ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

*Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών*

*Τμήμα Φυτικής Παραγωγής*

*Μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών: Επιστήμες και Συστήματα Φυτικής Παραγωγής*

*Κατεύθυνση: Φυτοπροστασία και Περιβάλλον*

*Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας*

# *Μεταπτυχιακή διατριβή: Βιολογική Αντιμετώπιση του μύκητα Botrytis cinerea σε φυτά τομάτας και μαρουλιού*

*Επιβλέπων καθηγητής :* Τζάμος Σωτήρης

*Πολυτίμη Π. Κούμπουλα*

*Αθήνα*

*2019*

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Φυτικής Παραγωγής

Μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών: Επιστήμες και Συστήματα Φυτικής Παραγωγής

Κατεύθυνση: Φυτοπροστασία και Περιβάλλον

Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας

Μεταπτυχιακή διατριβή:

# Βιολογική Αντιμετώπιση του μύκητα Botrytis cinerea σε φυτά τομάτας και μαρουλιού

# Organic Treatment of Botrytis cinerea fungus in tomato and lettuce plants

*Επιβλέπων καθηγητής :* Τζάμος Σωτήρης

*Εξεταστική επιτροπή:*

*Καθηγητής* Παπλωματάς Επαμεινώνδας

*Αναπληρωτής καθηγητής* Τσιτσιγιάννης Δημήτρης

*Επίκουρος καθηγητής* Τζάμος Σωτήρης

*Πολυτίμη Π. Κούμπουλα*

*Αθήνα*

*2019*

## Περίληψη

Ο μύκητας *Botrytis cinerea* αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές ασθένειες για την καλλιέργεια της τομάτας και του μαρουλιού. Στην παρούσα ερευνητική εργασία μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα των φυτοπροστατευτικών μικροοργανισμών *Paenibacillus alvei* K165 και *Rhodotorula glutinis* Y44 κατά του μύκητα *B. cinerea* σε φυτά τομάτας και μαρουλιού. Το στέλεχος K165 εφαρμόστηκε στο ριζικό σύστημα των φυτών ενώ το στέλεχος Y44 στο εναέριο τμήμα των φυτών με ψεκασμό έως απορροής. Παρατηρήθηκε ότι η μονή εφαρμογή των στελεχών K165 και Y44 καθώς και ο συνδυασμός αυτών μείωσε σημαντικά την ένταση και τη συχνότητα της ασθένειας στα φυτά σε σχέση με τον μάρτυρα. επίσης πραγματοποιήθηκε καταγραφή της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα, στα φυτά των πειραματικών εφαρμογών προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδραση των στελεχών K165 και Y44 στην ενεργοποίησή της. Η μεταγραφομική ανάλυση έδειξε ότι τα φυτά στα οποία είχαν εφαρμοστεί αρχικά τα στελέχη K165 και Y44 και ακολούθως ο μύκητας *B. cinerea* παρουσίαζαν υψηλά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων άμυνας. Συνεπώς η φυτοπροστατευτική δράση των στελεχών K165 και Y44 είναι πιθανό ότι οφείλεται στην επαγωγή της άμυνας των φυτών εναντίον του μύκητα *B. cinerea*.



Λέξεις κλειδιά: Botrytis cinerea, Paenibacillus alvei, Rhodotorula glutinis, βιολογική αντιμετώπιση

## Abstract

*Botrytis cinerea* is one of the most important phytopathogenic fungi for the cultivation of tomato and lettuce. In the present research, was studied the effectiveness of the biocontrol agent *Paenibacillus alvei* K165 and *Rhodotorula glutinis* Y44 against *B. cinerea* in tomato and lettuce plants. The K165 strain was applied to the root system of the plants, while the Y44 strain in the aerial part of the plants by spraying to runoff. It was observed that the single application of the strains K165 and Y44 as well as their combination reduced significantly the intensity and severity of the disease in the plants compared to controls. It was also recorded the expression of the defense-related genes in the plants of the experimental treatments in order to ascertain the effect of K165 and Y44 strains. The transcriptional analysis showed that the plants treated with K165 /Y44 and *B. cinerea* showed high levels of expression of the defense genes. Therefore, the plant protective activity of strains K165 and Y44 is likely to be due to induction of plant defense against *B. cinerea*.

Key words: Botrytis cinerea, Paenibacillus alvei, Rhodotorula glutinis, biological control

*Ευχαριστίες*

*Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του επίκουρου καθηγητή Φυτοπαθολογίας Δρ. Τζάμου Σωτήρη, τον οποίο θέλω να ευχαριστήσω θερμά για την ανάθεση του θέματος της μελέτης, για την εμπιστοσύνη και το ενδιαφέρον που μου έδειξε, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές που μου παρείχε.*

*Επιπρόσθετα θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Γκίζη Δανάη που με καθοδήγησε καθ όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής του πειράματος και για την αμέριστη συμπαράσταση και συνεισφορά της στην πραγματοποίηση αυτής της μελέτης.*

*Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω το μέλος ΕΔΙΠ Γαρυφαλλιά Φραγκογεώργη που με καθοδήγησε κατά το εργαστηριακό μέρος του πειράματος, όπως επίσης και για την άριστη συνεργασία που είχαμε.*

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ


1.Εισαγωγή ..... 9
1.1 Μαρούλι ..... 9
1.1.1 Εισαγωγή ..... 9
1.1.2 Καταγωγή – Ιστορικό του φυτού ..... 9
1.1.3 Εξάπλωση της καλλιέργειας στις μέρες μας ..... 10
1.1.4 Βοτανικοί χαρακτήρες ..... 10
1.1.5 Ομάδες και τύποι μαρουλιού ..... 11
1.1.6 Η θρεπτική αξία του μαρουλιού ..... 12
1.1.7 Ασθένειες της καλλιέργειας ..... 12
1.1.8 Φυσιολογικές ανωμαλίες ..... 13
1.2 Τομάτα ..... 13
1.2.4 Εισαγωγή ..... 13
1.2.2. Καταγωγή – Ιστορικό ..... 14
1.2.3 Εξάπλωση της καλλιέργειας στις μέρες μας ..... 14
1.2.4 Βοτανικοί χαρακτήρες ..... 15
1.2.5 Η θρεπτική αξία της τομάτας ..... 16
1.2.6 Ασθένειες της καλλιέργειας ..... 16
1.2.7 Φυσιολογικές ανωμαλίες ..... 17
1.2 Βοτρύτης ..... 18
1.3.1 Επιστημονική ταξινόμηση ..... 18
1.3.2 Ξενιστές και συμπτώματα ..... 18
1.3.3 Κύκλος ζωής και επιδημιολογία του μύκητα ..... 20
1.3.4 Χημική καταπολέμησηκαι βιολογική αντιμετώπιση του μύκητα ..... 21
1.4 Βιολογική αντιμετώπιση ..... 22
1.4.1 Εισαγωγή ..... 22
1.4.2 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της βιολογικής αντιμετώπισης ..... 22
1.4.3 Οι Μικροοργανισμοί στηνφυτοπροστασία ..... 23
1.4.4 Βιολογική αντιμετώπιση - Ριζόσφαιρα ..... 23
1.5 Μηχανισμοί δράσης των βιολογικών παραγόντων ..... 25
1.5.1 Μηχανισμός αντιβίωσης ..... 25
1.5.2 Μηχανισμοί άμυνας των φυτών ..... 26
1.5.2.1 Επίκτητη ή επαγόμενη διασυστηματική αντοχή (ανοσοποίηση) ..... 26
1.5.3 Παρασιτισμός ..... 27


Αλλαγή κωδικού πεδίου

1.5.4 Ανταγωνισμός για θρεπτικά στοιχεία ..... 27
1.6 Βιοχημικοί παράγοντες της ανοσοποιήσεως ..... 27
1.6.1 Σήμα ..... 28
1.6.2 Σαλικυλικό οξύ ..... 28
1.6.3 Ιασμονικό οξύ ..... 28
1.6.4 Αιθυλένιο ..... 29
1.6.5 Ανταγωνισμός και συνεργιστική αλληλεπίδραση σαλικυλικού οξέος, ιασμονικού οξέος και αιθυλενίου ..... 29
1.7 Βιολογικά σκευάσματα σήμερα στην αγορά ..... 29
1.8 Σκοπός της παρούσας μελέτης ..... 30
2. Πειραματικό μέρος – Υλικά και μέθοδοι ..... 31
2.1 Βιολογικό υλικό ..... 31
2.2 Φυτικό υλικό ..... 31
2.3 Εργαστηριακά υλικά ..... 31
2.3.1 Στερεό θρεπτικό υλικό με εκχύλισμα πατάτας (PotatoDextroseAgar) ..... 31
2.3.2.*NG* ..... 31
2.3.3 Yeast MaltExtract, YME ..... 32
2.4 Καλλιέργεια και ανάπτυξη του βακτηρίου *P. alvei* στέλεχος K165 ..... 32
2.4 Καλλιέργεια και ανάπτυξη της ζύμης *R. glutinis* στέλεχος Y44 ..... 32
2.5 Καλλιέργεια και ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *B. cinerea* ..... 33
2.6 Πείραμα αντιβίωσης ..... 33
2.7 Πείραμα δοκιμών παθογένειας ..... 35
2.8 Απομόνωση RNA από φυτά μαρουλιού και τομάτας ..... 36
2.9 Μέτρηση νουκλεϊκών οξέων ..... 37
2.10 Σύνθεση cDNA ..... 37
2.11 Έκφραση των γονιδίων *PR1, LOX, ERF1* και *PR1, PIN2* ..... 38
3. Αποτελέσματα ..... 41
3.1 Αξιολόγηση των στελεχών K165 και Y44 εναντίον του μύκητα *B. cinerea* σε φυτά ..... 41
3.2 Αξιολόγηση των στελεχών K165 και Y44 εναντίον του μύκητα *B. cinerea* σε φυτά τομάτας ..... 47
3.3 Έκφραση γονιδίων σε φυτά μαρουλιών ..... 51
3.4 Έκφρασηγονιδίων σε φυτά τομάτας ..... 55
3.5 Πείραμα 5$^{o}$ - Πείραμα αντιβίωσης ..... 58
3.5.1 Πείραμα αντιβίωσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα από φύλλα μαρουλιού. 58

Αλλαγή κωδικού πεδίου

**3.5.2 Πείραμα αντιβίωσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα από φύλλα τομάτας.... 59**

**3.5.3 Πείραμα αντιβίωσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα από εκχύλισμα πατάτας (PDA). ..... 60**

**4. Συζήτηση αποτελεσμάτων – Συμπεράσματα ..... 61**

***Βιβλιογραφία*** **..... 66**

# 1.Εισαγωγή

## 1.1 Μαρούλι

### 1.1.1 Εισαγωγή

Το μαρούλι *Lactuca sativa L.* είναι το σημαντικότερο φυλλώδες λαχανικό που χρησιμοποιείται νωπό σε σαλάτα στην Ελλάδα, κυρίως το φθινόπωρο μέχρι την άνοιξη. Σημαντικό επίσης είναι σε πάρα πολλές χώρες του κόσμου όπως οι Η.Π.Α., οι χώρες τις κεντρικής Ευρώπης, η Αυστραλία, η Νέα Ζηλανδία και η Ιαπωνία.

Είναι κατά κανόνα υπαίθρια καλλιέργεια, αλλά καλλιεργείται και σε θερμοκήπια, σε χώρες που ο χειμώνας είναι πολύ ψυχρός όπως στις βόρειες χώρες της Ευρώπης, στον Καναδά, στη βόρεια Αμερική κ.α. (Ολύμπιος, 2015).

### 1.1.2 Καταγωγή – Ιστορικό του φυτού

Το καλλιεργούμενο μαρούλι θεωρείται ότι πιθανότατα προήλθε από το άγριο μαρούλι *Lactuca serriola* ή *scariola L.* το οποίο συναντάται ως ζιζάνιο σε πολλές περιοχές της Ευρώπης, ή κατόπιν διασταυρώσεων με τα άγρια είδη *L. saligna* ή *L. virosa*. Υπάρχουν πάνω από 100 είδη στο γένος *Lactuca*.

Το μαρούλι ανήκει στη μεγαλύτερη βοτανική οικογένεια των φυτών, τα σύνθετα (Compositae) και στην υποδιαίρεση *Liguliflorae*, στην οποία τα ανθίδια έχουν χαρακτηριστικό σχήμα που μοιάζει σαν λουρί, και στους βλαστούς και στα φύλλα σχηματίζεται ένας γαλακτώδης χυμός (latex). Συγγενικά είδη με το μαρούλι είναι το κιχώριο, το αντίδι κ.α. (Ryder and Whitaker, 1976).

Ζωγραφιές του μαρουλιού τύπου Cos έχουν βρεθεί σε επιτύμβιες πλάκες στην Αίγυπτο από το 4.500 π.Χ. Το μαρούλι αυτού του τύπου πιστεύεται ότι έχει διαδοθεί από την Ελλάδα και το όνομα του τύπου προέρχεται από τη νήσο Κω, στο Αιγαίο πέλαγος. Άλλοι χώροι προέλευσης θεωρούνται οι περιοχές της Ανατολικής Μεσογείου, Μικράς Ασίας, Καυκάσου, Περσίας και Τουρκιστάν. Στην Ελλάδα αυτοφύονται 9 είδη του γένους *Lactuca*. Αναφέρεται ότι οι Πέρσες το καλλιεργούσαν τον $6^{ο}$ π.Χ. αιώνα ενώ στην Αγγλία αναφέρεται για πρώτη φορά το κεφαλωτό μαρούλι το 1543 (Ολύμπιος, 2015).

Είναι γνωστό ότι το μαρούλι χρησιμοποιείται πάρα πολύ στη διατροφή του ανθρώπου πάνω από 2.000 χρόνια ενώ πριν από τη χρήση του σαν τροφή χρησιμοποιείτο για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες καθώς έχει ναρκωτικές και παυσίπονες ιδιότητες (Ολύμπιος, 2015).

### 1.1.3 Εξάπλωση της καλλιέργειας στις μέρες μας

Τη σημερινή εποχή το μαρούλι, έχει διαδοθεί και καλλιεργείται σχεδόν σε όλα τα γεωγραφικά πλάτη και μήκη της γης ως ετήσιο λαχανικό.

Στην Ασία παράγεται περίπου το 50% της παγκόσμιας παραγωγής. Το 27% στην βόρεια και κεντρική Αμερική, ενώ στην Ευρώπη το 20%. Σε διεθνές επίπεδο η Κίνα και η Αμερική είναι οι κυριότερες χώρες παραγωγής. Σε ευρωπαϊκό επίπεδο οι κυριότερες χώρες παραγωγής είναι η Ιταλία, η Ισπανία και η Γαλλία (Ολύμπιος, 2015).

Όσον αφορά τις εισαγωγές και τις εξαγωγές, η Γερμανία και το Ηνωμένο Βασίλειο εισάγουν τις μεγαλύτερες ποσότητες ενώ η Ισπανία και η Ολλανδία εξάγουν τις μεγαλύτερες ποσότητες.

Στην Ελλάδα το μαρούλι καλλιεργείται κυρίως σαν υπαίθρια καλλιέργεια σχεδόν όλη τη διάρκεια του χρόνου, αλλά κυρίως νωρίς το φθινόπωρο μέχρι και την επόμενη άνοιξη. Τα τελευταία χρόνια το μαρούλι καλλιεργείται και στα θερμοκήπια κατά τη διάρκεια του χειμώνα, γιατί η ανάπτυξή του γίνεται πιο γρήγορα και παράγεται μαρούλι πολύ καλής ποιότητας. Η ζήτηση του μαρουλιού είναι πάρα πολύ μεγάλη το καλοκαίρι.

Γενικά το μαρούλι καλλιεργείται σε όλες τις περιοχές της Ελλάδας, οι μεγαλύτερες όμως εκτάσεις συγκεντρώνονται γύρω από τα μεγάλα αστικά κέντρα καθώς εκεί βρίσκονται και οι περισσότεροι καταναλωτές (Ολύμπιος, 2015).

### 1.1.4 Βοτανικοί χαρακτήρες

Το ήμερο μαρούλι ή εδώδιμο ή το καλλιεργούμενο μαρούλι είναι διπλοειδές και έχει 18 χρωμοσώματα 2n=18. Σε κανονικές συνθήκες είναι φυτό «μακράς ημέρας», που σημαίνει ότι δεν παράγει ανθικό στέλεχος και άνθη, εφόσον η διάρκεια της ημέρας δεν ξεπεράσει κατά πολύ τις 12 ώρες φωτός.

*Φυτό* : Είναι φυτό, μονοετές, ποώδες.

*Βλαστός* : Κοντός κατά τη διάρκεια της βλαστικής φάσης και φέρει τα φύλλα πολύ πυκνά και αναπτύσσεται σημαντικά κατά τη φάση αναπαραγωγής.

*Φύλλα* : Είναι λεία, πλατιά, διαφόρου μεγέθους και σχήματος, ωοειδή, καρδιοειδή, επιμήκη, εμφανίζονται πάνω στον κοντό βλαστό κατά σπειροειδή διάταξη, είναι ακέραια ή κυματοειδή ή ακανόνιστα οδοντωτά. Το χρώμα, ανάλογα με τον τύπο και την ποικιλία, κυμαίνεται από βαθύ πράσινο ή πρασινοκίτρινο ως με κοκκινωπή απόχρωση.

*Ανθικό στέλεχος – Άνθη* : Την εποχή της αναπαραγωγής σχηματίζεται το ανθικό στέλεχος ύψους 60-120 εκ., όρθιο, λείο, χωρίς άκανθες, πολύφυλλο και διακλαδιζόμενο.

Τα άνθη είναι ερμαφρόδιτα και φέρονται σε ταξιανθίες, κεφαλές γύρω από τον ανθοφόρο βλαστό σε διακλαδώσεις, υπό μορφή κορυμβόμορφου βότρυ ή φόβυς και κάθε κεφαλή φέρει 15 – 25 άνθη.

Το μαρούλι αυτογονιμοποιείται.

*Καρπός* : Είναι αχαίνιο, μικρός, επιμήκης 3-4 χιλιοστών, χρώματος πρασινωπού, λευκωπού είτε γκριζωπού. Επίσης είναι λείος με ραβδώσεις και φέρει πάππο από λευκές λεπτές τρίχες.

*Ρίζα* : Το μαρούλι σχηματίζει πασσαλώδη ρίζα. Ύστερα όμως από μία ή περισσότερες μεταφυτεύσεις, η κεντρική ρίζα του φυτού καταστρέφεται και αναπτύσσει θυσσανώδες ριζικό σύστημα.

(Ολύμπιος, 2015)

### 1.1.5 Ομάδες και τύποι μαρουλιού

Ανάλογα με την μορφή και την διάταξη των φύλλων τους στον κοντό βλαστό και τον σχηματισμό ή την απουσία κεφαλής, τα μαρούλια που καλλιεργούνται σήμερα διακρίνονται στις παρακάτω ομάδες :

- *Κως ή Ρωμάνα (Cos or Romaine) Lactuca sativa var. romana D.C*

Είναι το μαρούλι που προτιμάται κυρίως στην Ελλάδα, τη Μέση Ανατολή και την βόρεια Αφρική. Φυτό όρθιο, υψηλό, με λεπτή μικρή και επιμήκη κεφαλή στο εσωτερικό και λεπτά μακριά φύλλα στο εξωτερικό, με χρώμα συνήθως σκούρο πράσινο.

- *Λείο, κεφαλωτό (Butter head) Lactuca sativa var. capitata D.C.*

Είναι ο τύπος μαρουλιού που προτιμάται στην κεντρική και την βόρεια Ευρώπη. Σχηματίζει περίπου σφαιρική κεφαλή, τα φύλλα είναι μαλακά και το χρώμα ποικίλλει από ελαφρύ μέχρι σκούρο πράσινο.

- *Κατσαρό κεφαλωτό (Crisphead, Iceberg ή Curly) Lactuca sativa var. capitata D.C.*

Καλλιεργείται κυρίως στις Η.Π.Α. και τον Καναδά. Το χρώμα του ποικίλλει από ελαφρύ μέχρι σκούρο βαθύ πράσινο. Επίσης σχηματίζει σφαιρική κεφαλή και τα φύλλα είναι κυματοειδή, σγουρά, τραγανά και εύθραυστα.

- *Χαλαρό ανοικτό φύλλωμα (Loose leaf)*

Τα φυτά αυτά αναπτύσσουν τα φύλλα τους ελεύθερα και δεν σχηματίζουν κεφαλή. Τα φύλλα είναι κατσαρά και το χρώμα τους ποικίλλει στις διάφορες αποχρώσεις του πράσινου ενώ τα εξωτερικά κυρίως φύλλα φέρουν κοκκινωπή απόχρωση.

Βέβαια υπάρχουν και άλλοι τύποι μαρουλιού, όπως το κινέζικο (Celtuce) Lactuca sativa var. angustana, που καλλιεργείται στην Κίνα και Taiwan και το ινδικό μαρούλι (Lactuca indica L.) το οποίο ενδημεί στην Κίνα.

(Ολύμπιος, 2015)

### 1.1.6 Η θρεπτική αξία του μαρουλιού

Το μαρούλι τύπου Κως είναι πιο θρεπτικό από τους κεφαλωτούς τύπους μαρουλιού, διότι έχει υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνες Α και C. Επιπλέον σαν λαχανικό είναι μια πολύ καλή πηγή Ca και P.

### 1.1.7 Ασθένειες της καλλιέργειας

- *Ασθένειες λόγω μυκήτων και ωομυκήτων*

Τήξη σπορείων: *Pythium sp., Rhizoctonia solani* κ.α.

Οι μικροοργανισμοί αυτοί προσβάλλουν τα νεαρά φυτά στο σπορείο και προκαλούν σημαντικές ζημιές. Αναπτύσσονται κυρίως στο λαιμό των φυταρίων με αποτέλεσμα τη σήψη, τον μαρασμό και τέλος την καταστροφή τους.

Περονόσπορος: *Bremia lactuca*

Προκαλεί χλωρωτικές κηλίδες στα φύλλα που βρίσκονται χαμηλά, όταν υπάρχει πολύ υγρασία και τελικά προκαλείται σήψη των φύλλων.

Βοτρύτης: *Botrytis cinerea*

Προσβάλλει το μαρούλι σε όλα τα στάδια ανάπτυξής του και προκαλεί σοβαρές ζημιές ιδιαίτερα το φθινόπωρο και την άνοιξη. Αρχικά η προσβολή εμφανίζεται σαν στίγματα σκούρου χρώματος στα κάτω φύλλα, εξελίσσεται σε μαλακή σήψη και στη συνέχεια εμφανίζεται η καρποφορία του μύκητα και το φυτό καταστρέφεται.

Σκληρωτινίαση: *Sclerotinia sclerotiorum*

Η προσβολή αναπτύσσεται κοντά στην επιφάνεια του εδάφους στον κορμό του φυτού και τα κατώτερα φύλλα. Αποτέλεσμα της προσβολής είναι η μάρανση και η καταστροφή των φυτών.

Ωίδιο: *Erysiphe cichoracearum*

Εμφανίζεται υπό την μορφή κηλίδων στα φύλλα με τη λευκή εξάνθιση των ωιδίων. Η πιθανότητα προσβολής αυξάνεται όταν επικρατούν υψηλά επίπεδα υγρασίας και θερμοκρασίας.

- *Ιώσεις*

Το «*μωσαϊκό του μαρουλιού*» (LMV = *Lettuce Mosaic Virus*), είναι η πιο σημαντική ίωση που προσβάλει τα μαρούλια. Μεταφέρεται με το σπόρο και τις αφίδες (*Myzus persicae*). Τα συμπτώματα της ίωσης είναι η εμφάνιση μωσαϊκού στα φύλλα, η παραμόρφωση τους και η καθυστέρηση της ανάπτυξης των φυτών.

(Ολύμπιος, 2015)

### 1.1.8 Φυσιολογικές ανωμαλίες

Σε αυτές περιλαμβάνονται το «φυσιολογικό κάψιμο των φύλλων», «το περιφερειακό κάψιμο των φύλλων» και η «υάλωση» ή αλλιώς «κάψιμο των νεύρων των φύλλων». Όλες αυτές οι ανωμαλίες υποβαθμίζουν την ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος και επίσης βοηθούν στην ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών που επιφέρουν την καταστροφή των φυτών.

## 1.2 Τομάτα

### 1.2.4 Εισαγωγή

Η τομάτα είναι αρκετά διαδεδομένο, πολύ δημοφιλές και ετήσιο λαχανικό. Η καλλιέργεια της τομάτας καταλαμβάνει την τρίτη θέση μετά την πατάτα και την

γλυκοπατάτα, σε διεθνή κλίμακα. Στην Ελλάδα η καλλιέργεια της επιτραπέζιας τομάτας καταλαμβάνει τη δεύτερη θέση μετά την πατάτα.

Καλλιεργείται για τον καρπό της, ο οποίος καταναλώνεται ώριμος, νωπός, αποξηραμένος, σε άλμη, ακέραιος ή σε πολτό. Η δημοτικότητα της καλλιέργειας ποικίλλει στις διάφορες χώρες, αλλά είναι ελάχιστες οι περιοχές της γης όπου η τομάτα δεν καλλιεργείται με καμία από τις μορφές καλλιέργειας της. Οι ποικιλίες της έχουν εγκλιματιστεί σε ένα μεγάλο εύρος τύπων εδάφους και κλίματος, αν και θα πρέπει να τονιστεί ότι το φυτό απαιτεί θερμό κλίμα και εδάφη με καλή στράγγιση.

Η μορφή καλλιέργειας του φυτού ποικίλει από την εκτατική (μεγάλες εκτάσεις σε γραμμική καλλιέργεια πλήρως μηχανοποιημένη, με εφάπαξ συγκομιδή με μηχανικά μέσα), έως την εντατική (καλλιέργεια σε θερμοκήπια, υποστύλωση, κλάδεμα, επαναλαμβανόμενη συγκομιδή με το χέρι κ.λπ.) (Ολύμπιος, 2015).

### 1.2.2. Καταγωγή – Ιστορικό

Η τομάτα είναι ένα από τα 8-10 πολύ συγγενικά είδη του γένους *Lycopersicon*, το οποίο ξεχωρίζει από το πολύ συγγενικό είδος *Solanum* (πιθανός πρόγονος), από τα χαρακτηριστικά διάρρηξης των ανθήρων και απελευθέρωσης της γύρης. Όλα τα είδη είναι ενδογενή φυτά της νοτιο-ανατολικής Αμερικής. Αν και αρχικά επικρατούσε η άποψη ότι η χώρα καταγωγής της τομάτας είναι το Περού, σήμερα με τις πληροφορίες (ιστορικές, αρχαιολογικές, εθνοβοτανικές), γίνεται δεκτό ότι η καταγωγή της καλλιεργούμενης τομάτας είναι το Μεξικό και πιο συγκεκριμένα η περιοχή *Vera Cruz-Puebla*, από όπου αρχικά μεταφέρθηκε τον 16$^{ο}$ αιώνα στην Ευρώπη και εν συνεχεία διασκορπίστηκε σε πολλές περιοχές της γης (Ολύμπιος, 2015).

Στην Ελλάδα η εισαγωγή της καλλιέργειας έγινε αρχικά την Αθήνα το 1818 περίπου.

Όποια και αν είναι η γεωγραφική της καταγωγή, είναι σήμερα αποδεκτό, ότι άμεσος πρόγονος της καλλιεργούμενης τομάτας είναι η *var. cerasiforme*, και με μοναδικό ίσως διεκδικητή (πρόγονο) την *L. pimpinellifolium*, που είναι αρκετά πιθανό να είναι παραπροϊόν, παρά μέλος της γενετικής σειράς.

### 1.2.3 Εξάπλωση της καλλιέργειας στις μέρες μας

Η τομάτα καλλιεργείται σχεδόν σε όλα τα μήκη και πλάτη του κόσμου. Το μεγαλύτερο ποσοστό καλλιεργείται στην Ασία, την Αμερική και την Ευρώπη. Η Γερμανία, η Γαλλία, η Ολλανδία, το Ηνωμένο Βασίλειο, η Ρωσική Ομοσπονδία, η Σαουδική Αραβία και τα Ηνωμένα Αραβικά Εμιράτα εισάγουν μεγάλες ποσότητες τομάτας και θα πρέπει να διερευνηθούν οι αγορές αυτές για πιθανές εξαγωγές από

την Ελλάδα. Αντιθέτως, χώρες όπως η Ισπανία, το Βέλγιο-Λουξεμβούργο, το Μαρόκο, η Ιταλία, η Τουρκία παρουσιάζουν μεγάλες εξαγωγές τομάτας.

Η τομάτα μπορεί να φυτευτεί οποιαδήποτε χρονική περίοδο. Οι συνθήκες όμως παραγωγής και εμπορίας στην Ελλάδα επέβαλαν ουσιαστικά δύο περιόδους φύτευσης στα θερμοκήπια. Η 1η περίοδος ξεκινά από τα μέσα Σεπτεμβρίου μέχρι και τα μέσα Νοεμβρίου, ενώ η 2η ξεκινά από τα μέσα Ιανουαρίου μέχρι και τα μέσα Φεβρουαρίου. Στην Ελλάδα, σχεδόν ολόκληρη η ποσότητα τομάτας που παράγεται στα θερμοκήπια καταναλώνεται στον τόπο που παράγεται και μόνο μια μικρή ποσότητα (1,2%) τελικά εξάγεται.

(Ολύμπιος, 2015)

### 1.2.4 Βοτανικοί χαρακτήρες

*Φυτό*: Είναι ποώδες, ετήσιο, διετές και σπανιότερα πολυετές.

*Ρίζα*: Αναπτύσσει ευδιάκριτη κεντρική ρίζα, αρκετές δευτερεύουσες και ριζικά τριχίδια, όταν ο σπόρος σπέρνεται κατευθείαν στην μόνιμη θέση. Όμως συνήθως στο θερμοκήπιο η τομάτα μεταφυτεύεται μία ή και περισσότερες φορές, η κεντρική ρίζα κόβεται και καταστρέφεται και το φυτό αρχίζει να παράγει πολλές δευτερεύουσες πλευρικές ρίζες, ακόμη και από το λαιμό του φυτού, κάτι το οποίο θεωρείται πλεονέκτημα αφού διευκολύνεται η μεταφυτευσή του, είτε με γυμνή ρίζα είτε με μπάλα χώματος, χωρίς όμως αυτό να σημαίνει ότι είναι αυτή και η ενδεδειγμένη τεχνική καλλιέργειας της τομάτας.

*Βλαστός*: Ο κεντρικός βλαστός φέρει τα πραγματικά φύλλα, στις μασχάλες των οποίων υπάρχουν οι οφθαλμοί που δίνουν τους πλευρικούς βλαστούς. Το φυτό της τομάτας γενικά έχει την τάση να σχηματίζει πολλούς βλαστούς. Πολλές φορές οι πλευρικοί βλαστοί οι οποίοι βρίσκονται κοντά στη κορυφή του φυτού είναι τόσο ζωηροί, που με δυσκολία ξεχωρίζει κανείς ποιος είναι ο κεντρικός και ποιος ο πλευρικός βλαστός.

*Φύλλα*: Τα πραγματικά φύλλα της τομάτας είναι σύνθετα. Κάθε φύλλο αποτελείται από ζεύγη φυλλαρίων και παραφύλλων, με ένα μόνο φυλλάριο στην άκρη. Ο αριθμός των ζευγών φυλλαρίων σε κάθε φύλλο ποικίλει ανάλογα με την ποικιλία και τη θέση του φύλλου επάνω στον βλαστό. Είναι δυνατόν να υπάρχουν ποικιλίες με 3,4 ή 5 ζεύγη φυλλαρίων.

*Άνθη – Ταξιανθία*: Τα άνθη της καλλιέργειας εμφανίζονται σε ταξιανθίες από 2-3 άνθη ανά ταξιανθία μέχρι και 20 ή και περισσότερα. Βέβαια ένας μέσος επιθυμητός αριθμός ανθέων ανά ταξιανθία που θα εξελιχθεί σε καρπούς είναι 6-8 άνθη. Οι ταξιανθίες εμφανίζονται επί των βλαστών του φυτού και διακλαδίζονται συμμετρικά ή ασύμμετρα, ανάλογα την ποικιλία.

*Καρπός*: Είναι πολύχωρος ράγα με ποικίλα σχήματα. Οι ποικιλίες που ο καρπός τους έχει 2 χωρίσματα συνήθως είναι στρογγυλός, ενώ αυτές οι ποικιλίες που ο καρπός τους έχει 3,4,5 ή και περισσότερα χωρίσματα είναι πεπλατυσμένος και μπορεί και ακανόνιστος.

*Σπόρος*: Είναι ωοειδής, πεπλατυσμένος, χρώματος κίτρινο-καφέ και η επιφάνειά του καλύπτεται με τριχοειδείς αποφύσεις που του δίνουν μεταξωτή επιφάνεια. Το μέγεθος των σπόρων είναι μικρό, διαμέτρου 3-5 χλστ.

(Ολύμπιος, 2015)

### 1.2.5 Η θρεπτική αξία της τομάτας

Εφοδιάζει τον ανθρώπινο οργανισμό με βιταμίνες, ιδίως με τη βιταμίνη C.

### 1.2.6 Ασθένειες της καλλιέργειας

- *Μυκητολογικές ασθένειες*

Αδρομυκώσεις: *Verticillium dahliae, V. albo-atrum, Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*

Καστανή σήψη των ριζών ή φελλώδης σηψιρριζία (Brown root ή corky root): *Pyrenochaeta lycopersici*.

*Didymella lycopersici*

Προσβάλει κυρίως το στέλεχος αλλά και τα φύλλα και τους καρπούς.

Φαία σήψη: *Botrytis cinerea*

Προσβάλλει στελέχη, φύλλα, καρπούς, άνθη, όταν η θερμοκρασία είναι σχετικά χαμηλή (δλδ<18$^{o}$C).

Περονόσπορος: *Phytophtora infestans*

Προσβάλλει όλα τα τρυφερά μέρη του φυτού όταν η θερμοκρασία είναι χαμηλή και η υγρασία υψηλή.

Πρώιμος περονόσπορος: *Alternaria solani*

Προσβάλλει το λαιμό των νεαρών φυτών και στα ανεπτυγμένα φυτά τα φύλλα, τους βλαστούς και τους καρπούς ενώ ευνοείται από τον συνδυασμό υψηλής θερμοκρασίας και υγρασίας.

Κλαδοσπορίαση*: Cladosporium fulvum ή Fulvia fulva*

Προσβάλει τα κατώτερα φύλλα. Ευνοείται από θερμοκρασίες μεταξύ 18-24$^{o}$C και υγρασία 95%.

Ωίδιο: *Leveillula taurica*

Προσβάλλει κυρίως τα κατώτερα φύλλα και ευνοείται σε υψηλές θερμοκρασίες.

Σκληρωτινίαση: *Sclerotinia sclerotiorum*

Προσβάλλει κυρίως τα στελέχη αλλά και τα φύλλα και τους καρπούς.

- *Ιώσεις*

*Μωσαϊκό του καπνού – TMV*

Προσβάλλει το φυτό και προκαλεί μικροφυλλία και τα χαρακτηριστικά συμπτώματα του μωσαϊκού.

*Κίτρινο καρούλιασμα των φύλλων – TYLCV*

Προσβάλλει ολόκληρο το φυτό αλλά κυρίως τη βλαστάνουσα κορυφή. Προκαλεί βράχυνση των μεσογονατίων και παραμόρφωση. Επίσης μεταδίδεται με τον αλευρώδη.

### 1.2.7 Φυσιολογικές ανωμαλίες

- Ανωμαλίες στο φυτό

Λέπτυνση κορυφής και συστροφή των νεαρών φύλλων της κορυφής.

- Ανωμαλίες στον καρπό

Σχίσιμο ή σχάσιμο του καρπού, ξηρή σήψη κορυφής του καρπού, εσωτερική καστάνωση του, γκρίζα τοιχώματα αυτού, ανομοιόμορφη (κηλιδωτή) ωρίμανση καρπού, γωνιώδης καρπός, μαστοειδής καρπός, παραμόρφωση καρπού, ηλιόκαυμα, χείμερα (*Chimera – silvering*).

Τα αίτια που προκαλούν τις φυσιολογικές ανωμαλίες στην καλλιέργεια, είναι αρκετά και δρουν μεμονωμένα ή σε συνδυασμούς. Κάποια από αυτά τα αίτια μπορεί να είναι τα επίπεδα θερμοκρασίας και υγρασίας του περιβάλλοντος, η ένταση του φωτισμού, διάφορες τυχόν τροφοπενείες, η περιεκτικότητα αλάτων του εδάφους κ.α.

(Ολύμπιος, 2015)

## 1.2 Βοτρύτης

### 1.3.1 Επιστημονική ταξινόμηση

*Βασίλειο*: *Μύκητες*
*Φύλλο*: *Ascomycota*
*Υπόφυλλο*: *Pezizomycotina*
*Τάξη*: *Leotiomycetes*
*Σειρά*: *Helotiales*
*Οικογένεια*: *Sclerotiniaceae*
*Γένος*: *Botryotinia*

### 1.3.2 Ξενιστές και συμπτώματα

Πάνω από 200 είδη, κυρίως δικοτυλήδονων φυτών επηρεάζονται από τον μύκητα σε υποτροπικές και εύκρατες περιοχές. Ο μύκητας παράγει μια σειρά ενζύμων αποδόμησης των κυτταρικών τοιχωμάτων, τοξίνες και άλλες χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις όπως το οξαλικό οξύ. Νέες μελέτες δείχνουν ότι το παθογόνο ενεργοποιεί τον ξενιστή ώστε να προκαλέσει προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο ως μια στρατηγική παθογένειας.

Προκαλεί μαλακή σήψη σε όλα τα εναέρια τμήματα του φυτού (Droby και Lichter 2004). Το κύριο σημείο είναι εκτεταμένη γκρι εξάνθηση σε διάφορα φυτικά όργανα, συμπεριλαμβανομένων ανθέων, καρπών, φύλλων, και βλαστών. Επίσης, ο μύκητας προσβάλλει μετασυλλεκτικά τους καρπούς προκαλώντας σημαντικές οικονομικές απώλειες σε παγκόσμιο επίπεδο.

Η υψηλή σχετική υγρασία είναι μια βασική προϋπόθεση για την ανάπτυξη της ασθένειας, ενώ η θερμοκρασία δεν φαίνεται να παρουσιάζει κάποιο ρόλο καθώς ο μύκητας μπορεί και αναπτύσσεται σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών, με προτίμηση σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 20 C.

Με το αυξανόμενο διεθνές εμπόριο προϊόντων ψυχρής αποθήκευσης, αυτός ο μύκητας έχει αποκτήσει εξαιρετικά σημαντική σημασία επειδή μπορεί να αναπτυχθεί αποτελεσματικά σε μεγάλες χρονικές περιόδους, ακριβώς πάνω από τις θερμοκρασίες κατάψυξης σε προϊόντα όπως τα ακτινίδια, μήλα και αχλάδια (Brian Williamson, 2007).

*Εικόνα 1*: φωτογραφίες προσβεβλημένων φυτών (φρούτα + λουλούδια + βλαστοί) και συμπτωμάτων από το μύκητα Botrytis cinerea.

**1.3.3 Κύκλος ζωής και επιδημιολογία του μύκητα**

Ο μύκητας επιβιώνει με σκληρώτια τα οποία αναπτύσσονται μέσα στους νεκρούς ιστούς του ξενιστή και αντιπροσωπεύουν ένα σημαντικό μηχανισμό επιβίωσης του μύκητα *B. cinerea*. Η μελάνωση και οι β-γλυκάνες που περιβάλλουν το εσωτερικό των μυκηλίων τα προστατεύουν από την αποξήρανση, την υπεριώδη ακτινοβολία και την μικροβιακή επίθεση επί μεγάλες περιόδους (Backhouse and Willets, 1984).

Η ανάπτυξη των σκληρωτίων ξεκινάει στις αρχές της άνοιξης σε εύκρατες περιοχές, για την παραγωγή κονιδιοφόρων και πολυπυρηνικών κονιδίων. Τα μυκήλια επίσης επιβιώνουν μέσα σε μολυσμένους νεκρούς ιστούς του ξενιστή που απομένουν ως υπολείμματα καλλιεργειών και μέσα σε σπόρους. Σε πολυετή φυτά, τα νεκρά φύλλα, τα λουλούδια και τα μουμιοποιημένα φρούτα περιέχουν μάζες μυκηλίου που συχνά βρίσκονται σε ιδανική θέση εντός για να παράγουν κονίδια και να προκαλέσουν μετέπειτα μολύνσεις (Brian Williamson, 2007).

*Εικόνα 2:* Κονιδιοφόροι και κονίδια, ασκοί που περιέχουν τα ασκοσπόρεια του μύκητα, κονίδιο που βλαστάνει χωρίς την ύπαρξη σταγονιδίων ύδατος σε οξεία επιφάνεια πετάλου τριαντάφυλλου και υφές του *B. Cinerea* που αναπτύσσονται εντός των ιστών του φυτού.

### 1.3.4 Χημική καταπολέμηση και βιολογική αντιμετώπιση του μύκητα

Όσον αφορά τον χημικό έλεγχο τριάντα πέντε χρόνια έπειτα από την πρώτη εμπορική χρήση μυκητοκτόνων εναντίον του μύκητα *B. cinerea* και συγκεκριμένα του *methyl benzimidazole carbamate* (MBC), έχει ενισχυθεί η άποψη ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης ανθεκτικότητας αυξάνεται όσο ένα προϊόν εφαρμόζεται επανειλημμένα. Γι αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί μικτά προγράμματα ψεκασμού με κάθε φορά να επιλέγεται μια διαφορετική ομάδα μυκητοκτόνων, έως ότου να μειωθεί ο κίνδυνος εμφάνισης και διατήρησης ανθεκτικότητας για κάθε ενεργό συστατικό του φαρμάκου.

Στον τομέα της βιολογικής αντιμετώπισης, μελέτες σχετικά με τη μικροβιακή οικολογία της φυλλοσφαίρας και φάνηκε ότι υπήρχε σημαντική δυνατότητα χρήσης μικροβιακών ανταγωνιστών για τον έλεγχο του Βοτρύτη σε διάφορες καλλιέργειες. Τουλάχιστον επτά βιολογικά προϊόντα έχουν πλέον εγκριθεί (Elad and Stewart, 2004) για χρήση σε εδώδιμα και μη εδώδιμα προϊόντα θερμοκηπίων, σε διάφορες χώρες. Η βαριά χρήση συμβατικών μυκητοκτόνων έχει περιοριστεί λόγω συσσώρευσης υπολειμμάτων και λόγο των περιορισμών που έχουν επιβληθεί από διάφορες χώρες. Οι φιλοδοξίες για την ύπαρξη παραγόντων βιολογικής αντιμετώπισης (biological control agents, BCA)σπάνια στηρίζονται στην ικανότητά τους να εφαρμόζονται και να αυτο-διασκορπίζονται σε μια καλλιέργεια, στις απαιτούμενες ζώνες στόχου. Έχει αποδειχθεί στις περισσότερες περιπτώσεις ότι αυτό είναι εξωπραγματικά αισιόδοξο. Λόγο βέβαια της μεγάλης προόδου και της κατανόησης του τρόπου δράσης των βιολογικών παραγόντων στο μέλλον η χρήση τους μπορεί να δώσει αποτελέσματα.

Τέλος συνιστάται η συγκομιδή των καρπών να γίνεται με ξηρό καιρό και επίσης να αποφεύγονται οι τραυματισμοί τους κατά τη διάρκεια του χειρισμού τους μέχρι και την αποθήκευση τους.
(Brian Williamson, 2007)

## 1.4 Βιολογική αντιμετώπιση

### 1.4.1 Εισαγωγή

Η βιολογική αντιμετώπιση των ασθενειών είναι η πιο σωστή και ορθολογιστική μέθοδος αντιμετώπισης των ασθενειών των καλλιεργειών στα θερμοκήπια, ακίνδυνη για τον άνθρωπο και το περιβάλλον γενικότερα. Αποτελεί βασικό παράγοντα των συστημάτων Ολοκληρωμένης Διαχείρισης των Καλλιεργειών, συστήματα τα οποία πρέπει να ακολουθήσουν οι αγρότες του 21 αιώνα, ώστε να παράγουν ανταγωνιστικά προϊόντα, ψηλής ποιότητας, απαλλαγμένα υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων.

Ο όρος "βιολογική αντιμετώπιση'' (biological control) χρησιμοποιήθηκε αρχικά από τον Smith το 1919 (Wilson and Huffaker 1976) και είχε ως σκοπό να επισημάνει τη σημαντική σημασία της χρησιμοποίησης των φυσικών εχθρών, για την καταπολέμηση των εντόμων – εχθρών.

Όλα τα είδη των ζωικών και φυτικών οργανισμών έχουν φυσικούς εχθρούς (natural enemies) οι οποίοι προσβάλλουν διάφορα στάδια της ζωής τους. Στους φυσικούς εχθρούς περιλαμβάνονται τα παράσιτα (parasites), τα παρασιτοειδή (parasitoids), τα αρπακτικά (predators), όπως επίσης και οι παθογόνοι μικροοργανισμοί (pathogens). Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για βιολογική αντιμετώπιση είναι μύκητες, ζύμες, βακτήρια, ιοί, πρωτόζωα κ.α.. Οι επιδράσεις τους δύναται να κυμαίνονται από μια παροδική ή μικρή ενόχληση έως το θάνατο του ξενιστή ή της λείας τους.

Η χρησιμοποίηση φυσικών εχθρών για την αντιμετώπιση εντόμων – εχθρών δεν είναι νέα μέθοδος αλλά ανάγεται σε αρκετά παλαιούς χρόνους. Η βιολογική αντιμετώπιση βέβαια αποτελεί σήμερα ένα από τα κύρια αντικείμενα επιστημονικών ερευνών στον τομέα της αντιμετώπισης των ασθενειών και εχθρών. Σε ολόκληρο τον κόσμο γίνονται πειράματα με ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Αυτό μας δίνει ελπίδες ότι η βιολογική αντιμετώπιση δεν θα είναι στο μέλλον κάτι το ακατόρθωτο και ότι σύντομα θα μπορεί να εξελιχθεί σε έναν εναλλακτικό και οικονομικό τρόπο αντιμετώπισης των ασθενειών και εχθρών και δεν θα επιβαρύνουμε πλέον το περιβάλλον με φυτοφάρμακα (Τζάμος, 2007).

### 1.4.2 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της βιολογικής αντιμετώπισης

Η Βιολογική αντιμετώπιση δεν ρυπαίνει το περιβάλλον, δεν καταστρέφει τους ωφέλιμους οργανισμούς και δεν προκαλεί προβλήματα ανθεκτικότητας. Δυστυχώς όμως πέραν των προαναφερόμενων πλεονεκτημάτων η Βιολογική αντιμετώπιση δεν

βρίσκει εφαρμογή σε μεγάλο αριθμό επιβλαβών εντόμων, απαιτεί μεγάλο κόστος για βασική έρευνα για μαζική παραγωγή. Έχει καλύτερα αποτελέσματα όταν εφαρμόζεται από συλλογικά όργανα και σε μεγάλη κλίμακα. Και τέλος απαιτεί στοιχειώδη επιμόρφωση του αγροτικού πληθυσμού.

### 1.4.3 Οι Μικροοργανισμοί στην φυτοπροστασία

Η σύγχρονη επιστήμη γνωρίζει πάνω από 750 είδη μυκήτων. Επίσης αναφέρονται πάνω από 450 είδη ιων. (Μιχαηλίδης, 2000). Πολλοί από αυτούς τους μικροοργανισμούς έχουν μελετηθεί και χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα σε πειράματα στο εργαστήριο, αλλά και στον αγρό βασικά για τον έλεγχο των επιβλαβών εντόμων και μυκήτων των φυτών.

Τα σημαντικότερα προβλήματα κατά την εφαρμογή τους εντοπίζονται στην απομόνωση άριστων στελεχών, τη μαζική παραγωγή τους, την τυποποίησή τους και το χρόνο ζωής τους στην τυποποιημένη μορφή. Η αντιμετώπιση που δίνουν σε κάποιες περιπτώσεις αγγίζει το 80%, αλλά συνήθως συνοδεύονται από κάποια μειονεκτήματα. Τα πιο σημαντικά από αυτά είναι τα εξής:

- Δεν επιτυγχάνονται μόνιμα αποτελέσματα καθιστώντας απαραίτητες επανειλημμένες εισαγωγές των μικροοργανισμών.
- Η αύξηση του πληθυσμού των μικροοργανισμών στο έδαφος δεν είναι μόνιμη και εξαρτάται από μια σωρεία παραγόντων όπως πχ η οργανική ουσία και η ύπαρξη άλλων παθογόνων και ανταγωνιστικών μικροοργανισμών.
- Περιορισμένο ποσοστό αντιμετώπισης φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών
- Η κακή διαχείριση της υγρασίας στο έδαφος μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία δυσμενούς περιβάλλοντος εξουδετερώνοντας τους μικροοργανισμούς (Τζάμος, 2007)

### 1.4.4 Βιολογική αντιμετώπιση - Ριζόσφαιρα

Ο μύκητας δεν θεωρείται πραγματικό εδαφογενές παθογόνο, μπορεί όμως να προκαλέσει ασθένειες που μεταδίδονται από το έδαφος. Η βιολογική αντιμετώπιση αυτών των παθογόνων των φυτών είναι μια αρκετά περίπλοκη διαδικασία, που εκδηλώνεται στη ριζόσφαιρα, δηλαδή στο δυναμικό περιβάλλον αλληλεπιδράσεως της ρίζας και του εδάφους.

Πιο συγκεκριμένα ριζόσφαιρα είναι η στενή ζώνη εδάφους που περικλείει και επηρεάζεται από τις ρίζες των φυτών. Είναι το ενδιαίτημα για ένα μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών και ασπόνδηλων, επίσης θεωρείτε ότι είναι ένα από τα πιο δυναμικά περιβάλλοντα στη γη. Οι διάφοροι οργανισμοί που είναι παρόντες στη μικροχλωρίδα της ριζόσφαιρας μπορούν να έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη, στη θρέψη και στην υγεία των φυτών. Ωστόσο η μικροχλωρίδα της ριζόσφαιρας μπορεί να επηρεάσει άμεσα ή/και έμμεσα τη σύνθεση και την βιομάζα

των φυτικών ειδών στα φυσικά οικοσυστήματα. Σε αυτές τις διαδικασίες συμβάλουν πολυάριθμοι οργανισμοί, οδηγώντας σε αμέτρητες αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών, ανταγωνιστών και υποχρεωτικών συμβιωτών (Philippot et. al. 2013).

Από όλα τα παραπάνω μπορούμε να καταλάβουμε ότι το έδαφος της ριζόσφαιρας χαρακτηρίζεται από τις ραγδαίες μεταβολές , συνεχή μικροβιακή δραστηριότητα και υψηλούς πληθυσμούς βακτηρίων συγκριτικά με το έδαφος πέραν αυτής.

Επιπλέον η ριζόσφαιρα υποβάλλεται σε δραματικές αλλαγές σε μικρό χρονικό διάστημα λόγο διάφορων εξωτερικών παραγόντων όπως ξηρασία, βροχοπτώσεις κ.α.. σε μεγαλύτερες χρονικές περιόδους η ριζόσφαιρα υφίσταται μεταβολές οφειλόμενες στην ανάπτυξη της ρίζας του φυτού και στην αλληλεπίδραση με άλλους εδαφικούς οργανισμούς.

Οι πιο σημαντικές αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται στη ριζόσφαιρα ταξινομούνται σε τρεις κύριες ομάδες:

- Αλληλεπίδραση μεταξύ φυτών (προκαλείται από επικαλυπτόμενες ριζόσφαιρες, που σαν αποτέλεσμα έχει τον ανταγωνισμό για θρεπτικά στοιχεία)
- Αλληλεπίδραση μεταξύ ρίζας και μικροοργανισμών (οι μικροοργανισμοί μπορούν να ευνοούν, να αναστέλλουν ή να μην έχουν καμία ανάμιξη στην ανάπτυξη της ρίζας και στην άμυνα του φυτού. Βέβαια αυτό εξαρτάται και από τους μικροοργανισμούς, το είδος του φυτικού οργανισμού και τις συνθήκες του περιβάλλοντος)
- Αλληλεπίδραση μεταξύ μικροοργανισμών που εμπεριέχουν συνεργιστική ή ανταγωνιστική δράση μεταξύ τους.

(Lynch, 1990)

Οι μικροοργανισμοί του εδάφους είναι κυρίαρχοι οργανισμοί στους βιογεωχημικούς κύκλους των ανόργανων και οργανικών συστατικών του εδάφους όπως επίσης και στη διατήρηση της ποιότητας του. Η μικροβιακή δραστηριότητα στη ριζόσφαιρα είναι ένας σημαντικός παράγοντας ο οποίος καθορίζει τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών για τα φυτά και έχει σημαντική επίδραση στην υγεία των φυτών όπως και στην παραγωγικότητα τους.

(Jeffries et. al, 2002)

Για την αύξηση της αποτελεσματικότητας των ανταγωνιστικών μικροοργανισμών πρέπει να:

- ✓ Διατηρείται ή να αυξάνεται η ευνοϊκή επίδραση των ήδη υπαρχόντων ανταγωνιστικών μικροοργανισμών που επιβιώνουν στα έδαφος

✓ Αναπτύσσονται ή να ανακαλύπτονται αποτελεσματικότεροι ανταγωνιστικοί παράγοντες για εισαγωγή στο έδαφος ή για επέμβαση πάνω στα φυτά.

## 1.5 Μηχανισμοί δράσης των βιολογικών παραγόντων

Η δράση των βιολογικών παραγόντων επιτυγχάνεται μέσα από αρκετούς μηχανισμούς που εκφράζονται τόσο εναντίον εδαφογενών παθογόνων, όσο και εναντίον εναέριων παθογόνων των φυτών. Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν:

✓ Την παραγωγή τοξινών και αντιβιοτικών
✓ Την επαγωγή λανθανόντων μηχανισμών αντοχής (Ανοσοποίηση)
✓ Τον παρασιτισμό (δηλαδή την αποδιοργάνωση κυτταρικών τοιχωμάτων του παθογόνου από τη δράση λυτικών ενζύμων του ανταγωνιστικού παράγοντα)
✓ Τον ανταγωνισμό για θρεπτικά στοιχεία
✓ Τον συνδυασμό όλων των παραπάνω μηχανισμών.

(Τζάμος, 2007)

### 1.5.1 Μηχανισμός αντιβίωσης

Ο μηχανισμός της αντιβιώσεως στηρίζεται στην παραγωγή εξειδικευμένων τοξικών μεταβολιτών μικροβιακής προέλευσης. Τα αντιβιοτικά είναι γενικά οργανικά συστατικά μικρού μοριακού βάρους τα οποία παράγονται από μικροοργανισμούς. Επομένως είναι κατανοητό ότι η αντιβίωση έχει σημαντικό ρόλο στην ανταγωνιστική δράση βακτηρίων που παράγουν αντιβιοτικά κατά των διάφορων παθογόνων.

Η αντιβίωση είναι ο συνηθέστερος μηχανισμός βιολογικής αντιμετωπίσεως των ασθενειών των φυτών. Αυτό κυρίως λόγο της ευκολίας με την οποία επιλέγονται να αξιολογούνται οι δυνητικοί ανταγωνιστές. Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι οι μικροργανισμοί παράγουν αντιβιοτικά υπό συνθήκες καταπονήσεως. Σε πολλά συστήματα ξενιστή – παθογόνου η βιολογική καταπολέμηση συμβάλει με ένα ή και περισσότερα αντιβιοτικά στον ανταγωνισμό μειώνοντας ή εμποδίζοντας το σχηματισμό των πολλαπλασιαστικών μονάδων του παθογόνου ή και παρεμποδίζοντας τελείως την ανάπτυξη του (Τζάμος, 2007).

*Οι αρχές που διέπουν το φαινόμενο της αντιβίωσης:*

➢ Η παραγωγή αντιβιοτικών στο έδαφος λαμβάνει χώρα με την παρουσία οργανικής ύλης. Αυτό σημαίνει πως η παραγωγή αντιβιοτικών προϋποθέτει ότι ο οργανισμός που παράγει τα αντιβιοτικά διαθέτει επάρκεια θρεπτικών στοιχείων, μεταξύ των οποίων και πηγές άνθρακα
➢ Η ανίχνευση των αντιβιοτικών στο έδαφος είναι μια αρκετά δύσκολη διαδικασία. Επισημαίνεται ότι στη ριζόσφαιρα υπάρχουν συγκριτικά περισσότεροι δυνητικοί ανταγωνιστές από ότι στην υπόλοιπη μάζα του εδάφους

- Αντιβίωση η οποία εκδηλώνεται στο θρεπτικό υπόστρωμα του τρυβλίου δεν σημαίνει απαραίτητα και αντιβίωση στο έδαφος
- Η αδρανοποίηση των αντιβιοτικών η οποία μπορεί να συμβεί στο έδαφος, οφείλεται σε μια σειρά διαδικασιών στις οποίες περιλαμβάνονται, η προσρόφηση αυτών στα κολλοειδή του εδάφους και στα χουμικά, αποδιοργάνωση τους από διάφορους μικροοργανισμούς όπως επίσης και από την αστάθεια που αποδίδεται στο pHτου εδάφους

(Τζάμος, 2007)

Πρόσφατα δεδομένα μέσα από μελέτες που έχουν γίνει αποδεικνύουν ότι τα βακτήρια του γένους Bacillusμπορούν να δράσουν αποτελεσματικά ως καταστολείς φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών.

### 1.5.2 Μηχανισμοί άμυνας των φυτών

Τα φυτά για να επιβιώσουν κατά τη διάρκεια της εξέλιξης τους έχουν εκτεθεί σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες και καταπονήσεις από παθογόνους μικροοργανισμούς. Μέσα από αυτό τα φυτά έχουν αναπτύξει αμυντικά συστήματα ώστε να προστατευτούν από τα παθογόνα. Οι διάφοροι παθογόνοι μικροοργανισμοί (μύκητες, βακτήρια και ιοί) χρησιμοποιούν διαφορετικούς βιοχημικούς και μοριακούς μηχανισμούς προκειμένου να μολύνουν τα φυτά.

Η φυσική προστασία των φυτών έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών και των μασιτικών εντόμων είναι εν μέρει βασισμένη σε μια ποικιλία φυσικών εμποδίων που προυπάρχουν στο φυτό πολύ πριν την είσοδο του παθογόνου στο φυτό και αναφέρονται σαν παθητικοί ή προ-υπάρχοντες μηχανισμοί άμυνας. Ωστόσο τα φυτά έχουν την δυνατότητα να ενεργοποιήσουν μηχανισμούς άμυνας και κατά την επαφή με το φυτοπαθογόνο μικροοργανισμό. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται επίκτητη ή επαγόμενη διασυστηματική αντοχή (Sticher et al. 1997).

#### 1.5.2.1 Επίκτητη ή επαγόμενη διασυστηματική αντοχή (ανοσοποίηση)

Ως επίκτητη ή επαγόμενη διασυστηματική αντοχή ονομάζουμε την βιολογική, βιοχημική ή χημική διέγερση λανθανόντων μηχανισμών αντοχής, ώστε ένα φυτό ευπαθές σε ένα συγκεκριμένο σύστημα ξενιστή – παθογόνου να καθίσταται ανθεκτικό στο ίδιο σύστημα. Το φαινόμενο της επαγόμενης διασυστηματικής αντοχής διεγείρεται και από βιολογικούς παράγοντες που δραστηριοποιούν λανθάνοντες μηχανισμούς αντοχής με αποτέλεσμα σημαντικές βιοχημικές αλλαγές μέσα στο φυτό, ώστε να αυξηθεί η αντοχή του και να είναι προετοιμασμένο για ενδεχόμενη μόλυνση από ένα δυνητικό παθογόνο.

Έχει διαπιστωθεί ότι η ύπαρξη συγκεκριμένων στελεχών μη παθογόνων ριζοβακτηρίων, έχουν την ικανότητα να προστατεύσουν τα φυτά από παθογόνα

διεγείροντας λανθάνοντες μηχανισμούς αντοχής των φυτών. Αυτός ο μηχανισμός θεωρείται μια μορφή ανοσοποίησης. Η «ανοσοποίηση» με τα αυξητικά ριζοσφαιρικά βακτήρια εκδηλώνεται ως καθυστέρηση στην έκφραση των συμπτωμάτων και μείωση στην ένταση και στην εξέλιξη της ασθένειας με παράλληλη ενεργοποίηση μηχανισμών που συμβάλουν στη διασυστηματική προστασία των φυτών εναντίον φυτοπαθογόνων μυκήτων, βακτηρίων και ιών.

Ύστερα από τη μόλυνση με ένα νεκροτροφικό παθογόνο πολλά φυτά αναπτύσσουν μια ενισχυμένη αντοχή σε περαιτέρω μόλυνση από το ίδιο το παθογόνο στα μη εμβολιασμένα τμήματα του φυτού. Αυτού του τύπου η αντοχή των φυτών αναφέρεται ως επαγόμενη διασυστηματική αντοχή. Το αποτέλεσμα αυτού του φαινομένου είναι τα φυτά να ενεργοποιούν γρηγορότερα και πιο αποτελεσματικά τους μηχανισμούς άμυνας τους όταν μολυνθούν ξανά από το ίδιο παθογόνο (Conrath, 2006).

### 1.5.3 Παρασιτισμός

Ο παρασιτισμός ενός φυτοπαθογόνου μικροοργανισμού από άλλους μικροοργανισμούς είναι ένα πολύ γνωστό φαινόμενο. Οι μικροοργανισμοί οι οποίοι προκαλούν κυτταρόλυση άλλων μικροοργανισμών είναι ευρέως γνωστοί και διαδεδομένοι στα φυσικά οικοσυστήματα. Διάφορα βακτήρια παράγουν ένζυμα όπως πρωτεάσες και χιτινάσες, που προκαλούν αποδόμηση και λύση των τοιχωμάτων των κυττάρων του ξενιστή τους. Αυτός είναι ο λόγος που πολλά βακτήρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν και χρησιμοποιούνται ως βιολογικοί παράγοντες, διότι πάνε και επικάθονται στις υφές ορισμένων μυκήτων και καταστρέφουν τα κυτταρικά τους τοιχώματα (Τζάμος, 2007)

### 1.5.4 Ανταγωνισμός για θρεπτικά στοιχεία

Οι μικροοργανισμοί ανταγωνίζονται μεταξύ τους για τροφή και για άλλα βασικά στοιχεία στο έδαφος, στην περιοχή της ριζόσφαιρας όπως και στην περιοχή της φυλλόσφαιρας. Αυτός ο ανταγωνισμός μεταξύ των βιολογικών παραγόντων και του παθογόνου με την στέρηση των θρεπτικών συστατικών είναι πιθανό να οδηγήσει στη μείωση της δραστηριότητας του παθογόνου.

Στο ριζικό σύστημα των φυτών εγκαθίσταται αρκετά μεγάλοι βακτηριακοί πληθυσμοί και καταναλώνουν ποσότητες άνθρακα και αζώτου που είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση των μορφών διαχειμάσεως των παθογόνων ή για τον αποικισμό της ριζόσφαιρας.

## 1.6 Βιοχημικοί παράγοντες της ανοσοποιήσεως

### 1.6.1 Σήμα

Η διέγερση λανθάνοντων μηχανισμών αντοχής σε θέσεις πέραν της μολύνσεως, προϋποθέτει βιοχημικώς τη δραστηριοποίηση ή παραγωγή χημικών παραγόντων που αποτελούν το σήμα. Το σήμα αποτελεί τον καθοριστικό παράγοντα της ανοσοποιήσεως. Στην περίπτωση της βιολογικής διεγέρσεως το σήμα παράγεται με την εμφάνιση των νεκρωτικών κηλίδων. Μετακινείται γρήγορα και συνεχώς και στα υπόλοιπα μέρη του φυτού μέσω των αγγείων διεγείροντας με αυτό τον τρόπο το φαινόμενο της ανοσοποιήσεως. Όσο περισσότερο σήμα παράγεται και μετακινείται εντός του φυτού όλο και αυξάνεται το επίπεδο προστασίας. Το μέγιστο της προστασίας επιτυγχάνεται όταν έχουν πια κορεστεί όλοι οι υποδοχείς του σήματος (Τζάμος, 2007).

### 1.6.2 Σαλικυλικό οξύ

Το σαλικυλικό οξύ παράγεται στους χλωροπλάστες των φυτών. Είναι προϊόν του μεταβολισμού των φαινυλοπροπανοειδών. Έχει φυσικές ιδιότητες οι οποίες το καθιστούν ιδανική τη μεταφορά του μέσα στον ηθμό. Θεωρείται ότι το σαλικυλικό οξύ είναι διεγέρτης της συσσώρευσης των πρωτεϊνών σχετικών με τη παθογένεση. Επίσης πιστεύεται ότι το σαλικυλικό οξύ αποτελεί το ενδογενές σήμα της ανοσοποιήσεως ή ότι παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη διάχυση και στη μεταφορά του σήματος ύστερα από τη προσβολή και τη μόλυνση από το φυτοπαθογόνο.

Το σαλικυλικό οξύ παίζει κρίσιμο ρόλο στην άμυνα των φυτών και γενικά εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της άμυνας εναντίον βιοτροφικών και ημιβιοτροφικών παθογόνων καθώς και στην ενεργοποίηση της επίκτητης διασυστηματικής αντοχής (Grant and Lamb, 2006).

### 1.6.3 Ιασμονικό οξύ

Το ιασμονικό οξύ όπως και ο μεθυλιωμένος εστέρας, παράγονται από το λινολενικό οξύ. Αποτελούν ενώσεις που ανήκουν στις κυκλοπεντανόνες. Και τα δύο υπάρχουν σε όλα τα φυτά ενώ μετακινούνται εύκολα και στην υγρή και στην αέρια τους φάση. Όπως το αιθυλένιο, και το ιασμονικό οξύ σχετίζεται συνήθως με την άμυνα του φυτού ενάντια σε νεκροτροφικά παθογόνα και φυτοφάγα έντομα. Εξωγενής εφαρμογή ιασμονικού ή μεθυλιωμένου ιασμονικού οξέος προωθούν τη γήρανση και ρυθμίζουν την ανάπτυξη του φυτού. Επιπλέον προκαλεί διέγερση διάφορων πρωτεϊνών που συμβάλουν στην άμυνα του φυτού.

Τέλος είναι ένα πολύ σημαντικό ενδιάμεσο μόριο σήματος στην άμυνα των φυτών που δρα ενάντια σε πληγές, φυτοφάγα έντομα και παθογόνα (Turner et.al, 2002).

### 1.6.4 Αιθυλένιο

Το αιθυλένιο είναι μια πτητική ορμόνη, η οποία επηρεάζει το ρυθμό ανάπτυξης των φυτών καθώς επίσης και τη γήρανση. Όπως το ιασμονικό οξύ, και το αιθυλένιο σχετίζεται συνήθως με την άμυνα ενάντια σε νεκροτροφικά παθογόνα και φυτοφάγα όταν το παθογόνο διεισδύει στο φυτικό ιστό. Ωστόσο παράγεται και με την εφαρμογή διαφόρων ουσιών για τη διέγερση μηχανισμών άμυνας, όπου επάγει τη σύνθεση μερικών πρωτεϊνών παθογενέσεως. Η παρουσία του αιθυλενίου στο φυτό προκαλεί δομικές αλλαγές που αυξάνουν την αντοχή του κυτταρικού του τοιχώματος.

Όλα τα παραπάνω δεδομένα επιβεβαιώνουν ότι το αιθυλένιο αποτελεί σήμα για την επαγωγή της ανοσοποιήσεως. Παρ' όλα αυτά δεν αποτελεί την ουσία διεγέρσεως των λανθανόντων μηχανισμών άμυνας στα φυτά (Τζάμος, 2007).

### 1.6.5 Ανταγωνισμός και συνεργιστική αλληλεπίδραση σαλικυλικού οξέος, ιασμονικού οξέος και αιθυλενίου

Αν και τα μονοπάτια άμυνας του σαλικυλικού οξέος με του ιασμονικού και του αιθυλενίου είναι αμοιβαίως ανταγωνιστικά, έχουν αναφερθεί και αποδείξεις συνεργιστικής αλληλεπίδρασης. Διάφορες μελέτες έχουν γίνει και έχουν αποδειχθεί οι πολύ σύνθετες σχέσεις μεταξύ αιθυλενίου, ιασμονικού και σαλικυλικού οξέος που μπορούν να λειτουργήσουν συνεργιστικά ή ανταγωνιστικά ώστε να τελειοποιήσουν την ανταπόκριση της άμυνας των φυτών.

Όσον αφορά το σήμα του αιθυλενίου και το σήμα του ιασμονικού οξέος συχνά λειτουργούν συνεργιστικά για ενεργοποίηση της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα του φυτού ύστερα από την προσβολή του φυτού από τον παθογόνο μικροοργανισμό.

## 1.7 Βιολογικά σκευάσματα σήμερα στην αγορά

Τα βιολογικά σκευάσματα αντιμετωπίσεως των φυτοπαθογόνων αναμένεται να συμβάλλουν με έναν αυξανόμενο ρυθμό στη φυτοπροστασία κυρίως ως μέρος ενός ολοκληρωμένου σχήματος διαχειρίσεως της φυτοπροστασίας. Σήμερα όμως πολλά βιολογικά σκευάσματα δεν αποτελούν ουσιαστική διέξοδο για την αντιμετώπιση των παθογόνων λόγο μειωμένης αποτελεσματικότητας. Αυτό δείχνει ότι τα μυκητοκτόνα θα παραμείνουν για αρκετό χρονικό διάστημα πρωτεύουσες συνιστώσες σε αποτελεσματικά συστήματα αντιμετωπίσεως των ασθενειών των φυτών. Υπάρχει βέβαια η πιθανότητα να αυξηθεί η χρήση μυκητοκτόνων που συνδυάζονται με βιολογικούς παράγοντες.

Τα βιολογικά σκευάσματα ωστόσο μπορούν επίσης και χρησιμοποιούνται στις μέρες μας για να συμβάλουν στην επιβράδυνση της εμφάνισης της ανθεκτικότητας

στα μυκητοκτόνα σε περιπτώσεις εναλλαγής μεταξύ τους ή σε μικτά συστήματα προγραμμάτων αποφυγής εμφανίσεως της ανθεκτικότητας (Τζάμος, 2007).

### 1.8 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Ο μύκητας *Botrytis cinerea* είναι ένας ευρύτατα διαδεδομένος παθογόνος μύκητας που προκαλεί καταστρεπτικές ασθένειες σε πολλά είδη καλλιεργούμενων φυτών, και κυρίως λαχανικών στα θερμοκήπια, σε παγκόσμιο επίπεδο. Αποτελεί πραγματική απειλή για την εμπορεύσιμη παραγωγή, διότι εκτός από τις ποσοτικές απώλειες υποβαθμίζει και την ποιότητα των προϊόντων. Προκαλεί πολύ σοβαρά παθολογικά σύνδρομα όπως σήψεις σε καρπούς, φρούτα, λαχανικά και κονδύλους. Οι σήψεις αυτές προκαλούν σταδιακά και βαθμιαία αποδιοργάνωση των φυτικών ιστών ως αποτέλεσμα ενζυμικής δράσης. Τα ένζυμα αυτά καταστρέφουν τις πηκτίνες των μεσοτοιχίων των κυτταρικών τοιχωμάτων, με αποτέλεσμα τον ευχερή αποχωρισμό των κυττάρων των ιστών και οργάνων. Τα κύρια μέτρα για την αντιμετώπιση αυτού του μύκητα είναι καλλιεργητικά και χημικά. Η εμφάνιση ανθεκτικότητας στα χημικά σκευάσματα και μυκητοκτόνα που χρησιμοποιούνται στις μέρες μας, έχει οδηγήσει τους επιστήμονες στην προσπάθεια εύρεσης αποτελεσματικών μικροοργανισμών (βακτήρια + μύκητες) που έχουν τη δυνατότητα να αντιμετωπίζουν το μύκητα *B. cinerea*.

Για τους παραπάνω λόγους ο σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η μελέτη της αποτελεσματικότητας των βιολογικών παραγόντων *Paenibacillus alvei* K165 και *Rhodotorula glutinis* Y44, ενάντια του μύκητα *Botrytis cinerea* σε φυτά μαρουλιού και τομάτας σε θερμοκήπιο.

## 2. Πειραματικό μέρος – Υλικά και μέθοδοι

### 2.1 Βιολογικό υλικό

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν σαν βιολογικό υλικό οι μικροοργανισμοί:

- ✓ ***Botrytis cinerea***
- ✓ ***Paenibacillus alvei K165***
- ✓ ***Rhodotorula glutinis Y44***

Το μικροβιακό υλικό που χρησιμοποιήθηκε προερχόταν από τη συλλογή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Γ.Π.Α.

### 2.2 Φυτικό υλικό

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν σπόροι μαρουλιού της ποικιλίας *Tom Thumb* και σπόροι τομάτας της ποικιλίας *Ailsa craig.*

### 2.3 Εργαστηριακά υλικά

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα εξής εργαστηριακά υλικά:

#### 2.3.1 Στερεό θρεπτικό υλικό με εκχύλισμα πατάτας (Potato Dextrose Agar)

Για 1lt PDA χρησιμοποιούνται:

1 lt απεσταγμένο νερό

200 gr πατάτα

20 gr γλυκόζη

20gr άγαρ

Αποστείρωση στους 120$^{o}$C σε υγρό κλίβανο, με πίεση 1 atm για 20 λεπτά της ώρας.

#### 2.3.2.*NG*

Για 1lt NG χρησιμοποιούνται:

1lt απεσταγμένο νερό

8gr Nutrient broth (θρεπτικός ζωμός)

20 gr γλυκερόλη

Αποστείρωση στους 120$^{o}$C σε υγρό κλίβανο, με πίεση 1 atm για 20 λεπτά της ώρας.

### 2.3.3 Yeast Malt Extract, YME

Για 1lt YME χρησιμοποιούνται:

1lt απεσταγμένο νερό

3gr Yeast extract

3gr Malt extract

5gr πεπτόνη

10gr δεξτρόζη

Για το στερεό θρεπτικό υπόστρωμαYeast Malt Extract προσθέτω 15gr άγαρ.

Αποστείρωση στους 120$^{o}$C σε υγρό κλίβανο, με πίεση 1 atm για 20 λεπτά της ώρας.

### 2.4 Καλλιέργεια και ανάπτυξη του βακτηρίου *P. alvei* στέλεχος K165

Οι απομονώσεις του K165 βρίσκονταν σε σωλήνες Eppendorf στους -80$^{o}$C μέσα σε 20% γλυκερόλη.

Ο σωλήνας που περιείχε τις απομονώσεις του βακτηρίου μεταφέρθηκε στον θάλαμο σταθερής νηματικής ροής. Αυτό έγινε έτσι ώστε όλες οι ενέργειες να πραγματοποιηθούν υπό ασηπτικές συνθήκες. Η μεταφορά του K165 έγινε από τους -80$^{o}$ C σε 3 τρυβλία Petri με υλικό PDA, με την μέθοδο της γραμμικής διασποράς χρησιμοποιώντας βακτηριολογικό κρίκο, υπό ασηπτικές συνθήκες. Η καλλιέργεια των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε σε σκοτεινό επωαστικό θάλαμο με σταθερή θερμοκρασία 28$^{o}$C για 2 ημέρες. Από την καλλιέργεια διατήρησης τους σε τρυβλία Petri με PDA, μεταφέρθηκε μάζα βακτηριακών κυττάρων (σύροντας τον βακτηριολογικό κρίκο επάνω στην βακτηριακή αποικία) σε φιάλη χωρητικότητας 250 ml που περιείχε 100 ml NG. Ύστερα οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε περιστροφικό επωαστικό θάλαμο στους 28$^{o}$C και στις 140 r.p.m. για 2 ημέρες. Μετά το πέρας των 2 ημερών έγινε μεταφορά του περιεχομένου των κωνικών των 100 ml σε μεγαλύτερες κωνικές (χωρητικότητας 250 ml), οι οποίες περιείχαν 900 ml NG. Τέλος ακολούθησε η τοποθέτηση των κωνικών σε επωαστικό θάλαμο στους 28$^{o}$C για 1 ημέρα.

### 2.4 Καλλιέργεια και ανάπτυξη της ζύμης *R. glutinis* στέλεχος Y44

Οι απομονώσεις του στελέχουςY44 βρίσκονταν σε σωλήνες Eppendorf στους

-80$^{o}$C μέσα σε 20% γλυκερόλη.

Ο σωλήνας που περιείχε τις απομονώσεις της ζύμης μεταφέρθηκε στον θάλαμο σταθερής νηματικής ροής. Αυτό έγινε έτσι ώστε όλες οι ενέργειες να πραγματοποιηθούν υπό ασηπτικές συνθήκες. Η μεταφορά του στελέχουςΥ44 έγινε από τους -80$^{o}$ C σε 3 τρυβλία Petri με υλικό ΥΜΕ, με την μέθοδο της γραμμικής διασποράς χρησιμοποιώντας βακτηριολογικό κρίκο, υπό ασηπτικές συνθήκες. Η καλλιέργεια της ζύμης πραγματοποιήθηκε σε σκοτεινό επωαστικό θάλαμο με σταθερή θερμοκρασία 28$^{o}$C για 2 ημέρες. Από την καλλιέργεια διατήρησης της σε τρυβλίαPetri με ΥΜΕ, μεταφέρθηκε μάζα κυττάρων (σύροντας τον βακτηριολογικό κρίκο επάνω στην αποικία) σε φιάλη χωρητικότητας 250 ml που περιείχε 100 ml ΥΜΕ. Ύστερα οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε περιστροφικό επωαστικό θάλαμο στους 28$^{o}$C και στις 140 r.p.m. για 2 ημέρες. Μετά το πέρας των 2 ημερών έγινε μεταφορά του περιεχομένου των κωνικών των 100 ml σε μεγαλύτερες κωνικές (χωρητικότητας 250 ml), οι οποίες περιείχαν 900 ml ΥΜΕ. Τέλος ακολούθησε η τοποθέτηση των κωνικών σε επωαστικό θάλαμο στους 28$^{o}$C για 1 ημέρα.

### 2.5 Καλλιέργεια και ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *B. cinerea*

Ο μύκητας *B.cinerea* υπήρχε ήδη αναπτυγμένος σε τρυβλία Petri με υπόστρωμα PDA, στο ψυγείο στους 4$^{o}$C. Τα τρυβλία που περιείχαν τον μύκητα μεταφέρθηκαν στον θάλαμο σταθερής νηματικής ροής. Αυτό έγινε έτσι ώστε όλες οι ενέργειες να πραγματοποιηθούν υπό ασηπτικές συνθήκες. Η μεταφορά του μύκητα έγινε σε 7 καινούρια τρυβλία Petri με υλικό PDA, χρησιμοποιώντας νυστέρι το οποίο αποστειρωνόταν συνεχώς κατά τη διάρκεια της εργασίας με εμβάπτιση σε οινόπνευμα και στη συνέχεια κάψιμο σε φλόγα, κόβοντας από ένα τρυβλίο που περιείχε τον παθογόνο μικροοργανισμό τεμάχια θρεπτικού υλικού μαζί με μυκήλιο και τοποθετώντας αυτά πάνω στο καινούριο τρυβλίο. Η καλλιέργεια του φυτοπαθογόνου μύκητα πραγματοποιήθηκε σε σκοτεινό επωαστικό θάλαμο με σταθερή θερμοκρασία 28$^{o}$C για 7 ημέρες. Ύστερα το περιεχόμενο των τρυβλίων που είχε γίνει η καλλιέργεια του μύκητα μεταφέρθηκε σε κωνικές φιάλες μαζί με απεσταγμένο νερό. Οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε περιστροφικό επωαστικό θάλαμο στους 28$^{o}$C και στις 140 r.p.m. για 1 ημέρα. Την επομένη με την χρήση αιμοκυτταρόμετρου στο μικροσκόπιο μετρήσαμε τα σπόρια του μύκητα για να κρίνουμε την ανάπτυξή του.

### 2.6 Πείραμα αντιβίωσης

Στο συγκεκριμένο πείραμα αξιολογήθηκε η δυνατότητα των βιολογικών παραγόντων *P. alvei* (K165) και *R. glutinis* (Y44), να παράγουν αντιβιοτικά εναντίων του φυτοπαθογόνου μύκητα *B. cinerea*.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν:

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες στον θάλαμο σταθερής νηματικής ροής. Χρειάστηκαν 45 συνολικά τρυβλία με 3 διαφορετικά θρεπτικά υλικά. Υπήρχαν 15 τρυβλία για το κάθε θρεπτικό υλικό. Από τα 15 αυτά τρυβλία τα 5 αποτελούσαν τον μάρτυρα, τα άλλα 5 περιείχαν τον παθογόνο μικροοργανισμό μαζί με τον βιολογικό παράγοντα *P. alvei* (K165) και τα τελευταία 5 περιείχαν τον παθογόνο μικροοργανισμό *B. cinerea* μαζί με τον βιολογικό παράγοντα *R. glutinis* (Y44).

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- Στερεό θρεπτικό υλικό με εκχύλισμα φύλλων μαρουλιού

Για 1lt θρεπτικού υλικού χρησιμοποιούνται:
1 lt απεσταγμένο νερό
200 gr φύλλα μαρουλιού
20gr agar

- Στερεό θρεπτικό υλικό με εκχύλισμα φύλλων τομάτας

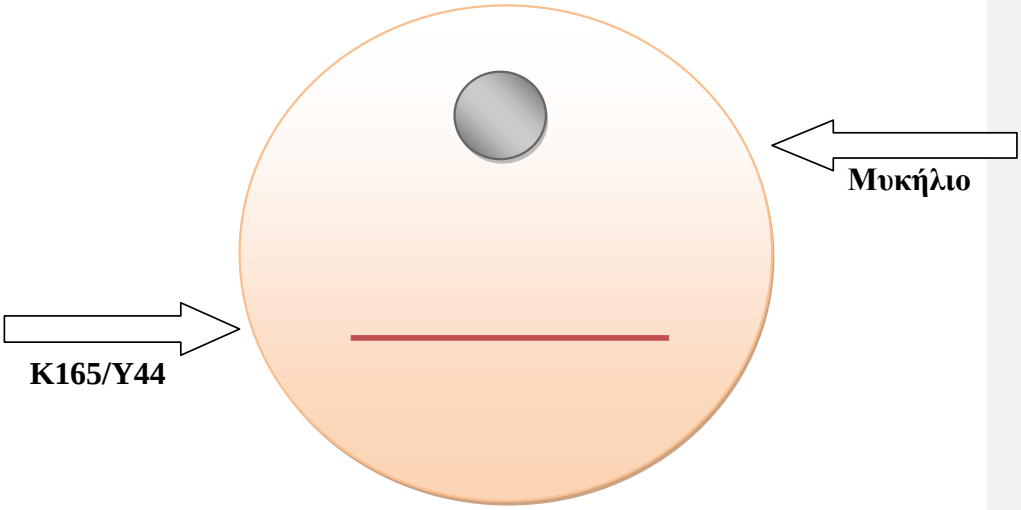
Για 1lt θρεπτικού υλικού χρησιμοποιούνται:
1 lt απεσταγμένο νερό
200 gr φύλλα τομάτας
20gr agar

- Στερεό θρεπτικό υλικό με εκχύλισμα πατάτας (Potato Dextrose Agar)

Το πείραμα ξεκινά χρησιμοποιώντας ένα εργαστηριακό φελλοτρυπητήρα, τον οποίο αποστειρώνουμε συνεχώς κατά τη διάρκεια της εργασίας μας με εμβάπτιση σε οινόπνευμα και στη συνέχεια κάψιμο σε φλόγα, κόβοντας από ένα τρυβλίο που περιείχε τον παθογόνο μικροοργανισμό τεμάχια θρεπτικού υλικού μαζί με μυκήλιο και τα τοποθετώντας αυτά πάνω στο αποστειρωμένο τρυβλίο λίγο πιο πάνω από το κέντρο και δεξιά, πάνω στο θρεπτικό υλικό.

Έπειτα με την βοήθεια του βακτηριακού κρίκου ο οποίος αποστειρώνεται συνεχώς κατά τη διάρκεια της εργασίας, λαμβάνεται από τρυβλίο Petri που περιέχει καλλιέργεια του βιολογικού παράγοντα *P. alvei* (K165) το βακτήριο, ακουμπώντας το βακτηριακό κρίκο πάνω στις αποικίες του που έχουν αναπτυχθεί στο τρυβλίο. Στη συνέχεια απλώνουμε το βακτήριο στα 15 από τα 45 τρυβλία (5 από κάθε θρεπτικό υλικό), κάνοντας μια οριζόντια γραμμή πάνω στο θρεπτικό υλικό, απέναντι από το μυκηλιακό τεμάχιο. Την ίδια ακριβώς διαδικασία ακολουθούμε και με τον βιολογικό παράγοντα *R. glutinis* (Y44).

Τα τρυβλία Petri που εμβολιάστηκαν τοποθετούνται ύστερα σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 26$^{o}$C και τα παρατηρούμε μετά από 1 εβδομάδα.




*Σχήμα 1*: Σχηματική απεικόνιση εμβολιασμένου τρυβλίου για την αξιολόγηση των βιολογικών παραγόντων *P. alvei* (K165) και *R. glutinis* (Y44), στο να παράγουν αντιβιοτικά εναντίων του *B. cinerea*.

**2.7 Πείραμα δοκιμών παθογένειας**

Στο συγκεκριμένο πείραμα αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα των βιολογικών παραγόντων *P. alvei* (K165) και *R. glutinis* (Y44), κατά του φυτοπαθογόνου μύκητα *B. cinerea*.

***Εκτέλεση πειράματος***

Στο 1$^{ο}$ πείραμα φυτεύτηκαν 230 σπόροι μαρουλιού και στο δεύτερο 230 σπόροι τομάτας. Ύστερα περιμέναμε μέχρι η ανάπτυξη τους να φτάσει στο δεύτερο πραγματικό φύλλο.

Όσον αφορά το 1$^{ο}$ πείραμα που έγινε σε φυτά μαρουλιού:

Τα φυτά αφού έφτασαν στο επιθυμητό επίπεδο ανάπτυξης χωρίστηκαν σε 9 ομάδες των 30 και 20 φυτών.

- Η 1$^{η}$ ομάδα φυτών αποτελούνταν από 30 φυτά και ήταν ο θετικός μάρτυρας. Μολύναμε με διάλυμα συγκέντρωσης 5μl * 10^6 B. cinerea. Σε 2 φύλα από κάθε φυτό χρησιμοποιώντας πιπέτα εφαρμόζαμε 0,2μl διαλύματος με *B. cinerea*.
- Η 2$^{η}$ ομάδα φυτών αποτελούνταν από 30 φυτά. Αρχικά ψεκάσαμε έως απορροής με το θρεπτικό υλικό που είχε αναπτυχθεί η καλλιέργεια του βιολογικού

παράγοντα *R. glutinis* Y44. Μετά από 7 ημέρες μολύναμε τα φυτά με τον μύκητα όπως παραπάνω.

- Η 3η ομάδα φυτών αποτελούνταν από 30 φυτά. Αρχικά με μια σύριγγα των 10 ml με ριζοπότισμα εφαρμόσαμε στο χώμα τον βιολογικό παράγοντα K165. Ύστερα από 7 ημέρες μολύναμε τα φυτά με τον παθογόνο μύκητα *B. cinerea*.
- Η 4η ομάδα φυτών αποτελούνταν και αυτή από 30 φυτά. Σε αυτή την ομάδα εφαρμόστηκαν και οι 2 βιολογικοί παράγοντες ώστε να εξετάσουμε τον συνδυασμό τους κατά του φυτοπαθογόνου μύκητα. Πρώτα ψεκάσαμε έως απορροής με το θρεπτικό υλικό που είχε αναπτυχθεί η καλλιέργεια του βιολογικού παράγοντα *R. glutinis* Y44. Στη συνέχεια την ίδια μέρα με μια σύριγγα των 10 ml με ριζοπότισμα εφαρμόσαμε στο χώμα τον βιολογικό παράγοντα K165. Τέλος μετά από 7 ημέρες μολύναμε τα φυτά με τον βοτρύτη με τον ίδιο τρόπο όπως στα φυτά της 1ης ομάδας.
- Η 5η ομάδα φυτών ήταν η τελευταία που αποτελούνταν από 30 φυτά. Στα συγκεκριμένα φυτά έγινε εφαρμογή του χημικού σκευάσματος *SWITCH* (δραστική ουσία *cyprodinil* και *fludioxonil*) με ψεκασμό έως απορροής. Έπειτα από 2 ημέρες μολύναμε τα φυτά με τον βοτρύτη με τον ίδιο τρόπο όπως στα φυτά της 1ης ομάδας.
- Η 6η ομάδα φυτών αποτελούνταν από 20 φυτά. Αυτή η ομάδα ήταν ο αρνητικός μάρτυρας του πειράματος.
- Η 7η ομάδα φυτών αποτελούνταν από 20 φυτά. Σε αυτά τα φυτά εφαρμόστηκε μόνο ο βιολογικός παράγοντας *R. glutinis* Y44 με ψεκασμό έως απορροής.
- Η 8η ομάδα φυτών αποτελούνταν από 20 φυτά. Σε αυτά τα φυτά εφαρμόστηκε μόνο ο βιολογικός παράγοντας K165 με ριζοπότισμα.
- Τέλος η 9η ομάδα φυτών αποτελούνταν από 20 φυτά. Σε αυτή την ομάδα εφαρμόστηκαν και οι 2 βιολογικοί παράγοντες. Πρώτα ψεκάσαμε έως απορροής με το θρεπτικό υλικό που είχε αναπτυχθεί η καλλιέργεια του βιολογικού παράγοντα *R. glutinis* Y44.Στη συνέχεια την ίδια μέρα με ριζοπότισμα εφαρμόσαμε στο χώμα τον βιολογικό παράγοντα K165.

Στο 2ο πείραμα που χρησιμοποιήθηκαν φυτά τομάτας ακολουθήθηκαν ακριβώς οι ίδιες διαδικασίες.

Η ένταση της ασθένειας μετρήθηκε με βάση τον δείκτη ασθενείας των:

0 – Υγιή φυτά

1- Σοβαρά συμπτώματα της ασθένειας στα φύλλα, καστανές κηλίδες και σήψεις φύλλων. Νεκρά φυτά.

**2.8 Απομόνωση RNA από φυτά μαρουλιού και τομάτας**

Για τη διαδικασία αυτή κόπηκαν φύλλα από όλες τις επεμβάσεις που κάναμε, εκτός της χημικής, και κονιορτοποιήθηκαν με τη χρήση υγρού αζώτου σε καθαρά ιγδία. Στη συνέχεια 80-100 mg κονιορτοποιημένου φυτικού ιστού τοποθετήθηκαν σε πλαστικό σωλήνα 1,5 ml και αναμείχθηκαν με 1 ml διαλύματος εξαγωγής RNA. Ακολούθησε ανάδευση για 10 sec και ύστερα τα δείγματα παρέμειναν σε ηρεμία σε

θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα μετά από 5 min ακολούθησε ανάμειξη με 200 ml χλωροφόρμιο, ανακίνηση με το χέρι για 1 min και τέλος φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm στους 4$^{o}$C για 10 min. Η υπερκείμενη φάση που δημιουργήθηκε (0,5 ml) μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα 1,5 ml. Ακολούθησε εκχύλιση με 0,5 ml ισοπροπανόλης και μετά από ανάδευση, φυγοκέντρηση για 20 min στις 12.000 rpm και 4$^{o}$C και απομάκρυνση της υπερκείμενης φάσης. Ύστερα έγινε προσθήκη 200 ml EtOH, φυγοκέντρηση για 2 min στους 4$^{o}$C και αφαίρεση του διαλύματος ώστε να παραμείνει μόνο το ίζημα. Τέλος έγινε στέγνωμα του ιζήματος RNA για 10-15 min σε θερμοκρασία δωματίου και επαναιώρηση του σε 25 μl υπερκάθαρο νερό, απαλλαγμένο από ριβονουκλεάσες.

Το RNAαποθηκεύτηκε στους -80$^{o}$C για περαιτέρω χρήση.

**2.9 Μέτρηση νουκλεϊκών οξέων**

Η συγκέντρωση του RNA των δειγμάτων μετρήθηκε σε Nanodrop ND – 1000 Spectrophotometer (Saveen Wermer, Malmf, Swede)

**2.10 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 του βιολογικού παράγοντα στη ριζόσφαιρα των φυτών του μαρουλιού και του γονιδίου *APT* που χρησιμοποιήθηκε σαν γονίδιο αναφοράς. Όσον αφορά τα φυτά τομάτας η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής εφαρμόστηκε για τον καθορισμό του επιπέδου μεταγραφής των υπό μελέτη γονιδίων *PR1* και *PIN2* τα οποία πιθανόν επίσης να επάγονται από την προσθήκη του βιολογικού παράγοντα στη ριζόσφαιρα των φυτών της τομάτας και του γονιδίου *APT* που χρησιμοποιήθηκε σαν γονίδιο αναφοράς.

*Καταστροφή υπολλειμάτων DNA*: Πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των δειγμάτων από DNA με την χρήση DNAse I (New Engl and Biolabs) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Ο καθορισμός των δειγμάτων από DNA έγινε ως εξής:

- ✓ Σε κάθε δείγμα προστέθηκε 1μl DNAseI (1unit)
- ✓ Τα δείγματα τοποθετήθηκαν για επώαση σε θερμοκήπια 37$^{o}$C για 10΄
- ✓ Έπειτα σε κάθε δείγμα προστέθηκε 0,5 μl EDTA ( 5mM τελική συγκέντρωση)
- ✓ Τέλος τα δείγματα επωάστηκαν στους 75$^{o}$C για 10΄ ώστε να απενεργοποιηθεί η DNAseI

*Σύνθεση cDNA από ολικό RNA με RT-PCR*: Προσδιορίστηκε η συγκέντρωση και η καθαρότητα των δειγμάτων με τη χρήση Nanodrop. Στη συνέχεια 500 ng RNA από

κάθε δείγμα, αραιώθηκαν με δις- απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 7μl. Πριν την μελέτη της έκφρασης των γονιδίων πραγματοποιήθηκε αντίστροφη μεταγραφή του mRNA σε cDNA με τη χρήση του Prime Script RT re agent kit (*Takara Bio Inc*) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Για αντιδράσεις τελικού όγκου 10μl, σε κάθε δείγμα προστέθηκαν:

- ✓ 2μl ρυθμιστικό διάλυμα (5x prime script buffer)
- ✓ 0,5 μl αντίστροφη μεταγραφάση (prime script RT enzyme)
- ✓ 0,5μl μείγμα εκκινητών θυμίνης (oligo dT primer)

**2.11 Έκφραση των γονιδίων *PR1, LOX, ERF1*και *PR1, PIN2***

Η RT-PCR έγινε σε θερμοκυκλοποιητή της Strat agene Mx3005P^TM και για τις αντιδράσεις ενίσχυσης χρησιμοποιήθηκε ένα master mix KAPASYBR Fast Universal Qpcr kit (KAPA biosystems, Woburn, MA, USA), ενώ τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό Mx ProqPCR.

Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη έκφρασης των γονιδίων *PR1, LOX*, και *ERF1*στο μαρούλι απεικονίζονται στο παρακάτω πίνακα:

| *Γονίδιο στόχος* | *Ζεύγος εκκινητών* | *Αναφορές* |
|---|---|---|
| PR1 (Lsa018589.1) | 5´-ATGGGACAGTCGTGTGGCTAGTTT-3´<br>5’-TGTTCACAGCATCTACACCGGTCA-3’ | De Cremer et al., 2013 |
| LOX (Lsa036946.1) | 5´-GCAACTAAGCGTGCTTCACCCAAT-3´<br>5´-TGCCTCAAGAAGACCTCCACCATT-3´ | De Cremer et al., 2013 |
| ERF1 (Lsa016859.1) | 5´-TCGCCGGTGATGTCCAGTTATCAA-3´<br>5´-TGTTTCCCTCTCTGCTGGTTCACA-3´ | De Cremer et al., 2013 |
| APT1 | 5’-CTGTACTTGAAGGAGAACGAGC-3’<br>5’-ACGAGCACATACAGTGGCTT-3’ | Argyris et al., 2008 |

Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη έκφρασης των γονιδίων *PR1*και *PIN2* στην τομάτα απεικονίζονται στο παρακάτω πίνακα:

| *Γονίδιο στόχος* | *Ζεύγος εκκινητών* | *Αναφορές* |
|---|---|---|
| PR1 (Lsa018589.1) | 5´-GAGGGCAGCCGTGCAA-3´<br>5'- CACATTTTTCCACCAACACATTG -3' | Blocketal. 2005 |
| PIN2 | 50-TGATGCCAAGGCTTGTACTAGAGA-30<br>50-AGCGGACTTCCTTCTGAACGT-30 | (Hermanetal. 2008) |
| ACTIN | 5'- TTGCCGCATGCCATTCT -3'<br>5'- TCGGTGAGGATATTCATCAGGTT -3' | (Hermanetal. 2008) |

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

| *Αντιδραστήρια* | *Όγκος* | *Τελική συγκέντρωση* |
|---|---|---|
| KAPA SYBR Fast Universal qPCR Master Mix | 5μl | |
| Rox Low | 0,2μl | 25μM |
| Εκκινητής F | 0,5 μl | 25μM |
| Εκκινητής R | 0,5 μl | |
| Δείγμα cDNA | 1μl | 50 ng/ml |
| H2O | 2,8 μl | |
| Τελικός όγκος | 10 μl | |

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *APT1* και *ACTIN* που είναι γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιείται σαν σταθερά για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των άλλων γονιδίων.

Τέλος απεικονίζεται το πρόγραμμα θερμοκρασιών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις Real-time PCR:

| | *Χρόνος* | *Θερμοκρασία* | *Αποτέλεσμα* |
|---|---|---|---|
| Στάδιο 1$^{o}$ | 3min | 95 | Ενεργοποίηση της HotStar Taq DNA πολυμεράσης |
| Στάδιο 2$^{o}$ * | 3sec | 95 | Αποδιάταξη DNA |
| | 30sec | 60 | Υβριδισμός εκκινητών/ επιμήκυνση αλυσίδας |
| Στάδιο 3$^{o}$ | 1min | 95 | Δημιουργία της καμπύλης |
| | 30sec | 60 | διαχωρισμού των προϊόντων |
| | 30sec | 95 | της RT-PCR (Dissociation curve)** |

*το 2$^{o}$ στάδιο επαναλήφθηκε για 40 κύκλους

**η εξειδίκευση των εκκινητών και ο σχηματισμός των διμερών των εκκινητών παρακολουθήθηκαν από την καμπύλη διαχωρισμού της RT-PCR.

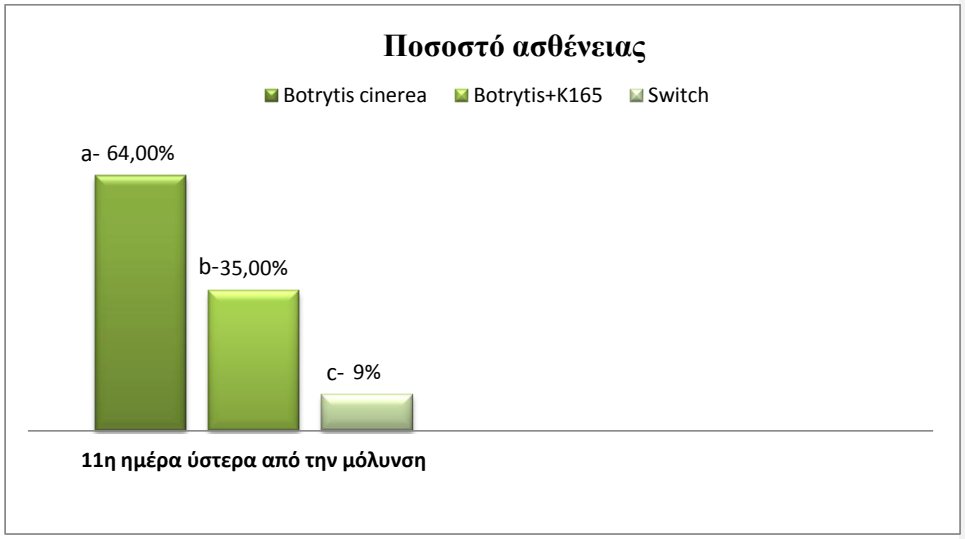
Η κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε 3 επαναλήψεις.

## 3. Αποτελέσματα

### 3.1 Αξιολόγηση των στελεχών Κ165 και Υ44 εναντίον του μύκητα *B. cinerea* σε φυτά

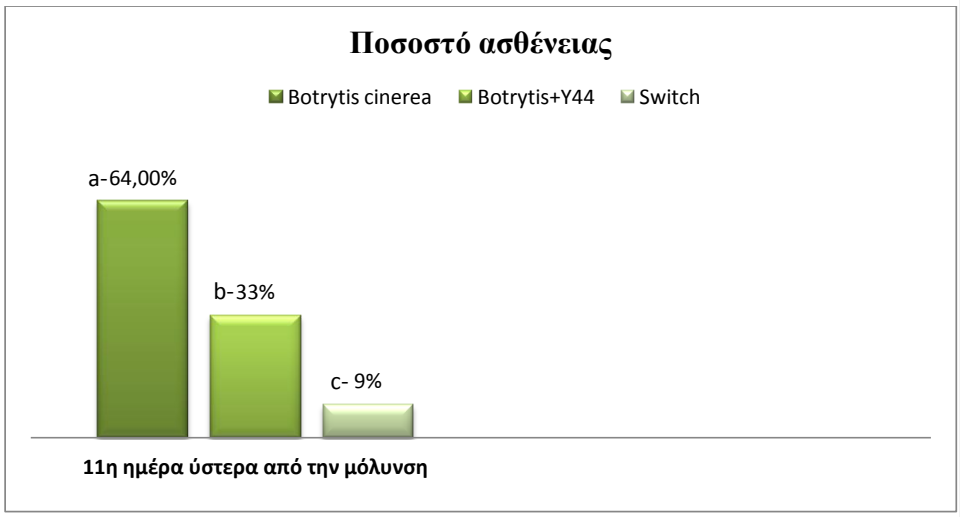
Σε αυτό το πείραμα αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα του βιολογικού παράγοντα *P.alvei* (στέλεχος Κ165) και του βιολογικού παράγοντα *R.glutinis* (Υ44) κατά του φυτοπαθογόνου μύκητα B. cinerea σε φυτά μαρουλιού. Οι δύο βιολογικοί παράγοντες εξετάστηκαν και μόνοι τους αλλά και σε συνδυασμό για να αξιολογηθεί την αποτελεσματικότητα τους.

Έντεκα ημέρες ύστερα από την μόλυνση των φυτών του μαρουλιού με τον μύκητα *B.cinerea* πραγματοποιήθηκε η παρατήρηση των συμπτωμάτων.



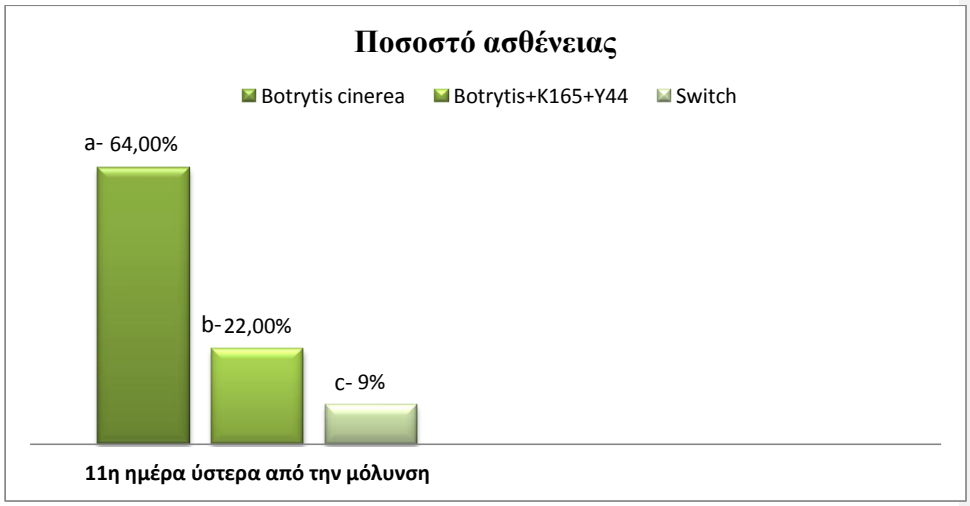

*Γράφημα 1:* Αξιολόγηση του βιολογικού παράγοντα *P.alvei* (στέλεχος Κ165) σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα και την εφαρμογή με Switch, 11 ημέρες ύστερα από την μόλυνση των φυτών.

Όπως φαίνεται από το γράφημα 1, τα πιο έντονα συμπτώματα εμφάνισε ο μάρτυρας όπως ήταν αναμενόμενο. Συμπτώματα παρουσίασε και η εφαρμογή με τον βιολογικό παράγοντα σε μικρότερα όμως επίπεδα σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα. Τέλος η εφαρμογή με το χημικό σκεύασμα παρουσίασε τα λιγότερα συμπτώματα μέχρι το τέλος το πειράματος, κάτι λογικό καθώς είναι σκεύασμα το οποίο ειδικεύεται στην αντιμετώπιση των μυκήτων του εδάφους.



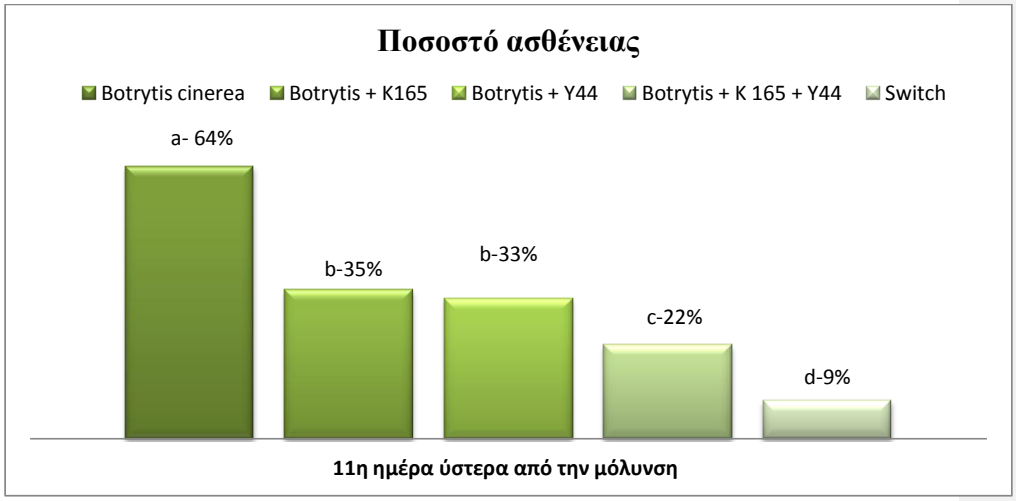

*Γράφημα 2:* Αξιολόγηση του βιολογικού παράγοντα *R.glutinis* (Y44) σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα και την εφαρμογή με Switch, 11 ημέρες ύστερα από την μόλυνση των φυτών.

Όπως φαίνεται από το γράφημα 2, τα επίπεδα των συμπτωμάτων του μάρτυρα είναι αρκετά πιο αυξημένα σε σχέση με τα επίπεδα της εφαρμογής με το Y44. Τέλος η εφαρμογή με το χημικό σκεύασμα και αυτήν τη φορά παρουσίασε τα λιγότερα συμπτώματα μέχρι το τέλος το πειράματος.



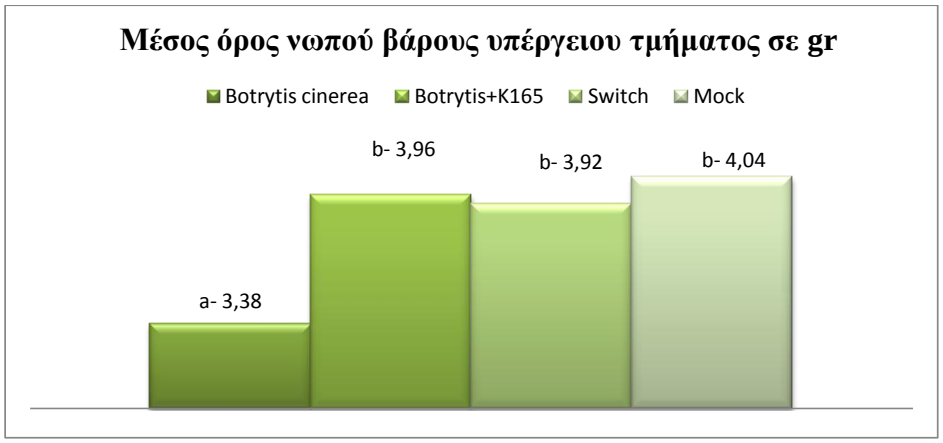

*Γράφημα 3:* Αξιολόγηση του συνδυασμού των δύο βιολογικών παραγόντων (K165 + Y44) σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα και την εφαρμογή με *SWITCH*, 11 ημέρες ύστερα από την μόλυνση των φυτών.

Όπως φαίνεται από το γράφημα 3, αρκετά πιο έντονα συμπτώματα εμφάνισε ο μάρτυρας σε σύγκριση με τις επόμενες δύο εφαρμογές. Συμπτώματα βέβαια παρουσιάστηκαν και στην εφαρμογή με τους βιολογικούς παράγοντες σε μικρότερα όμως επίπεδα σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα. Κλείνοντας όπως ήταν αναμενόμενο η εφαρμογή με το χημικό σκεύασμα παρουσίασε τα μικρότερα επίπεδα συμπτωμάτων μέχρι το τέλος το πειράματος.



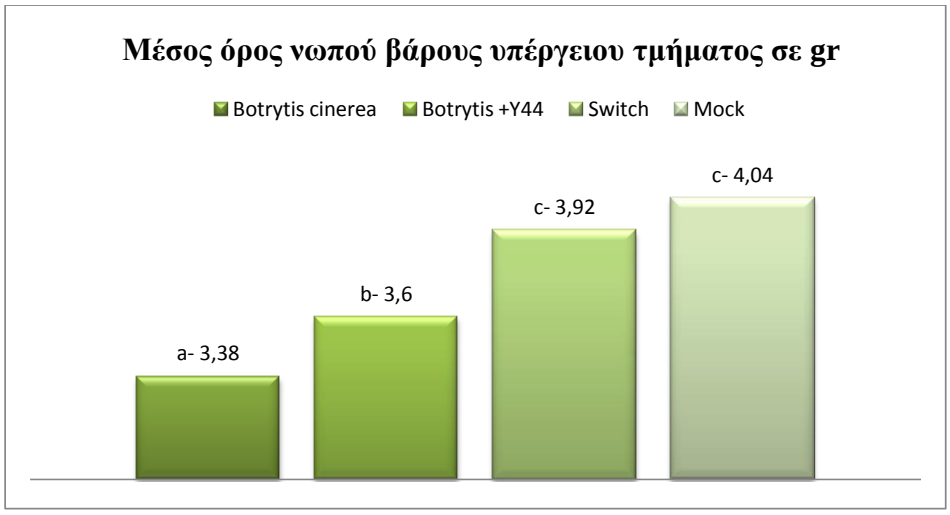

*Γράφημα 4*: Συνολικό γράφημα με τα ποσοστά της ασθένειας.

Αυτό που παρατηρούμε κοιτώντας το συνολικό γράφημα με τα ποσοστά της ασθένειας είναι ότι τα πιο χαμηλά ποσοστά συμπτωμάτων, εκτός από την εφαρμογή με το χημικό σκεύασμα, εμφανίζονται όταν οι δύο βιολογικοί παράγοντες που εξετάζονται στην εργασία (K165 + Y44) εφαρμόζονται σε συνδυασμό στη ριζόσφαιρα και πάνω στα φυτά αντίστοιχα.



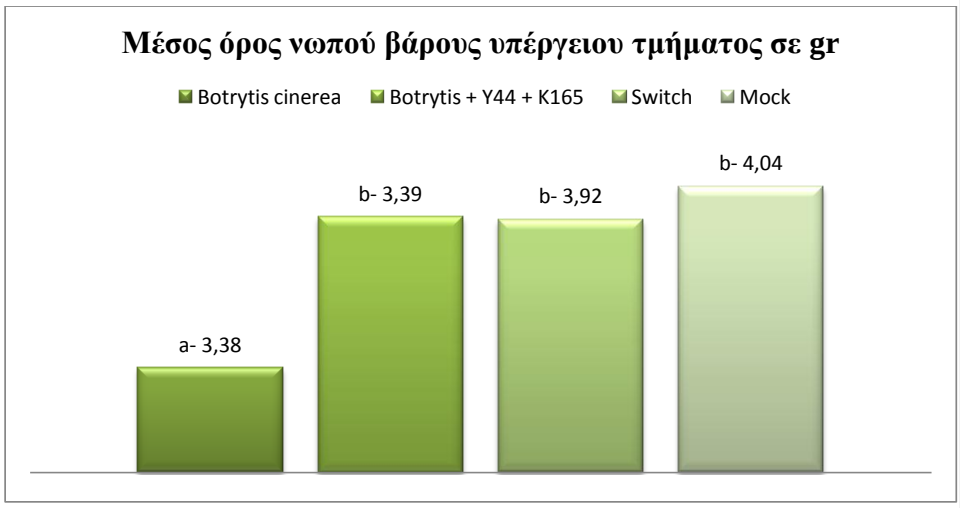
*Γράφημα 5*: Μέσος όρος νωπού βάρους του υπέργειου τμήματος των φυτών μαρουλιού της εφαρμογής με τον βιολογικού παράγοντα *P.alvei* (στέλεχος K165) σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα, τον αρνητικό μάρτυρα και την εφαρμογή με Switch στο τέλος του πειράματος.

Παρατηρώντας το γράφημα 5, βλέπουμε πως τα μεγαλύτερα βάρη φυτών ανήκαν στον αρνητικό μάρτυρα όπως ήταν αναμενόμενο. Παρόλο που τα βάρη των φυτών της εφαρμογής με τον βιολογικό παράγοντα ήταν παραπλήσια με αυτά της εφαρμογής με το χημικό σκεύασμα, η εφαρμογή με τον βιολογικό παράγοντα δίνει ελάχιστα υψηλότερο μέσο όρο βάρους. Τέλος ο θετικός μάρτυρας εμφάνισε τον μικρότερο μέσο όρο βάρους.



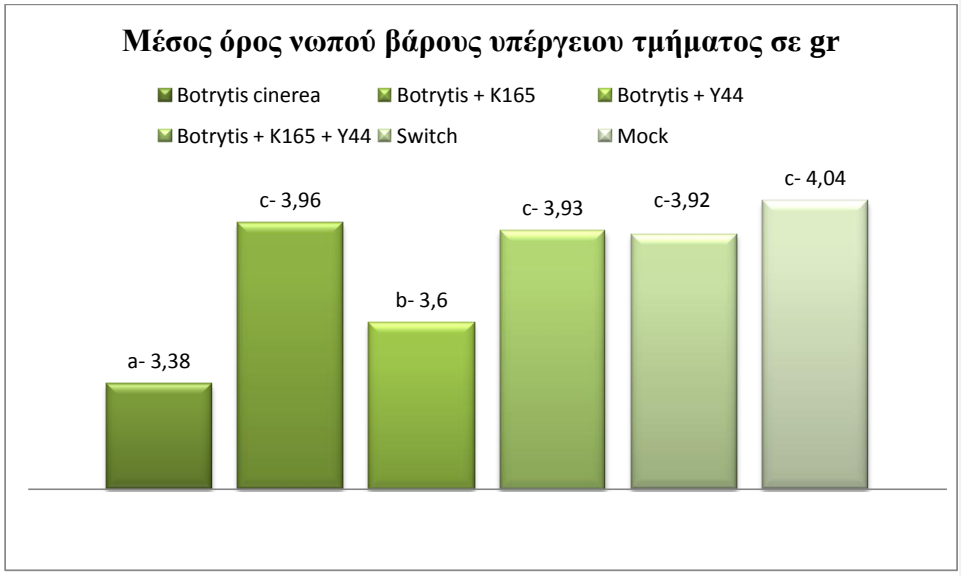

*Γράφημα 6*: Μέσος όρος νωπού βάρους του υπέργειου τμήματος των φυτών μαρουλιού της εφαρμογής με τον βιολογικού παράγοντα *R.glutinis* (Y44) σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα, τον αρνητικό μάρτυρα και την εφαρμογή με *SWITCH* στο τέλος του πειράματος.

Παρατηρώντας το γράφημα 6, βλέπουμε πως τα μεγαλύτερα βάρη φυτών ανήκαν και σε αυτήν την περίπτωση στον αρνητικό μάρτυρα. Αυτήν τη φορά όμως η εφαρμογή με το χημικό σκεύασμα εμφάνισε υψηλότερο μέσο όρο βάρους σχετικά με την εφαρμογή με τον βιολογικό παράγοντα Y44. Τέλος και πάλι ο θετικός μάρτυρας εμφάνισε τον μικρότερο μέσο όρο βάρους.




*Γράφημα 7*: Μέσος όρος νωπού βάρους του υπέργειου τμήματος των φυτών μαρουλιού της εφαρμογής που εφαρμόστηκε ο συνδυασμός των δύο βιολογικών παραγόντων (K165 + Y44) σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα, τον αρνητικό μάρτυρα και την εφαρμογή με *SWITCH* στο τέλος του πειράματος.

Παρατηρώντας το γράφημα 7, βλέπουμε πως τα μεγαλύτερα βάρη φυτών ανήκαν για ακόμη μια φορά στον αρνητικό μάρτυρα ενώ ο θετικός μάρτυρας εμφάνισε τον μικρότερο μέσο όρο βάρους. Οι εφαρμογές με τον συνδυασμό των βιολογικών παραγόντων και το χημικό σκεύασμα παρουσίασαν σχεδόν ίδιο μέσο όρο με τη εφαρμογή του συνδυασμού των βιολογικών να εμφανίζει ελάχιστα μεγαλύτερο.




*Γράφημα 8*: Συνολικό διάγραμμα μέσου όρου του βάρους των φυτών.

Εξετάζοντας το συνολικό γράφημα των μέσων όρων, αυτό που παρατηρούμε είναι ότι οι ψηλότεροι μέσοι όροι όσον αφορά τα βάρη των φυτών, πέρα από τον αρνητικό μάρτυρα, εμφανίζονται στην εφαρμογή με τον συνδυασμό των βιολογικών παραγόντων (K165 + Y44) καθώς και στην εφαρμογή με τον βιολογικό παράγοντα *P.alvei* (στέλεχος K165). Οι τιμές αυτών των δύο για τους μέσους όρους νωπού βάρους φυτών είναι παραπλήσιες.

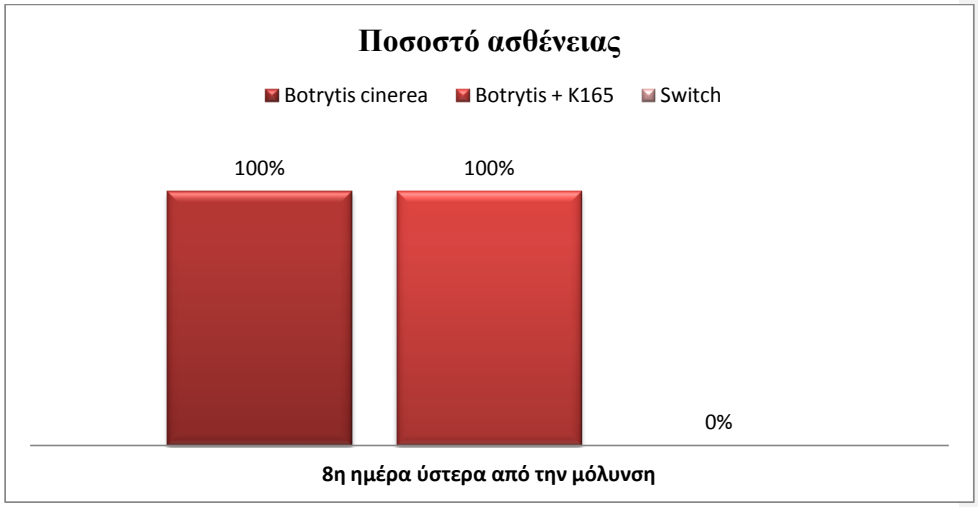
*Εικόνα 3:* Τα φυτά της κάθε εφαρμογής 13 ημέρες μετά την μόλυνση με τον φυτοπαθογόνο μύκητα B. cinerea.

### 3.2 Αξιολόγηση των στελεχών K165 και Y44 εναντίον του μύκητα *B. cinerea* σε φυτά τομάτας

Στο συγκεκριμένο πείραμα αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα του βιολογικού παράγοντα *P.alvei* (στέλεχος K165) και του βιολογικού παράγοντα *R.glutinis* Y44 κατά του φυτοπαθογόνου μύκητα B. cinerea σε φυτά τομάτας. Οι δύο βιολογικοί

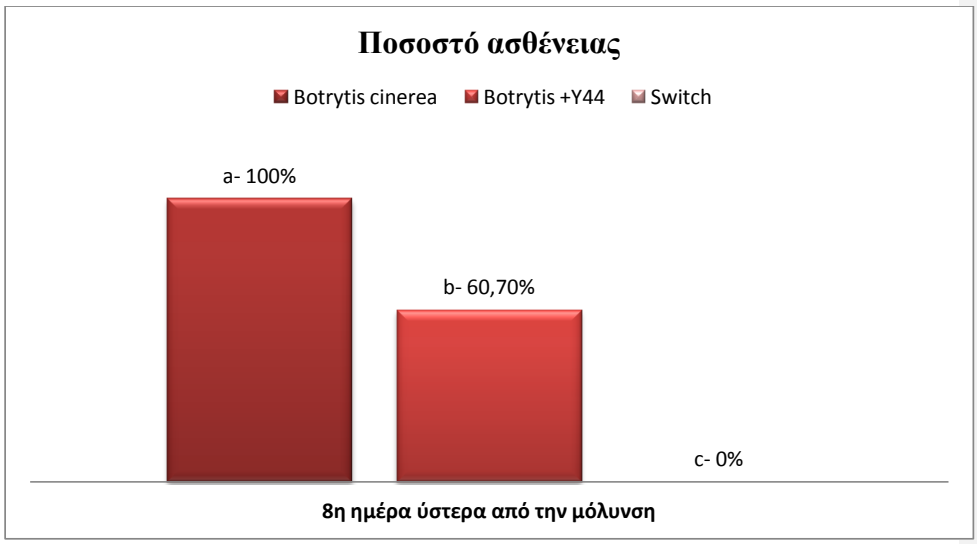
παράγοντες εξετάστηκαν και μόνοι τους αλλά και σε συνδυασμό για να αξιολογηθεί την αποτελεσματικότητα τους.

Οκτώ ημέρες ύστερα από την μόλυνση των φυτών τομάτας με τον μύκητα *B.cinerea* πραγματοποιήθηκε η παρατήρηση των συμπτωμάτων.



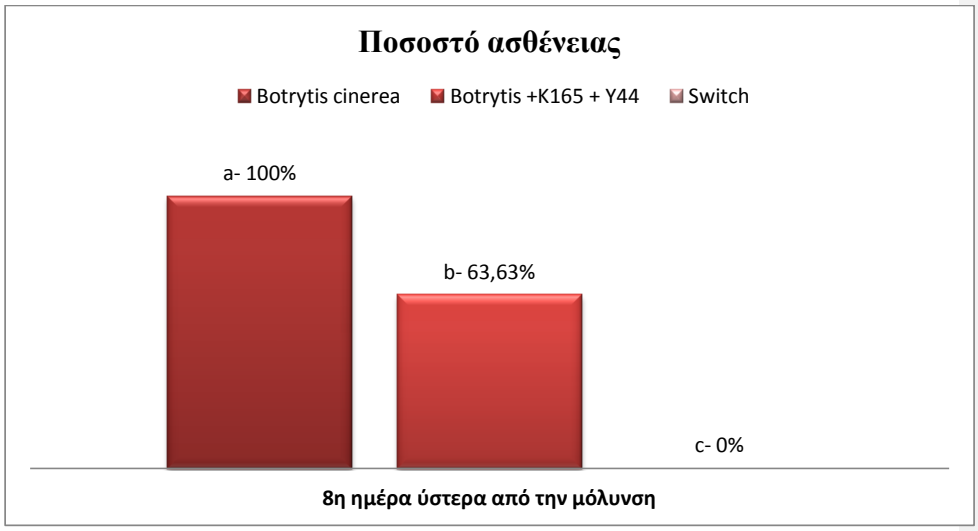

*Γράφημα 9:* Αξιολόγηση του βιολογικού παράγοντα *P.alvei* (στέλεχος K165) σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα και την εφαρμογή με Switch, 8 ημέρες ύστερα από την μόλυνση των φυτών.

Όπως διακρίνεται στο γράφημα 9, η εφαρμογή με τον βιολογικό παράγοντα (K165) δεν βοήθησε στη μείωση της εμφάνισης των συμπτωμάτων καθώς στην συγκεκριμένη εφαρμογή όπως και στον θετικό μάρτυρα συμπτώματα έντονα εμφάνισαν όλα τα μολυσμένα φυτά. Η εφαρμογή με το χημικό σκεύασμα δεν παρουσίασε συμπτώματα μέχρι το τέλος το πειράματος, κάτι λογικό καθώς είναι σκεύασμα το οποίο ειδικεύεται στην αντιμετώπιση του μύκητα.



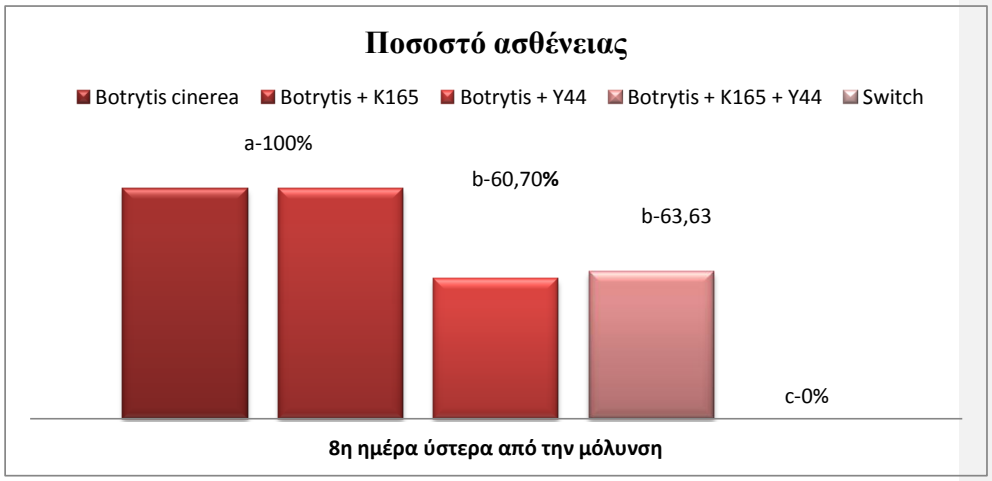

*Γράφημα 10:* Αξιολόγηση του βιολογικού παράγοντα *R.glutinis* Y44 σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα και την εφαρμογή με *SWITCH*, 8 ημέρες έπειτα από την μόλυνση των φυτών.

Όπως διακρίνεται στο γράφημα 10, την 8$^{η}$ ημέρα της παρατήρησης έντονα συμπτώματα σε όλα τα φυτά εμφάνισε ο θετικός μάρτυρας. Η εφαρμογή με το Y44 μείωσε αρκετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων. Τέλος η εφαρμογή με το χημικό σκεύασμα και αυτήν τη φορά δεν παρουσίασε συμπτώματα κατά τη διάρκεια του πειράματος.



*Γράφημα 11:* Αξιολόγηση του συνδυασμού των δύο βιολογικών παραγόντων (K165 + Y44) σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα και την εφαρμογή με *SWITCH*, 8 ημέρες ύστερα από την μόλυνση των φυτών.

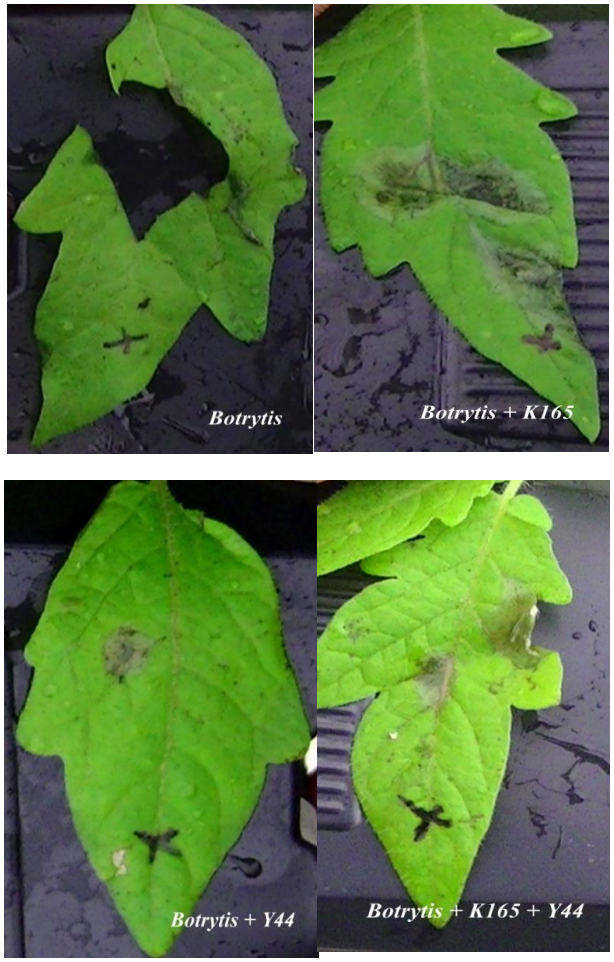
Όπως διακρίνεται στο γράφημα 11, πιο έντονα συμπτώματα εμφάνισε ο μάρτυρας διότι συμπτώματα εμφανίστηκαν σε όλα τα προσβεβλημένα φυτά. Συμπτώματα βέβαια παρουσιάστηκαν και στην εφαρμογή με τους βιολογικούς παράγοντες σε αρκετά όμως μικρότερα επίπεδα σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα. Κλείνοντας η εφαρμογή με το χημικό σκεύασμα δεν παρουσίασε συμπτώματα και πάλι.




*Γράφημα 12*: Συνολικό γράφημα με τα ποσοστά της ασθένειας των φυτών.

Από το συνολικό γράφημα του ποσοστού ασθένειας αυτό που παρατηρούμε είναι ότι ο βιολογικός παράγοντας *P.alvei* (στέλεχος K165) δεν βοήθησε στην μείωση εμφάνισης των συμπτωμάτων που προέρχονται από την μόλυνση με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *B.cinerea* στα φυτά τομάτας. Από την αλλή η χρήση του βιολογικού παράγοντα *R.glutinis* (Y44), είτε μόνο του πάνω στα φυτά είτε σε συνδυασμό με το K165 στη ριζόσφαιρα, μείωσε αρκετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων στα προσβεβλημένα φυτά.

Όσον αφορά το νωπό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών της τομάτας δεν έχουμε μετρήσεις διότι τα προσβεβλημένα φυτά όλων των εφαρμογών ήταν τελείως μαραμένα και εξασθενημένα μέχρι το τέλος του πειράματος.

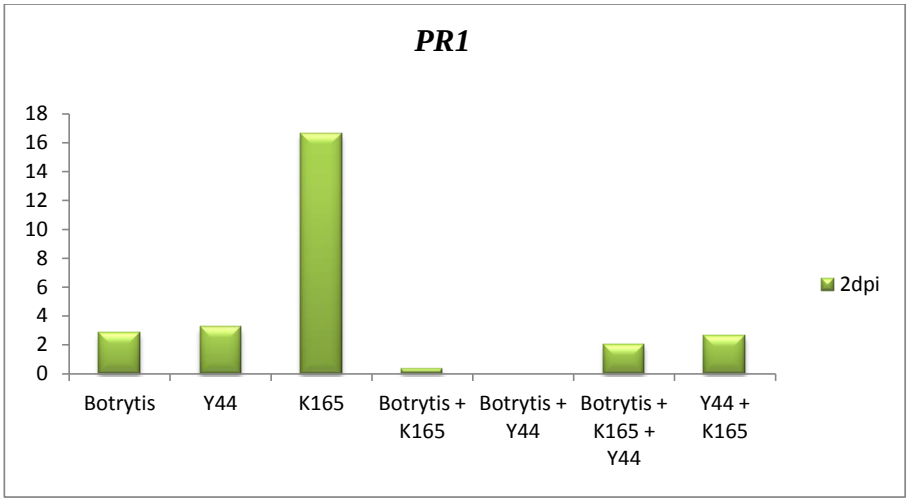



*Εικόνα 4:* Τα φυτά της κάθε εφαρμογής 7 ημέρες μετά την μόλυνση με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *B.cinerea*.

**3.3 Έκφραση γονιδίων σε φυτά μαρουλιών**

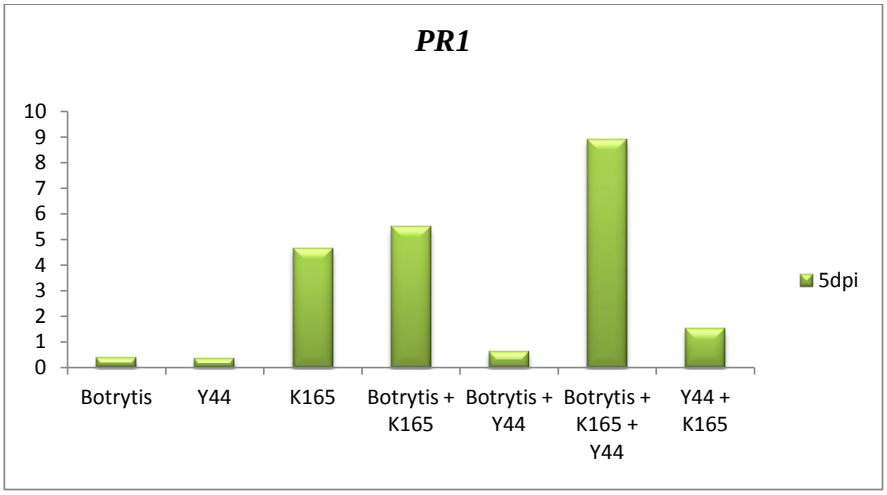
Σε αυτό το πείραμα αξιολογήθηκε η έκφραση των γονιδίων *PR1, LOX, ERF1* που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών μαρουλιού. Πιο συγκεκριμένα το γονίδιο *PR1* ενεργοποιείται μέσω του βιοχημικού μονοπατιού του σαλικυλικού οξέος, το *LOX* μέσω του ιασμονικού οξέος, ενώ το γονίδιο *ERF1* ενεργοποιείται μέσω του μονοπατιού του αιθυλενίου.

Η συλλογή των φύλλων για την μελέτη έκφρασης των γονιδίων έγινε 2 και 5 ημέρες ύστερα από την μόλυνση των φυτών με τον μύκητα.



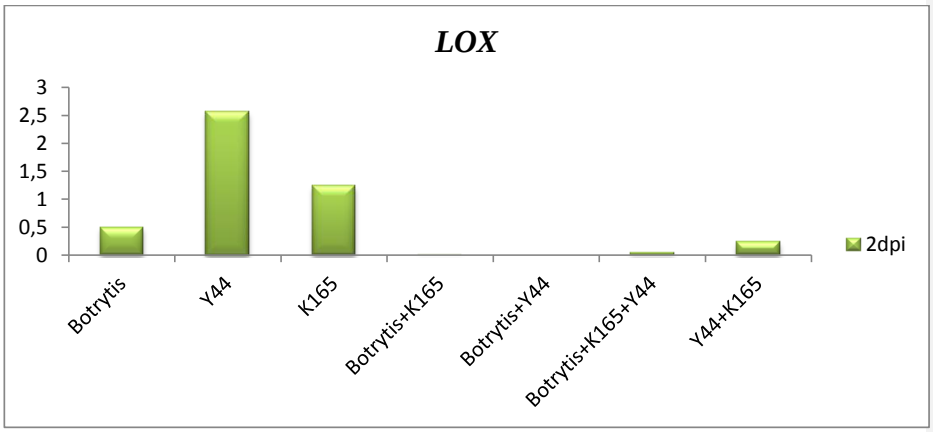

*Γράφημα 13*: Έκφραση του γονιδίου *PR1*, 2 ημέρες ύστερα από την μόλυνση τον φυτών με τον παθογόνο μύκητα.

Από το γράφημα 13 παρατηρούμε ότι υπάρχει έκφραση του γονιδίου *PR1* σε όλες τις εφαρμογές του πειράματος, εκτός από την εφαρμογή με τον παθογόνο μύκητα και τον βιολογικό παράγοντα Y44. Η πιο έντονη έκφραση όμως παρατηρείται στην εφαρμογή με τον βιολογικό παράγοντα K165, σε αμόλυντα φυτά.



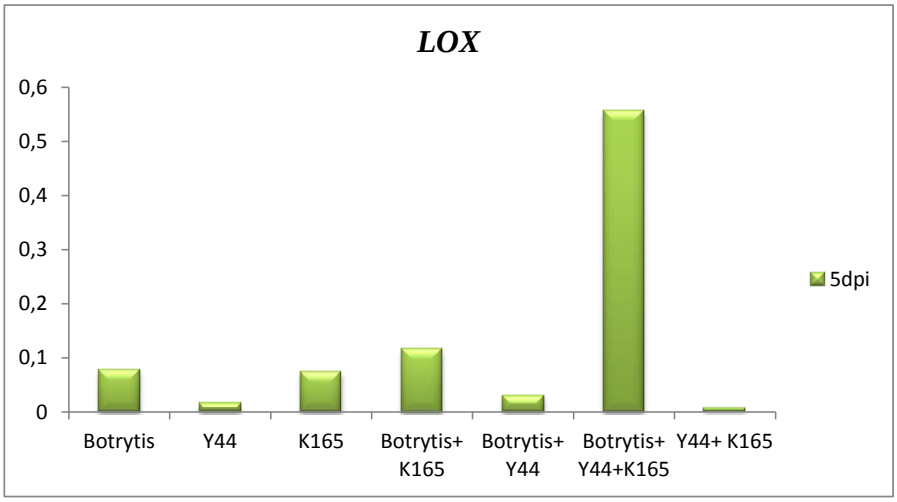

*Γράφημα 14*: Έκφραση του γονιδίου *PR1*, 5ημέρες ύστερα από την μόλυνση τον φυτών με τον παθογόνο μύκητα.

Από το γράφημα 14 παρατηρούμε ότι υπάρχει έκφραση του γονιδίου *PR1* σε όλες τις εφαρμογές του πειράματος. Η πιο έντονη έκφραση όμως παρατηρείται στην εφαρμογή με τον βιολογικό παράγοντα K165 σε αμόλυντα φυτά, στην εφαρμογή με τον παθογόνο μύκητα και το K165 καθώς επίσης και σε μολυσμένα φυτά που εχεί εφαρμοστεί συνδυασμός των βιολογικών παραγόντων.




*Γράφημα 15*: Έκφραση του γονιδίου *LOX*,2 ημέρες ύστερα από την μόλυνση του φυτού με τον παθογόνο μύκητα.

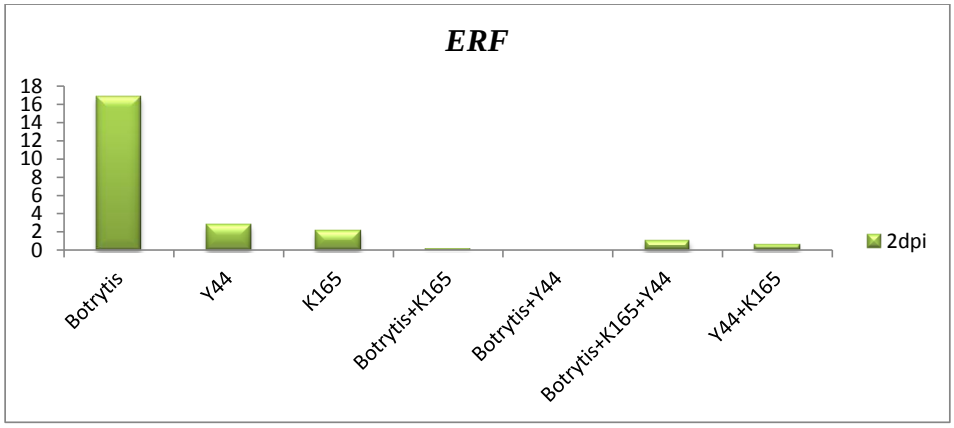
Μέσω του γραφήματος 15 παρατηρούμε ότι υπάρχει έντονη έκφραση του γονιδίου στην εφαρμογή με το Y44 και το K165. Επιπλέον έκφραση παρατηρείται και στον θετικό μάρτυρα του πειράματος . Σε όλες τις υπόλοιπες εφαρμογές εμφανίζεται πολύ μικρή έκφραση ή υποέκφραση του γονιδίου *LOX*.




*Γράφημα 16*: Έκφραση του γονιδίου *LOX*, 5 ημέρες ύστερα από την μόλυνση του φυτού με τον παθογόνο μύκητα.

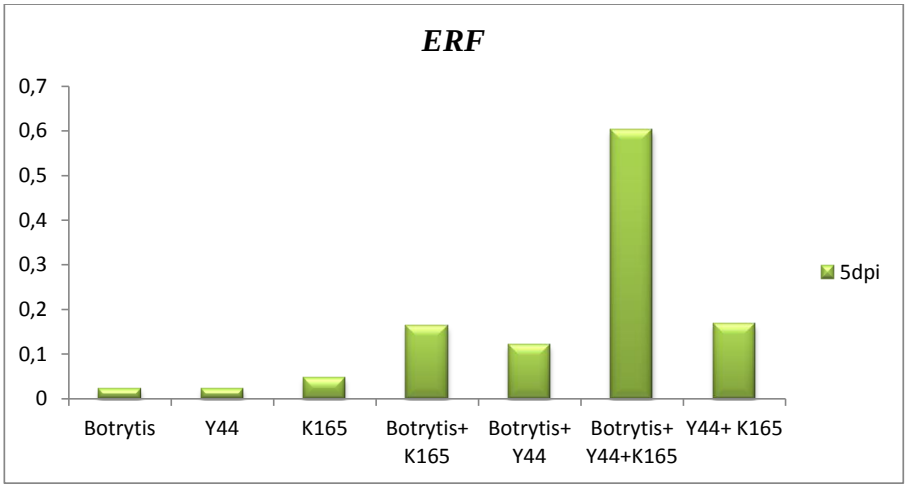
Μέσω του γραφήματος 16 παρατηρούμε ότι υπάρχει έντονη έκφραση του γονιδίου στην εφαρμογή με τον συνδυασμό των βιολογικών παραγόντων σε προσβεβλημένα φυτά. Έκφραση του γονιδίου παρατηρείται σε όλες τις εφαρμογές. Η μικρότερη όμως

έκφραση παρατηρείται στην εφαρμογή με τον συνδυασμό των βιολογικό παραγόντων σε μη προσβεβλημένα φυτά.




*Γράφημα 17*: Έκφραση του γονιδίου *ERF*,2 ημέρες ύστερα από την μόλυνση του φυτού με τον παθογόνο μύκητα.

Από το γράφημα 17 διαπιστώνουμε ότι υπάρχει έντονη έκφραση του γονιδίου στον θετικό μάρτυρα του πειράματος. Επιπλέον έκφραση παρατηρείται και στις εφαρμογές με τους βιολογικούς παράγοντες.




*Γράφημα 18*: Έκφραση του γονιδίου *ERF*, 5 ημέρες ύστερα από την μόλυνση του φυτού με τον παθογόνο μύκητα.

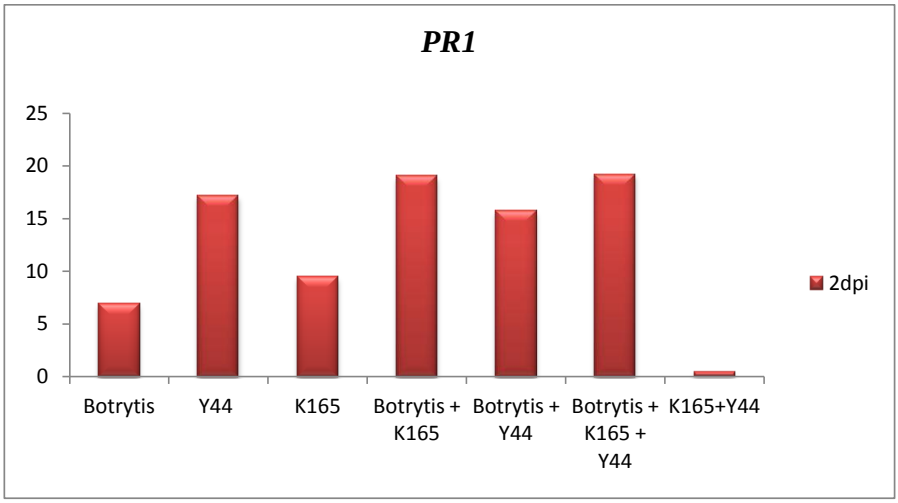
Από το γράφημα 18 διαπιστώνουμε ότι υπάρχει έκφραση του γονιδίου σε όλες τις εφαρμογές του πειράματος. Πολύ έντονη παρόλα αυτά έκφραση εμφανίζεται στην

εφαρμογή με τον συνδυασμό των βιολογικών παραγόντων (K165+Y44) σε μολυσμένα φυτά.

### 3.4 Έκφραση γονιδίων σε φυτά τομάτας

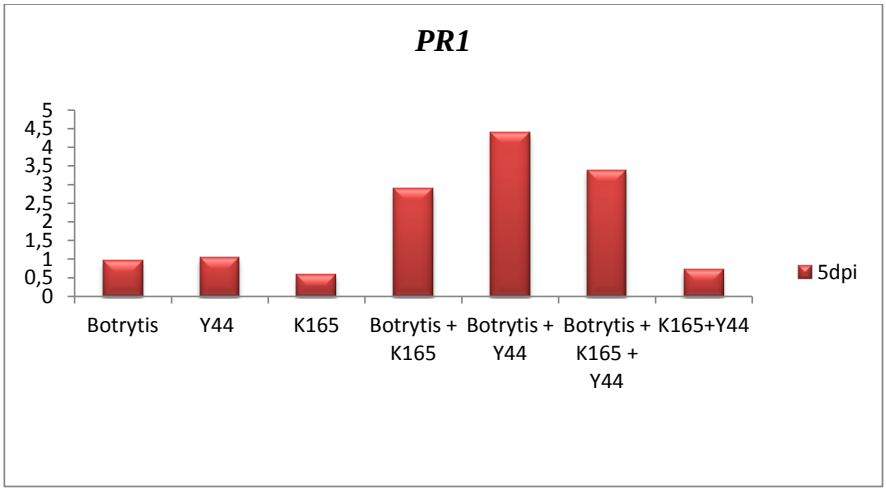
Σε αυτό το πείραμα αξιολογήθηκε η έκφραση των γονιδίων *PR1* και *PIN2* που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών τομάτας. Πιο συγκεκριμένα το γονίδιο *PR1* ενεργοποιείται μέσω του βιοχημικού μονοπατιού του σαλικυλικού οξέος και το *PIN2* ενεργοποιείται μέσω του μονοπατιού του αιθυλενίου.

Η συλλογή των φύλλων για την μελέτη έκφρασης των γονιδίων έγινε 2 και 5 ημέρες ύστερα από την μόλυνση των φυτών με τον φυτοπαθογόνο μύκητα.



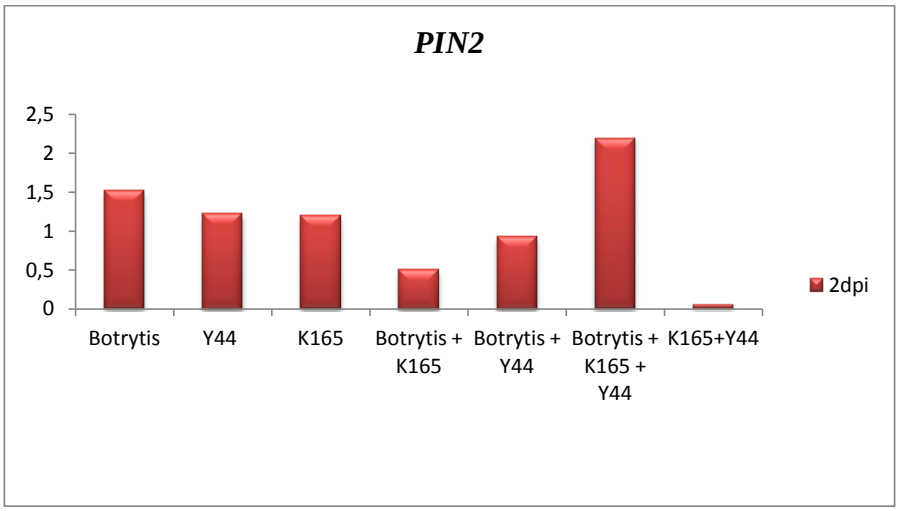

*Γράφημα 19*: Έκφραση του γονιδίου *PR1*,2 ημέρες ύστερα από την μόλυνση του φυτού με τον παθογόνο μύκητα.

Παρατηρώντας το γράφημα 19, βλέπουμε ότι υπάρχει έντονη έκφραση του γονιδίου σε όλες τις εφαρμογές του πειράματος εκτός από την εφαρμογή με τον συνδυασμό των βιολογικών παραγόντων σε αμόλυντα φυτά.



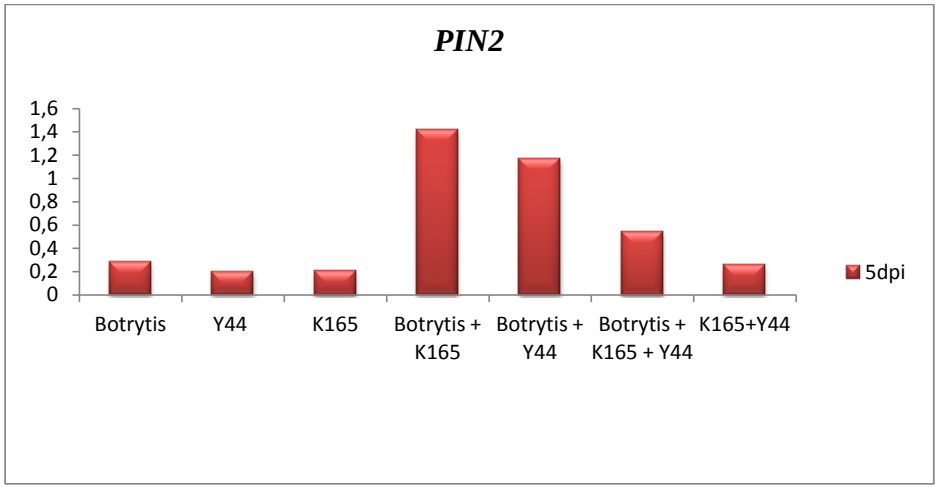

*Γράφημα 20*: Έκφραση του γονιδίου *PR1*, 5 ημέρες ύστερα από την μόλυνση του φυτού με τον παθογόνο μύκητα.

Από το γράφημα 20, διαπιστώνουμε ότι υπάρχει έκφραση του γονιδίου σε όλες τις εφαρμογές του πειράματος. Πολύ έντονη παρόλα αυτά έκφραση του γονιδίου εμφανίζεται στην εφαρμογή με τον συνδυασμό των βιολογικών παραγόντων (K165+Y44) σε μολυσμένα φυτά, στην εφαρμογή με το K165 και τον παθογόνο μύκητα καθώς και στην εφαρμογή με τον βιολογικό παράγοντα Y44 και τον παθογόνο μύκητα.




*Γράφημα 21*: Έκφραση του γονιδίου *PIN2*,2 ημέρες ύστερα από την μόλυνση του φυτού με τον παθογόνο μύκητα.

Παρατηρώντας το γράφημα 21, βλέπουμε ότι υπάρχει έντονη έκφραση του γονιδίου σε όλες τις εφαρμογές του πειράματος εκτός από την εφαρμογή με τον συνδυασμό των βιολογικών παραγόντων σε αμόλυντα φυτά.




*Γράφημα 22*: Έκφραση του γονιδίου *PIN2*, 5 ημέρες ύστερα από την μόλυνση του φυτού με τον παθογόνο μύκητα.

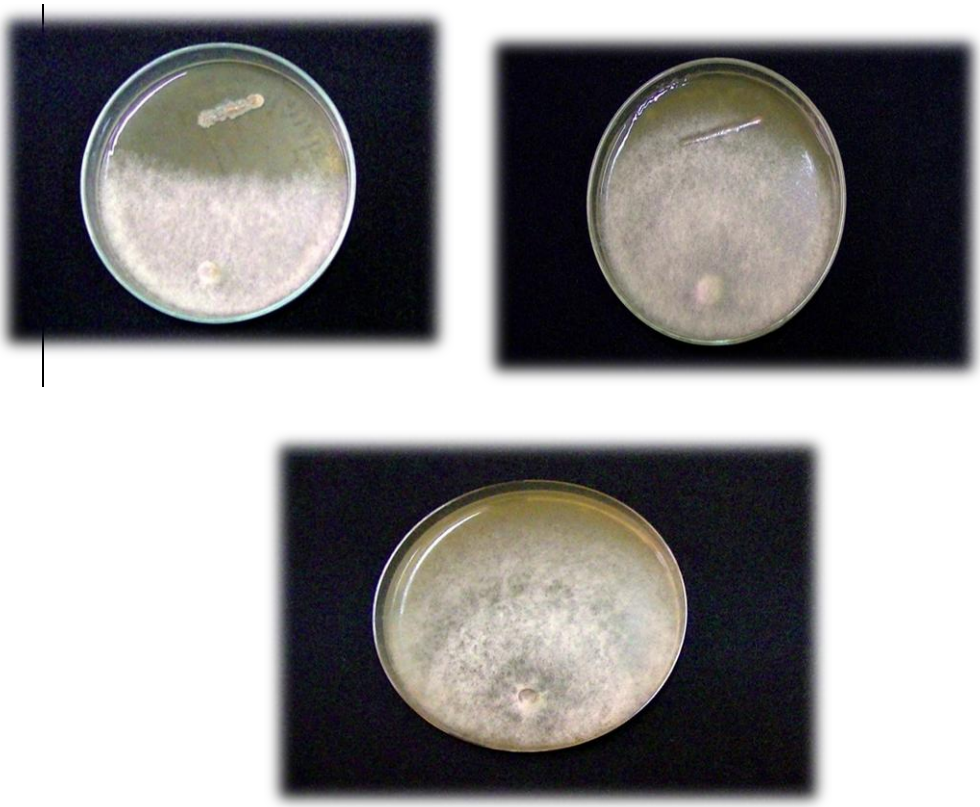
Από το γράφημα 22, διαπιστώνουμε ότι υπάρχει έκφραση του γονιδίου σε όλες τις εφαρμογές του πειράματος. Πολύ έντονη παρόλα αυτά έκφραση του γονιδίου εμφανίζεται στην εφαρμογή με τον συνδυασμό των βιολογικών παραγόντων (K165+Y44) σε μολυσμένα φυτά, στην εφαρμογή με το K165 και τον παθογόνο μύκητα καθώς και στην εφαρμογή με τον βιολογικό παράγοντα Y44 και τον παθογόνο μύκητα.

### 3.5 Πείραμα 5$^{ο}$ – Πείραμα αντιβίωσης

Στο πείραμα αντιβίωσης χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικά υποστρώματα για την ανάπτυξη του μύκητα και των βιολογικών παραγόντων.

Στα τρυβλία όπου αναπτύχθηκε μόνο ο φυτοπαθογόνος μύκητας η ανάπτυξή του ήταν καλή σε όλα τα υπό μελέτη υποστρώματα. Αυτό που ανέκοψε την ανάπτυξη του, δημιουργώντας μια ζώνη παρεμπόδισης ήταν η παρουσία του βιολογικού παράγοντα K165 στο τρυβλίο. Αντίθετα η παρουσία του βιολογικού παράγοντα Y44 στα ίδια τρυβλία με τον μύκητα B. cinerea δεν επηρέασε καθόλου την ανάπτυξη του.

#### 3.5.1 Πείραμα αντιβίωσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα από φύλλα μαρουλιού



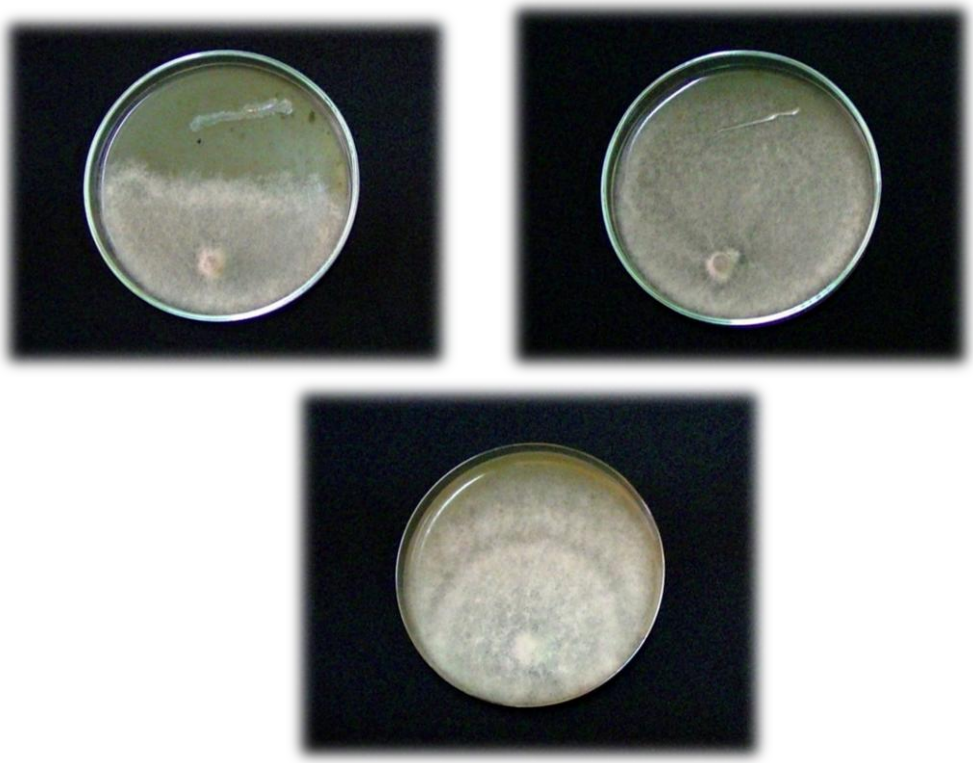
**Μορφοποιήθηκε:** Γραμματοσειρά: (Προεπιλεγμένη) Times New Roman, 12 pt, Πλάγια, Χωρίς υπογράμμιση, Χρώμα γραμματοσειράς: Αυτόματο

*Εικόνα 5$^{η}$ (πάνω αριστερά):* Τρυβλίο μολυσμένο με τον μύκητα *B.cinerea* και εμβολιασμένο με τον βιολογικό παράγοντα *P. alvei* (στέλεχος K165).

*Εικόνα 6η (πάνω δεξιά):* Τρυβλίο μολυσμένο με τον μύκητα *B.cinerea* και εμβολιασμένο με τον βιολογικό παράγοντα *R.glutinis* (Y44).

*Εικόνα 7η (κάτω):* Μάρτυρας. Τρυβλίο μολυσμένο με τον μύκητα *B.cinerea*.

### 3.5.2 Πείραμα αντιβίωσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα από φύλλα τομάτας



*Εικόνα 8η (πάνω αριστερά):*Τρυβλίο μολυσμένο με τον μύκητα B. cinerea και εμβολιασμένο με τον βιολογικό παράγοντα *P. alvei* (στέλεχος K165).

*Εικόνα 9η (πάνω δεξιά):*Τρυβλίο μολυσμένο με τον μύκητα *B.cinerea* και εμβολιασμένο με τον βιολογικό παράγοντα *R.glutinis* (Y44).

*Εικόνα 10η (κάτω):* Μάρτυρας. Τρυβλίο μολυσμένο με τον μύκητα *B.cinerea*.

### 3.5.3 Πείραμα αντιβίωσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα από εκχύλισμα πατάτας (PDA)

*Εικόνα 11η:* Στα αριστερά τρυβλίο μολυσμένο με τον μύκητα *B.cinerea* και εμβολιασμένο με τον βιολογικό παράγοντα *P. alvei* (στέλεχος K165). Στα δεξιά τρυβλίο μολυσμένο με τον μύκητα *B.cinerea* και εμβολιασμένο με τον βιολογικό παράγοντα *R.glutinis* (Y44).

## 4. Συζήτηση αποτελεσμάτων – Συμπεράσματα

Ο όρος της βιολογικής αντιμετώπισης έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορα πεδία της επιστήμης της βιολογίας. Περισσότερο όμως έχουν χρησιμοποιηθεί στις επιστήμες της εντομολογίας και της φυτοπαθολογίας.

Όσον αφορά την εντομολογία ο όρος αναφέρεται στη χρήση αρπακτικών, παράσιτων, εντομοπαθογόνων νηματωδών και άλλων μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση πολλών επιβλαβών για τα φυτά εντόμων. Από την άλλη πλευρά στο πεδίο της φυτοπαθολογίας, αυτοί οι δύο όροι χρησιμοποιούνται για την περιγραφή διαφόρων μικροοργανισμών, ανταγωνιστών συνήθως των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών. Και στο πεδίο της εντομολογίας αλλά και στο πεδίο της φυτοπαθολογίας οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών αναφέρονται σαν βιολογικοί παράγοντες.

Το πιο σύνηθες είναι αυτοί οι μικροοργανισμοί που αναφέρονται σαν βιολογικοί παράγοντες, να αναπτύσσονται στις ρίζες και στην ριζόσφαιρα των φυτών. Η δράση ορισμένων από αυτών των μικροοργανισμών είναι τόσο αποτελεσματική και έντονη που υπάρχει πιθανότητα πλήρους ελέγχου της ασθένειας.

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια έξαρση του ενδιαφέροντος σχετικά με την βιολογική αντιμετώπιση των ασθενειών και των εντόμων που προσβάλουν τα φυτά. Όλη αυτή η έξαρση έχει αποδοθεί σε διάφορους λόγους. Αρχικά στην περιβαλλοντική ευαισθητοποίηση σχετικά με την αλόγιστη χρήση φυτοφαρμάκων που γίνεται τα τελευταία χρόνια. Επίσης η ανθεκτικότητα που έχουν αναπτύξει κάποια φυτοπαθογόνα σε διάφορα φυτοφάρμακα έχει στρέψει ακόμα περισσότερο το ενδιαφέρον στη βιολογική αντιμετώπιση.

Οι προσβολές που προκαλούνται στα μαρούλια και στις τομάτες που αναπτύσσονται σε θερμοκήπια είναι συχνές και σοβαρές από τον μύκητα *B.cinerea*. Άλλες καλλιέργειες οι οποίες προσβάλλονται έντονα από τον συγκεκριμένο μύκητα είναι διάφορα λαχανικά όπως λάχανο, μαρούλι, μπρόκολο, φασόλια και μικρές καλλιέργειες φρούτων όπως σταφύλι, φράουλα, βατόμουρο. Επιπλέον προκαλεί και μετασυλλεκτικές σήψεις σε προσβεβλημένα προϊόντα.

Όσον αφορά τον βιολογικό παράγοντα *P.alvei* K165,διάφορες μελέτες και έρευνες έχουν γίνει πάνω στη χρήση του ενάντια των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Verticillium dahliae, Thielaviopsis basicola, Fusarium oxysporum* για τον βιολογικό παράγοντα *R.glytinis* Y44 ελάχιστες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για τη χρήση του.

Για τον φυτοπαθογόνο μύκητα *B.cinerea* δεν έχει μελετηθεί διεξοδικά η αντιμετώπισή του με χρήση βιολογικών παραγόντων. Έχουν γίνει κάποιες μελέτες για τον βιολογικό έλεγχο του παθογόνου με την χρήση των *Acinetobacter, Bacillus, Pantoea και Pseudomonas spp.*. Οι έρευνες όμως για τη χρήση βιολογικών παραγόντων ενάντια σε διάφορους φυτοπαθογόνους μύκητες συνεχίζονται, δίνοντας

τις περισσότερες φορές αρκετά ενθαρρυντικά αποτελέσματα και για ανάπτυξη νέων μεθόδων αντιμετώπισης.

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει και σε προηγούμενα κεφάλαια στην παρούσα μελέτη έχει μελετηθεί η αποτελεσματικότητα των βιολογικών παραγόντων *P.alvei* K165 και *R. glytinis* Y44, ενάντια του φυτοπαθογόνου μύκητα *B.cinerea* σε φυτά μαρουλιού και τομάτας που φυτεύτηκαν και αναπτύχθηκαν σε θερμοκήπιο.

Ξεκινώντας με το πείραμα που έγινε στα μαρούλια, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η εφαρμογή με τη χρήση του βιολογικού παράγοντα *P.alvei* K165 μόνο του στο φυτό με ριζοπότισμα βοήθησε στη προστασία του φυτού καθώς μείωσε τα συμπτώματα της ασθένειας σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα. Αυτό μπορεί να παρατηρηθεί και στη μέτρηση των συμπτωμάτων που αντικατοπτρίζουν το ποσοστό της ασθένειας καθώς και στη μέτρηση του νωπού βάρους του υπέργειου τμήματος των φυτών. Αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς και μέσα από τις φωτογραφίες τα φυτά που είχαν υποστεί την εφαρμογή με τον βιολογικό παράγοντα ήταν πολύ πιο ζωηρά και υγιή. Άλλες μελέτες και έρευνες που έχουν γίνει για τα αξιολογηθούν τα αποτελέσματα της εφαρμογής του βιολογικού παράγοντα K165 στο χώμα των φυτών ενάντια των παθογόνων μυκήτων *Verticillium dahliae* και *Fusarium oxysporum* έδειξαν προστασία των φυτών κατά των παθογόνων (Angelopoulou et. al., 2014, Charalambous et. al. 2013). Μέσα από αυτές τις μελέτες φαίνεται ότι η χρήση του K165 σαν βιολογικό παράγοντα ίσως είναι μια καλή λύση και στρατηγική σε φυτά τα οποία αρχικά φυτεύονται στο σπορείο και ύστερα μεταφυτεύονται στον αγρό ενάντια σε διάφορα γνωστά και ευρέως διαδεδομένα παθογόνα.

Στις ίδιες μελέτες που αναφέρθηκαν παραπάνω η φυτοπροστατευτική δραστηριότητα του K165 αποδίδεται σε μεγάλο βαθμό στην επαγωγή των μηχανισμών άμυνας των φυτών μέσω του μονοπατιού του σαλικυλικού οξέος. Μέσω της μοριακής ανάλυσης που έγινε αυτό παρατηρείται και στη παρούσα μελέτη καθώς σε όλες τις εφαρμογές που έγινε χρήση του K165 υπήρχε υπερέκφραση του γονιδίου *PR1* το οποίο ενεργοποιείται μέσω του βιοχημικού μονοπατιού του σαλικυλικού οξέος, εν αντιθέσει με την έκφραση των γονιδίων *LOX* και *ERF1* όπου σε όλες τις εφαρμογές που έγιναν με το K165 παρατηρείται υποέκφραση αυτών.

Προχωρώντας στο πείραμα με τα φυτά μαρουλιού, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η εφαρμογή με τη χρήση του βιολογικού παράγοντα *R. glytinis* Y44, μόνο του στα φυτά με ψεκασμό ως απορροής στο υπέργειο τμήμα τους βοήθησε στη προστασία τους καθώς μείωσε τα συμπτώματα της ασθένειας σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα. Η προστασία αυτή παρατηρώντας την ανάπτυξη των προσβεβλημένων φυτών σημειώνεται ύστερα από την $11^{η}$ ημέρα μόλυνσης των φυτών με το παθογόνο. Αυτό μπορεί να παρατηρηθεί και στη μέτρηση των συμπτωμάτων που αντικατοπτρίζουν το ποσοστό της ασθένειας. Μέσα από τις φωτογραφίες των φυτών που είχαν υποστεί την εφαρμογή με τον βιολογικό παράγοντα είναι επίσης ευκρινής η διαφορά στην ανάπτυξη τους σε σχέση με τους θετικούς μάρτυρες.

Λίγες μελέτες και έρευνες έχουν γίνει για τα αξιολογηθούν τα αποτελέσματα της εφαρμογής του βιολογικού παράγοντα Y44 ενάντια σε φυτοπαθογόνους μύκητες. Κυρίως έχει μελετηθεί ενάντια στο μύκητα *B. cinerea* σε φυτά τομάτας, φράουλας, ακτινιδίων και επιτραπέζιων σταφυλιών (Kalogiannis et. al. 2006). Τα αποτελέσματα στις μετρήσεις των συμπτωμάτων ήταν ενθαρρυντικά καθώς η εφαρμογή του βιολογικού παράγοντα στα φυτά μείωσε τα συμπτώματα της ασθένειας.

Μέσω της μοριακής ανάλυσης που έγινε στη παρούσα μελέτη σε όλες τις εφαρμογές με τη χρήση του Y44, δεν παρατηρήθηκε έκφραση σε κανένα από τα γονίδια που επάγουν την άμυνα των φυτών. Αυτό δηλώνει ότι η μείωση του ποσοστού ασθενείας που παρατηρείται, δεν οφείλεται στην επαγωγή των μηχανισμών άμυνας των φυτών μέσω του μονοπατιού του σαλικυλικού οξέος, του ιασμονικού οξέος ή του αιθυλενίου.

Η εφαρμογή με τον συνδυασμό των βιολογικών παραγόντων (K165+Y44), εμφάνισε τα μικρότερα ποσοστά ασθένειας στο μαρούλι. Αυτό αποδεικνύεται και επιβεβαιώνεται και από τις μετρήσεις νωπού βάρους του υπέργειου τμήματος των φυτών. Η εφαρμογή του K165 στη ρίζα και του Y44 στο υπέργειο τμήμα του φυτού βοηθά στη μείωση της εμφάνισης των συμπτωμάτων της προσβολής.

Η μοριακή ανάλυση των φυτών που είχαν δεχθεί την εφαρμογή του συνδυασμού των βιολογικών παραγόντων εμφάνισε υπερέκφραση του γονιδίου *PR1* το οποίο ενεργοποιείται μέσω του βιοχημικού μονοπατιού του σαλικυλικού οξέος. Σε αυτό ίσως να ευθύνεται η παρουσία του K165 καθώς η φυτοπροστατευτική του δραστηριότητα αποδίδεται σε μεγάλο βαθμό στην επαγωγή των μηχανισμών άμυνας των φυτών μέσω του μονοπατιού του σαλικυλικού οξέος όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω. Ωστόσο μια ελάχιστη έκφραση των γονιδίων *LOX* και *ERF* εμφανίζεται αλλά κρίνεται αμελητέα σε σχέση με την έκφραση του *PR1*.

Συνεχίζοντας στο πείραμα που έγινε στα φυτά της τομάτας η εφαρμογή του βιολογικού παράγοντα K165 στις ρίζες των φυτών δεν έδειξε να βοηθά στη μείωση των συμπτωμάτων της ασθένειας καθώς τα ποσοστά της ασθένειας σε όλα τα φυτά ήταν ίδια με τον θετικό μάρτυρα.

Η μοριακή ανάλυση των φυτών για την εξέταση της έκφρασης των γονιδίων που επάγουν την άμυνα, έδειξε για το γονίδιο *PR1* ότι ενώ υπάρχει έκφραση του τη $2^{η}$ ημέρα της μόλυνσης των φυτών, την $5^{η}$ ημέρα η έκφρασή του μειώνεται κατά πολύ. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και με το γονίδιο *PIN2* καθώς ενώ υπάρχει μικρή έκφραση αυτού τη $2^{η}$ ημέρα της μόλυνσης των φυτών, την $5^{η}$ ημέρα η έκφραση του μειώνεται. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί διότι η εφαρμογή του βιολογικού παράγοντα δεν έδειξε καμία μείωση του ποσοστού ασθενείας. Οπότε δεν επάγει την άμυνα των φυτών μέσω των μηχανισμών άμυνας που εκφράζονται μέσω του σαλικυλικού οξέος ή του αιθυλενίου.

Σε αντίθεση με το K165, η εφαρμογή του βιολογικού παράγοντα Y44 στο υπέργειο τμήμα των φυτών της τομάτας βοήθησε στη μείωση του ποσοστού της

ασθένειας. Σε άλλες μελέτες που έχουν γίνει έχει παρατηρηθεί η προστασία που προσφέρει σε φυτά τομάτας που μεγαλώνουν σε θερμοκηπιακές εγκαταστάσεις, ενάντια στο φυτοπαθογόνο μύκητα *B. cinerea*, καθώς η εφαρμογή του είχε και πάλι βοηθήσει στη μείωση της εμφάνισης των συμπτωμάτων της ασθένειας (Kalogiannis et. al. 2006).

Στη μοριακή ανάλυση ωστόσο, όσον αφορά το *PR1* εμφανίζεται και πάλι το ίδιο φαινόμενο όπως και στην εφαρμογή με το K165. Δηλαδή ενώ υπάρχει έκφραση του γονιδίου τη 2η μέρα της μόλυνσης, ύστερα η έκφραση του μειώνεται. Κάτι τέτοιο όμως δεν παρατηρείται στην έκφραση του *PIN2* αφού εμφανίζεται υπερέκφραση αυτού τη 5η ημέρα της μόλυνσης. Μέσω αυτού μπορούμε να πούμε ότι η εφαρμογή του Y44 στα φυτά της τομάτας επάγει την άμυνα των φυτών μέσω του μονοπατιού του αιθυλενίου.

Ο συνδυασμός τον βιολογικών παραγόντων (K165+Y44) βοηθά και μειώνει την εμφάνιση των συμπτωμάτων και του ποσοστού της ασθένειας. Αυτό ίσως αποδίδεται στη παρουσία του Y44 στην εφαρμογή.

Το φαινόμενο της πιο έντονης έκφρασης των γονιδίων που επάγουν την άμυνα των φυτών την 2η ημέρα της μόλυνσης και στη συνέχεια την μείωσης της έκφρασης τους την 5η ημέρα εμφανίζεται και σε αυτή την εφαρμογή. Πιο έντονη αυτή τη φόρα είναι η έκφραση του *PR1*. Δεν μπορούμε όμως να ισχυριστούμε ότι η προστασία που προσφέρεται από την εφαρμογή του συνδυασμού των βιολογικών παραγόντων επάγεται λόγο της έκφρασης του γονιδίου λόγο αυτής της μείωσης της έκφρασης του με την πάροδο του χρόνου.

Όσον αφορά τα in vitro πειράματα, οι μελέτες που έγιναν και στα τρία διαφορετικά υποστρώματα που ήταν υπό εξέταση έδειξαν ότι ο βιολογικός παράγοντας K165 αναστέλλει την ανάπτυξη του μύκητα *B. cinerea* στα τρυβλία.. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες όπως στην παραγωγή αντιβιοτικών μορίων από το βακτήριο, άλλων βιολογικά δραστικών μορίων ή στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών ουσιών που παράγει ο μύκητας με αντιβιοτική δράση. Ίδιου τύπου πειράματα σε εργαστήρια έχουν πραγματοποιηθεί για να εξετάσουν την ανασταλτική δράση του βάκτηρίου κατά διάφορων άλλων φυτοπαθογόνων μυκήτων όπως π.χ. του *T.basicola* και του *F.oxysporum* (Schoina et. al., 2010). Τα αποτελέσματα σε αυτά τα πειράματα έδειξαν ότι η ανάπτυξη των παθογόνων αναστέλλεται πλήρως και δημιουργείται μια ζώνη παρεμπόδισης γύρω από το K165. Μέσω αυτού γίνεται αντιληπτό ότι ο βιολογικός παράγοντας K165 εκκρίνει δευτερογενείς μεταβολίτες στο μέσο ανάπτυξης με αντιμυκητιακή δράση.

Συνεχίζοντας στα in vitro πειράματα, οι μελέτες που έγιναν και στα τρία διαφορετικά υποστρώματα που ήταν υπό εξέταση έδειξαν ότι ο βιολογικός παράγοντας Y44 δεν αναστέλλει την ανάπτυξη του μύκητα *B. cinerea* στα τρυβλία.. Δεν δημιουργείται καμία ζώνη παρεμπόδισης γύρω από τον βιολογικό παράγοντα και ο μύκητας αναπτύσσεται κανονικά στο τρυβλίο. Μέσω αυτού γίνεται αντιληπτό ότι δεν παράγει

αντιβιοτικά μόρια ενάντια του παθογόνου, ούτε εκκρίνει δευτερογενείς μεταβολίτες με αντιμυκητιακή δράση για την αναστολή της ανάπτυξης του.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης επισημαίνουν τη φυτοπροστατευτική δραστηριότητα των K165 και Y44 όταν εφαρμόζονται μόνα τους πάνω στο φυτό, καθώς και όταν εφαρμόζεται συνδυασμός αυτών. Η κατασταλτική τους δράση μπορεί να αποδοθεί είτε σε ανταγωνισμό για θρεπτικά στοιχεία και χώρο στην φυλλική επιφάνεια, είτε στην ενεργοποίηση της επαγόμενης διασυστηματικής αντοχής εναντίον του μύκητα *B. cinerea*. Ωστόσο απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να επιβεβαιωθούν όλες οι παραπάνω παρατηρήσεις και να δημιουργηθούν νέες προοπτικές στην έρευνα για την χρήση βιολογικών παραγόντων στη σύγχρονη γεωργία.

## ***Βιβλιογραφία***

**Agrios GN, 2005,** Plant Pathology 5thedn. Elsevier. New York

**Angelopoulou D. J., E. Naska, E. Paplomatas, S. Tjamos, 2014.** Biological control agents (BCAs) of verticillium wlt: influence of application rates and delivery method on plant protection, triggering of host defence mechanisms and rhizosphere populations of BCAs. Plant Pathology 63, 926-47

**Antonopoulos F. D., Sotirios E. Tjamos, Polymnia P. Antoniou, Panagiotis Rafeletos, Eleftherios C. Tjamos (2007),** Effect of Paenibacillus alvei, strain K165, on the germination of Verticillium dahlia microsclerotia in planta, Elsevier, Athens

**Block A, Schmelz E, O'Donnell PJ, Jones JB, Klee HJ. (2005),** Systemic acquired tolerance to virulent bacterial pathogens in tomato. Plant Physiol 138:1481–1490

**Charalambous A., S. E. Tjamos, E. Domazakis, E. J. Paplomatas, 2013,** Incorporation into the transplant soil plug of the plant protective agent Paenibacillus alvei strain K165 confers protection to melon against Fusarium wilt, BioControl (2013) 58:685–692

**John G. Turner, Christine Ellis, and Alessandra Devoto, 2002,** The Jasmonate Signal Pathway, The Plant Cell, Supplement 2002, American Society of Plant Biologists

**Herman MAB, Davidson JK, Smart CD. (2008)** Induction of plant defense gene expression by plant activators and Pseudomonas syringe epv. tomato in greenhouse-grown tomatoes. Phytopathology 98:1226–1232.

**Kalogiannis S., S. E. Tjamos, A. Stergiou, P. P. Antoniou, B. N. Ziogas and E. C. Tjamos, 2006**, Selection and evaluation of phyllosphere yeasts as biocontrol agents against grey mould of tomato, European Journal of Plant Pathology 116:69–76

**Kunkel Bn, Brooks DM, 2002,** Cross talk between signaling pathways in pathogen defense, CurrOpin Plant Biology 5

**Laurent Philippot, Jos M. Raaijmakers, Philippe Lemanceau and Wim H. van der Putten, 2013,** Nature Reviews Microbiology

**Lynch J, 1990,**The rhizosphere, Wiley, London, UK

**Murray Grant and Chris Lamb, 2006,** Systemic immunity. Current Opinion in Plant Biology Volume 9,Issue 4, August 2006

**P.D Sharma, 2004,** Plant Pathology. Published 2006 by Alpha Science International, Ltd (first published 2004)

**Peng G., J.C. Sutton, 2009,** Evaluation of microorganisms for biocontrol of Botrytis cinerea in strawberry, Canadian Journal of Plant Pathology, 13:3, 247-257

**Peter Jeffries, 2002,** The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. Department of biosciences, The university of kent, Canterbury, UK

**Schoina C., Ioannis A. Stringlis, Iakovos S. Pantelides, Sotirios E. Tjamos, Epaminondas J. Paplomatas, 2010**, Evaluation of application methods and biocontrol efficacy of Paenibacillus alvei strain K-165, against the cotton black root rot pathogen Thielaviopsis basicola, Elsevier, Athens

**Thomma B, Pennincks I, Broekaert WF, Cammue BPA, 2001**, The complexity of disease signaling in Arabidopsis, Curr Opinion Immunol

**Trotel-Aziz P., Michel Couderchet, Sylvie Biagianti, Aziz Aziz, 2007**, Characterization of new bacterial biocontrol agents Acinetobacter, Bacillus, Pantoea and Pseudomonas spp. Mediating grapevine resistance against Botrytis cinerea, Elsevier, France

**Tjamos E. S., E. Flemetakis, E. J. Paplomatas, and P. Katinakis, 2004,** Induction of Resistance to Verticillium dahlia in Arabidopsis thalianaby the Biocontrol Agent K-165 and Pathogenesis-Related Proteins Gene Expression, MPMI Vol. 18, No. 6, pp. 555–561

**Uwe-Conrath, 2006,** Systemic Aquired Resistance. Department of Plant Pathology, RWTH Aachen University, 52056 Aachen, Germany

**Williamson B., B Tudzynski, P. Tudzynski and J. A. L. Van Kan, 2007,** Botrytis cinerea: the cause of grey mould disease, Molecular Plant Pathology (2007) 8(5), 561–580

**Λυκουρέσης Π. Διονύσης, 1995**, Εργαστήριο γεωργικής ζωολογίας και εντομολογίας. Ολοκληρωμένη αντιμετώπιση εντόμων – εχθρών καλλιεργειών (πανεπιστημιακές παραδόσεις), Αθήνα. Σελ 67

**Μεπμπακίτη Ασκληπία, 2010,** Οι μικροοργανισμοί στη βιολογική καταπολέμηση εχθρών & ασθενειών των ανθοκηπευτικών, Πτυχιακή μελέτη, Ανώτατο Τεχνολογικό ίδρυμα Καλαμάτας, Καλαμάτα Σελ. 6, 7, 23

**Ολύμπιος Χρίστος, 2015**, Η τεχνική της Καλλιέργειας των Υπαίθριων Κηπευτικών, Εκδόσεις ΑΘ. Σταμούλης, Αθήνα

**Τζάμος Ε., 2007**, Φυτοπαθολογία, Εκδόσεις ΑΘ. Σταμούλης, Αθήνα