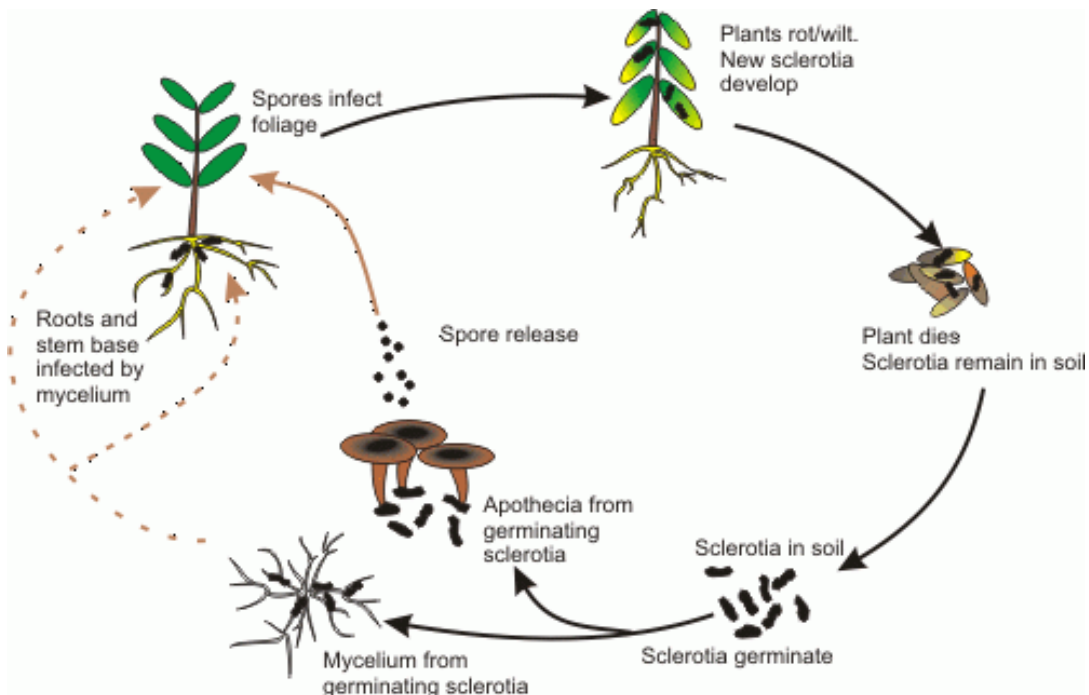
Ο μύκητας *S. sclerotiorum* αναπτύσσει πλούσιο, πυκνό βαμβακώδες μυκήλιο επάνω στο οποίο σχηματίζονται μαύρα ακανόνιστα σκληρώτια τα οποία είναι κατασκευές που επιτρέπουν στο μύκητα να επιβιώνει στο έδαφος για μεγάλες χρονικές περιόδους κάτω από αντίξοες συνθήκες (Coley-Smith και Cook, 1971 ; Adams και Ayers, 1979 ; Τζάμος, 2007 ; Παναγόπουλος, 1995). Έχει υπολογιστεί ότι περίπου το 90% του κύκλου ζωής του μύκητα είναι υπό μορφή σκληρωτίων (Adams και Ayers, 1979). Σε ορισμένες στιγμές κατά τη διάρκεια της χρονιάς, που εξαρτώνται από τη φύση του παθογόνου και διαφόρους περιβαλλοντικούς παράγοντες, τα σκληρώτια βλαστάνουν και παράγουν είτε μυκήλιο το οποίο μπορεί να μολύνει κάποιον ευπαθή ξενιστή είτε να σχηματίσουν αποθήκια (Adams και Ayers, 1979). Τα αποθήκια είναι καστανοκίτρινα και έχουν σχήμα χοάνης, διαθέτουν στύπο και έχουν διάμετρο 3-8mm και ύψος 15-25mm (Τζάμος, 2007). Για το σχηματισμό των αποθηκίων απαιτείται επαρκής υγρασία και ευνοϊκή θερμοκρασία. Σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 23°C τα αποθήκια δε σχηματίζονται (Παναγόπουλος, 1995). Τα αποθήκια είναι οι καρποφορίες εγγενούς αναπαραγωγής του μύκητα *S. sclerotiorum* και πάνω τους αναπτύσσονται οι ασκοί με τα ασκοσπόρια. Οι ασκοί είναι κυλινδρικοί διαστάσεων 8-10 X 125-160 μm και περιέχουν 8 μονοκύτταρα, υαλώδη, ωοειδή ή ελλειψοειδή ασκοσπόρια διαστάσεων 9-13 X 4-6,5 μm (Τζάμος, 2007).



Εικόνα 1.7: Αποθήκια που έχουν βλαστήσει από ένα σκληρωτίο (Peltier *et al.*, 2012)

1.3.2 Διαχείμαση του μύκητα *S. sclerotium*

Η διαίωσιση του μύκητα *S. sclerotium* στηρίζεται κυρίως στα σκληρώτια που παράγονται σε μεγάλους αριθμούς και είναι δυνατόν να περιμείνουν επί μακρόν στο έδαφος. Οι Adams και Ayers (1979) έχουν υπολογίσει, κατ' εκτίμηση, ότι υπάρχουν 0-10 σκληρώτια του μύκητα ανά κιλό εδάφους σε έναν αγρό έτοιμο για φύτευση. Όταν οι συνθήκες γίνουν ευνοϊκές (11-15°C και υψηλή σχετική υγρασία) τα σκληρώτια βλαστάνουν, για να δώσουν είτε αποθήκια (Abawi και Grogan, 1979 ; Zizzerini και Tosi, 1985 ; Huang και Kozub, 1989 ; Huang, 1991), είτε μυκήλιο (Huang, 1985 ; Huang, 1991).



Εικόνα 1.8: Βιολογικός κύκλος του μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum* (www.Metos.at)

Ο αριθμός των παραγόμενων αποθηκίων ανά σκληρώτιο είναι συνάρτηση του μειώνεται σημαντικά με την αύξηση του βάθους του εδάφους (Ben-Yerphet *et al.*, 1993).

1.3.3 Μετάδοση – Μόλυνση του μύκητα *S. sclerotium*

Η διασπορά και η μόλυνση των αγρών γίνεται με τον άνεμο, τα γεωργικά εργαλεία, τον άνθρωπο, το πολλαπλασιαστικό υλικό, τα ζώα, το πότισμα αλλά και σπόρους που είτε φέρουν μυκηλιακές υφές είτε είναι μολυσμένοι με σκληρώτια (Adams και Ayers, 1979).

Οι πρωτογενείς μολύνσεις στα καλλιεργούμενα φυτά γίνονται από τα ήδη υπάρχοντα σκληρώτια στο έδαφος. Τα σκληρώτια βλαστάνουν είτε ως μυκήλιο και μολύνουν τις ρίζες, τους βλαστούς ή τα φύλλα που βρίσκονται σε επαφή με το έδαφος (Purdy, 1979 ; Abawi και Grogan, 1979 ; Huang και Dueck, 1980 ; Huang και Hoes, 1980 ; Huang και Kozub, 1990), είτε με τη μορφή αποθηκίου ελευθερώνοντας ασκοσπόρια τα οποία θα μολύνουν τον βλαστό, τα άνθη ή τα φύλλα (Coley-Smith και Cook, 1971 ; Abawi και Grogan, 1979 ; Adams και Ayers, 1979 ; Whipps, 1993 ; Jones και Whipps, 2002 ; Jones *et al.*, 2003), είτε και με τους δυο τρόπους (Abawi και Grogan, 1975 ; Hoes και Huang, 1976).

1.3.4 Συμπτώματα του μύκητα *S. sclerotium*

Τα φυτά μολύνονται σε όλα τα στάδια αναπτύξεως τους, συχνότερες όμως είναι οι προσβολές στα ανεπτυγμένα φυτά και εμφανίζονται στο στέλεχος και στους καρπούς (Παναγόπουλος, 1995).

Η μόλυνση εμφανίζεται συχνά στην περιοχή του λαιμού των φυτών, ως υδατώδης μεταχρωματισμός των ιστών που σύντομα εξαπλώνεται προς το στέλεχος πάνω από την επιφάνεια του εδάφους και τη ρίζα. Σχηματίζεται εκτεταμένο, μαλακό, υπόλευκο μέχρι σταχτόχροο έλκος που όταν περιβάλλει το στέλεχος, το φύλλωμα του φυτού πάνω από την προσβολή γίνεται χλωρωτικό, μαραίνεται και ξηραίνεται. Με υψηλή υγρασία οι προσβεβλημένες περιοχές καλύπτονται από

πλούσιο, πυκνό, βαμβακώδες μυκήλιο μέσα στο οποίο σχηματίζονται τα χαρακτηριστικά μαύρα σκληρώτια. Σκληρώτια εμφανίζονται επίσης στην εντεριώνη κάτω από τις προσβεβλημένες περιοχές του στελέχους (Παναγόπουλος, 1995).



Εικόνα 1.9: Σκληρώτια του μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum* στην εντεριώνη φυτού σόγιας (Peltier *et al.*, 2012)



Εικόνα 1.10: Φυτό φασολιού τον οποίο έχει προσβληθεί από το μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum* (www.kaliergo.gr)

Στους καρπούς σχηματίζονται υδατώδεις εκτεταμένες κηλίδες που σύντομα αποκτούν ανοικτό καστανό χρώμα και εμφανίζουν μαλακή υγρή σήψη. Με υγρό καιρό σχηματίζεται άφθονο μυκήλιο και σκληρώτια (Παναγόπουλος, 1995).



Εικόνα 1.11: Προσβολή από το μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum* σε καρότα (www.kaliergo.gr)

1.4 Αντιμετώπιση παθογόνων

1.4.1 Χημική αντιμετώπιση

Η σύγχρονη πρακτική φυτοπροστασίας βασίζεται σημαντικά στη χρήση χημικών ενώσεων, αφού μέχρι σήμερα, η χρησιμοποίηση φυτοπροστατευτικών προϊόντων που μπορούν να θανατώσουν το παθογόνο, να παρεμποδίσουν ή να επιβραδύνουν την ανάπτυξη του, αποτελεί μια από τις κυριότερες, αποτελεσματικότερες και οικονομικότερες μεθόδους αντιμετώπισης των κυριότερων ασθενειών των φυτών, πλην των ιολογικών, τουλάχιστον στις περιοχές με ανεπτυγμένη γεωργία.

Όμως, η αυξημένη σήμερα ανησυχία σε θέματα φυτοπροστασίας και διατήρησης του περιβάλλοντος θέτει αυστηρούς όρους στη χρήση χημικών ουσιών στη γεωργία. Η προσθήκη στο περιβάλλον μεγάλων ποσοτήτων χημικών ουσιών, ξένων προς το οικοσύστημα, συνεπάγεται σημαντικούς κινδύνους, ιδίως όταν πρόκειται για μη εκλεκτικές ενώσεις, με ευρύ φάσμα δράσης και μεγάλη υπολειμματική διάρκεια. Στις περιπτώσεις αυτές, η αύξηση της συγκέντρωσης του

φαρμάκου με την πάροδο του χρόνου μπορεί να γίνει σημαντικά επικίνδυνη για οργανισμούς άσχετους με το παθογόνο που θέλουμε να καταπολεμήσουμε. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να περιορίζεται ο πληθυσμός των φυσικών εχθρών-ανταγωνιστών (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007). Ακόμη με την έκθεση για μεγάλο χρονικό διάστημα ενός παθογόνου μικροοργανισμού σε μία συγκεκριμένη χημική ουσία είναι δυνατόν να υπάρξει ανάπτυξη των ανθεκτικών στελεχών του μικροοργανισμού αυτού στην ουσία αυτή.

Σήμερα πλέον έχει φανεί η ζημία που έχει προκληθεί από την αλόγιστη χρήση χημικών μέσων και γι' αυτό το λόγω έχει μειωθεί η χρήση τους και έχει γίνει πιο ορθολογική. Αυτό δεν έγινε μονάχα για την προστασία της οικολογικής ισορροπίας αλλά για την καλύτερη ποιότητα των γεωργικών προϊόντων, για την μείωση του κόστους παραγωγής και για την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση των εχθρών και παθογόνων των καλλιεργειών.

1.4.2 Βιολογική αντιμετώπιση

Ένας άλλος τρόπος αντιμετώπισης είναι η βιολογική αντιμετώπιση, πρόκειται για μία εναλλακτική μέθοδο αντιμετώπισης, πολλά υποσχόμενη, έχοντας ως κατεύθυνση την οικολογική ισορροπία των οικοσυστημάτων και την αποτελεσματική και διαρκή αντιμετώπιση των παθογόνων και εχθρών της καλλιέργειας. Η βιολογική καταπολέμηση των ασθενειών των φυτών είναι η άμεση εφαρμογή βιολογικών παραγόντων με την εισαγωγή ανταγωνιστικών ή παρασιτικών οργανισμών ή την εισαγωγή μη παθογόνων στελεχών των παθογόνων. Με τη χρήση μη παθογόνων στελεχών επιδιώκεται σε μερικές περιπτώσεις η επαγωγή της διασυστηματικής ανθεκτικότητας των φυτών (ανοσοποίηση) που επιτυγχάνεται και με χημικούς παράγοντες. (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).

Τα τελευταία χρόνια διερευνώνται διεξοδικώς διάφοροι βιολογικοί παράγοντες όπου η θετική βιολογική τους δράση οφείλεται στους εξής ακόλουθους μηχανισμούς (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007) :

- Ανταγωνισμός του βιολογικού παράγοντα με το παθογόνο για τα θρεπτικά συστατικά ή για θέση στο φυτό ξενιστή

- Παραγωγή διαφόρων αντιμικροβιακών ενώσεων (αντιβίωση)
- Παρασιτισμός
- Επαγωγή της διασυστηματικής αντοχής των φυτών

1.4.3 Τρόποι αντιμετώπισης του μύκητα *R. solani*

Οι τρόποι αντιμετώπισης του μύκητα *R. solani* είναι οι εξής (Παναγόπουλος, 2007):

- Λήψη μέτρων που επιβραδύνουν το ευαίσθητο στάδιο ευπάθειας των φυταρίων όπως η χρησιμοποίηση σπόρου υψηλής βλαστικής ικανότητας, η επιμελημένη προετοιμασία του εδάφους και η διενέργεια σποράς με άριστες συνθήκες για την ταχεία ανάπτυξη των φυτών, η προβλάστηση του σπόρου και η αβαθής σπορά.
- Αποφυγή δημιουργίας γύρω από τα φυτά υψηλής υγρασίας και κακού αερισμού. Αυτό επιτυγχάνεται με αραιότερη σπορά η φύτευση, καλή αποστράγγιση και κανονική άρδευση.
- Απολύμανση του μολυσμένου εδάφους, στα σπορεία, φυτώρια, θερμοκήπια, πριν τη σπορά. Η απολύμανση μπορεί να γίνει με ατμό ή μείγμα αέρα και ατμού η με χημικά μέσα.
- Απολύμανση σπόρου με κατάλληλα μυκητοκτόνα
- Βιολογική αντιμετώπιση

Έρευνες έχουν δείξει ότι πολλά βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Bacillus* είναι αποτελεσματικοί ανταγωνιστές τόσο σε *in vitro* συνθήκες όσο και σε συνθήκες θερμοκηπίου. Πολλά είδη του γένους *Bacillus* συμπεριλαμβανομένου του *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. mycoides* και *B. thuringiensis* είναι γνωστά για τη παρεμπόδιση της ανάπτυξης συγκεκριμένων παθογόνων όπως μύκητες του γένους *Rhizoctonia*. Ο κύριος μηχανισμός της παρεμποδιστικής τους δράσης είναι η παραγωγή αντιβιοτικών εναντίον των μυκήτων αυτών. Ο αριθμός των αντιβιοτικών που παράγουν βακτήρια του γένους αυτού είναι περίπου 167 από τα οποία τα 66 προέρχονται από το βακτήριο *B.*

subtilis (Khyati και Hareshkumar, 2013 ; Castillo *et al.*, 2013). Επίσης μελέτες έχουν δείξει ότι ο μύκητας *Trichoderma harzianum* είναι βιολογικός παράγοντας ενάντια του παθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* σε μεγάλο αριθμό φυτών (Elad Y. *et al.*, 1979). Ακόμη τα βακτήρια *Pseudomonas flurescens* B1, *Serratia plymuthica* B4 και *Pseudomonas flurescens* B2 μείωσαν την ασθένεια που προκαλεί ο μύκητας *R. solani* στη πατάτα και στο μαρούλι (Grosch *et al.*, 2005). Επιπλέον μελέτες έδειξαν ότι το στέλεχος 5,5B του βακτηρίου *Pseudomonas ceracia* παράγει δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι είναι ανασταλτικοί για το μύκητα *R. solani in vitro* (Cartwright *et al.*, 1994). Σε πειράματα *in vitro* που έγιναν φάνηκε ότι ο βιολογικός παράγοντας, το βακτήριο, *Raenibacillus alvei* K165, παρεμποδίζει μέσω της παραγωγής αντιβιοτικών τον μύκητα *R. solani* (Εικόνα:1.12) (Φατούρος, 2017). Τέλος πειράματα έχουν δείξει ότι το βακτήριο K165 είναι βιολογικός παράγοντας ενάντια του μύκητα *R. solani* σε φυτά μαρουλιού (Φατούρος, 2017).



Εικόνα 1.12: Στα αριστερά τρυβλίο με τον μύκητα *R.solani* και εμβολιασμένο με τον βιολογικό παράγοντα *Raenibacillus alvei* K165. Στα δεξιά ο μάρτυρας (Φατούρος, 2017).

1.4.4 Τρόποι αντιμετώπισης του μύκητα *S. sclerotium*

Εναντίον της ασθένειας συνιστώνται τα ακόλουθα μέτρα (Παναγόπουλος, 1995) :

- Περιορισμός της εδαφικής υγρασίας με κατάλληλα μέτρα (όχι υπερβολική άρδευση, αποστράγγιση εδάφους, αραιή φύτευση).

- Εκρίζωση, απομάκρυνση και καταστροφή των προσβεβλημένων φυτών και φυτικών τμημάτων αμέσως όταν εμφανισθεί η ασθένεια για την αποφυγή εμπλουτισμού του εδάφους με σκληρώτια.
- Μετά το πέρας της καλλιέργειας να γίνεται βαθύ όργωμα για τη κάλυψη των σκληρωτίων και αν είναι δυνατό κατάκλιση του αγρού με νερό 4-5 εβδομάδες.
- Για την καταστροφή των σκληρωτίων συνιστάται να γίνεται απολύμανση του εδάφους μετά το πέρας της καλλιέργειας με χημικά μέσα, με ατμό ή με την εφαρμογή της ηλιοαπολύμανσης.
- Προληπτικοί ψεκασμοί των φυτών με εγκεκριμένα φάρμακα.

Τα τελευταία χρόνια διεξάγεται εντατική έρευνα με ενθαρρυντικά αποτελέσματα για την ανάπτυξη μεθόδων βιολογικής αντιμετώπισης της ασθένειας που προκαλεί ο μύκητας *Sclerotinia sclerotiorum* (Adams και Fravel, 1990 ; Budge και Whipps, 1991). Μύκητες όπως οι *Coniothyrium minutans* (Campbell, 1947), *Trichoderma viride Pers. ex Fr.* (Huang, 1980), *Trichothecium roseum Pers. ex Fr.* (Huang και Kokko, 1993) και ο *Epicoccum purpurascens Ehrenb.* (Zhou και Reeleder, 1989) είναι γνωστά παράσιτα ή ανταγωνιστές ικανά να επιτεθούν σε σκληρώτια ή να επηρεάσουν την μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum* κάτω από φυσικές συνθήκες (Huang *et al.*, 2000). Πολλά είδη μυκήτων του γένους *Trichoderma* έχουν βρεθεί ότι είναι πολύ ισχυροί βιολογικοί παράγοντες εναντίον αρκετών εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων (Chet, 1987). Ο μύκητας *Trichoderma harzianum* έδειξε να είναι αποτελεσματικός στον έλεγχο του σχηματισμού σκληρωτίων (Hadar *et al.*, 1979; DOS Santos και Dhingra, 1982 ; Elad *et al.*, 1983). Ακόμα πολλά βακτήρια του γένους *Bacillus* συμπεριλαμβανομένου του *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. mycoides* και *B. thurigiensis* είναι γνωστά για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης των παθογόνων μυκήτων του γένους *Sclerotinia*. Ο κύριος μηχανισμός της παρεμποδιστικής τους δράσης είναι η παραγωγή αντιβιοτικών εναντίον των μυκήτων αυτών (Khyati και Hareshkumar, 2013). Σε πειράματα *in vitro* που έγιναν φάνηκε ότι ο βιολογικός παράγοντας *Paenibacillus alvei* K165, παρεμποδίζει μέσω της παραγωγής αντιβιοτικών τον μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum* σε σχέση με τον μάρτυρα (Εικόνα:1.13) (Φατούρος, 2017). Τέλος πειράματα έχουν δείξει ότι το βακτήριο

Paenibacillus alvei K165 είναι βιολογικός παράγοντας ενάντια του μύκητα *S. Sclerotiorum* σε φυτά μαρουλιού (Φατούρος, 2017).



Εικόνα 1.13: Στα αριστερά τρυβλίο με τον μύκητα *S. Sclerotiorum* και εμβολιασμένο με τον βιολογικό παράγοντα *Paenibacillus alvei* K165. Στα δεξιά ο μάρτυρας (Φατούρος, 2017).

1.5 Μηχανισμοί άμυνας των φυτών

Τα φυτά φαίνονται εκ πρώτης όψεως ευάλωτα σε μια πλειάδα παθογόνων μυκήτων, βακτηρίων και άλλων προκαρυωτικών μικροοργανισμών και ιών και ίσως αδύναμα να αποφύγουν τον εισβολέα (Τζάμος, 2007). Οι παθογόνοι αυτοί οργανισμοί χρησιμοποιούν διαφορετικούς βιοχημικούς και μοριακούς μηχανισμούς προκειμένου να μολύνουν τα φυτά τα οποία όμως, έχουν αναπτύξει βαθμιαία και εξελικτικά εξεζητημένους και λεπτεπίλεπτους μηχανισμούς ανθεκτικότητας για να αντιληφθούν τα αρχικά στάδια προσβολής και να μεταφράσουν αυτή την αίσθηση/διάκριση σε συγκεκριμένη βιοχημική αντίδραση, αναλόγως της αλληλεπίδρασης ξενιστή παθογόνου. Αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης είναι μία σταθερή και παράλληλη εξέλιξη στο χρόνο του αμυντικού συστήματος των φυτών αλλά και των μηχανισμών μολυσματικότητας των παθογόνων (Agrios, 2005 ; Τζάμος, 2007). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ένα γυμνόσπερμο δένδρο της Ανατολικής Ασίας, το είδος *Ginkgo biloba*, αναφέρεται ως το πλέον άνοσο φυτό στα φυτοπαθογόνα με ελάχιστες αναφορές ασθενειών (Τζάμος, 2007).

Οι μηχανισμοί άμυνας των φυτών λειτουργούν στα ανθεκτικά, κατά περίπτωση, φυτά ή παραμένουν σε λανθάνουσα κατάσταση και διεγείρονται από βιοτικούς ή αβιοτικούς παράγοντες. Η διέγερση λανθανόντων μηχανισμών αντοχής αποτελεί το αντικείμενο της Επίκτητης ή Επαγόμενης Διασυστηματικής Αντοχής. Ουσιαστικά πρόκειται για μία μορφή « ανοσοποίησης », η οποία προκαλείται από βιολογικούς παράγοντες, όπως μύκητες, βακτήρια και ιούς, εναντίον των ίδιων ή διαφορετικών σε σύγκριση με εκείνα τα παθογόνα που προκάλεσαν την διέγερση (Τζάμος, 2007).

1.5.1 Επαγωγή της διασυστηματικής αντοχής των φυτών (Ανοσοποίηση)

Επίκτητη ή επαγόμενη διασυστηματική αντοχή είναι η βιολογική, βιοχημική ή χημική διέγερση λανθανόντων μηχανισμών αντοχής, ώστε ένα φυτό ευπαθές σε ένα συγκεκριμένο σύστημα ξενιστή-παθογόνου να καθίσταται ανθεκτικό στο ίδιο σύστημα (Τζάμος, 2007).

Η « διασυστηματική » αντοχή αποδίδεται, για χάριν συντομίας, με τον γενικό όρο « ανοσοποίηση » και διαχωρίζεται σε επίκτητη διασυστηματική αντοχή (Systemic Acquired Resistance / SAR), όταν ενεργοποιείται κατόπιν μόλυνσεως του ξενιστή με το παθογόνο και σε επαγόμενη διασυστηματική αντοχή (Induced Systemic Resistance / ISR), όταν επιτυγχάνεται με βιολογικούς παράγοντες οι οποίοι δεν προκαλούν τοπική νέκρωση, π.χ. ριζοβακτήρια. Επιπλέον, η ανοσοποίηση εμφανίζεται με δύο μορφές, μια τοπικού και μια διασυστηματικού χαρακτήρα. Η τοπικά επαγόμενη αντοχή εκφράζεται μόνο στο σημείο εισβολής του παθογόνου στο φυτό με νέκρωση και ξήρανση των ιστών και σχετίζεται με την αντίδραση υπερευαισθησίας. Ενώ κατά την διασυστηματική επαγόμενη αντοχή, οι αμυντικοί μηχανισμοί του φυτού εκφράζονται και μακράν του σημείου διεγέρσεως (Τζάμος, 2007).

Το φαινόμενο της « ανοσοποίησης » στα φυτά παρουσιάζει ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον, διότι αποδεικνύει ότι λανθάνοντες μηχανισμοί αντοχής μπορεί να διεγερθούν διασυστηματικά στα φυτά και να αξιοποιηθούν σε τομείς της σύγχρονης φυτοπροστασίας (Τζάμος, 2007).

1.5.1.1 Παράγοντες διέγερσης της ανοσοποίησης

Η διέγερση λανθανόντων μηχανισμών αντοχής σε θέσεις πέραν της μολύνσεως, προϋποθέτει βιοχημικώς τη δραστηριοποίηση ή παραγωγή χημικών παραγόντων που αποτελούν το σήμα το οποίο μετακινείται διασυστηματικά και προετοιμάζει τους φυτικούς ιστούς, ώστε να αμυνθούν σε επακολουθεί μόλυνση (Τζάμος, 2007).

Η διέγερση λανθανόντων μηχανισμών αντοχής, έχει διαπιστωθεί ότι μπορεί να προκληθεί από τους εξής παράγοντες (Τζάμος, 2007):

- Παθογόνα
- Μη συμβατικές φυλές παθογόνων μικροοργανισμών
- Μη παθογόνα στελέχη παθογόνων μικροοργανισμών
- Μη παθογόνοι μικροοργανισμοί (σαπρόφυτα) π.χ. Ριζοσφαιρικά βακτήρια
- Παράγοντες αβιοτικής καταπόνησης (π.χ. ξηρασία και έλλειψη θρεπτικών στοιχείων)
- Χημικές ενώσεις

Σχετικά με την επαγωγή της « ανοσοποίησης » με ριζοσφαιρικά βακτήρια και χημικές ενώσεις, είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι πολλά ριζοσφαιρικά βακτήρια που ανήκουν κυρίως στα γένη *Pseudomonas*, αλλά και *Bacillus*, δρουν ως διεγέρτες της επαγόμενης διασυστηματικής αντοχής στα φυτά που εμφανίζουν πανομοιότυπες φαινοτυπικά αντιδράσεις με την κλασική επίκτητη διασυστηματική αντοχή. Η επαγόμενη με ριζοβακτήρια διασυστηματική αντοχή έχει διαπιστωθεί εναντίον μυκήτων, βακτηρίων και ιών σε πολλά φυτά με μεθόδους που αποκλείουν την παρουσία και επαφή του ριζοβακτηρίου με θέσεις μολύνσεως του εκάστοτε παθογόνου (Τζάμος, 2007).

Πολλές φυσικές ή συνθετικές ενώσεις αποτελούν εισαγωγείς της ανοσοποίησης. Αναφορικά με τις χημικές ενώσεις, μια χημική ουσία μπορεί να θεωρηθεί ως διεγέρτης / επαγωγέας « ανοσοποίησης », εάν έχει τη δυνατότητα (Τζάμος, 2007) :

- Να διεγείρει μηχανισμούς αντοχής εναντίον ενός αριθμού παθογόνων αιτιών
- Να προκαλεί την έκφραση των ίδιων βιοχημικών δεικτών που εμφανίζει και το βιολογικό πρότυπο « ανοσοποίησης »
- Να μην έχει άμεση αντιμικροβιακή δράση *in vitro* ή *in vivo*
- Να τροποποιεί την αλληλεπίδραση παθογόνου-φυτού, ώστε φαινοτυπικά να μην έχουμε μόλυνση και να επάγει τους μηχανισμούς αμύνης του φυτού πριν από ή μετά τη μόλυνση

1.5.1.2. Βιοχημικοί παράγοντες της ανοσοποίησης

A) Σήματα της «ανοσοποίησης» στα φυτά και οι ιδιότητες του στην περίπτωση της βιολογικής διεγέρσεως

Το σήμα αποτελεί τον καθοριστικό βιοχημικό παράγοντα της « ανοσοποίησης », και οι ιδιότητες του στην περίπτωση της βιολογικής διεγέρσεως είναι η εξής (Τζάμος, 2007):

- Το σήμα παράγεται με την εμφάνιση των νεκρωτικών κηλίδων
- Το σήμα μετακινείται ταχέως και συνεχώς στα υπόλοιπα μέρη του φυτού μέσω των αγγείων (ανοδικώς και καθοδικώς) διεγείροντας το φαινόμενο της « ανοσοποίησης »
- Το επίπεδο της προστασίας αυξάνει, καθώς όλο και περισσότερο σήμα παράγεται και μετακινείται εντός του φυτού
- Το μέγιστο της προστασίας επιτυγχάνεται, όταν έχουν κορεσθεί όλοι οι υποδοχείς του σήματος

B) Σήματα της «ανοσοποίησης» στα φυτά και η βιοχημική φύση τους

Η επαγωγή λανθανόντων μηχανισμών αντοχής πραγματοποιείται κατά την αναγνώριση των μορίων διεγέρσεως από αντίστοιχους υποδοχείς τους στα φυτά. Η αναγνώριση ενεργοποιεί μεταβολικά μονοπάτια δημιουργίας και μεταφοράς ενός ενδογενούς σήματος. Το σήμα με την σειρά του ενεργοποιεί γόνους παραγωγής

αντιμικροβιακών πρωτεϊνών / πεπτιδίων. Από τα υπάρχοντα μέχρι σήμερα δεδομένα έχει αναγνωρισθεί η σημασία ορισμένων ουσιών ως σημάτων ή φορέων του σήματος για την διέγερση λανθανόντων μηχανισμών αμύνης των φυτών. Αυτές οι ουσίες είναι οι εξής (Τζάμος, 2007) :

Σαλικυλικό οξύ

Το σαλικυλικό οξύ παράγεται στους χλωροπλάστες των φυτών. Είναι προϊόν του μεταβολισμού των φαινυλοπροπανοειδών και σχηματίζεται μέσω της αποκαρβοξυλίωσης του trans-κινναμικού οξέος σε βενζοϊκό οξύ με επακόλουθη 2-υδροξυλίωση του τελευταίου σε σαλικυλικού οξύ. Το σαλικυλικό οξύ έχει φυσικές ιδιότητες που το καθιστούν ιδανικό για την μεταφορά του μέσα στον ηθμό. Επιπλέον μπορεί να μετακινηθεί ταχέως από το σημείο της αρχικής εφαρμογής ή συνθέσεώς του σε απομακρυσμένους φυτικούς ιστούς (Τζάμος, 2007).

Το σαλικυλικό οξύ θεωρείται ότι αποτελεί το ενδογενές σήμα της « ανοσοποίησης » ή ότι παίζει καίριο ρόλο στη διάχυση – μεταφορά του σήματος μετά τη μόλυνση από το παθογόνο. Ακόμη, το σαλικυλικό οξύ πιστεύεται ότι είναι διεγέρτης της συσσωρεύσεως των πρωτεϊνών σχετικών με την παθογένεση (PR πρωτεϊνών). Η εξωγενής εφαρμογή σαλικυλικού οξέως επάγει τη σύνθεση πρωτεϊνών παθογενέσεως, κυρίως στη θέση εφαρμογής, σε αντίθεση με τα παθογόνα που επάγουν πρωτεϊνών παθογενέσεως διασυστηματικά. Οι γόνι των πρωτεϊνών εκφράζονται τόσο με εξωγενή εφαρμογή σαλικυλικού οξέος, όσο και κατά την διάρκεια της βιολογικής διεγέρσεως της « ανοσοποίησης » (Τζάμος, 2007).

Συνθετικές χημικές ενώσεις

Η χημική ένωση (CGA 245704) με βάση το σαλικυλικό οξύ, που κυκλοφορεί στο εμπόριο είναι ένα ελπιδοφόρο σκεύασμα για την αντιμετώπιση πολλών φυτοπαθογόνων μυκήτων, βακτηρίων και ιών (Τζάμος, 2007).

Ιασμονικό οξύ

Το ιασμονικό οξύ και ο μεθυλιωμένος εστέρας του παράγονται από το λινολενικό οξύ και αποτελούν ενώσεις που ανήκουν στις κυκλοπεντανόνες. Εξωγενής εφαρμογή ιασμονικού οξέως προωθούν τη γήρανση και ρυθμίζουν την ανάπτυξη. Ειδικότερα, το ιασμονικό οξύ μπορεί να τροποποιήσει την έκφραση γόνων και κατά την δημιουργία πληγής ή υπάρξεως κατάλληλων διεγερτών να έχουμε συσσώρευση ιασμονικού και μεθυλιωμένου ιασμονικού μέσα στους φυτικούς ιστούς. Τόσο το ιασμονικό οξύ όσο, και το μεθυλιωμένο ιασμονικό οξύ υπάρχουν σε όλα τα φυτά. Μετακινούνται ευκόλως και στην υγρή και στην αέρια φάση τους. Το μεθυλιωμένο ιασμονικό οξύ είναι ιδιαίτερος πτητικό και ίσως να δρα αναλόγως με την αέρια φυτική ορμόνη αιθυλενίου. Σε υψηλές συγκεντρώσεις οι ιασμονικές ουσίες είναι φυτοτοξικές (Τζάμος, 2007).

Ως προς τους τρόπους δράσεως του ιασμονικού οξέος μικρές ποσότητες επάγουν πρωτεϊνικούς παράγοντες, όπως θειονίνη, ωσμοτίνη, προλίνη των κυτταρικών τοιχωμάτων, ένα σουλφιδριλικό παρεμποδιστή πρωτεϊνών και διάφορα ένζυμα που εμπλέκονται στους μηχανισμούς άμυνας του φυτού. Έτσι, το ιασμονικό οξύ φαίνεται ότι δρα ως δευτερογενής επαγωγέας της « ανοσοποίησης » (Τζάμος, 2007).

Συστεμίνη

Η συστεμίνη είναι ένα πεπτίδιο 18 αμινοξέων που έχει απομονωθεί από την τομάτα. Απαντά σε μικρές ποσότητες και όταν χορηγείται σε νεαρά φυτά τομάτας συμβάλλει στην σύνθεση των παρεμποδιστών πρωτεϊνών (Τζάμος, 2007).

Αιθυλένιο

Το αιθυλένιο είναι μία πτητική φυτική ορμόνη, που επηρεάζει το ρυθμό αναπτύξεως των φυτών και τη γήρανση. Στις περιπτώσεις ασθενών φυτών το αιθυλένιο παράγεται, όταν το παθογόνο διεισδύει στο φυτικό ιστό. Παράγεται επίσης με την εφαρμογή διαφόρων ουσιών για τη διέγερση μηχανισμών άμυνας, όπου επάγει τη σύνθεση μερικών πρωτεϊνών παθογενέσεως, όπως β-1,3

γλουκανάση, χιτινάση και β-γλουκανάση. Επιπλέον η παρουσία του αιθυλενίου προκαλεί δομικές αλλαγές που αυξάνουν την αντοχή του κυτταρικού τοιχώματος, όπως η εναπόθεση λιγνίνης και συσσώρευση υδροξυπρολινοπρωτεϊνών (Τζάμος, 2007).

Το σαλικυλικό οξύ, το ιασμονικό οξύ και το αιθυλένιο παίζουν σημαντικό ρόλο στο δίκτυο σημάτων. Η διακοπή της αντίδρασης σε κάποιο από αυτά τα σήματα μπορεί να καταστήσει τα φυτά πιο ευπαθή στα παθογόνα ή και στα έντομα (Gaffney *et al.*, 1993 ; McConn *et al.*, 1997 ; Knoester *et al.*, 1998 ; Staswick *et al.*, 1998 ; Vijayan *et al.*, 1998)

1.5.2 Διεγέρτες που επάγουν τους αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών

Οι διεγέρτες είναι μία ομάδα βιοχημικών παραγόντων που δρουν κατά τα αρχικά στάδια της αναγνώρισης μεταξύ παθογόνου και ξενιστού με σκοπό την καταστολή του εγγενούς φυτικού ανοσοποιητικού συστήματος. Οι διεγέρτες μεταβολίζουν μέσω εξειδικευμένων προσδενοσών πρωτεϊνών, οι οποίες αποτελούν τους υποδοχείς – δέκτες στις κυτταρικές μεμβράνες ή κυτταρόπλασμα των φυτών, το μήνυμα στον ξενιστή για την επαπειλούμενη είσοδο και μόλυνση με αποτέλεσμα την πρόκληση ή την αποφυγή της ασθένειας από το συγκεκριμένο παθογόνο (Τζάμος, 2007).

Οι διεγέρτες περιλαμβάνουν μόρια παθογόνου προελεύσεως (εξωγενής διεγέρτες) και ενώσεις που απελευθερώνονται από τα φυτά κατά την επαφή τους με τα παθογόνα (ενδογενής διεγέρτες). Οι διεγέρτες κατατάσσονται περαιτέρω σε δύο κατηγορίες, τους γενικούς που έχουν την ικανότητα διεγέρσεως του βασικού ανοσοποιητικού συστήματος σε ξενιστές και μη – ξενιστές του παθογόνου και τους εξειδικευμένους σε φυλή παθογόνου διεγέρτες που οδηγούν στην ανάπτυξη αντοχής μόνο σε φυτά ξενιστές μέσω του ανοσοποιητικού συστήματος των γόνων ανθεκτικότητας (Τζάμος, 2007).

Οι διεγέρτες έχουν την ικανότητα δράσης σε χαμηλές συγκεντρώσεις και δεν έχουν κοινή χημική δομή, αλλά ανήκουν σε μία ευρεία κλίμακα χημικών ενώσεων που συμπεριλαμβάνουν ολισακχαρίτες, πεπτίδια, πρωτεΐνες και λιπίδια. Οι περισσότεροι διεγέρτες είναι συστατικά στοιχεία των κυτταρικών τοιχωμάτων των

παθογόνων. Σ' αυτές ανήκουν η γλυκάνη, η χιτίνη, τα λιπολυσακχαρίδια και η φλατζελίνη, δομικό συστατικό του βακτηριακού μαστιγίου, που ονομάζεται από κοινού PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns). Μια άλλη κλάση διεγερτών που παίζουν ρόλο στην μολυσματική ικανότητα των παθογόνων είναι οι χαρπίνες και τα προϊόντα των γόνων αμολυσματικότητας (Avr). Ενδογενής διεγέρτες που παράγονται από τα φυτά είναι τα ολιγογαλακτουρονίδια που αποτελούν τμήματα πηκτίνης ως αποτέλεσμα της ενζυμικής διασπάσεως του κυτταρικού τοιχώματος του φυτού. Οι βασικότερες ιδιότητες εξειδικευμένων διεγερτών είναι να (Τζάμος, 2007):

- Αποτελούν το έναυσμα της αντιδράσεως υπερευαισθησίας
- Διεγείρουν τη σύνθεση φυτοαλεξινών
- Επάγουν την παραγωγή γλυκοσυλο – υδρολασών, ικανών να αντιδράσουν με πολυμερή των επιφανειών των παθογόνων
- Επάγουν τη σύνθεση πρωτεϊνών που παρεμποδίζουν ένζυμα των παθογόνων με ικανότητα αποσυνθέσεως των φυτικών ιστών
- Επάγουν την παραγωγή των δραστικών ομάδων οξυγόνου
- Επάγουν την τροποποίηση των κυτταρικών τοιχωμάτων με εναπόθεση καλλόζης, λιγνίνης ή και γλυκοπρωτεΐνες πλούσιες σε υδροξυπρολίνη

1.5.3 Μεταγωγή σήματος με έκφραση αντοχής

Τα παθογόνα παράγουν διάφορους τελεστές (effectors) με σκοπό την καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος του φυτού και κατά συνέπεια την επιτυχή έκβαση της μόλυνσεως και της εγκαταστάσεως τους στον ξενιστή. Οι τελεστές παθογόνων μυκήτων που έχουν μέχρι σήμερα χαρακτηριστεί είναι πρωτεϊνικής φύσεως. Οι τελεστές έχουν την ικανότητα τροποποιήσεως διαφόρων πρωτεϊνών στα φυτικά κύτταρα με στόχο την ενίσχυση της μολυσματικής τους ικανότητας και την διαφυγή τους από τον αμυντικό μηχανισμό του φυτού (Τζάμος, 2007).

Μελέτες με τη χρησιμοποίηση εξειδικευμένων ή μη διεγερτών έχουν αποδείξει την παρουσία αλληλουχίας γεγονότων που ακολουθεί ταχέως με την

αναγνώριση του παθογόνου από τους ξενιστές. Παρατηρείται αυξημένη ροή διαφόρων ηλεκτρολυτών εντός λεπτού από τη διέγερση. Έχει βρεθεί ότι το 20% του συνολικού αριθμού των γόνων της αραβίδοψης μεταβάλλεται κατά την επαφή και κατά τα πρώτα στάδια της αλληλεπιδράσεως του φυτού με παθογόνα. Η αλυσίδα των σημαντικότερων και ιδιαίτερα πολύπλοκων μεταβολών που ακολουθούν την αναγνώριση των διεγερτών – τελεστών από τους γόνους ανοχής και τη μεταγωγή των διαφόρων μοριακών σημάτων μέχρι τη τελική εκδήλωση της άμυνας του φυτού αναφέρονται κατωτέρω (Τζάμος, 2007):

- Οξειδωτική έκρηξη των ενεργά αντιδρώντων ριζών οξυγόνου
- Αυξημένη διαμεμβρανική ροή ιόντων κυρίως Ca^{2+} , K^+ και H^+
- Παραγωγή νιτρικού οξέος
- Προσωρινή ενεργοποίηση πρωτεϊνικών κινασών
- Αλκαλίωση του εξωκυτταρικού χώρου
- Αποδιοργάνωση μεμβρανών και κυτταρικών οργανιδίων
- Δέσμευση φαινολικών ουσιών με συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος
- Ενίσχυση των κυτταρικών τοιχωμάτων με καλόζη και λιγνίνες
- Παραγωγή αντιμικροβιακών δευτερογενών ουσιών (φυτοαλεξίνες, πρωτεΐνες παθογενέσεως)
- Επαναπρογραμματισμένη μεταγραφή του φυτικού κυττάρου

1.6 Ζεόλιθος

Η λέξη ζεόλιθος σημαίνει η πέτρα που βράζει και η πρώτη παρατήρηση του έγινε το 1765 από το Σουηδό ορυκτολόγο Axel Cronstedt. Η δημιουργία του ηφαιστειογενούς αυτού υλικού αποδίδεται στην αντίδραση ενός αργιλοπυριτικού πετρώματος, του οψιδιανού, με το θαλασσινό νερό σε θερμοκρασία περίπου στους 50°C. Πρόκειται για μία βραδεία διαδικασία που για να ολοκληρωθεί απαιτούνται πολλά χρόνια από 50 έως 50.000. Για καιρό η οικογένεια των ορυκτών ζεόλιθων δεν είχε καμία προφανή χρησιμότητα, όμως σήμερα γίνεται συστηματική μελέτη των ιδιοτήτων τους καθώς και αξιοποίηση τους σε μία πληθώρα εφαρμογών (Παππά, 2015).

Η δομική μονάδα των ζεόλιθων είναι ένα περιοδικό πλέγμα ατόμων πυριτίου που περιβάλλονται από τέσσερα άτομα οξυγόνο έτσι ώστε να σχηματίζονται τετράεδρα όπως στην καθαρή μορφή του διοξειδίου του πυριτίου, τον χαλαζία. Η διαφορά είναι ότι στους ζεόλιθους μερικά άτομα πυριτίου έχουν αντικατασταθεί από άτομα αλουμινίου, τα οποία έχουν ένα ηλεκτρόνιο λιγότερο από το πυρίτιο. Για να διατηρηθεί η δομή των τετράεδρων χρειάζεται ένα επιπλέον ηλεκτρόνιο. Το ηλεκτρόνιο αυτό το συνεισφέρει ένα άτομο νατρίου, το οποίο έτσι καθίσταται θετικά φορτισμένο και «εγκαθίσταται» μέσα στο αρχικό πλέγμα. Τα παραλλαγμένα τετράεδρα των ζεόλιθων διευθετούνται με ποικίλους τρόπους σε κυκλικές διατάξεις σχηματίζοντας κοιλότητες (πόρους) σε μία ποικιλία διαμέτρων και γεωμετρίας (Παππά, 2015). Οι ζεόλιθοι είναι πολύ σταθερά ορυκτά που αντέχουν ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες σε αντίθεση με άλλα υλικά (Παππά, 2015).

1.6.1 Χρήση Ζεόλιθου στη γεωργία

Ο ζεόλιθος χρησιμοποιήθηκε για πολλά χρόνια ως υλικό βελτίωσης του εδάφους, καθώς απορροφά υψηλές ποσότητες νερού, θρεπτικών στοιχείων και χημικών ουσιών και δρα ως επιβραδυντής, απελευθερώνοντας νερό και θρεπτικά στοιχεία. Είναι γνωστό ότι ο ζεόλιθος βελτιώνει τις φυσικοχημικές και μικροβιακές ιδιότητες του εδάφους, αυξάνοντας τη διαθεσιμότητα σε άζωτο και φώσφορο και ενισχύει την αποδοτικότητα της οργανικής ύλης (Kefalogianni I. *et al.*, 2016).

Ο ζεόλιθος έχει την ικανότητα να απορροφά μόρια νερού από την επιφάνεια του φυτού, έτσι δημιουργεί ένα εχθρικό περιβάλλον για τους μύκητες (Smedt, *et al.*, 2015). Πειράματα που έγιναν σε φυτά μελιτζάνα (Black Beauty) τα οποία μολύνθηκαν με το μύκητα *Verticillium dahliae* έδειξαν ότι το σχετικό εμβαδό ασθενείας στα φυτά που μολύνθηκαν μόνο με το μύκητα ήταν υψηλότερο από τα φυτά που μολύνθηκαν από το μύκητα και στο χώμα τους είχε προστεθεί ζεόλιθος σε αναλογία 9:1 (χώμα : ζεόλιθος). Ακόμη, φάνηκε ότι το επίπεδο του DNA του μύκητα στις 14 ημέρες μετά την μόλυνση στα φυτά που μολύνθηκαν μόνο από το μύκητα ήταν υψηλότερο σε σχέση με τα φυτά που μολύνθηκαν με το μύκητα και στο χώμα τους είχε προστεθεί ζεόλιθος σε αναλογία 9:1 (χώμα : ζεόλιθος) (Παππά, 2015).

ΣΚΟΠΟΣ

Οι μύκητες του γένους *Sclerotinia* και *Rhizoctonia* είναι ευρύτατα διαδεδομένοι παθογόνοι μικροοργανισμοί του εδάφους και προκαλούν καταστρεπτικές ασθένειες σε πολλά είδη καλλιεργούμενων φυτών σε παγκόσμιο επίπεδο. Σχηματίζουν ανθεκτικές κατασκευές σε ακραίες συνθήκες ή για τη διαχείμαση τους, τα σκληρώτια, που επιβιώνουν για πολλά έτη στο έδαφος. Η δυσκολία αντιμετώπισης των διαχειμαζουσών μορφών των μυκήτων, οδηγεί τους επιστήμονες στη προσπάθεια εύρεσης άλλων αποτελεσματικών μεθόδων.

Ο σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης ήταν η μελέτη της αποτελεσματικότητας της χρήσης ζεόλιθου σε ποσοστό 1% και 10% στο υπόστρωμα σποράς και μεταφύτευσης εναντίον των μυκήτων *Sclerotinia sclerotiorum* και *Rhizoctonia solani* σε φυτά μαρουλιού.

3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Βιολογικό υλικό

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν σαν βιολογικό υλικό οι μικροοργανισμοί :

α) *Sclerotinia sclerotiorum*

β) *Rhizoctonia solani*

Το μικροβιακό υλικό που χρησιμοποιήθηκε προερχόταν από τη συλλογή του εργαστηρίου φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

3.2 Φυτικό υλικό

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν σπόροι μαρουλιού της ποικιλίας Tom Thump (butterhead) της εταιρίας Thomson & Morgan (Ηνωμένο Βασίλειο).

3.3 Ζεόλιθος

Ο ζεόλιθος που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα μελέτη προέρχεται από τη Κίμωλο και έχει τα εξής χαρακτηριστικά (Παππά, 2015 ; Stamatakis *et al.*, 2010) :

Ορυκτό	Μορντενίτης (Ζεόλιθος)	
	Τυπικό	Προδιαγραφές
Υγρασία	10-11%	<13%
Απορροφητικότητα νερού (με τη μέθοδο Westinghouse)	50-60%	>45%
Κοκκομετρία	1/4in-18	
Ποσοστό άνω του 1/4in (6mm)	~1%	<3%
Ποσοστό κάτω του n.18 (1mm)	~3%	<5%
Πυκνότητα υλικού (g/cm ³)	0,85	

Ορυκτό	Μορντενίτης (Ζεόλιθος)	
Ικανότητα ιονταλλαγής (CEC in meq + /100g)	~80	>50
Ειδική Επιφάνεια (m ² /g)	~60	

3.4 Θρεπτικό υλικό

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ως στερεό θρεπτικό υλικό εκχύλισμα πατάτας με δεξτρόζη και άγαρ (Potato Dextrose Agar). Για τη παρασκευή αυτού του υλικού χρησιμοποιήθηκε έτοιμο PDA της εταιρείας MERCK. Το υλικό αποστειρώθηκε στους 120 °C σε υγρό κλίβανο με πίεση 1atm για 20 λεπτά.

3.5 Πείραμα όπου ο ζεόλιθος προστέθηκε σε ποσοστό 1% και 10% στη μεταφύτευση των φυτών

3.5.1 Σπορά σπόρων φυτών μαρουλιού

- Η σπορά των σπόρων μαρουλιού έγινε σε 4 παλέτες σποράς, 50 θέσεων, με χώμα

3.5.2 Παρασκευή μολύσματος

3.5.2.1. Παρασκευή εμβολιασμένων τρυβλίων με τους παθογόνους μύκητες

α) Τρυβλία Petri με PDA εμβολιάστηκαν με το μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum*

β) Τρυβλία με Petri PDA εμβολιάστηκαν με το μύκητα *Rhizoctonia solani*

Στη συνέχεια τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο θερμοκρασίας 24°C έως την πλήρη κάλυψη του υποστρώματος από το μύκητα.

3.5.2.2. Παρασκευή μολύσματος

Προετοιμασία μολύσματος του μύκητα *S. sclerotiorum* και του μύκητα *R. solani*

- Τοποθετήθηκε σε ομογενοποιητή ολόκληρο το περιεχόμενο του τρυβλίου. Για κάθε φυτό που μολύνθηκε με το μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum* τοποθετήθηκαν 2 τρυβλία στα οποία είχε αναπτυχθεί ο μύκητας. Ενώ για κάθε φυτό που μολύνθηκε με το μύκητα *Rhizoctonia solani* τοποθετήθηκαν 0,5 τρυβλία στα οποία είχε αναπτυχθεί ο μύκητας .
- Στη συνέχεια προστέθηκαν 1000ml νερού στον ομογενοποιητή που περιείχε τα τρυβλία στα οποία είχε αναπτυχθεί ο μύκητας *Sclerotinia sclerotiorum*. Ενώ στον ομογενοποιητή που περιείχε τα τρυβλία στα οποία είχε αναπτυχθεί ο μύκητας *Rhizoctonia solani* προστέθηκαν 500ml νερού.
- Πραγματοποιήθηκε ανάδευση στο μίγμα του ομογενοποιητή.
- Τέλος, το μίγμα του ομογενοποιητή ανακατεύθηκε α) με χώμα, β) με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και γ) με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%

3.5.3. Μεταφύτευση φυτών μαρουλιού σε υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο

- Στο στάδιο του 2^{ου} φύλλου, έγινε η μεταφύτευση των φυτών μαρουλιού σε γλαστράκια διάστασης 9 X 9 X 10cm. Κάθε εφαρμογή του πειράματος είχε 20 φυτά, ένα φυτό σε κάθε γλαστράκι. Οι εφαρμογές που πραγματοποιήθηκαν και για τους 2 μύκητες σε αυτό το πείραμα είναι οι εξής:

Εφαρμογές	
1	Μεταφύτευση φυτών μαρουλιού σε υπόστρωμα με χώμα
2	Μεταφύτευση φυτών μαρουλιού σε υπόστρωμα που περιείχε χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1%
3	Μεταφύτευση φυτών μαρουλιού σε υπόστρωμα που περιείχε χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%
4	Μεταφύτευση φυτών μαρουλιού σε υπόστρωμα που περιείχε χώμα μολυσμένο με το μύκητα
5	Μεταφύτευση φυτών μαρουλιού σε μολυσμένο με το μύκητα υπόστρωμα που περιείχε χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1%
6	Μεταφύτευση φυτών μαρουλιού σε μολυσμένο με το μύκητα υπόστρωμα που περιείχε χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%

- Αφού ολοκληρώθηκε η μεταφύτευση ακολούθησε ελαφρύ πότισμα.

3.6 Πείραμα όπου ο ζεόλιθος προστέθηκε σε ποσοστό 1% και 10% στο υπόστρωμα σποράς των φυτών

3.6.1 Σπορά σπόρων φυτών μαρουλιού

- Η σπορά των σπόρων μαρουλιού έγινε σε παλέτες σποράς με χώμα ,σε παλέτες σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% αλλά και σε παλέτες σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%.

3.6.2 Παρασκευή μολύσματος

3.6.2.1 Παρασκευή εμβολιασμένων τρυβλίων με τους παθογόνους μύκητες

α) Τρυβλία Petri με PDA εμβολιάστηκαν με το μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum*

β) Τρυβλία με Petri PDA εμβολιάστηκαν με το μύκητα *Rhizoctonia solani*

Στη συνέχεια τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο θερμοκρασίας 24°C έως την πλήρη κάλυψη του υποστρώματος από το μύκητα.

3.6.2.2. Παρασκευή μολύσματος

Προετοιμασία μολύσματος του μύκητα *S sclerotiorum* και του μύκητα *R. solani*

- Τοποθετήθηκε σε ομογενοποιητή ολόκληρο το περιεχόμενο του τριβλίου. Για κάθε φυτό που μολύνθηκε με το μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum* τοποθετήθηκαν 2 τρυβλία στα οποία είχε αναπτυχθεί ο μύκητας. Ενώ για κάθε φυτό που μολύνθηκε με το μύκητα *Rhizoctonia solani* τοποθετήθηκαν 0,5 τρυβλία στα οποία είχε αναπτυχθεί ο μύκητας .
- Στη συνέχεια προστέθηκαν 1000ml νερού στον ομογενοποιητή που περιείχε τα τρυβλία στα οποία είχε αναπτυχθεί ο μύκητας *Sclerotinia sclerotiorum*. Ενώ στον

ομογενοποιητή που περιείχε τα τρυβλία στα οποία είχε αναπτυχθεί ο μύκητας *Rhizoctonia solani* προστέθηκαν 500ml νερού.

- Πραγματοποιήθηκε ανάδευση στο μίγμα του ομογενοποιητή.
- Τέλος, το μίγμα του ομογενοποιητή ανακατεύθηκε με χώμα

3.6.3. Μεταφύτευση φυτών μαρουλιού σε υπόστρωμα με χώμα

- Στο στάδιο του 2^{ου} φύλλου, έγινε η μεταφύτευση των φυτών μαρουλιού σε γλαστράκια, με χώμα, διάστασης 9 X 9 X 10cm. Σε κάθε εφαρμογή του πειράματος είχαμε 20 φυτά, ένα φυτό σε κάθε γλαστράκι. Οι εφαρμογές που πραγματοποιήθηκαν και για τους 2 μύκητες σε αυτό το πείραμα είναι οι εξής:

Εφαρμογές	
1	Φυτά μαρουλιού που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και μεταφυτεύθηκαν σε χώμα
2	Φυτά μαρουλιού που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς το οποίο περιείχε χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και μεταφυτεύτηκαν σε χώμα
3	Φυτά μαρουλιού που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς το οποίο περιείχε χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% και μεταφυτεύτηκαν σε χώμα
4	Φυτά μαρουλιού που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και μεταφυτεύθηκαν σε μολυσμένο χώμα με το μύκητα
5	Φυτά μαρουλιού που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς το οποίο περιείχε χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο χώμα με το μύκητα
6	Φυτά μαρουλιού που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς το οποίο περιείχε χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% και μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο χώμα με το μύκητα

- Αφού ολοκληρώθηκε η μεταφύτευση ακολούθησε ελαφρύ πότισμα.

3.7 Καταγραφή συμπτωμάτων και μέτρηση νωπού βάρους

Για τη καταγραφή των συμπτωμάτων χρησιμοποιήθηκαν 20 φυτά για κάθε εφαρμογή. Η ένταση της ασθένειας μετρήθηκε με βάση τον δείκτη ασθένειας των Kofot *et al.* (2001)

- 0 -Υγιή φυτά
- 2 – Συμπτώματα μόνο στα πρώτα φύλλα που βρίσκονται χαμηλά σε επαφή με το έδαφος, ανοιχτές προς σκούρες καστανές κηλίδες, αρχικά στην κάτω επιφάνεια της κεντρικής νεύρωσης των φύλλων.
- 3 – Καστανές κηλίδες στη κεντρική νεύρωση των κατώτερων φύλλων και στα μεσαία φύλλα, κεντρική νεύρωση με συμπτώματα σήψης
- 4 – Σοβαρά συμπτώματα της ασθένειας στα ανώτερα φύλλα, αρχικά στάδια σήψης της κεφαλής έως πλήρη σήψη της κεφαλής
- 5 – Νεκρά φυτά



Βαθμός Ασθένειας 2



Βαθμός Ασθένειας 3



Βαθμός Ασθένειας 4

Εικόνα 3.1: Δείκτης ασθένειας (Kofot *et al.*, 2001)

Στο τέλος των δύο πειραμάτων μετρήθηκε το νωπό βάρος στα φυτά κάθε εφαρμογής.

3.8 Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *PR1*, *LOX* και *ERF1*

Για το πείραμα αυτό συλλέχθηκαν δείγματα φύλλων από φυτά που μολύνθηκαν με το μύκητα *S. sclerotiorum* αλλά και από φυτά που μολύνθηκαν με το μύκητα *R. solani*. Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε στις εξής εφαρμογές :

- Σε φυτά μαρουλιού που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και μεταφυτεύτηκαν σε υπόστρωμα με χώμα
- Σε φυτά μαρουλιού που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και μεταφυτεύτηκαν σε υπόστρωμα που περιείχε χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%
- Σε φυτά μαρουλιού που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα υπόστρωμα με χώμα
- Σε φυτά μαρουλιού που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%

Κάθε δείγμα αποτελούταν από 5 φυτά τα οποία συλλέχθηκαν στις 3 και στις 7 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών με τους μύκητες.

3.9 Απομόνωση RNA από φυτά μαρουλιού

Η απομόνωση ολικού RNA από τα φυτά του μαρουλιού πραγματοποιήθηκε με τη χρήση διαλύματος Trizol. Για τη διαδικασία αυτή, κόπηκαν φύλλα από τα φυτά των διαφορετικών εφαρμογών, καθαρίστηκαν με αποστειρωμένο νερό και κονιορτοποιήθηκαν με τη χρήση υγρού αζώτου σε αποστειρωμένα ιγδία. Στη συνέχεια 80-100mg κονιορτοποιημένου φυτικού ιστού τοποθετήθηκαν σε πλαστικό σωλήνα 1,5ml και αναμείχθηκαν με 1ml διαλύματος εξαγωγής RNA. Ακολούθησε έντονη ανάδευση για 10sec και έπειτα τα δείγματα παρέμειναν σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από 5min ακολούθησε ανάμειξη με 200ml χλωροφόρμιο, ανακίνηση με το χέρι για 1min και φυγοκέντριση στις 12.000 rpm στους 4°C για 10min. Η υπερκείμενη φάση (0,5ml) μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα 1,5ml και ακολούθησε εκχύλιση με 0,5ml ισοπροπανόλη, μετά από ανάδευση, φυγοκέντριση (για 20min στις 12.000 rpm και 4°C) και απομάκρυνση της υπερκείμενης φάσης. Ακολούθησε προσθήκη 200ml αιθανόλης (EtOH), φυγοκέντριση για 2min στους 4°C και αφαίρεση του διαλύματος, ώστε να παραμείνει μόνο το ίζημα. Στη συνέχεια, ακολούθησε στέγνωμα του ιζήματος RNA για 5-10min σε θερμοκρασία δωματίου και επαναιώρηση του σε 25μl υπερκαθαρό

νερό, απαλλαγμένο από ριβονουκλεάσες (RNase free water). Το RNA φυλάχτηκε σε κατάψυξη, στους -80°C, για περαιτέρω χρήση.

3.10 Μέτρηση νουκλεϊκών οξέων

Η συγκέντρωση του RNA υπολογίστηκε σε Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Saveen Wermer, Malmf, Swede)

3.11 Σύνθεση cDNA

Η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής εφαρμόστηκε για τον καθορισμό του επιπέδου μεταγραφής των υπό μελέτη γονιδίων *PR1*, *LOX*, *ERF1* τα οποία πιθανόν να επάγονται από την προσθήκη ζεόλιθου στο υπόστρωμα της μεταφύτευσης του μαρουλιού και του γονιδίου *ATP1* που χρησιμοποιήθηκε σαν γονίδιο αναφοράς. Για να αποτραπεί η οποιαδήποτε επιμόλυνση του δείγματος με DNA πραγματοποιήθηκε χειρισμός του RNA με το ένζυμο δεοξυριβόζονουκλεάση (DNase, Invitrogen) και επώαση στους 37°C για 15 λεπτά. Έπειτα προστίθεται 1ml EDTA και επώαση των δειγμάτων στους 65°C για 10 λεπτά ώστε να τερματιστεί η δράση του ενζύμου.

Αντιδραστήρια	Όγκος
Ρυθμιστικό διάλυμα DNase 1	1μl
DNase 1(Invitrogen)	1μl
EDTA (Invitrogen)	1μl
Ολικό RNA	1000ng
H ₂ O	Έως τα 10μl

Για την αντίδραση αντιστροφής μεταγραφής χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο της Superscript II (Invitrogen). Η σύνθεση cDNA πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο έγινε αποδιάταξη ποσότητας 1mg ολικού RNA (ποσότητα που αντιστοιχούσε σε 10ml δείγματος) με 1ml εκκινητή oligo-dT και προσθήκη 1,5ml

νερού (HPLC grade) σε τελικό όγκο 12,5ml στους 65°C για 5 λεπτά και ακολούθως η αντίδραση τοποθετήθηκε σε πάγο. Κατά το δεύτερο στάδιο προστέθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

Αντιδραστήρια	Όγκος
Ρυθμιστικό διάλυμα	1μl
Αναστολέας RNase (Fermentas)	1μl
DNTPs (10mM)	1μl
Αντίστροφη μεταγραφή Superscript II H	1000ng
Τελικός όγκος αντίδρασης	Έως τα 10μl

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 20μl και επώαστηκε για 50 λεπτά στους 42°C και στη συνέχεια στους 75 °C για 15 λεπτά.

3.12 Έκφραση των γονιδίων *PR1*, *LOX* και *ERF1*

Η RT-PCR έγινε σε θερμοκυκλοποιητή της Stratagene Mx300P™ και για τις αντιδράσεις ενίσχυσης χρησιμοποιήθηκε ένα master mix KAPA SYBR Fast Universal qPCR kit (KAPAbiosystems, Woburn, MA, USA), ενώ τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό MxPro QPCR. Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *PR1*, *LOX* και *ERF1* απεικονίζονται στο παρακάτω πίνακα:

Γονίδιο Στόχος	Ζεύγος εκκινητών	Αναφορές
<i>PR1</i> (<i>Lsa018589.1</i>)	5'-ATGGGACAGTCGTGGCTAGTTT-3' 5'TGTTACAGCATCTACACCGGTCA-3'	De Cremer <i>et al.</i> , 2013
<i>LOX</i> (<i>Lsa036946.1</i>)	5'-GCAACTAAGCGTGCTTCACCCAAT-3' 5'-TGCCTCAAGAAGACCTCCACCATT-3'	De Cremer <i>et al.</i> , 2013
<i>ERF1</i> (<i>Lsa016859.1</i>)	5'-TCGCCGGTGATGTCCAGTTATCAA-3' 5'-TGTTTCCCTCTCTGCTGGTTCACA-3'	De Cremer <i>et al.</i> , 2013
<i>ATP1</i>	5'-CTGTACAAGAAGGAGAACGAGC-3' 5'-ACGAGCACATACAGTGGCTT-3'	Argyris <i>et al.</i> ,2008

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR Fast Universal qPCR Master Mix	5μl	
Rox low	0,2 μl	25μM
Εκκινητές F	0,5 μl	25 μM
Εκκινητές R	0,5 μl	
Δείγμα Cdna	1 μl	50ng/ml
H ₂ O	2,8 μl	
Τελικός όγκος	10 μl	

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ATP1*, που είναι γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν σαν σταθερά για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των άλλων γονιδίων.

Τέλος, στο παρακάτω πίνακα, απεικονίζεται το πρόγραμμα θερμοκρασιών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις αντιδράσεις Real-time PCR.

	Χρόνος	Θερμοκρασία (°C)	Αποτελέσματα
Στάδιο	3min	95	Ενεργοποίηση της HotStarTaqDNA πολυμεράσης
Στάδιο 2*	3sec	95	Αποδείαταξη DNA
	30sec	60	Υβριδισμός εκκινητών / επιμήκυνση αλυσίδας
Στάδιο 3	1min	95	Δημιουργία της καμπύλης διαχωρισμού των προϊόντων της RT-PCR(Dissociation curve) **
	30sec	60	
	30sec	95	

*Το στάδιο 2 επαναλήφθηκε για 40 κύκλους

**Η εξειδίκευση των εκκινητών και ο σχηματισμός των διμερών των εκκινητών παρακολούθηθηκαν από τη καμπύλη διαχωρισμού της RT-PCR.

Η κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τρεις επαναλήψεις.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στη παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη που πραγματοποιήθηκε προκειμένου να διερευνηθεί η αποτελεσματικότητα της χρήσης του ζεόλιθου στην αντιμετώπιση των μυκήτων *Rhizoctonia solani* και *Sclerotinia sclerotiorum* σε φυτά μαρουλιού έγιναν τα εξής πειράματα:

Για τους μύκητες *Rhizoctonia solani* και *Sclerotinia sclerotiorum*

- Πείραμα παθογένειας, όπου μελετήθηκε η πορεία της ασθένειας σε φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο υπόστρωμα με το μύκητα, σε φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα υποστρώματα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και 10% και σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και 10% και τα οποία στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο χώμα με το μύκητα.
- Πείραμα μέτρησης νωπού βάρους, όπου μετρήθηκε το νωπό βάρος σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε χώμα και μεταφυτεύτηκαν σε υπόστρωμα με χώμα μόνο, σε φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο υπόστρωμα με το μύκητα, σε φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και 10%, σε φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα υποστρώματα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και 10%, σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και 10% και τα οποία στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε χώμα, σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και 10% και τα οποία στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο χώμα με το μύκητα.
- Πείραμα διερεύνησης της έκφρασης των γονιδίων *PR1*, *ERF1* και *LOX*, όπου διερευνήθηκε η έκφραση των γονιδίων σε φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε υπόστρωμα με χώμα, σε φυτά τα οποία μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με τον παθογόνο μύκητα υπόστρωμα με χώμα, σε φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα υποστρώματα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%

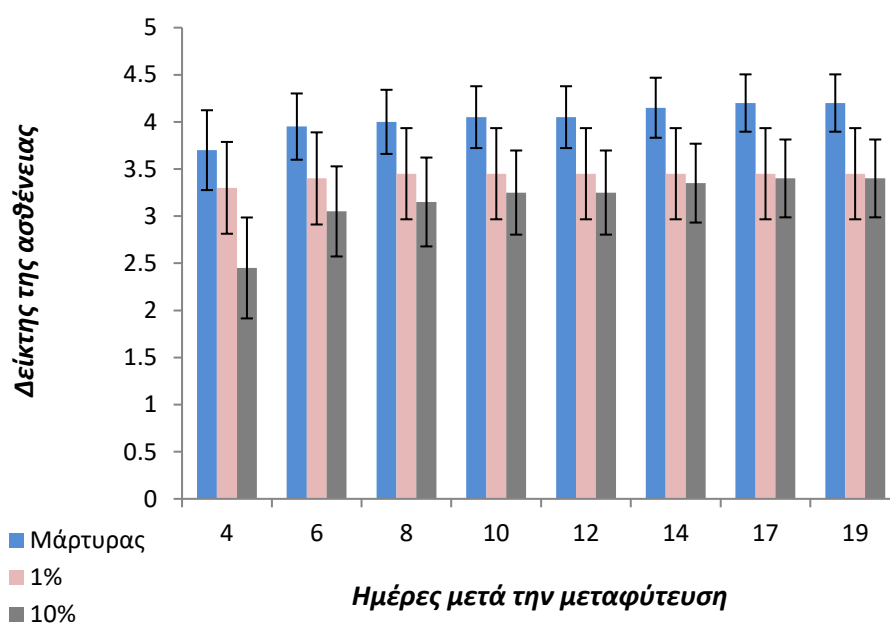
και σε φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%.

4.1 Πείραμα παθογένειας

4.1.1 Πείραμα παθογένειας σε φυτά που μολύνθηκαν με το μύκητα *R. solani*

Πείραμα παθογένειας σε φυτά όπου ο ζεόλιθος προστέθηκε στη μεταφύτευση των φυτών μαρουλιού

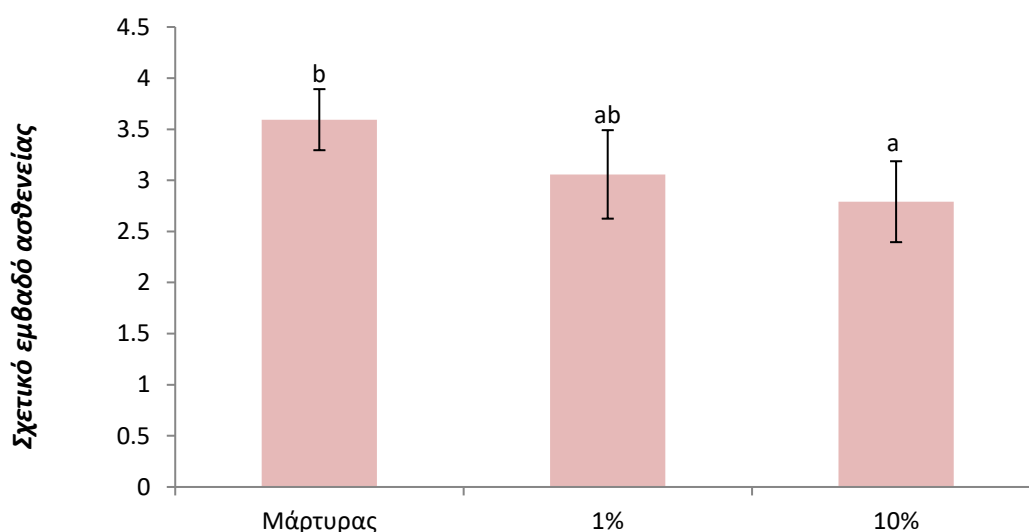
Για τη διερεύνηση της συμπτωματολογίας η καταγραφή ξεκίνησε 4 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών μαρουλιού με τον παθογόνο μύκητα *R. solani* και η καταγραφή ολοκληρώθηκε 19 ημέρες μετά τη μόλυνση με το μύκητα *R. solani*.



Εικόνα 4.1: Στο γράφημα αυτό απεικονίζεται η εξέλιξη της ασθένειας σε 1)φυτά τα οποία μολύνθηκαν μόνο με το μύκητα *R. solani* 2) φυτά τα οποία μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *R. solani* υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% 3) φυτά τα οποία μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *R. solani* υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%

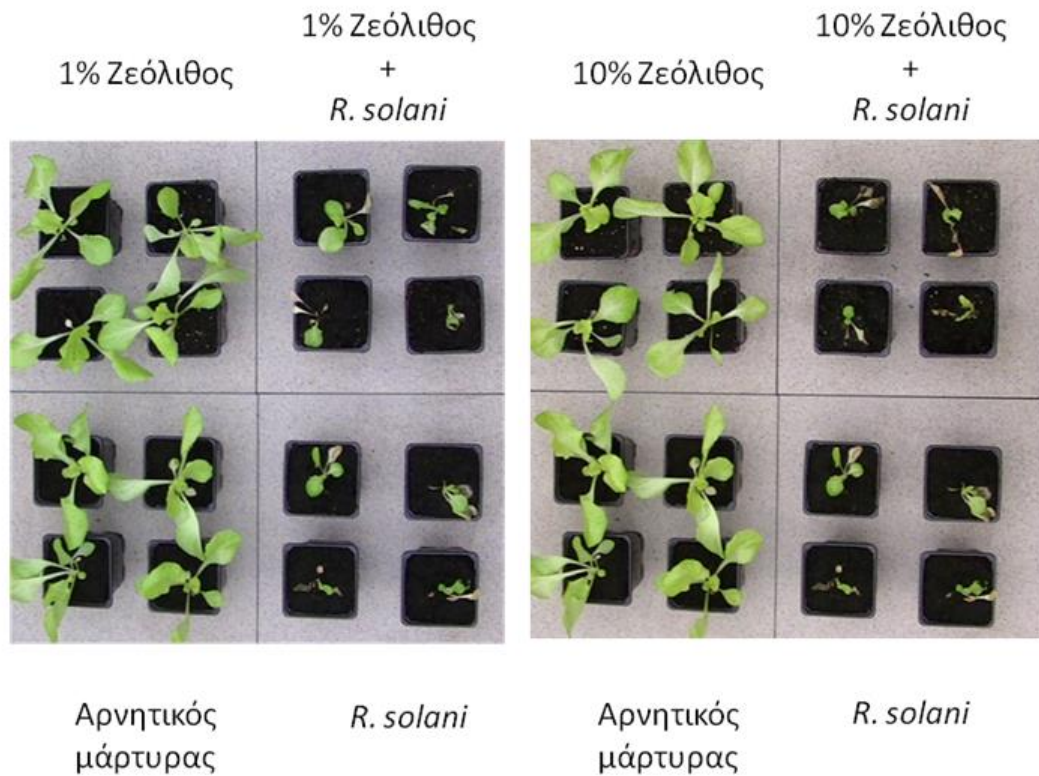
Όπως φαίνεται στην εικόνα 4.1, που απεικονίζει την εξέλιξη της ασθένειας, τη 4^η έως και τη 19^η ημέρα μετά τη μόλυνση με το παθογόνο μύκητα τα φυτά που

μολύνθηκαν μόνο με το μύκητα *R. solani* παρουσίασαν τα ίδια συμπτωματολογική εικόνα με τα φυτά που μεταφτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1%. Τα λιγότερα συμπτώματα σε σχέση με το μάρτυρα παρουσίασε η εφαρμογή όπου τα φυτά μεταφτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%. Οι δύο εφαρμογές με το ζεόλιθο παρουσίασαν την ίδια συμπτωματολογική εικόνα.



Εικόνα 4.2: Στο γράφημα αυτό απεικονίζεται το σχετικό εμβαδόν της καμπύλης εξέλιξης της ασθeneίας για 1) τα φυτά που μολύνθηκαν με το μύκητα *R.solani* 2) τα φυτά που μεταφτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *R. solani* υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% 3) τα φυτά που μεταφτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *R. solani* υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%

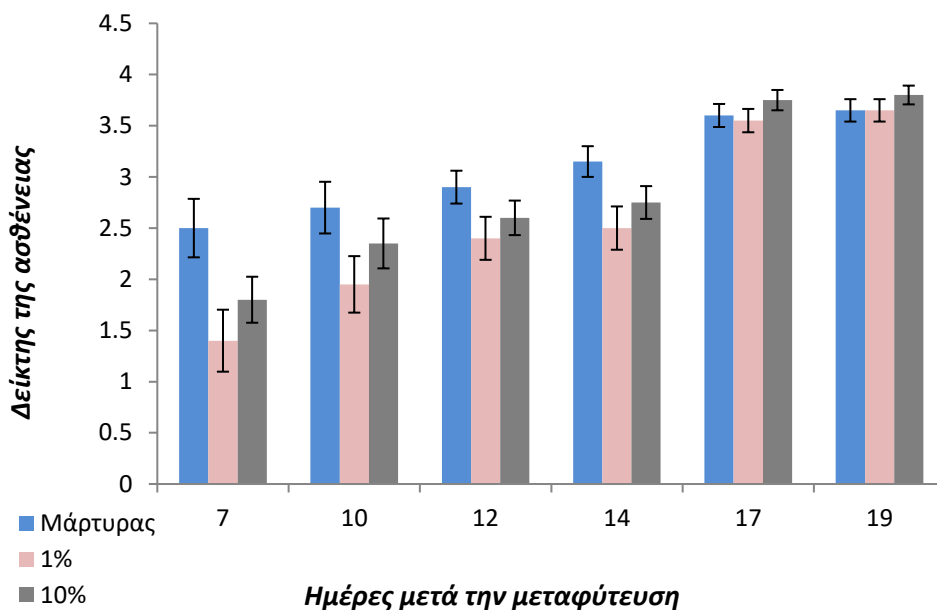
Όπως απεικονίζεται στην εικόνα 4.2 η εφαρμογή με τα φυτά μάρτυρες, δηλαδή με φυτά που μεταφτεύτηκαν σε μολυσμένο υπόστρωμα μόνο με χώμα, παρουσίασαν το ίδιο εμβαδό ασθeneίας με την εφαρμογή όπου τα φυτά μαρουλιού μεταφτεύτηκαν σε μολυσμένο υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1%. Τα φυτά που μεταφτεύτηκαν σε μολυσμένο υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% παρουσίασαν μικρότερο εμβαδό ασθeneίας από τα φυτά μάρτυρες. Τέλος οι εφαρμογές όπου ο ζεόλιθος προστέθηκε στο υπόστρωμα μεταφύτευση παρουσίασαν το ίδιο εμβαδό ασθeneίας.



Εικόνα 4.3 : Πείραμα παθογένειας του μύκητα *R. solani* σε φυτά μαρουλιού.

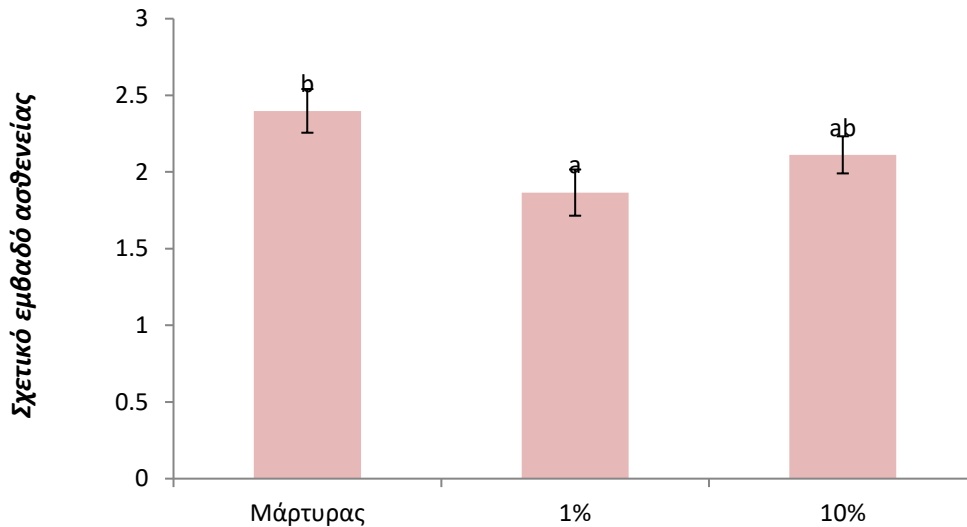
Πείραμα παθογένειας σε φυτά όπου ο ζεόλιθος προστέθηκε στο υπόστρωμα σποράς των φυτών μαρουλιού

Για τη διερεύνηση της συμπτωματολογίας η καταγραφή ξεκίνησε 7 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών μαρουλιού με τον παθογόνο μύκητα *R. solani* και η καταγραφή ολοκληρώθηκε 19 ημέρες μετά τη μόλυνση με το μύκητα *R. solani*.



Εικόνα 4.4: Στο γράφημα αυτό απεικονίζεται η εξέλιξη της ασθένειας σε 1) φυτά τα οποία μολύνθηκαν μόνο με το μύκητα *R. solani* 2) φυτά τα οποία αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *R. solani* χώμα 3) φυτά τα οποία αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *R. solani* χώμα

Όπως φαίνεται στο γράφημα 4.4, που απεικονίζει την εξέλιξη της ασθένειας, την 7^η έως την 14^η ημέρα μετά τη μόλυνση τα φυτά μάρτυρες παρουσίασαν περισσότερα συμπτώματα σε σχέση με την εφαρμογή όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1%. Ο μάρτυρας την 7^η και την 14^η ημέρα παρουσίασε περισσότερα συμπτώματα σε σχέση με την εφαρμογή όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%, ενώ τη 10^η και 12^η ημέρα παρουσίασε την ίδια συμπτωματολογική εικόνα. Τις 2 τελευταίες ημέρες του πειράματος ο μάρτυρας παρουσίασε την ίδια συμπτωματολογική εικόνα με τις δύο εφαρμογές του ζεόλιθου. Τέλος οι δύο εφαρμογές με το ζεόλιθο παρουσίασαν την ίδια συμπτωματολογική εικόνα σε όλες τις ημέρες.



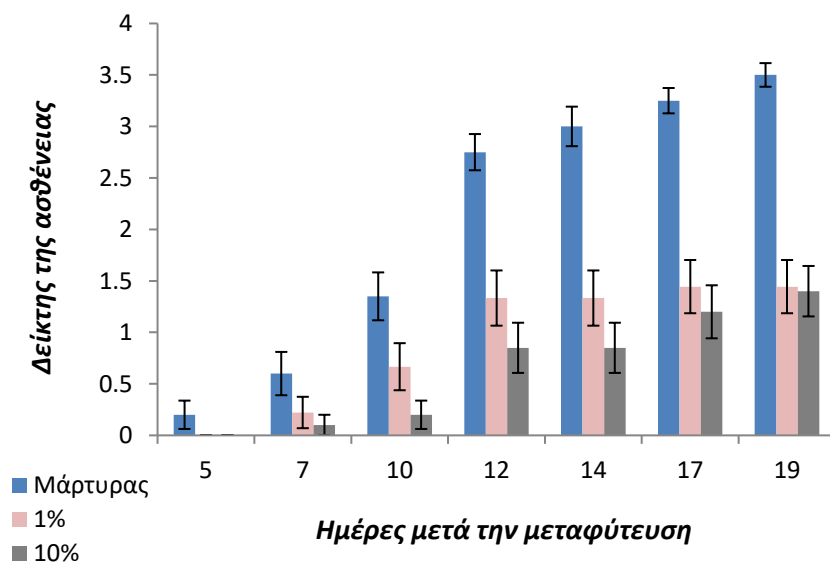
Εικόνα 4.5: Στο γράφημα αυτό απεικονίζεται το σχετικό εμβαδόν της καμπύλης εξέλιξης της ασθeneίας για 1) τα φυτά που μολύνθηκαν με το μύκητα *R.solani* 2) τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *R. solani* χώμα και 3) τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *R. solani* χώμα

Όπως φαίνεται στην εικόνα 4.5 τα φυτά μάρτυρες παρουσιάζουν το ίδιο εμβαδό ασθeneίας σε σχέση με τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο χώμα. Ωστόσο τα φυτά μάρτυρες φάνηκε να έχουν μεγαλύτερο εμβαδό ασθeneίας σε σχέση με τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο χώμα. Τέλος οι εφαρμογές όπου τα φυτά μαρουλιού αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο χώμα φάνηκε να παρουσιάζουν το ίδιο εμβαδό ασθeneίας.

4.1.2 Πείραμα παθογένειας σε φυτά που μολύνθηκαν με το μύκητα *S. sclerotiorum*

Πείραμα παθογένειας σε φυτά όπου ο ζεόλιθος προστέθηκε στη μεταφύτευση των φυτών μαρουλιού

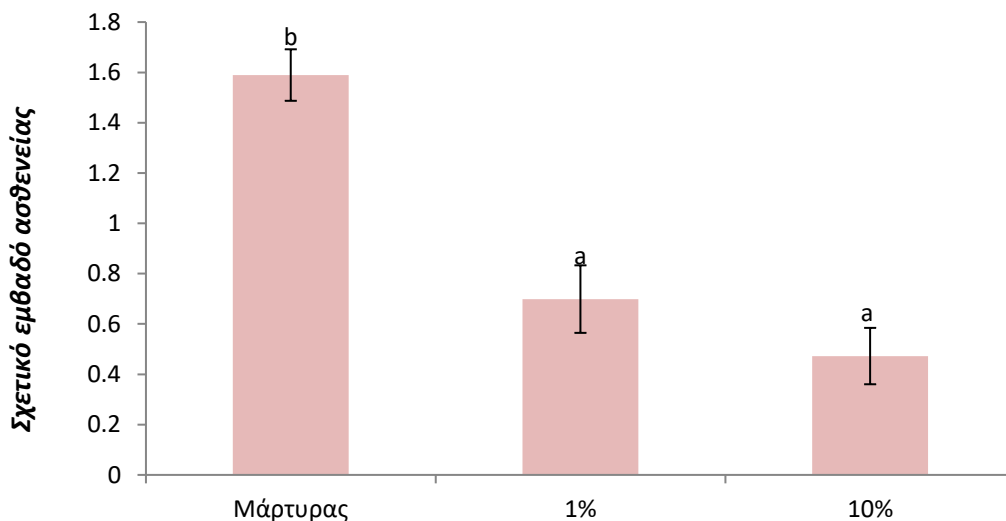
Για τη διερεύνηση της συμπτωματολογίας η καταγραφή ξεκίνησε 5 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών μαρουλιού με τον παθογόνο μύκητα *S. sclerotiorum* και η καταγραφή ολοκληρώθηκε 19 ημέρες μετά τη μόλυνση με το μύκητα *S. sclerotiorum*.



Εικόνα 4.6: Στο γράφημα αυτό απεικονίζεται η εξέλιξη της ασθένειας σε 1) φυτά τα οποία μολύνθηκαν μόνο με το μύκητα *S. sclerotiorum* 2) φυτά τα οποία μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *S. sclerotiorum* υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% 3) φυτά τα οποία μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *S. sclerotiorum* υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%

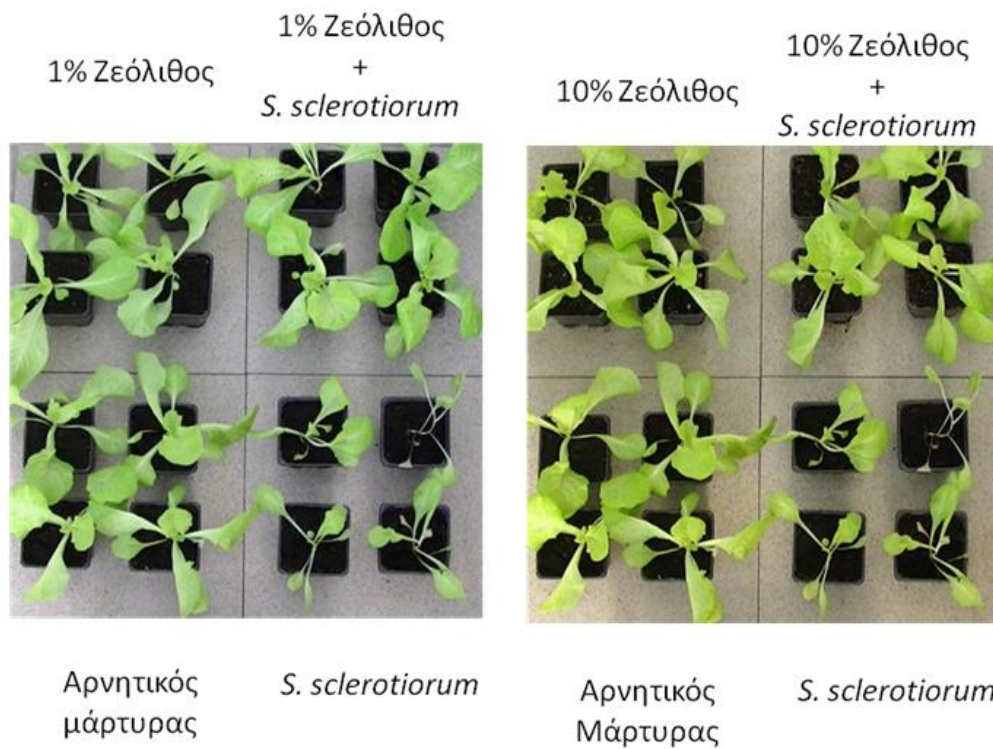
Όπως φαίνεται στο γράφημα 4.6 τα φυτά μάρτυρες, δηλαδή τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα υπόστρωμα μόνο με χώμα, παρουσίασαν τα περισσότερα συμπτώματα σε όλες τις χρονικές στιγμές σε σχέση με τις άλλες δύο εφαρμογές στις οποίες τα φυτά αναπτύχθηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο. Την 5^η ημέρα μετά την μόλυνση με τον παθογόνο μύκητα συμπτώματα παρουσίασαν μόνο τα φυτά μάρτυρες. Ενώ τα πρώτα συμπτώματα στις εφαρμογές όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε μολυσμένο υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο καταγράφηκαν την 7^η ημέρα. Την 7^η, 12^η, 14^η, 17^η και 19^η ημέρα μετά τη μεταφύτευση οι εφαρμογές με το ζεόλιθο παρουσιάζουν την ίδια συμπτωματολογική εικόνα. Ενώ την 10^η ημέρα μετά την μεταφύτευση η εφαρμογή όπου τα φυτά μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% παρουσίασε περισσότερα συμπτώματα σε σχέση με την

εφαρμογή όπου τα φυτά μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%.



Εικόνα 4.7: Στο γράφημα αυτό απεικονίζεται το σχετικό εμβαδόν της καμπύλης εξέλιξης της ασθeneίας για 1) τα φυτά που μολύνθηκαν με το μύκητα *S. sclerotiorum* 2) τα φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *S. sclerotiorum* υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και 3) τα φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *S. sclerotiorum* υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%

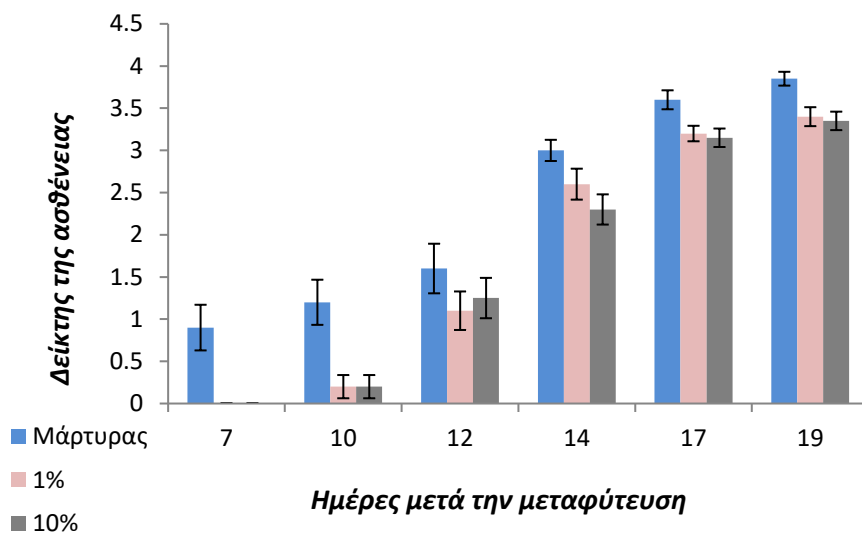
Όπως φαίνεται στο γράφημα 4.7 οι εφαρμογές όπου φυτά μαρουλιού αναπτύχθηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο, είτε σε ποσοστό 1% είτε σε ποσοστό 10%, παρουσίασαν λιγότερα συμπτώματα σε σχέση με τα φυτά της εφαρμογής του μάρτυρα. Οι δύο εφαρμογές με το ζεόλιθο παρουσίασαν το ίδιο σχετικό εμβαδό ασθeneίας.



Εικόνα 4.8: Πείραμα παθογένειας του μύκητα *S. sclerotiorum* σε φυτά μαρουλιού.

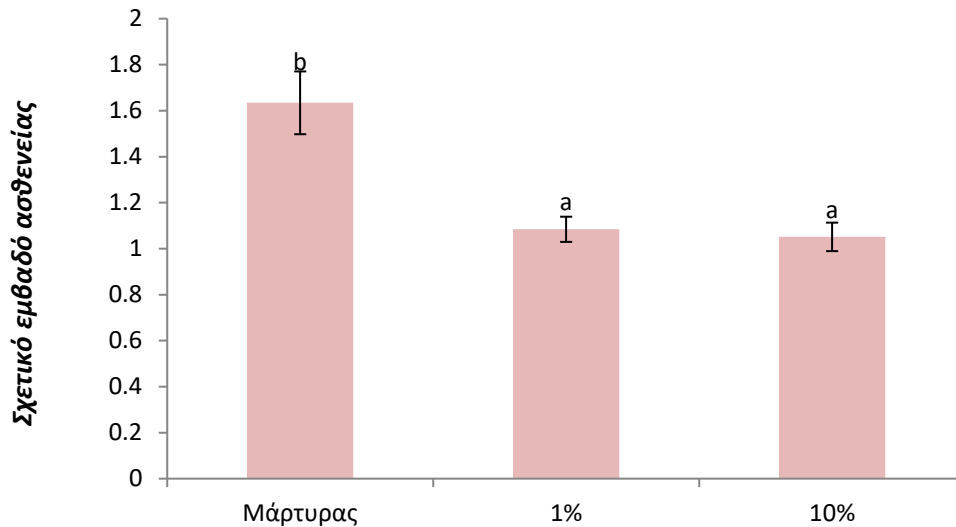
Πείραμα παθογένειας σε φυτά όπου ο ζεόλιθος προστέθηκε στο υπόστρωμα σποράς των φυτών μαρουλιού

Για τη διερεύνηση της συμπτωματολογίας η καταγραφή ξεκίνησε 7 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών μαρουλιού με τον παθογόνο μύκητα *S. sclerotiorum* και η καταγραφή ολοκληρώθηκε 19 ημέρες μετά τη μόλυνση με το μύκητα *S. sclerotiorum*.



Εικόνα 4.9: Στο γράφημα αυτό απεικονίζεται η εξέλιξη της ασθένειας σε 1)φυτά τα οποία μολύνθηκαν μόνο με το μύκητα *S. sclerotiorum* 2) φυτά τα οποία αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο χώμα με το μύκητα *S. sclerotiorum* 3) φυτά τα οποία αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο χώμα με το μύκητα *S. sclerotiorum*

Όπως φαίνεται στο γράφημα τα πρώτα συμπτώματα στα φυτά μάρτυρες ξεκίνησαν την 7^η ημέρα. Τα πρώτα συμπτώματα στις εφαρμογές όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο χώμα παρουσιάστηκαν την 10^η ημέρα. Τα φυτά μάρτυρες παρουσίασαν τα περισσότερα συμπτώματα σε όλες τις χρονικές στιγμές σε σχέση με τις άλλες δύο εφαρμογές με το ζεόλιθο, εκτός από την 12 ημέρα όπου παρουσίασε την ίδια συμπτωματολογική εικόνα με την εφαρμογή όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και 10%. Τέλος οι εφαρμογές με το ζεόλιθο παρουσίασαν την ίδια συμπτωματολογική εικόνα σε όλες τις χρονικές στιγμές.



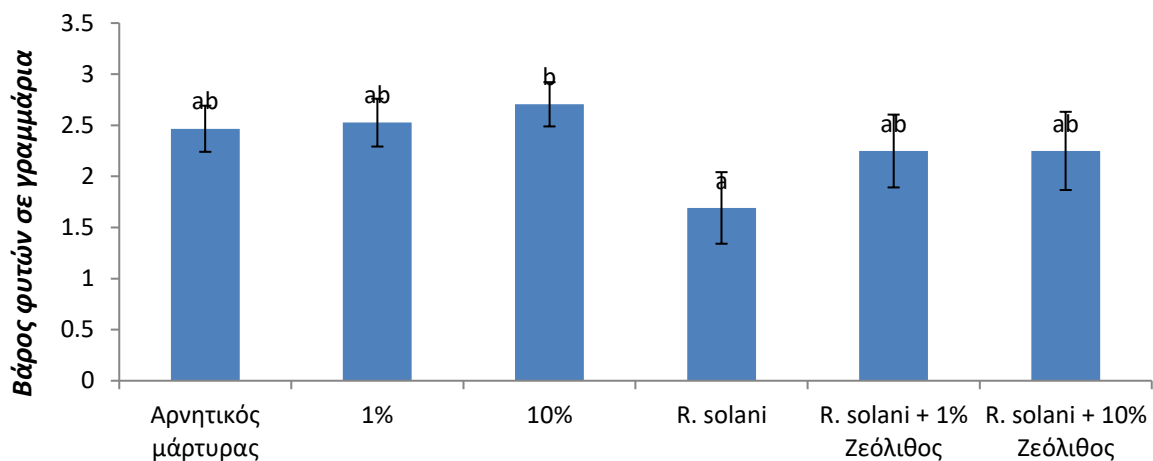
Εικόνα 4.10: Στο γράφημα αυτό απεικονίζεται το σχετικό εμβαδόν της καμπύλης εξέλιξης της ασθένειας για 1) τα φυτά που μολύνθηκαν με το μύκητα *S. sclerotiorum* 2) τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο χώμα με το μύκητα *S. sclerotiorum* και 3) τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% και μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο χώμα με το μύκητα *S. sclerotiorum*

Όπως φαίνεται στο γράφημα 4.10 τα φυτά, τα οποία αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο, σε ποσοστό 1% είτε σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%, και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο χώμα, παρουσίασαν μεγαλύτερη προστασία στην ασθένεια σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες δηλαδή τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και μεταφυτεύτηκαν στη συνέχεια σε χώμα μολυσμένο με το μύκητα. Οι δύο εφαρμογές με το ζεόλιθο παρουσίασαν το ίδιο εμβαδό ασθeneίας.

4.2 Πείραμα μέτρησης νωπού βάρους υπέργειου τμήματος

4.2.1 Φυτά μαρουλιού που μεταφυτεύτηκαν σε υπόστρωμα που περιείχε ζεόλιθο

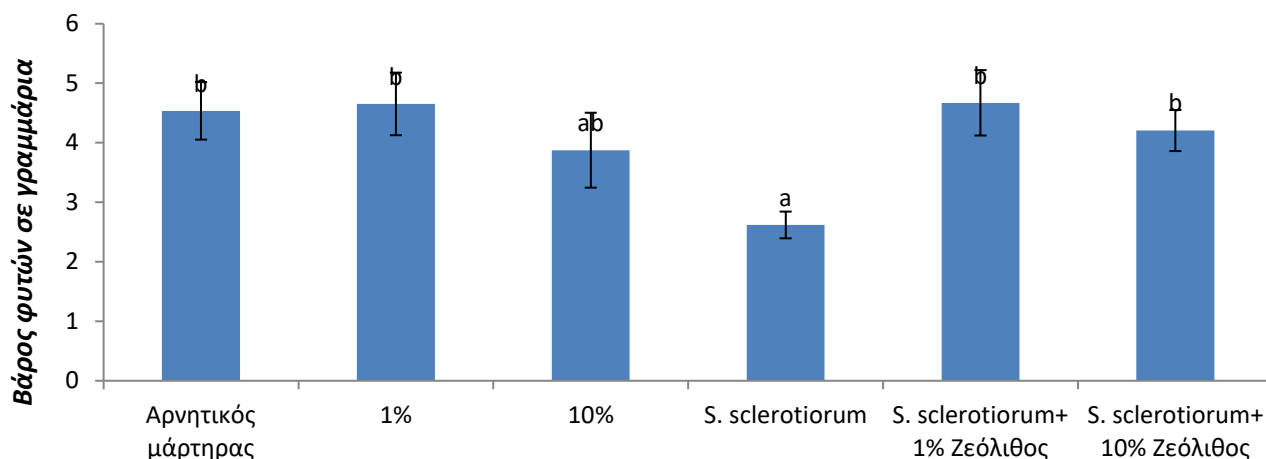
Rhizoctonia solani



Εικόνα 4.11: Μέσος όρος νωπού βάρους υπέργειου τμήματος 1) φυτών μαρουλιού που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα μόνο με χώμα 2) φυτών που μεταφυτεύτηκαν σε υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% 3) φυτών που μεταφυτεύτηκαν σε υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% 4) φυτών τα οποία μεταφυτεύθηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *R. solani* υπόστρωμα μόνο με χώμα 5) φυτών τα οποία μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *R. solani* υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% 6) φυτών τα οποία μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *R. solani* υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%

Όπως φαίνεται στο γράφημα 4.11, ο μέσος όρος του νωπού βάρους των φυτών που μεταφυτεύτηκαν σε μη μολυσμένο υπόστρωμα μόνο με χώμα, των φυτών που μεταφυτεύθηκαν σε μη μολυσμένο υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1%, των φυτών που μεταφυτεύθηκαν σε μη μολυσμένο υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%, των φυτών που μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και φυτών που μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% είναι ίδιος. Ο μέσος όρος νωπού βάρους στα φυτά τα οποία μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο υπόστρωμα μόνο με χώμα είναι ίδιος με όλες τις εφαρμογές εκτός από την εφαρμογή όπου τα φυτά μεταφυτεύτηκαν σε μη μολυσμένο υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%, όπου ο μέσος όρος του νωπού βάρους στα φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο χώμα είναι μικρότερος.

Sclerotinia sclerotiorum

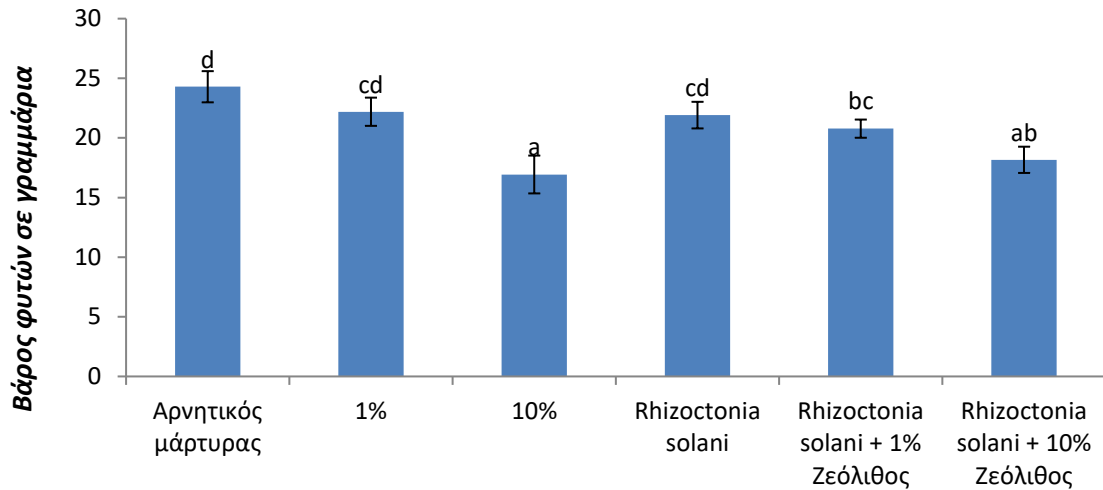


Εικόνα 4.12: Μέσος όρος νωπού βάρους υπέργειου τμήματος 1) φυτών μαρουλιού που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα μόνο με χώμα 2) φυτών που μεταφυτεύτηκαν σε υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% 3) φυτών που μεταφυτεύτηκαν σε υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% 4) φυτών τα οποία μεταφυτεύθηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *S. sclerotiorum* υπόστρωμα μόνο με χώμα 5) φυτών τα οποία μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *S. sclerotiorum* υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% 6) φυτών τα οποία μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *S. sclerotiorum* υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%

Όπως φαίνεται στο γράφημα 4.12 τα φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε μη μολυσμένο υπόστρωμα μόνο με χώμα, τα φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε μη μολυσμένο υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1%, τα φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε μη μολυσμένο υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% και τα φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο φάνηκε να έχουν τον ίδιο μέσο όρο νωπού βάρους. Η εφαρμογή όπου τα φυτά μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο υπόστρωμα μόνο με χώμα παρουσίασε μικρότερο μέσο όρο νωπού βάρους από όλες της εφαρμογές εκτός από την εφαρμογή όπου τα φυτά μεταφυτεύτηκαν σε μη μολυσμένο υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%. Τα φυτά αυτών των δύο εφαρμογών παρουσίασαν τον ίδιο μέσο όρο νωπού βάρους.

4.2.2 Φυτά μαρουλιού που στο υπόστρωμα σποράς περιείχαν ζεόλιθο

Rhizoctonia solani

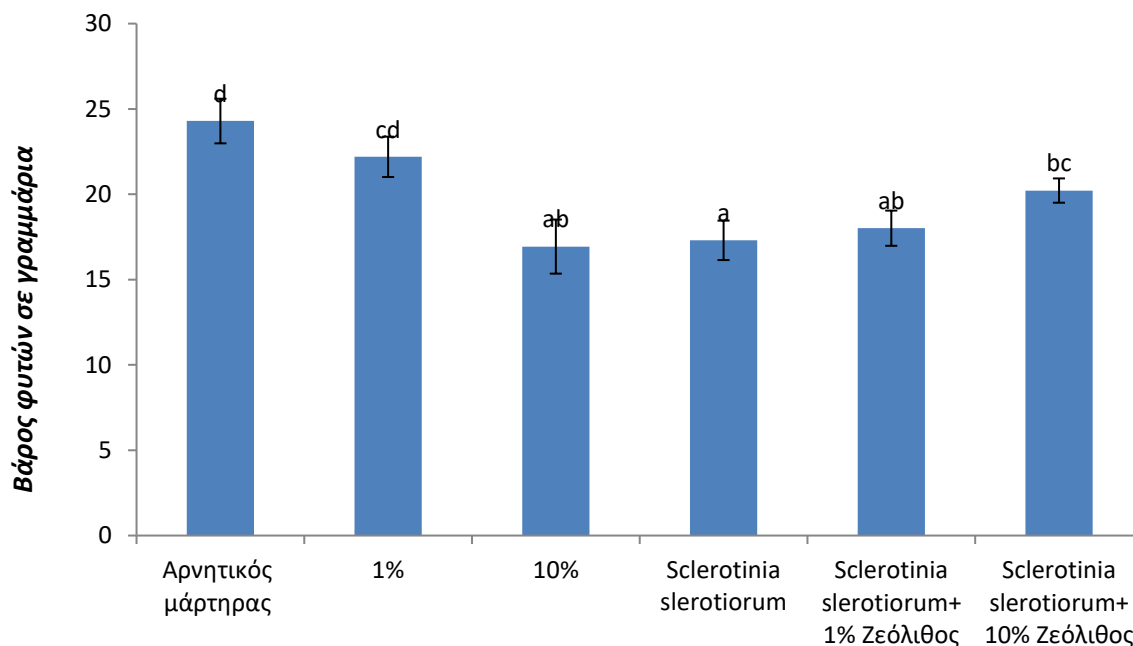


Εικόνα 4.13: Μέσος όρος νωπού βάρους υπέργειου τμήματος 1) φυτών μαρουλιού που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα μόνο και μεταφυτεύτηκαν σε χώμα 2) φυτών μαρουλιού που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και μεταφυτεύτηκαν σε χώμα 3) φυτών μαρουλιού που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% και μεταφυτεύτηκαν σε χώμα 4) φυτών μαρουλιού που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *R. solani* χώμα 5) φυτών μαρουλιού που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *R. solani* χώμα 6) φυτών μαρουλιού που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *R. solani* χώμα.

Όπως φαίνεται στο γράφημα 4.13, ο μέσο όρος του νωπού βάρους των φυτών που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο χώμα φάνηκε να είναι ίσος με τον μέσο όρο του νωπού βάρους των φυτών που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο χώμα. Επίσης φάνηκε να είναι μεγαλύτερος από την εφαρμογή όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% και που στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο χώμα. Οι εφαρμογές όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο και στην συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο χώμα παρουσίασαν τον ίδιο μέσο όρο νωπού βάρους. Η εφαρμογή όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και μεταφυτεύτηκαν σε χώμα αλλά και η εφαρμογή όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και μεταφυτεύτηκαν σε χώμα παρουσίασαν τον ίδιο μέσο όρο νωπού

βάρους. Οι δύο αυτές εφαρμογές παρουσίασαν μεγαλύτερο μέσο όρο νωπού βάρους από την εφαρμογή όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% και μεταφυτεύτηκαν σε χώμα. Ο μάρτυρας παρουσίασε τον ίδιο μέσο όρο νωπού βάρους με τον αρνητικό μάρτυρα και την εφαρμογή όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε χώμα. Ο μάρτυρας επίσης παρουσίασε μεγαλύτερο μέσο όρο νωπού βάρους από την εφαρμογή όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε χώμα. Η εφαρμογή όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο χώμα παρουσίασε τον ίδιο μέσο όρο νωπού βάρους με την εφαρμογή όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε χώμα. Η εφαρμογή όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο χώμα παρουσίασε μικρότερο μέσο όρο νωπού βάρους από τον αρνητικό μάρτυρα και μεγαλύτερο μέσο όρο νωπού βάρους από την εφαρμογή όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% και μεταφυτεύτηκαν σε χώμα. Ακόμη, τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο χώμα παρουσίασαν τον ίδιο μέσο όρο νωπού βάρους με τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε χώμα. Επίσης παρουσίασαν μικρότερο μέσο όρο νωπού βάρους με τον αρνητικό μάρτυρα αλλά και με την εφαρμογή όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και μεταφυτεύτηκαν σε χώμα.

Sclerotinia sclerotiorum



Εικόνα 4.14: Μέσος όρος νωπού βάρους υπέργειου τμήματος 1) φυτών μαρουλιού που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα μόνο και μεταφυτεύτηκαν σε χώμα 2) φυτών μαρουλιού που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και μεταφυτεύτηκαν σε χώμα 3) φυτών μαρουλιού που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% και μεταφυτεύτηκαν σε χώμα 4) φυτών μαρουλιού που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *S. sclerotiorum* χώμα 5) φυτών μαρουλιού που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *S. sclerotiorum* χώμα 6) φυτών μαρουλιού που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *S. sclerotiorum* χώμα.

Όπως φαίνεται στο γράφημα 4.14, ο μέσο όρος του νωπού βάρους του μάρτυρα είναι ίσος με την εφαρμογή όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο χώμα και μικρότερος με την εφαρμογή όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% και που στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο χώμα. Η εφαρμογή όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο χώμα παρουσίασε μέσο όρο νωπού βάρους ίσο με την εφαρμογή όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο χώμα. Ο μάρτυρας παρουσίασε μικρότερο μέσο όρο νωπού βάρους από τον αρνητικό

μάρτυρα αλλά και από την εφαρμογή όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε χώμα. Όμως ο μάρτυρας παρουσίασε ίσο μέσο όρο νωπού βάρους με την εφαρμογή όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε χώμα. Η εφαρμογή όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο χώμα παρουσίασε μικρότερο μέσο όρο νωπού βάρους από τον αρνητικό μάρτυρα αλλά και από τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν στο χώμα. Ωστόσο παρουσίασε τον ίδιο μέσο όρο νωπού βάρους με την εφαρμογή όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε χώμα. Επίσης η εφαρμογή όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο χώμα παρουσίασε μέσο όρο νωπού βάρους μικρότερο από τον αρνητικό μάρτυρα και ίσο μέσο όρο νωπού βάρους με τις εφαρμογές όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε χώμα. Η εφαρμογή του αρνητικού μάρτυρα παρουσιάζει ίσο μέσο όρο νωπού βάρους με την εφαρμογή όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και στην συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε χώμα. Ακόμη ο αρνητικός μάρτυρας παρουσιάζει μεγαλύτερο μέσο όρο νωπού βάρους από την εφαρμογή όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε χώμα. Τέλος η εφαρμογή όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και στη συνέχεια αναπτύχθηκαν σε χώμα παρουσίασε μεγαλύτερο μέσο όρο νωπού βάρους από την εφαρμογή όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% και στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν σε χώμα.

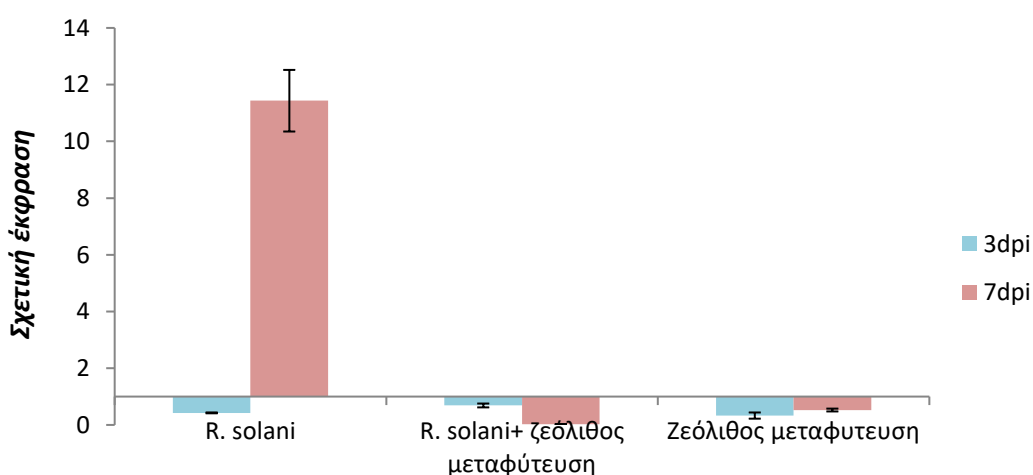
4.3 Διερεύνηση της έκφρασης των γονιδίων *PR1*, *ERF1* και *LOX*

Εκτός από την συμπτωματολογική κατάσταση των φυτών και τη μέτρηση νωπού βάρους έγινε και έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων *PR1*, *ERF1* και *LOX* σε δύο χρονικές στιγμές, στις 3 και 7 ημέρες μετά την μόλυνση των φυτών, στις παρακάτω εφαρμογές:

- Φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%
- Φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *R. solani* υπόστρωμα μόνο με χώμα
- Φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *R. solani* υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%
- Φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *S. sclerotiorum* υπόστρωμα μόνο με χώμα
- Φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *S. sclerotiorum* υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%
- Φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε υπόστρωμα με χώμα

4.3.1 Έκφραση του γονιδίου *PR1*

Rhizoctonia solani

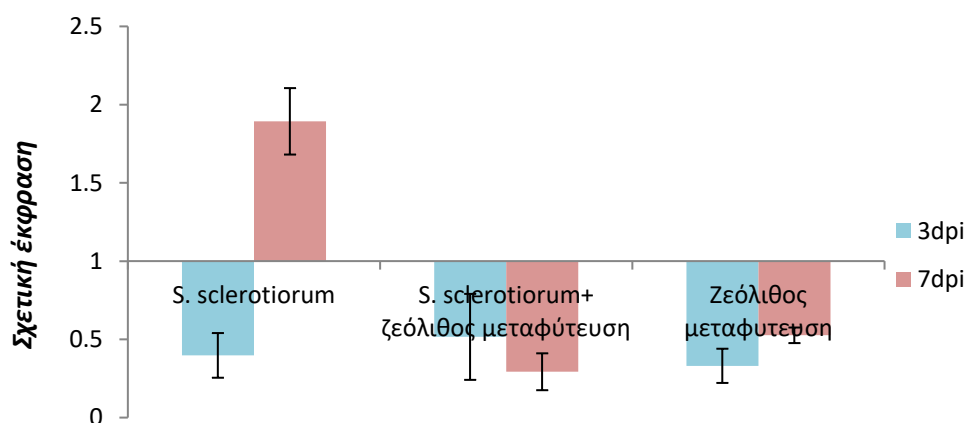


Εικόνα 4.15: Έκφραση γονιδίων *PR1* σε 1) φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *R. solani* υπόστρωμα μόνο με χώμα 2) φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με

το μύκητα *R. solani* υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% και 3) φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%.

- Στις 3 ημέρες μετά τη μόλυνση το γονίδιο *PR1* παρουσίασε υποέκφραση σε όλες τις εφαρμογές.
- Στις 7 ημέρες μετά τη μόλυνση το γονίδιο *PR1* παρουσίασε υποέκφραση σε όλες τις εφαρμογές εκτός από την εφαρμογή όπου τα φυτά μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα υπόστρωμα με χώμα μόνο, όπου το γονίδιο παρουσίασε σημαντικά επίπεδα έκφρασης.

Sclerotinia sclerotiorum

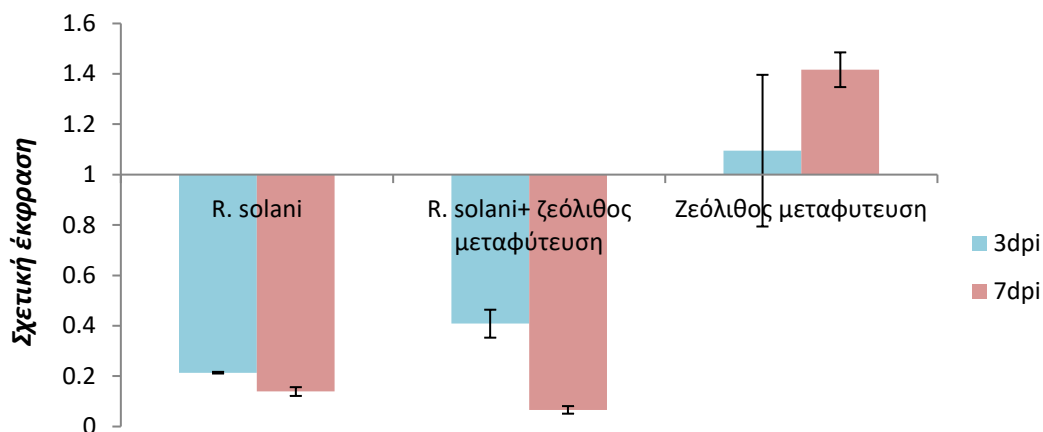


Εικόνα 4.16: Έκφραση γονιδίων *PR1* σε 1) φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *S. sclerotiorum* υπόστρωμα μόνο με χώμα 2) φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *S. sclerotiorum* υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% και 3) φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%.

- Στις 3 ημέρες μετά τη μόλυνση, το γονίδιο *PR1* υποεκφράστηκε σε όλες τις εφαρμογές.
- Στις 7 ημέρες μετά τη μόλυνση, το γονίδιο *PR1* υποεκφράστηκε σε όλες τις εφαρμογές εκτός από την εφαρμογή όπου τα φυτά μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα υπόστρωμα μόνο με χώμα όπου το γονίδιο παρουσίασε μικρά επίπεδα έκφρασης.

4.3.2 Έκφραση του γονιδίου *ERF1*

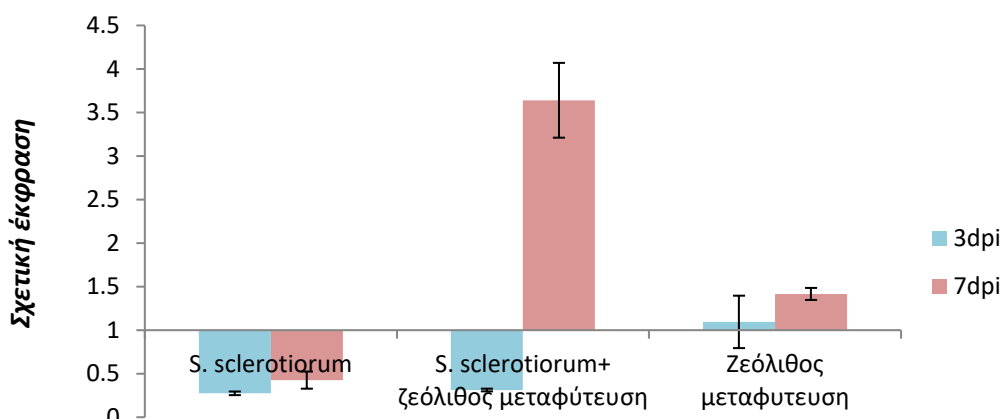
Rhizoctonia solani



Εικόνα 4.17: Έκφραση γονιδίων *ERF1* σε 1) φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *R. solani* υπόστρωμα μόνο με χώμα 2) φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *R. solani* υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% και 3) φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%.

- Στις 3 ημέρες μετά τη μόλυνση το γονίδιο *ERF1* υποεκφράστηκε στις δύο εφαρμογές όπου τα φυτά μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα υπόστρωμα. Στην εφαρμογή όπου τα φυτά μεταφυτεύτηκαν σε μη μολυσμένο υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% το γονίδιο *ERF1*, στις 3 ημέρες μετά τη μόλυνση, παρουσίασε μικρά επίπεδα έκφρασης.
- Στις 7 ημέρες μετά τη μόλυνση το γονίδιο *ERF1* υποεκφράστηκε στις δύο εφαρμογές όπου τα φυτά μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα υπόστρωμα. Στην εφαρμογή όπου τα φυτά μεταφυτεύτηκαν σε μη μολυσμένο υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο το γονίδιο *ERF1*, στις 7 ημέρες μετά τη μόλυνση, παρουσίασε μικρά επίπεδα έκφρασης.

Sclerotinia sclerotiorum

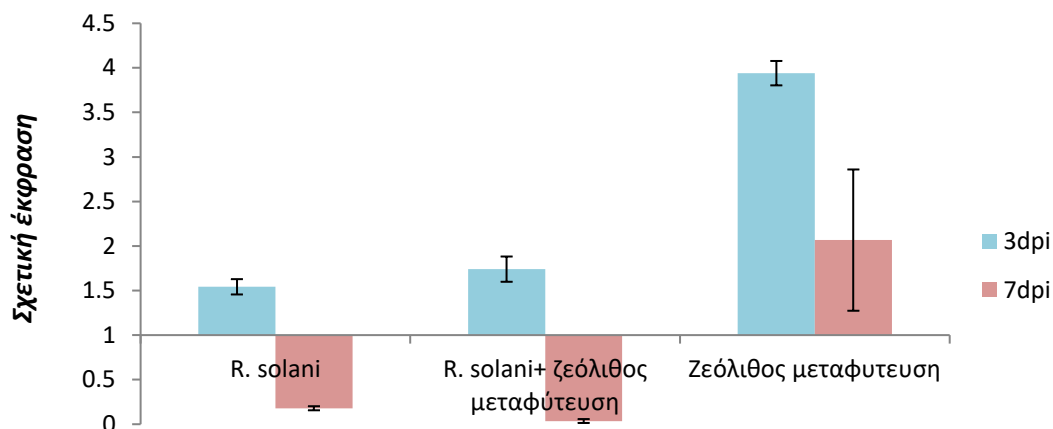


Εικόνα 4.18: Έκφραση γονιδίων *ERF1* σε 1) φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *S. sclerotiorum* υπόστρωμα μόνο με χώμα 2) φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *S. sclerotiorum* υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% και 3) φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%.

- Στις 3 ημέρες μετά τη μόλυνση με το μύκητα το γονίδιο *ERF1* υποεκφράστηκε σε στις δύο εφαρμογές όπου τα φυτά μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα υπόστρωμα. Η εφαρμογή όπου τα φυτά μεταφυτεύτηκαν σε μη μολυσμένο υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% το γονίδιο *ERF1*, στις 3 ημέρες μετά την μετά τη μόλυνση, παρουσίασε μικρά επίπεδα έκφρασης.
- Στις 7 ημέρες μετά τη μόλυνση φαίνεται ότι το γονίδιο *ERF1* υποεκφράστηκε στην εφαρμογή όπου τα φυτά μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα υπόστρωμα με χώμα μόνο. Στην εφαρμογή όπου τα φυτά μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% το γονίδιο *ERF1*, στις 7 ημέρες μετά τη μόλυνση ,παρουσίασε σημαντικά επίπεδα έκφρασης. Τέλος στην εφαρμογή όπου τα φυτά μεταφυτεύτηκαν σε μη μολυσμένο υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% το γονίδιο *ERF1*, στις 7 ημέρες μετά τη μόλυνση, παρουσίασε μικρά επίπεδα έκφρασης.

4.3.3 Έκφραση του γονιδίου *LOX*

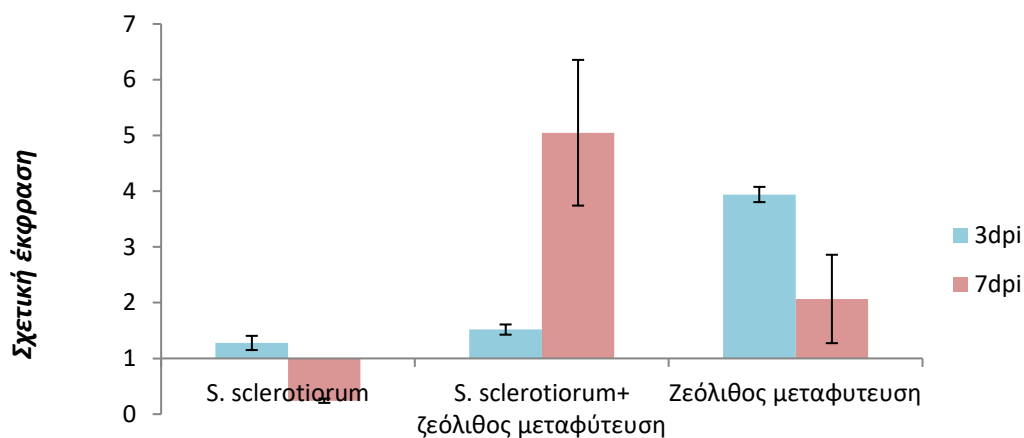
Rhizoctonia solani



Εικόνα 4.19: Έκφραση γονιδίων *LOX* σε 1) φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *R. solani* υπόστρωμα μόνο με χώμα 2) φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *R. solani* υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% και 3) φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%.

- Στις 3 ημέρες μετά τη μόλυνση το γονίδιο *LOX* παρουσίασε μικρά επίπεδα έκφρασης στις δύο εφαρμογές όπου τα φυτά μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα υπόστρωμα. Στην εφαρμογή όμως όπου τα φυτά μεταφυτεύτηκαν σε μη μολυσμένο υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% το γονίδιο *LOX*, στις 3 ημέρες μετά τη μόλυνση, παρουσίασε σημαντικά επίπεδα έκφρασης.
- Στις 7 ημέρες μετά τη μόλυνση το γονίδιο *LOX* υποεκφράστηκε στις δύο εφαρμογές όπου τα φυτά μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα υπόστρωμα. Όμως στην εφαρμογή όπου τα φυτά μεταφυτεύτηκαν σε μη μολυσμένο υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% το γονίδιο *LOX*, στις 7 ημέρες μετά τη μόλυνση, παρουσίασε σημαντικά επίπεδα έκφρασης.

Sclerotinia sclerotiorum



Εικόνα 4.20: Έκφραση γονιδίων *LOX* σε 1) φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *S. sclerotiorum* υπόστρωμα μόνο με χώμα 2) φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα *S. sclerotiorum* υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% και 3) φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%.

- Στις 3 ημέρες μετά τη μόλυνση το γονίδιο *LOX* παρουσίασε μικρά επίπεδα έκφρασης στις δύο εφαρμογές όπου τα φυτά μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα υπόστρωμα. Στην εφαρμογή όπου τα φυτά μεταφυτεύτηκαν σε μη μολυσμένο υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%, στις 3 ημέρες μετά τη μόλυνση, το γονίδιο *LOX* παρουσίασε σημαντικά επίπεδα έκφρασης.
- Στις 7 ημέρες μετά τη μόλυνση το γονίδιο *LOX* υπεκφράστηκε στην εφαρμογή όπου τα φυτά μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα υπόστρωμα με μόνο χώμα. Στην εφαρμογή όπου τα φυτά μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο με το μύκητα υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10% το γονίδιο *LOX*, στις 7 ημέρες μετά τη μόλυνση, παρουσίασε σημαντικά επίπεδα έκφρασης. Τέλος, 7 ημέρες μετά τη μόλυνση, η εφαρμογή όπου τα φυτά μεταφυτεύτηκαν σε μη μολυσμένο υπόστρωμα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%, το γονίδιο *LOX* παρουσίασε σημαντικά επίπεδα έκφρασης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στα περισσότερα αγροοικοσυστήματα τα εδαφογενή παθογόνα μπορεί να είναι ένας σημαντικός περιοριστικός παράγοντας στις αποδόσεις εμπορεύσιμων προϊόντων των καλλιεργειών. Οι φυτοπαθογόνοι μύκητες *Sclerotinia sclerotiorum* και *Rhizoctonia solani* αποτελούν πολύ σημαντικά εδαφογενή παθογόνα με ευρεία γεωγραφική εξάπλωση που προκαλούν πληθώρα ζημιών σε καλλιεργούμενα φυτά. Όσον αφορά το μαρούλι και γενικά τα φυλλώδη λαχανικά τα παραπάνω παθογόνα προκαλούν σημαντικές ζημίες και μείωση της παραγωγής.

Συχνές και σοβαρές είναι οι προσβολές από το μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum* στα μαρούλια αλλά και σε άλλα φυλλώδεις καλλιέργειες, όπως στο σέλινο, στο μαϊντανό, στο ραδίκι, στο σπανάκι, στο παντζάρι, στα τεύτλα αλλά και στα καρότα. Τα φυτά προσβάλλονται σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης τους, αλλά συχνότερη και περισσότερο σοβαρή είναι η μαλακή σήψη της βάσεως της κεφαλής (προσβολή της βάσεως των κατώτερων φύλλων και της βάσεως του στελέχους). Το παθογόνο προκαλεί επίσης και μετασυλλεκτικές σήψεις (Παναγόπουλος, 2000).

Ο μύκητας *Rhizoctonia solani* προκαλεί τήξεις στα σπορεία και σήψη της βάσεως της κεφαλής στα μαρούλια (damping-off, bottom rot) (Παναγόπουλος, 2000). Επίσης προσβάλλει και άλλα φυτά εκτός από το μαρούλι όπως το ρύζι, το σόργο, το καλαμπόκι, τη σόγια, το φασόλι, το ζαχαρότευτλο, τον καπνό, το μπιζέλι, το βαμβάκι, το σιτάρι, το λάχανο, το καρότο, το ιαπωνικό ραδίκι, τη φράουλα, τη μελιτζάνα και την τομάτα (Gonzalez *et al.*, 2006 ; Blancard *et al.*, 2006).

Πέραν των χημικών τρόπων αντιμετώπισης των παθογόνων, τα τελευταία χρόνια αντικείμενο έρευνας πολλών ερευνητών αποτελεί η εξεύρεση νέων τρόπων αντιμετώπισης, φιλικών προς το περιβάλλον.

Η σύγχρονη τάση αντιμετώπισης των παθογόνων μυκήτων *S. sclerotiorum* και *R. solani* είναι με βιολογικούς παράγοντες. Πολλά είδη του γένους *Trichoderma* έχουν βρεθεί ότι είναι πολλοί ισχυροί βιολογικοί παράγοντες εναντίον αρκετών εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων (Chet, 1987). Συγκεκριμένα το είδος *Trichoderma harzianum* έδειξε να είναι αποτελεσματικό στον έλεγχο του

σχηματισμού σκληρωτίων (Hadar *et al.*, 1979 ; DOS Santos και Dhingra, 1982). Επίσης μελέτες έχουν δείξει ότι ο μύκητας *Trichoderma harzianum* είναι βιολογικός παράγοντας ενάντια του παθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* σε μεγάλο αριθμό φυτών (Elad Y. *et al.*, 1979). Ένας άλλος βιολογικός παράγοντας που έχει βρεθεί ότι αποτελεί βιολογικό παράγοντα εναντίον των δύο αυτών φυτοπαθογόνων μυκήτων σε φυτά μαρουλιού είναι το βακτήριο *Paenibacillus alvei* K165 (Fatouros *et al.*, 2018).

Ένας άλλος τρόπος αντιμετώπισης πέρα από τη χρήση βιολογικών παραγόντων που προσπαθούν να εξερευνήσουν σήμερα οι επιστήμονες είναι η χρήση ορυκτών, όπως είναι ο ζεόλιθος. Πειράματα που έγιναν σε φυτά μελιτζάνα (Black Beauty) τα οποία μολύνθηκαν με το μύκητα *Verticillium dahliae* έδειξαν ότι το σχετικό εμβασμό ασθενείας στα φυτά που μολύνθηκαν μόνο με το μύκητα ήταν υψηλότερο από τα φυτά που μολύνθηκαν από το μύκητα και στο χώμα τους είχε προστεθεί ζεόλιθος σε αναλογία 9:1 (χώμα : ζεόλιθος) δηλαδή σε ποσοστό 10% ζεόλιθο (Παππά, 2015). Επίσης φάνηκε ότι ο ζεόλιθος προστάτευσε τα φυτά πεπονιού από το μύκητα *Fusarium oxysporum f.sp. melonis*. Στα δύο παραπάνω πειράματα ο ζεόλιθος εφαρμόστηκε μόνο μία φορά στη μεταφύτευση και φάνηκε ότι ενεργοποιεί την έκφραση των γονιδίων της άμυνας που εξαρτώνται από το σαλικυλικό οξύ. Επομένως ο κύριος μηχανισμός της καταστολής από την εφαρμογή του ζεόλιθου στα φυτά μελιτζάνας και πεπονιού μπορεί να οφείλετε στην επαγόμενη διασυστηματική αντοχή από το ζεόλιθο (Kefalogianni *et al.*, 2016).

Ο ζεόλιθος χρησιμοποιήθηκε για πολλά χρόνια ως υλικό βελτίωσης του εδάφους, καθώς απορροφά υψηλές ποσότητες νερού, θρεπτικών στοιχείων και χημικών ουσιών και δρα ως επιβραδυντής, απελευθερώνοντας νερό και θρεπτικά στοιχεία. Είναι γνωστό ότι ο ζεόλιθος βελτιώνει τις φυσικοχημικές και μικροβιακές ιδιότητες του εδάφους, αυξάνοντας τη διαθεσιμότητα σε άζωτο και φώσφορο και ενισχύει την αποδοτικότητα της οργανικής ύλης (Kefalogianni *et al.*, 2016).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα της χρήσης ζεόλιθου σε ποσοστό 1% και 10% σε υπόστρωμα σποράς και υπόστρωμα μεταφύτευσης εναντίον των μυκήτων *Sclerotinia sclerotiorum* και *Rhizoctonia solani* σε φυτά μαρουλιού. Για το σκοπό αυτό έγιναν δύο πειράματα παθογένειας. Το πρώτο πείραμα παθογένειας έγινε σε φυτά μαρουλιού που μεταφτεύτηκαν σε

υπόστρωμα με χώμα μολυσμένο με το μύκητα *R. solani*, σε φυτά μαρουλιού που μεταφυτεύτηκαν σε υπόστρωμα με ζεόλιθο, σε ποσοστό 1%, και χώμα μολυσμένο με το μύκητα *R. solani* και σε φυτά μαρουλιού που μεταφυτεύτηκαν σε υπόστρωμα με ζεόλιθο, σε ποσοστό 10%, και χώμα μολυσμένο με το μύκητα *R. solani*. Οι ίδιες εφαρμογές έγιναν και για το μύκητα *S. sclerotiorum*. Το δεύτερο πείραμα παθογένειας έγινε σε φυτά μαρουλιού που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο χώμα με το μύκητα *R. solani*, σε φυτά μαρουλιού που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο, σε ποσοστό 1%, και μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο χώμα με το μύκητα *R. solani* αλλά και σε φυτά μαρουλιού που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και ζεόλιθο, σε ποσοστό 10%, και μεταφυτεύτηκαν σε μολυσμένο χώμα με το μύκητα *R. solani*. Οι ίδιες εφαρμογές έγιναν και για το μύκητα *S. sclerotiorum*. Στις παραπάνω εφαρμογές έγινε και μέτρηση νωπού βάρους του υπέργειου τμήματος των φυτών μαρουλιού. Επιπλέον μέτρηση του νωπού βάρους του υπέργειου τμήματος έγινε και στις εφαρμογές όπου τα φυτά μεταφυτεύτηκαν σε μη μολυσμένα υποστρώματα με χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 1% και χώμα και ζεόλιθο σε ποσοστό 10%. Μέτρηση του νωπού βάρους του υπέργειου τμήματος έγινε και στις εφαρμογές όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υποστρώματα σποράς με χώμα και ζεόλιθο με ποσοστό 1% και χώμα και ζεόλιθο με ποσοστό 10% και στη συνέχεια τα φυτά αυτά και από τις δύο εφαρμογές μεταφυτεύτηκαν σε χώμα. Τέλος μέτρηση νωπού βάρους έγινε και στην εφαρμογή όπου τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα σποράς με χώμα και μεταφυτεύτηκαν σε υπόστρωμα με χώμα.

Επίσης έγινε διερεύνηση του επιπέδου έκφρασης των γονιδίων *PR1*, *ERF1* και *LOX*, σε φυτά μαρουλιού που μεταφυτεύτηκαν σε υπόστρωμα με χώμα μολυσμένο με το μύκητα *R. solani* και σε φυτά μαρουλιού που μεταφυτεύτηκαν σε υπόστρωμα με ζεόλιθο, σε ποσοστό 10%, και χώμα μολυσμένο με το μύκητα *R. solani*. Οι ίδιες εφαρμογές έγιναν και για το μύκητα *S. sclerotiorum*. Διερεύνηση του επιπέδου έκφρασης των γονιδίων *PR1*, *ERF1* και *LOX* έγινε και σε φυτά μαρουλιού που μεταφυτεύτηκαν σε υπόστρωμα με ζεόλιθο, σε ποσοστό 10%, και χώμα. Τα γονίδια *PR1*, *ERF1* και *LOX* σχετίζονται με την ενεργοποίηση των βιοχημικών μονοπατιών του σαλικυλικού οξέος, του αιθυλενίου και του ιασμονικού οξέος αντίστοιχα (Glazebrook, 2005 ; Fatouros *et al.*, 2018).

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης φάνηκε ότι η προσθήκη ζεόλιθου στο υπόστρωμα της μεταφύτευσης μείωσε το εμβαδό ασθενείας στα φυτά που μολύνθηκαν με το μύκητα *S. sclerotiorum* σε σχέση με το μάρτυρα. Αντίθετα τα φυτά που μολύνθηκαν με το μύκητα *R. solani* δεν παρουσίασαν διαφορά με το μάρτυρα, εκτός από την εφαρμογή που προστέθηκε ζεόλιθος σε ποσοστό 10% όπου τα φυτά παρουσίασαν λιγότερα συμπτώματα σε σχέση με το μάρτυρα. Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη ζεόλιθου στο υπόστρωμα σποράς μείωσε το σχετικό εμβαδό ασθενείας στα φυτά που μολύνθηκαν με το μύκητα *S. sclerotiorum* σε σχέση με τον μάρτυρα. Όμως στα φυτά που μολύνθηκαν με το μύκητα *R. solani* το σχετικό εμβαδό ασθενείας δεν παρουσίασε διαφορά με το μάρτυρα, εκτός από την εφαρμογή όπου ο ζεόλιθος προστέθηκε σε ποσοστό 1% όπου μειώθηκε σε σχέση με το μάρτυρα.

Από το πείραμα της μέτρησης του μέσου όρου του νωπού βάρους του υπέργειου τμήματος των φυτών παρατηρήθηκε ότι τα φυτά που μολύνθηκαν με το μύκητα *R. solani* και στα οποία είχε προστεθεί ζεόλιθος είτε στη μεταφύτευση είτε στη σπορά δε φάνηκε να παρουσιάζουν μεγαλύτερο μέσο όρο νωπού βάρους σε σχέση με το μάρτυρα. Δηλαδή δε φάνηκε τα μολυσμένα φυτά με το μύκητα στα οποία είχε προστεθεί ζεόλιθος είτε στη μεταφύτευση είτε στη σπορά να είναι πιο εύρωστα σε σχέση με το μάρτυρα. Αντίθετα τα φυτά που μολύνθηκαν με το μύκητα *S. sclerotiorum* και στα οποία είχε προστεθεί ζεόλιθος είτε στη μεταφύτευση είτε στη σπορά φάνηκε να είναι πιο εύρωστα σε σχέση με το μάρτυρα.

Η διερεύνηση της έκφρασης των γονιδίων έδειξε ότι στις εφαρμογές όπου έγινε εφαρμογή του ζεόλιθου παρουσία του μύκητα *S. sclerotiorum* υπήρξε επαγωγή των γονιδίων άμυνας *ERF1* και *LOX*. Αντιθέτως, στην περίπτωση των πειραμάτων με το μύκητα *R. solani* δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στην έκφραση των γονιδίων μεταξύ των διαφορετικών εφαρμογών. Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα, το γονίδιο *LOX* που σχετίζεται με την ενεργοποίηση των βιοχημικού μονοπατιού του ιασμονικού οξέος, επηρεάζεται από την παρουσία του ζεόλιθου. Αυτό μπορεί να συμβαίνει διότι ο ζεόλιθος είναι πιθανόν να προκαλεί πληγές στις ρίζες και όπως γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία υπάρχει διασυστηματική αντοχή σε παθογόνα που επάγεται από τραυματισμούς. Ο τραυματισμός νεαρών φυτών ρυζιού ενεργοποίησε τη διασυστηματική αντοχή που

οδήγησε στην προστασία των φυτών στη μόλυνση από το μύκητα *Magnaporthe grisea* απουσία έκφρασης γονιδίων *PR* (Schweizer *et al.*, 1998). Ακόμη έρευνες έχουν δείξει ότι το ιασμονικό οξύ έχει τον πιο σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα μετά από τραυματισμούς (Wasternack και Parthier, 1997).

Από την παρούσα εργασία είναι κατανοητό ότι αξίζει να μελετηθεί περαιτέρω η επίδραση του ζεόλιθου, ως υλικό υποστρώματος, που θα μπορούσε να συμβάλει στην αντιμετώπιση διαφόρων παθογόνων μυκήτων σε διάφορους ξενιστές.

ΒΙΒΛΙΟΦΡΑΦΙΑ

- **Παναγοπουλος Χ.Γ., (1995).** Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών. Εκδόσεις ΑΘ. Σταμούλης, Αθήνα
- **Παναγοπουλος Χ.Γ., (2007).** Ασθένειες καρποφόρων δένδρων & αμπέλου. Εκδόσεις ΑΘ. Σταμούλης, Αθήνα
- **Παναγόπουλος Χ.Γ., (2000).** Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών. Έκδοση. Εκδόσεις Σταμούλη. Αθήνα
- **Παππά Ε., (2015).** Εκτίμηση της παρεμποδιστικής δράσης in planta των βακτηρίων *Bcillus sp.*, *Bacillus subtilis* και *Stenotrophomonas rhizophila* τα οποία απομονώθηκαν από compost αγροτοβιομηχανικών υποπροϊόντων, έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Verticillium dahlia*. Πτυχιακή μελέτη.
- **Τζάμος Ε., (2007).** Φυτοπαθολογία. Εκδόσεις ΑΘ. Σταμούλης, Αθήνα
- **Φατούρος Γ., (2007).** Βιολογική αντιμετώπιση των εδαφογενών παθογόνων *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* και *Sclerotinia sclerotiorum*, του λείου κεφαλωτού μαρουλιού (*Lactuca sativa* L. var. capitata). Πτυχιακή μελέτη.
- **Ζιώγας Β.Ν. και Μαρκόγλου Α.Ν., (2010).** Γεωργική Φαρμακολογία. Ελληνικής έκδοσης.
- **Abawi, G.S. and Grogan, R.G. (1979).** Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, 69, 899–904
- **Abawi, G.S. and Grogan, R.G. (1975).** Source of primary inoculum and effects of temperature and moisture on infection of beans by *Whetzelinia sclerotiorum*. *Phytopathology*. 65:300-309.
- **Abd-El, Moity, T.H. and Shatla, M.N., (1981).** Biological control of white rot disease of onion (*Sclerotium cepivorum*) by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology Z.* 100:29-35.
- **Adams, P.B. and Ayres, W.A., (1979).** Ecology of *Sclerotinia* species. *Phytopathology*. 69:896-899.
- **Adams και Fravel, (1990).** Economical Biological Control of *Sclerotinia* Lettuce Drop by *Sporidesmium sclerotivorum*. *Phytopathology* 80:1120-1124.

- **Agrios GN (2005)** Plant pathology, 5th edn. Elsevier. New York
- **Argyris J., Dahal P., Hayashi E., Still D.W., Bradford K.J., (2008).** Genetic variation for lettuce seed thermo inhibition is associated with temperature sensitive expression of abscisic acid, gibberellin, and ethylene biosynthesis, metabolism, and response genes. *Plant Physiology* 148: 926–47.
- **Baird, R.E. (1997)** First Report of *Rhizoctonia solani* AF-7 in Georgia. *Plant Disease* 81:832
- **Ben-Yephet, Y. (1993).** Sclerotial survival and apothecial production by *Sclerotinia sclerotiorum* following outbreaks of lettuce drop. *Phytopathology* 83: 509-513.
- **Blancard, D., and Lot., H., Maisonneuve. (2006).** A color atlas of disease of lettuce and related 615 salad crops: observation, biology and control. Elsevier, London
- **Boland, G.J. and Hall, R. (1994).** Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Plant Path.* 16:93-108.
- **Budge, S.P. and Whipps, J.M. (1991).** Glasshouse trials of *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma* species for the biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* in celery and lettuce. *Plant Pathol.* 40:59-66.
- **Buntin G.D., Raymer, P.L., Bednarz, C.W., Phillips, D.V. and Baird R.E. (2002).** Winter crop Tillage, and Planting Date Effects on Double-crop cotton. *Agronomy Journal* 94:273-280.
- **Campbell, W.A. (1947).** A new species of *Coniothyrium* parasitic on sclerotia. *Mycologia.* 39:190-195
- **Carling 2002a, D.E., Baird, R.E., Gitaitis, R.T., Brainard, K.A. and Kuniyaga, S. (2002a).** Characterization of AG-13, a newly reported anastomosis group of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 92:893-899.
- **Cartwright, D.K., Chilton, W.S., and Benson, D.M.(1994).** Pyroclitrin and phenazine production by *Pseudomonas cepacia* strain 5.5B, a biocontrol agent of *Rhizoctonia solani*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 211–216.

- **Castillo H. F.D., Castillo F.R., Gallegos G.M., Rodriguez R. H. and Aguilar C., (2013).** Biological Control of Root Pathogens by Plant-Growth Promoting *Bacillus spp.*, Intech, Chapter 4
- **Chet, I. (1987).** *Trichoderma* - application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: I. Chet (ed.), Innovative Approaches to Plant Disease Control, pp. 137-160. John Wiley & Sons: New York.
- **Coley-Smith, J.R. and Cooke, R.C. (1971).** Survival and germination of fungal sclerotia. *Ann. Rev Phytop.* 9:65-92.
- **Cubeta M.A. and Vilgalys R.,(1997).** Population Biology of the *Rhizoctonia solani* Complex. *Phytopathology* April 1997, Volume 87, Number 4 Pages 480-484
- **De Cremer K, Mathys J, Vos C, Froenicke L, Michelmore RW, Cammue BPA, De Coninck, (2013).** RNAseq-based transcriptome analysis of *Lactuca sativa* infected by the fungal necrotroph *Botrytis cinerea*. *Plant, Cell and Environment* 36: 1992–2007
- **DOS Santos, A.F. and Dhingra, O.D. (1982).** Pathogenicity of *Trichoderma* spp on the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Bot.* 60:472-475.
- **Elad, Y., Chet, I., Boyle, P. and Henis, Y. (1983).** Parasitism of *Trichoderma* spp on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* – scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology* 73:85-88.
- **Elad Y., Chet I. and Katan J., (1979).** *Trichoderma harzianum*: A Biocontrol Agent Effective Against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70: 119-121
- **Fatouros G., Gkizi D., Fragogeorgi G.A., Paplomatas E.J., Tjamos S.E. (2018).** Biological control of *Pythium*, *Rhizoctonia* and *Sclerotinia* in lettuce: association of the plant protective activity of the bacterium *Paenibacillus alvei* K165 with the induction of systemic resistance. *Plant Pathology* 67 : 418-425
- **Gaffney T, Friedrich L., Vernooij B., Negrotto D., Nye G., Ukness S., Ward E., Kessmann H., Ryals J., (1993).** Requirement of salicylic acid for acquired resistance. *Science* 261: 754-756

- **Glazebrook J. (2005).** Contrasting mechanism of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 43: 205-27
- **Gonzalez, V.G., Portal, M.A.O. and Rubio, V.S. Review.(2006).** Biology and Systematics of the form genus *Rhizoctonia solani*. *Spanish journal of Agricultural Research* 4:55-79
- **Grosch R., Franziska F., Lottmann J., Kofoet A. and Gabriele B. (2005).** Effectiveness of 3 antagonistic bacterial isolates to control *Rhizoctonia solani* Kuhn on lettuce and potato. *Canadian Journal of Microbiology*. 51:345-353
- **Grosch, R., Schneider, J.H.M., and Kofoet, A. (2004a).** Characterisation of *Rhizoctonia solani* Anastomosis Groups causing bottom rot in field grown lettuce in Germany. *Eur. J. Plant Pathol.* 110: 53–62.
- **Hadar, Y., I. Chet, and Y. Henis, (1979).** Biological control of *Rhizoctonia solani* damping off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 69:64-68.
- **Hoes, J.A. and Huang, H.C., (1976).** Importance of disease to sunflower in Manitoba in 1975. *Can Plant Dis Surv.* 56:75-76.
- **Huang, H.C. ,(1980).** Control of *Sclerotinia* wilt of sunflower by hyperparasites. *Can J. Plant Pathol.* 2:26-32.
- **Huang, H.C., (1985).** Factors affecting myceliogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 75:433-437.
- **Huang, H.C., (1991).** Induction of myceliogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* by exposure to sub-freezing temperatures. *Plant Pathol.* 40:621-625.
- **Huang H.C, Bremer E. , Hynes R.K. , Erickson R.S., (2000).** Foliar Application of Fungal Biocontrol Agents for the Control of White Mold of Dry Bean Caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological Control* 18: 270–276
- **Huang, H.C. and Dueck, J., (1980).** Wilt of sunflower from infection by mycelialgerminating sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can J Plant Pathol.* 2:47-52
- **Huang, H.C. and Hoes, J.A., (1980).** Importance of plant spacing and sclerotial position to development of *Sclerotinia* wilt of sunflower. *Plant Dis.* 64:81-84

- **Huang H.C, Kokko E.G., (1993).** *Trichothecium roseum*, a mycoparasite of *Sclerotinia sclerotiorum*. Canadian Journal of Botany, 1993, 71(12): 1631-1638, 10.1139/b93-198
- **Huang, H.C. and Kozub, G.C., (1989).** A simple method for production of apothecia from sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Protec. Bull. (Taiwan) 31:333-345
- **Huang, H.C. and Kozub, G.C., (1990).** Cyclic occurrence of *Sclerotinia* wilt of sunflower in western Canada. Plant Dis. 74:766-770
- **Jones, E.E., Mead, A. and Whipps, J.M., (2003).** Evaluation of different *Coniothyrium minitans* inoculum sources and application rates on apothecial production and infection of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia. Soil Biol. and Bioch. 35:409-419
- **Jones, E.E. and Whipps, J.M., (2002).** Effect of inoculum rates and sources of *Coniothyrium minitans* on control of *Sclerotinia sclerotiorum* disease in glasshouse lettuce. Eur. J. Plant Pathol. 108:527-538
- **Kefalogianni I., Gkizi D., Pappa E., Dulaj L., Tjamos S.E., Chatzipavlidis I. (2016).** Combined use of biocontrol agents and zeolite as a management strategy against *Fusarium* and *Verticillium* wilt. BioControl.
- **Kofoet A, Fricke A, Heine H, Hommes M, Richter E, Ulbrich A, Weier U, (2001).** Kopfsalatsorten und ihre Anfälligkeit gegenüber bodenbürtigen Pathogenen. Gemüse 37: 10–13.
- **Knoester M., Van loon L.C., Van Den Hennig J., Bol J.F., Linthorst H.J.M., (1998).** Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 1933-1937
- **Khyathi V.P. and Hareshkumar K., (2013).** Identification of surfactins and iturins produced by potent fungal antagonist *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) tree using mass spectrometry. 3 Biotech 4:283-295
- **Lee, Y.A. and Wu, W.S., (1986).** Chemical and biological controls of sunflower *Sclerotinia* disease. Plant Protection Bulletin, (Taiwan, ROC) 28:101-109

- **McConn M., Creelman R.A., Bell E., Mullet J.E., Browse J., (1997).** Jasmonate is essential for insect defence in Arabidopsis, Proc. Nati. Acad. Sci. USA 94: 5473-5477
- **Melvin D. B, Bart. P. H. J. T. and Berlin D. N., (2006).** *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen, Molecular plant pathology (2006) 7(1), 1–16
- **Oerke E.C., (2005).** Crop losses to pests. Journal of Agricultural Science (2006), 144, 31–43. f 2005 Cambridge University Press 31 doi:10.1017/S0021859605005708 Printed in the United Kingdom
- **Oerke E.C., H.-W. Dehne, (2004).** Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection. Crop Protection 23 (2004) 275–285, Institute for Plant Diseases, University of Bonn, Bonn 53115, Germany
- **Ogoshi A., (1987).** Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kuhn. Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Kitaku, Sapporo 060, Japan Ann. Rev. Phytopathol. 1987. 25:125-43
- **Parmeter, T.R. and Whitney, H.S. (1970).** *Rhizoctonia solani*: Biology and Pathology. University of California Press, Berkley.
- **Parmeter, J.R., Sherwood, R.T. and Piatt W.D. (1969).** Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. Phytopathology. 59:1270-1278
- **Peltier A.J., Bradley C.A., Chilvers M.I., Malvick D.K., Mueller D.S., Wise K.A. and Esker P.D., (2012).** Biology, Yield loss and Control of Sclerotinia Stem Rot of Soybean. Pest Management.
- **Priyatmojo, A., Yotani, Y., Hattori, K., Kageyama, K., and Hyakumachi, M. (2001a).** Characterization of *Rhizoctonia spp.* Causing Root and Stem Rot of Miniature Rose. Plant Disease. 85:1200-1205
- **Purdy, L.H., (1979).** *Sclerotinia sclerotiorum*: history, disease and symptomatology, host range, geographic distribution and impact. Phytopathology 69:875-880
- **Raaijmakers J.M., Paulitz T.C., Steinberg C., Alabouvette C., Moëgne-Loccoz Y., (2009).** The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. Plant and Soil, Volume 321, Issue 1, pp 341–361

- **Schweizer P., Buchala A., Dudler R., Metraux J-P., (1998).** Induced systemic resistance in wounded rice plants Plant J. 14 : 475-481
- **Sharma, B.K. and Singh, B.M., (1990).** Biological control of white rot of pea caused by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. J Biol. Control 4:132-134
- **Smedt D.C., Someus E., Spanoghe P., (2015).** Potential and actual uses of zeolites in crop protection. Pest Manag Sci. 71:1355-1367
- **Sneh. (1996).** *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology Pathology and Control. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Germany
- **Stamatakis M.G., Requiro M., Calvo J.P., Fraggoulis D., Stamatakis G., (2010)** “A study of zeolitic tuffs associated with bentonine deposits from Almeria, Spain and Kimolos Island, Greece and their industrial potential as pozzolanas in the cement industry” Hellenic Journal of Geosciences. 45: 283-292
- **Staswick PE., Yuen GY., Lehman CC., (1998).** Jasmonate signaling mutants of Arabidopsis are susceptible to the soil fungus *Pythium irregular*. Plant J. 15: 747-745
- **Tores, J.A., (1990).** In vitro variability of a number of characteristics of *Sclerotinia sclerotiorum*. Phytoparasitica 18:321-329
- **Vijayan P., Shockey J., Levesque C.A., Cook R.J., Browse J., (1998).** A role for jasmonate in pathogen defense of Arabidopsis. Proc. Nati. Acad. Sci. USA. 95: 7209-7214
- **Wasternack C., Parthier B., (1997).** Jasmonate – signaled plant gene expression. Trends Plant Sci. 2 : 302-307
- **Whipps, J.M., (1993).** Aspects of selection and use of fungal antagonists for biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* in glasshouse celery and lettuce. In: Biological Control of Foliar and Post-Harvest Diseases (Eds. N.J. Fokkema, J. Kohl and Y. Elad), IOBC/WPRS Bulletin 16 (11), 1993, 60-63
- **Zizzerini A. and Tosi, L., (1985).** Antagonistic activity of fungi isolated from sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Pathol. 34:415-421
- **Zhou T. and Reeleder R.D. (1989).** Application of *Epicoccum purpurascens* spores to control white mold of snap bean. Plant Dis. 73:639-642