



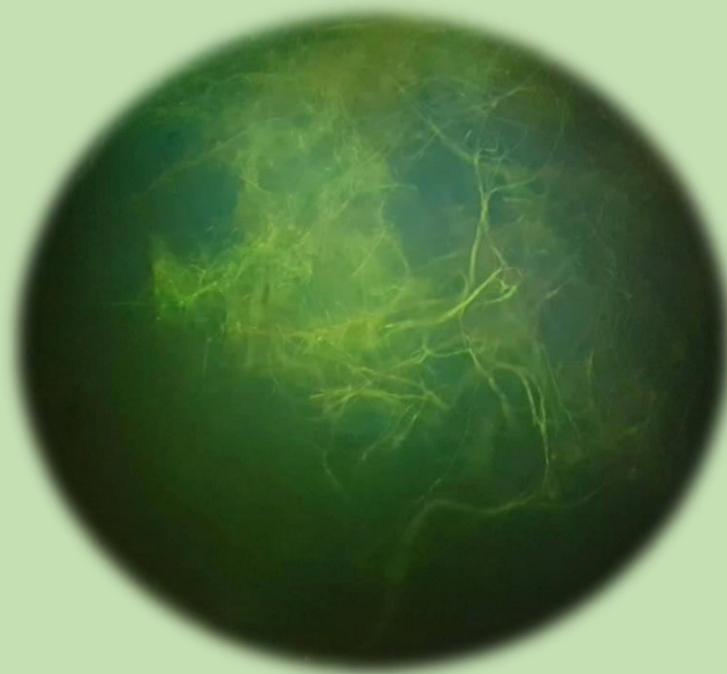
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
Π.Μ.Σ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ & ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΙΚΗΣ
ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Μεταπτυχιακή διατριβή

Βιολογική αντιμετώπιση του μύκητα *Verticillium dahliae* σε φυτά
τομάτας με το μη παθογόνο στέλεχος *Fusarium oxysporum* F2

Αθηνά Ανδριάνα Β. Παταπατίου



Επιβλέπων καθηγητής:

Επαμεινώνδας Παπλωματάς, Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ

2019

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακή διατριβή

Βιολογική αντιμετώπιση του μύκητα *Verticillium dahliae* σε
φυτά τομάτας με το μη παθογόνο στέλεχος *Fusarium*
oxysporum F2

“Biological control of the fungi *Verticillium dahliae* on tomato
plants by the non-pathogenic strain *Fusarium oxysporum* F2”

Αθηνά Ανδριάννα Β. Παταπατίου

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Επαμεινώνδας Παπλωματάς, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Σωτήρης Τζάμος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Αλίκη Τζίμα, Λέκτορας ΓΠΑ

Βιολογική αντιμετώπιση του μύκητα *Verticillium dahliae* σε φυτά τομάτας με το μη παθογόνο στέλεχος *Fusarium oxysporum* F2.

Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής

Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας

Περίληψη

Η ασθένεια βερτισιλλίωση που προκαλείται από τον εδαφογενή μύκητα *Verticillium dahliae*, είναι ιδιαίτερα καταστρεπτική εξαιτίας της ικανότητας του να προσβάλλει τους αγγειώδεις ιστούς των φυτών και να επιβιώνει στο έδαφος για μεγάλα χρονικά διαστήματα μέσω διαχειμάζουσων μορφών που λέγονται μικροσκληρώτια. Επί του παρόντος, δεν υπάρχουν χημικά μέσα για τον έλεγχο της ασθένειας. Ο μόνος τρόπος αντιμετώπισης, είναι η εφαρμογή καλλιεργητικών μέτρων. Για αυτό το λόγο, το ενδιαφέρον για την βιολογική αντιμετώπιση, αυξάνεται όλο και περισσότερο.

Στην εργασία αυτή, εφαρμόστηκε ως βιολογικός παράγοντας το μη παθογόνο στέλεχος *Fusarium oxysporum* F2 σε φυτά τομάτας που προσβλήθηκαν από το βερτισιλίλιο στο θερμοκήπιο. Η εφαρμογή του F2 στα φυτά έγινε σε όλες τις επεμβάσεις προληπτικά, δηλαδή πριν την μόλυνση των φυτών με τον *V. dahliae*. Το στέλεχος εφαρμόστηκε με ριζοπότισμα αιωρήματος κονιδίων και με δύο διαφορετικά υλικά επικάλυψης σπόρων, αλγινικό νάτριο (sodiumalginate) και ταλκ. Η μόλυνση των φυτών με το παθογόνο έγινε σε όλες τις επεμβάσεις με ριζοπότισμα αιωρήματος κονιδίων. Περίπου 7-10 ημέρες μετά την μόλυνση των φυτών, γινόταν καταγραφή των συμπτωμάτων στα φύλλα των ασθενών φυτών. Επίσης, κατά το τέλος των πειραμάτων, καταγράφονταν το ύψος και το νωπό βάρος των φυτών.

Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων φάνηκε πως σε όλες τις επεμβάσεις με το F2, η παρουσία του είχε είτε μειώσει τα συμπτώματα της βερτισιλλίωσης είτε ενισχύσει την ανάπτυξη του φυτού όσον αφορά το ύψος και το βάρος τους. Επιπλέον, τα αποτελέσματα των μετρήσεων από τις επεμβάσεις που χρησιμοποιήθηκαν τα υλικά επικάλυψης των σπόρων ήταν τα πιο θετικά, ανεξάρτητα από την παρουσία του F2. Πιο συγκεκριμένα, στην επέμβαση με το αλγινικό νάτριο και το F2 επετεύχθει ο καλύτερος έλεγχος της βερτισιλλίωσης.

Επιστημονική περιοχή: Φυτοπροστασία

Λέξεις κλειδιά: τομάτα, *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum* F2, βιολογική αντιμετώπιση, μύκητας, μη παθογόνο στέλεχος, επικάλυψη σπόρων.

Biological control of the fungi *Verticillium dahliae* on tomato plants by the non-pathogenic strain *Fusarium oxysporum* F2.

Faculty of Crop Science
Phytopathology laboratory

Abstract

Verticillium wilt caused by the soil fungus *Verticillium dahliae* is particularly devastating due to its ability to attack the vascular tissues of plants and to survive on the ground for long periods of time through dormant survival structures called microsclerotia. At present, there are no chemicals to control the disease. The only way to deal with it is to implement cultivation measures. For this reason, the interest in biological treatment is growing more and more.

In this study, the non-pathogenic strain *Fusarium oxysporum* F2 was applied as a biological agent to tomato plants infected by *V. dahliae* at the greenhouse. The application of F2 to the plants was carried out in all the interventions preventively, ie prior to the infection of the plants with *V. dahliae*. The strain was applied by root irrigation with conidial suspension and two different seed coating materials, sodium alginate and talc. The infection of the plants with the pathogen was done in all operations by root irrigation with conidial suspension. About 7-10 days after the infection of the plants, the symptoms of the leaves of the diseased plants were recorded. Also, at the end of the experiments, the height and the fresh weight of the plants were also recorded.

From the results of the measurements it appeared that in all interventions with F2, its presence had either reduced the symptoms of *Verticillium* wilt or enhanced the growth of the plant in terms of height and weight. In addition, the results of the measurements of the used seed coatings materials were the most positive, regardless of the presence of F2. In particular, the treatment with sodium alginate and F2 achieved the best control of *Verticillium* wilt.

Scientific area: Plant protection

Key words: tomato, *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum* F2, biological control, fungi, non-pathogenic strain, seed coating.

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον Καθηγητή κο. Επαμεινώνδα Παπλωματά για την επίβλεψη και την καθοδήγηση της μεταπτυχιακής εργασίας μου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κο. Σωτήρη Τζάμο για την καθοδήγηση που μου πρόσφερε από την αρχή έως την ολοκλήρωση της εργασίας. Ακόμα, ευχαριστώ τους φοιτητές και το προσωπικό του εργαστηρίου φυτοπαθολογίας για την πολύτιμη βοήθεια τους. Ιδιαίτερες ευχαριστίες, θα ήθελα να απευθύνω στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Ειρήνη Καραναστάση που χάρη σε εκείνη επέλεξα το μεταπτυχιακό αυτό.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση και την αγάπη τους.

Η εργασία αυτή είναι προς τιμήν και εις μνήμην του πατέρα μου
Βύρωνα Παταπατίου.

8 Ιουλίου 2019

Περιεχόμενα

Εισαγωγή.....	7
1.1 Οι φυτοπαθογόνοι μύκητες.....	7
1.2 Ο μύκητας <i>Verticillium dahliae</i>	8
1.2.1 Ταξινόμική κατάταξη.....	8
1.2.2 Βιολογικός κύκλος.....	9
1.2.3 Συμπτωματολογία.....	13
1.2.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την παθογένεια του <i>V.dahliae</i>	16
1.2.5 Επιδημιολογία.....	17
1.2.6 Αντιμετώπιση.....	18
1.3 Το μη παθογόνο στέλεχος <i>Fusarium oxysporum</i> F2 ως βιολογικός παράγοντας...	25
Σκοπός της εργασίας.....	28
2 Υλικά & Μέθοδοι.....	29
2.1 Προετοιμασία μικροοργανισμών.....	29
2.2 Πειράματα παθογένειας.....	32
2.3 Ποσοτικοποίηση της ενδοφυτικής παρουσίας του <i>V. dahliae</i> στα μολυσμένα φυτά τομάτας.....	38
2.4 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	41
3 Αποτελέσματα.....	43
3.1 Πείραμα παθογένειας 1 ^ο	43
3.2 Πείραμα παθογένειας 2 ^ο	44
3.3 Πείραμα παθογένειας 3 ^ο	47
3.4 Μετρήσεις νωπού βάρους και ύψους των φυτών.....	48
4 Συμπεράσματα & Συζήτηση.....	55
Βιβλιογραφία.....	58
Ξενόγλωσση.....	58
Ελληνική.....	61
Διαδικτυακή.....	62

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Οι φυτοπαθογόνοι μύκητες

Από τα αρχαία χρόνια, έχει διαπιστωθεί το φαινόμενο των ασθενειών των φυτών. Οι πρώτες αναφορές έγιναν από Έλληνες φιλόσοφους και φυσικούς επιστήμονες. Τα αίτια όμως αυτών των ασθενειών, ξεκίνησαν να αποκαλύπτονται μετά την εφεύρεση του πρώτου μικροσκοπίου, το 1675 από τον Ολλανδό Leeuwenhoek. Έκτοτε, έχουν καταγραφεί διάφορες μυκητολογικές ασθένειες των φυτών που εξελίχθηκαν σε επιδημίες και κατά συνέπεια επηρέασαν ουσιαστικά τις ανθρώπινες κοινωνίες. Παραδείγματα αποτελούν, η πρόκληση θανάτων στην Ιρλανδία το 1845-1846 από τον λιμό που προκάλεσε ο ωομύκητας *Phytophthora infestans*, καθώς και ο λιμός στην Ινδία και στο Μπανγκλαντές το 1943 που προκάλεσε ο μύκητας *Helminthosporium oryzae*.

Οι επιδράσεις των φυτοπαθογόνων μυκήτων είναι πολύ σημαντικές για την φυτική παραγωγή και την αγροτική οικονομία. Στην σύγχρονη εποχή, οι ερευνητές της φυτοπροστασίας έχουν αναπτύξει μία σειρά μεθόδων για την αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων μυκήτων όπως, η παραγωγή με ανθεκτικές ποικιλίες και η χρήση αντιμυκητιακών χημικών. Η χημική φυτοπροστασία όμως, παρότι έχει κατασταθεί ως ένα απαραίτητο μέτρο για την εξασφάλιση μιας ποιοτικής και ποσοτικής παραγωγής, παράλληλα έχει αυξήσει το κόστος καλλιέργειας, ενώ ολοκληρωμένη προστασία δεν παρέχεται. Η αναποτελεσματικότητα αυτή μπορεί να οφείλεται, σε λανθασμένη χρήση του φυτοπροστατευτικού προϊόντος, εκθέτοντας τον φυτοπαθογόνο μύκητα σε ακατάλληλες ποσότητες χημικού και προκαλώντας την αναπαραγωγή ανθεκτικών μυκητιακών στελεχών, σε λανθασμένη διάγνωση, καθώς πολλές ασθένειες έχουν παρόμοια συμπτώματα και σε διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Μερικά είδη φυτοπαθογόνων μυκήτων μεγάλης οικονομικής σημασίας είναι, ο *Phytophthora infestans* (ο περονόσπορος της πατάτας), ο *Verticillium dahliae* (η βερτισιλλίωση της ελιάς), ο *Plasmopara viticola* (ο περονόσπορος της αμπέλου), ο *Erysiphe necator* (το ωίδιο της αμπέλου) και ο *Phoma tracheiphila* (η κορυφοξήρα των εσπεριδοειδών). Στην ακόλουθη ενότητα, γίνεται αναλυτική περιγραφή του φυτοπαθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae* που επιλέχθηκε για το επιστημονικό πείραμα.

1.2 Ο μύκητας *Verticillium dahliae*

1.2.1 Ταξινόμική κατάταξη

Το γένος *Verticillium* εισήχθηκε το 1816 από τον Nees von Esenbeck, για την περιγραφή ενός σαπροφυτικού είδους, το *V.tenerum* (Green, 1981). Το όνομα του γένους, περιγράφει την ακτινωτή διάταξη των φιαλιδίων στους κονιδιοφορείς, καθώς στα λατινικά *Verticillus* σημαίνει σφόνδυλος (Εικόνα 1.1). Στις θέσεις των εγκάρσιων χωρισμάτων που έχουν οι κονιδιοφορείς, σχηματίζονται περίπου 3-4 πλάγια, κοντά, μονοκύτταρα φιαλίδια, στην κορυφή των οποίων παράγονται διαδοχικά κονίδια (Τζάμος, 2005).



Εικόνα 1-1 Διάταξη κονιδιοφόρων του είδους *V.dahliae*.

(Πηγή: <http://repository.library.teimes.gr>)

Αργότερα, το γένος *Verticillium* εμπλουτίστηκε με περίπου 190 είδη, τα οποία είχαν ακτινωτά φιαλίδια, μονοκύτταρα κονίδια και δεν εμφάνιζαν εγγενή αναπαραγωγή. Αρχικά, η κατάταξη των ειδών πραγματοποιήθηκε με βάση τα γενικά μορφολογικά χαρακτηριστικά, με αποτέλεσμα το γένος να θεωρείται εξαιρετικά ετερογενές και πολυφυλετικό, καθώς περιελάμβανε είδη που παρασιτούσαν φυτά, έντομα, μύκητες και νηματώδεις, ενώ κάποια είδη ήταν και σαπρόφυτα. Για αυτόν τον λόγο, η κατάταξη των ειδών αναθεωρήθηκε βάσει μορφολογικών και μοριακών δεδομένων (Zare, 2001). Στον κλάδο της φυτοπαθολογίας κατατάχθηκαν, κατά κύριο λόγο, έξι φυτοπαθογόνα είδη αδρομυκώσεων: *V.dahliae*, *V.albo-atrum*, *V. nigrescens*, *V.nubilum*, *V. Tricorpus* και *V. theobromae*. Μεταξύ αυτών, πιο σημαντικά θεωρούνται τα είδη *V.dahliae* και *V. albo-atrum*, επειδή προσβάλλουν μεγάλο εύρος καλλιεργούμενων και καλλωπιστικών φυτών, κυρίως σε εύκρατες και ψυχρές περιοχές (Barbara and Clewes, 2003). Τα είδη αυτά, απαντώνται στο έδαφος (εδαφογενή), εξαπλώνονται μέσω του αγγειακού συστήματος στο φυτό και προκαλούν το μαρασμό του. Η μόλυνση μπορεί να οδηγήσει σε πλήρη αποφύλλωση, σταδιακή μάρανση και νέκρωση διαδοχικών βραχιόνων ή αιφνίδια κατάρρευση και νέκρωση ολόκληρων των φυτών (Agrios, 2005).

Το είδος *V.dahliae* μπορεί να διαχωριστεί με βάση τον σχηματισμό των μικροσκληρωτίων (Klebahn 1913), ενώ το *V. albo-atrum* σχηματίζει μελανό ή μαύρο

μυκήλιο διατήρησης (DRM: dark resting mycelium) με παχιά τοιχώματα (Green 1981, Reinke and Berthold 1879).

Ο μύκητας *V.dahliae* έχει παγκόσμια εξάπλωση, ενώ έχει διαπιστωθεί ότι προσβάλλει πάνω από 300 είδη φυτών, ανάμεσα στα οποία είναι και φυτά αγροτικής σημασίας (Melouk, 1992). Η ανάπτυξη του μύκητα ευνοείται από σχετικά υψηλές θερμοκρασίες που κυμαίνονται μεταξύ 25-28 °C, για αυτό οι ασθένειες που προκαλεί σε θερμότερες περιοχές θεωρούνται πιο σοβαρές (Agiros, 2005).

1.2.2 Βιολογικός κύκλος

Η ασθένεια που προκαλεί ο μύκητας *V. dahliae* είναι μονοκυκλική, δηλαδή ο κύκλος της ασθένειας που περιλαμβάνει την διάπαυση, την παρασιτική και σαπροφυτική φάση, ολοκληρώνεται μέσα σε μία καλλιεργητική περίοδο (Fradin and Thomma, 2006).

Κατά την περίοδο διάπαυσης, ο μύκητας διαχειμάζει με την μορφή μικροσκληρωτίων (Εικόνα 1.2), τα οποία παραμένουν σε λήθαργο μέσω της λειτουργίας που ονομάζεται μυκόσταση (mycostasis). Τα μικροσκληρώτια εμφανίζονται ως σημεία του παθογόνου μέσα ή πάνω σε αποδιοργανωμένες ή σε σηπόμενες επιφάνειες του φυτού ξενιστή. Είναι σκληρές μυκηλιακές κατασκευές που



Εικόνα 1-2 Σχηματισμός μικροσκληρωτίων του μύκητα *V.dahliae* στο ξύλωμα του φυτού ξενιστή.

(Πηγή: <https://www.APS.net.org>)

προέρχονται από συμπαγείς συναθροίσεις και διαπλοκές μικρού αριθμού υφών. Εξωτερικά, φέρουν το λεγόμενο ψευδοπαρέγχυμα, ψευδοϊστός που χαρακτηρίζεται από στενή διαπλοκή μεταξύ των υφών, ενώ εσωτερικά φέρουν το προσέγγυμα, ψευδοϊστός που χαρακτηρίζεται από χαλαρή σύνδεση των υφών. Τα μικροσκληρώτια του *V.dahliae* έχουν διαστάσεις 20-100μm και είναι σκούρου έως μαύρου χρώματος. Ο ρόλος των μικροσκληρωτίων είναι η διαίωνιση και η διατήρηση του παθογόνου (Τζάμος, 2007). Ο *V. dahliae* μπορεί να επιβιώσει στο έδαφος μέσω αυτών, για πολύ μεγάλα χρονικά διαστήματα. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί πως ο μύκητας μπορεί να επιβιώσει σε αυτά για πάνω από 14 έτη, ακόμα και με την απουσία ξενιστή. Καθώς τα μικροσκληρώτια έχουν σημαντικότερο ρόλο στον κύκλο της ασθένειας του μύκητα,

λαμβάνονται υπόψη ως στόχοι-κλειδί για την καταπολέμηση του μύκητα (Cheng et al., 2017).

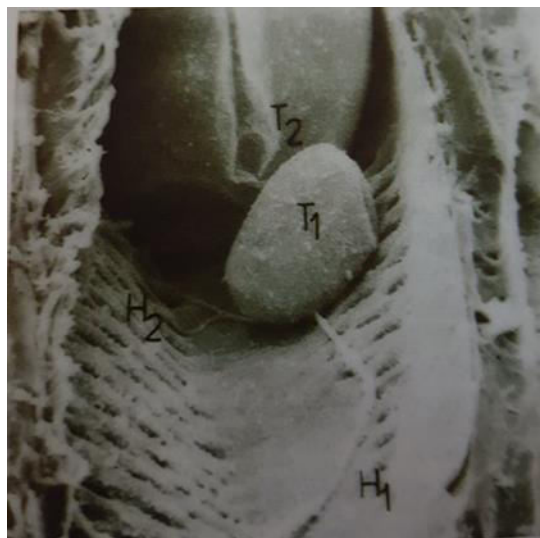
Τα μικροσκληρώτια συγκεντρώνονται στα πρώτα 10εκ. από την επιφάνεια του εδάφους, ενώ ο πληθυσμός τους έχει σχεδόν εκμηδενισθεί ως τα 40εκ. Κατά την παραμονή τους στο έδαφος δεν παρατηρείται εκβλάστηση, και αυτό λόγω μυκοστατικών παραγόντων όπως είναι, η έλλειψη θρεπτικών στοιχείων και η παρουσία ανασταλτικών παραμέτρων. Η μυκοστατική φάση, όπου βρίσκονται, εξουδετερώνεται με την έκκριση ουσιών από τις ρίζες φυτού ξενιστή ή μη ξενιστή, γεγονός που δείχνει ότι οι εκκρίσεις αυτές δεν παρουσιάζουν εξειδίκευση (Olsson and Nordbring-Hertz, 1985). Παρ'όλα αυτά, βρέθηκε ότι μικροσκληρώτια και κονίδια του μύκητα *V.dahliae* βλάστησαν σε μεγαλύτερο ποσοστό από τις εκκρίσεις των ριζών φυτού τομάτας παρά σιταριού, το οποίο αποδόθηκε στη συγκέντρωση των εκκρίσεων σε διάφορες ουσίες (Schnathorst, 1981). Οι εκκρίσεις των ριζών μπορούν να επιδράσουν σε περιορισμένη απόσταση την βλάστηση των υφών. Συγκεκριμένα, στον μύκητα *V. dahliae*, τα μικροσκληρώτια δεν πρέπει να είναι σε μεγαλύτερη απόσταση από 300μm, ώστε οι βλαστανούσες υφές να μπορούν να μολύνουν τις ρίζες των ξενιστών (Fradin and Thomma, 2006).

Κατά την περίοδο του παρασιτισμού, ο μύκητας μολύνει τα ευπαθή φυτά είτε από το ακρορίζιο είτε από το σημείο του σχηματισμού των πλευρικών ριζών. Η είσοδος του μύκητα στους ιστούς του ξύλου, επιτυγχάνεται διά μέσω της ενδοδερμίδα. Η ενδοδερμίδα, λειτουργεί σαν φυσικός φραγμός σε μία επικείμενη προσβολή. Ο μύκητας μπορεί να την διαπεράσει είτε στην περίπτωση που έχει τραυματιστεί (π.χ. από την δράση νηματωδών) είτε όταν δεν έχει αναπτυχθεί πλήρως (Schnathorst, 1981).

Αφού καταφέρει να ξεπεράσει την ενδοδερμίδα, οι υφές του μύκητα εισέρχονται στα αγγεία του ξύλου και παράγουν υαλώδη κονίδια από απλούς κονιδιοφόρους ή με διάσχιση (budding). Τα κονίδια αυτά, μεταφέρονται με το ανοδικό ρεύμα του αγγειακού υγρού και παγιδεύονται σε θέσεις στο τέλος των αγγείων (trapping sites). Η φράξη αυτή των αγγείων, οδηγεί στην διόγκωση και στο κλείσιμο τους, παρεμποδίζοντας τη κυκλοφορία του νερού και καταλήγοντας στον μαρασμό του φυτού. Επίσης, αναφέρεται ότι προβλήματα στην μετακίνηση των στοιχείων μέσω των αγγείων δημιουργούν και οι τυλώσεις ή θηλίδες.

Οι τυλώσεις είναι διατάσεις και διογκώσεις της κυτταρικής μεμβράνης των παρεγχυματικών κυττάρων των αγγειωδών δεσμίδων και δημιουργούνται στα σημεία

των πλάγιων βοθρίων προς το εσωτερικό των αγγείων, ως αποτέλεσμα ορμονικών διαταραχών στο φυτό (Εικόνα 1.3). Πιστεύεται, ότι η παρουσία πολλών τυλώσεων σχετίζεται με την αντοχή των φυτών στις αδρομυκώσεις και αυτό διότι δυσχαιρένουν την αποίκιση και την προέλαση του παθογόνου στα αγγεία του ξύλου. Εάν σχηματισθούν εγκαίρως, μπορούν να παρεμποδίσουν ή και να αποτρέψουν την είσοδο του παθογόνου (Τζάμος, 2007).



Εικόνα 1-3 Ανάπτυξη τυλώσεων (T1, T2) στα αγγεία ξύλου φυτών τομάτας σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώσεως.

Η διασυστηματική μόλυνση των αγγείων, επεκτείνεται με τον σχηματισμό των κονιδίων του μύκητα που μεταφέρονται σε νέες θέσεις, βλαστάνουν εκ νέου και διατρυπούν γειτονικά όργανα ή ιστούς των αγγειωδών δεσμίδων, συνεχίζοντας έτσι τον αποικισμό. Τα συμπτώματα, εντείνονται περισσότερο από την δράση των τοξίνων που παράγονται από τον μύκητα. Οι τοξίνες νεκρώνουν το πρωτόπλασμα και καταστρέφουν την ωσμωτική λειτουργία των κυττάρων, κυρίως των φύλλων. Ο Agrios το 2005, υποστήριξε πως οι τοξίνες αυτές μεταφέρονται στα φύλλα προκαλώντας, μείωση της χλωροφύλλης κατά μήκος των νευρώσεων και επομένως μείωση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας, την κατάρρευση των κυτταρικών μεμβρανών του φύλλου και συνεπώς την ικανότητα του να ρυθμίζει την υδατική του κατάσταση, με αποτέλεσμα την επιναστία, τον μααρασμό και την νέκρωση του φύλλου.

Ο καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου (συχνά διακοπτόμενος), κατατάσσεται στα κύρια συμπτώματα που προκαλεί ο μύκητας *V. dahliae* κατά την προσβολή του ξενιστή (Εικόνα 1.4). Το σύμπτωμα αυτό, είναι παθογνωμονικό και αποδίδεται στην απόθεση ουσιών μελανίνης στα κυτταρικά τοιχώματα των αγγείων και των γειτονικών παρεγχυματικών κυττάρων, αλλά και σε χρώση με φαινολικές ουσίες (Pegg, 1989).

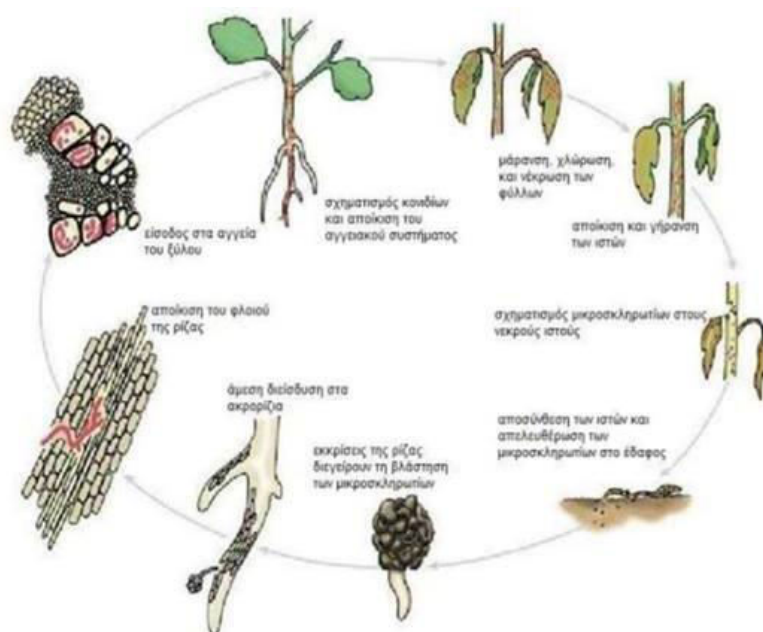


*Εικόνα 1-4 Ο καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου που προκαλεί ο *V. dahliae*.*
(Πηγή: <http://dspace.aua.gr>)

Η σαπροφυτική φάση του *V.dahliae*, ξεκινά κατά την διάρκεια της νέκρωσης των ιστών ή της γήρανσης του φυτού. Στο στάδιο αυτό, ο μύκητας έχει αποικίσει, εκτός από τους αγγειακούς ιστούς, τους βλαστούς και τις ρίζες του φυτού. Εν τω μεταξύ, ο μύκητας ξεκινά να παράγει μεγάλες ποσότητες μικροσκληρωτίων στους γηρασμένους ή νεκρούς ιστούς του φυτού, τα οποία καταλήγουν στο έδαφος μαζί με τους νεκρούς ιστούς (Fradin and Thomma, 2006). Για τον σχηματισμό των μικροσκληρωτίων, αναφέρεται ότι είναι απαραίτητη η ενυδάτωση των ιστών ή η κάλυψη τους με χώμα. Όταν τα υπέργεια μέρη του φυτού αποξηραθούν, ο μύκητας νεκρώνεται στους ιστούς και δεν δρα σαν μόλυσμα (Schnathorst, 1981).

Σύμφωνα με τον Rowe το 1985, ο κύκλος της ασθένειας, συνοπτικά απαρτίζεται από 9 στάδια:

- Βλάστηση μικροσκληρωτίων από τις εκκρίσεις των ριζών του ξενιστή.
- Παραγωγή κονιδίων και μόλυνση των ριζών.

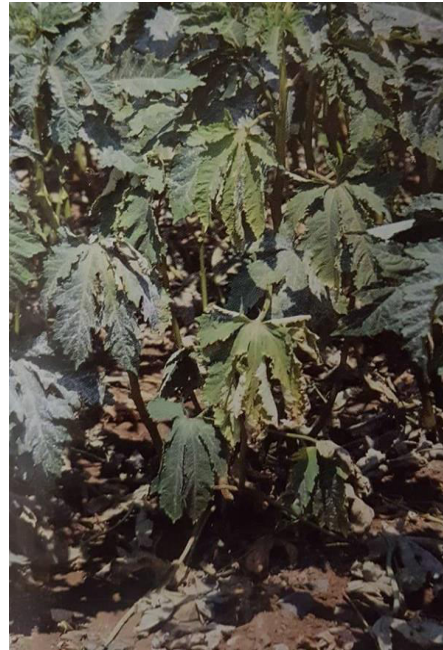


Εικόνα 1-5 Ο βιολογικός κύκλος του *V.dahliae*.

(Πηγή: <http://dSPACE.AUA.GR>)

- Είσοδος του μύκητα μέσω των υφών.
- Εγκατάσταση του μύκητα στα αγγεία και παραγωγή κονιδίων που μεταφέρονται με το ανοδικό ρεύμα.
- Νέκρωση των ιστών του ξενιστή.
- Δευτερογενής εισβολή των νεκρών ιστών από απλοειδή μυκήλια και παραγωγή περισσότερων κονιδίων από σπονδυλωτούς κονιδιοφόρους.

- Μετάπτωση του μυκηλίου απο απλοειδές σε διπλοειδές για την παραγωγή μικροσκληρωτίων στους νεκρωμένους ιστούς.
- Ενηλικίωση μικροσκληρωτίων.
- Απελευθέρωση ώριμων μικροσκληρωτίων από τα αποσυντεθημένα υπολείμματα των προσβεβλημένων φυτών και βλάστηση τους από τις εκκρίσεις των ριζών της νέας καλλιέργειας.



Εικόνα 1-6 Σύνδρομο βραδέως μαρασμού στη μπάμια προσβεβλημένη από τον V. dahliae.

1.2.3 Συμπτωματολογία

Η εκδήλωση των συμπτωμάτων εξαρτάται από τον ξενιστή, τον χρόνο προσβολής (πρώιμη ή όψιμη), τις κλιματολογικές συνθήκες, την πυκνότητα του μολύσματος, την παρουσία ή την απουσία ενός εξειδικευμένου στελέχους, τη φυλή του μύκητα και τις καλλιεργητικές ιδιότητες. Η ασθένεια εκδηλώνεται είτε με το σύνδρομο του βραδέως μαρασμού (συνήθως στα ετήσια φυτά) είτε με το σύνδρομο της ημιπληγίας (συνήθως στις δενδρώδεις καλλιέργειες) (Τζάμος, 2007).

(Πηγή: Τζάμος Ε. Φυτοπαθολογία, 2007)

Το σύνδρομο του βραδέως μαρασμού (vascular wilt syndrome), είναι ένα



Εικόνα 1.7 Σύνδρομο της ημιπληγίας στην ελιά προσβεβλημένη από τον V.dahliae.

(Πηγή: Τζάμος Ε. Φυτοπαθολογία, 2007)

σύνολο ορατών ή μικροσκοπικών συμπτωμάτων. Τα συμπτώματα αυτά χαρακτηρίζονται από βραδεία εξέλιξη και συμπεριλαμβάνουν, το φύλλο σημαίας, τον μαρασμό, τη χλώρωση, το κιτρίνισμα, τη νέκρωση και τη φύλλόπτωση. (Εικόνα 1.6).

Αντίστοιχα, το σύνδρομο της ημιπληγιάς περιλαμβάνει επίσης ένα σύνολο ορατών ή μικροσκοπικών συμπτωμάτων, τα οποία εκδηλώνονται στην μία πλευρά του φυτού, ενώ το υπόλοιπο ήμισυ του φυτού παραμένει συνήθως υγιές. Η ευδιάκριτη ασθενής πλευρά, εμφανίζει τα συμπτώματα της χλώρωσης, του κιτρινίσματος, της νέκρωσης και της φυλλόπτωσης (Εικόνα 1.7).

Συνήθως, τα συμπτώματα εμφανίζονται πρώτα στο ήμισυ των παλαιότερων φύλλων και στην συνέχεια η προσβολή προχωρά στα νεότερα φύλλα, εξαιτίας της ακροπεταλικής κατεύθυνσης της μόλυνσης του μύκητα (από τη βάση στην κορυφή). Τα συμπτώματα της αδρομύκωσης, αποδίδονται στην φραγή των αγγείων του ξύλου από την μεμονωμένη ή συνεργιστική δράση των πολυσακχαρίτων, πηγμάτων και μυκηλίων του μύκητα που περιορίζουν την ροή του νερού, με αποτέλεσμα τα συμπτώματα μαρασμού.

Τα κύρια συμπτώματα της βερτισιλλίωσης είναι τα ακόλουθα:

Μάρανση ή μαρασμός (wilt): τα φύλλα (συνήθως ποώδων φυτών) αρχικά χάνουν την σπαργή τους, παίρνοντας μία λεπτή και όχι δερματώδη υφή, η οποία οδηγεί στην απώλεια της συνεκτικότητας των ιστών και καταλήγει στην εμφάνιση περιορισμένης



Εικόνα 1-8 Αριστερά το σύμπτωμα επιναστία και δεξιά το σύμπτωμα φύλλο σημαίας.

περιφερειακής πλαδαρότητας που τελικά γενικεύεται σε όλο το φύλλο.

Φύλλο σημαίας (flag leaf): τα φύλλα των ποώδων φυτών βρίσκονται σε αρχικό στάδιο μάρανσης και κρέμονται από τη βάση του στελέχους. Χαρακτηριστικό σύμπτωμα της ασθένειας που παρομοιάζεται με σημαία σε κατάσταση νηνεμίας (Εικόνα 1.8).

Επιναστία (epinasty): η ανάπτυξη του κεντρικού άξονος του μίσχου ενός ή περισσοτέρων φύλλων ετήσιων φυτών με κατεύθυνση τη βάση αυτών και η δημιουργία αμβλείας γωνίας μεταξύ του άξονος του φύλλου και του στελέχους του. Το σύμπτωμα δεν συνοδεύεται από μαρασμό και χαρακτηρίζεται από την κάμψη του μίσχου των σύνθετων κυρίως φύλλων προς το έδαφος (Εικόνα 1.8).

Χλώρωση (chlorosis): χλώρωση αρχικά των κατώτερων φύλλων που επεκτείνεται προς τα ανώτερα φύλλα του φυτού.

Ξήρανση των κατώτερων φύλλων (lower leaf drying): μετά την χλώρωση των κατώτερων φύλλων επέρχεται η ξήρανση τους.

Νανισμός των προσβεβλημένων φυτών (dwarfing, stunting): το προσβεβλημένο φυτό δεν εκτελεί τις κανονικές φυσιολογικές του λειτουργίες σε επαρκές επίπεδο για να



Εικόνα 1.9 Αριστερά πορτοκαλόχρους μεταχρωματισμός σε προσβεβλημένη λεμονιά από τον *Phomatracheiphila* και δεξιά καστανός μεταχρωματισμός σε προσβεβλημένο αβοκάντο από τον *V.dahliae*.

μπορέσει να προσλάβει το αναμενόμενο ύψος την δεδομένη χρονική στιγμή.

Καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου: ο μεταχρωματισμός των αγγειωδών δεσμίδων είναι παθογνωμονικό σύμπτωμα των αδρομυκώσεων. Η καστανή χρώση που αποκτούν τα αγγεία, από τις ουσίες μελανίνης αλλά και τις φαινολικές ουσίες, είναι αυτή που διαχωρίζει τον *V.dahliae* από τα υπόλοιπα παθογόνα αδρομυκώσεων (Εικόνα 1.9). Παλαιότερες μελέτες αλλά και νέες, έχουν δείξει ότι ο μεταχρωματισμός προηγείται της μόλυνσης (Vallad and Subbarao, 2008).

1.2.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την παθογένεια του *V.dahliae*

Φωτοπερίοδος

Αναφέρεται ότι, η διάρκεια της φωτοπεριόδου επηρεάζει την εκδήλωση των συμπτωμάτων της ασθένειας που προκαλεί ο *V. dahliae*. Περιπτώσεις όπου φυτά καπνού, χρυσανθέμων και πατάτας είχαν προσβληθεί από τον εν λόγω μύκητα, εμφάνισαν εντονότερα συμπτώματα και υψηλότερα ποσοστά μόλυνσης όταν η φωτοπερίοδος διαρκούσε λιγότερο, σε σχέση με αντίστοιχα προσβεβλημένα φυτά που αναπτύσσονταν σε μεγαλύτερη φωτοπερίοδο.

Η επίδραση της φωτοπεριόδου στην εκδήλωση των συμπτωμάτων πιθανόν να σχετίζεται με τον μεταβολισμό των φαινολών, οι οποίες επηρεάζουν το επίπεδο της αυξίνης παρεμποδίζοντας (καφεϊκό, χλωρογενικό οξύ) ή ενεργοποιώντας (κουμαρικό οξύ) την οξειδάση της αυξίνης (Pegg, 1981, 1989). Τα αυξημένα επίπεδα αυξίνης συσχετίζονται με την επαγωγή βιοσύνθεσης αιθυλενίου, που πιστεύεται ότι εμπλέκεται στην εκδήλωση συμπτωμάτων από παθογόνα αδρομυκώσεων.

Αλληλεπίδραση με άλλους οργανισμούς

Το 1981 ο Schnathorst, ανέφερε πως ο χειρισμός φυτών μέντας με τον μύκητα *Verticillium nigrescens* 7-9 ημέρες πριν την μόλυνση με τον *V. dahliae*, μείωσε σημαντικά την εκδήλωση συμπτωμάτων της βερτισιλλίωσης, ενώ κάποια από τα φυτά δεν εμφάνισαν συμπτώματα έως και 4 εβδομάδες μετά. Η ύπαρξη αυτής της προστασίας, προέκυψε από τον ανταγωνισμό μεταξύ των δύο μυκήτων και από την πιθανή αλλαγή του μεταβολισμού του φυτού με παρουσία παρεμποδιστικών ουσιών που δεν ευνοούν την μόλυνση από τον *V. dahliae*.

Η αλληλεπίδραση μεταξύ *V.dahliae* και μεγάλου πληθυσμού *Thielaviopsis basicola* προκάλεσε μείωση της μόλυνσης από τον *V. dahliae*, καθώς ο μύκητας *T.*

Basicola είχε καταλάβει πιθανές θέσεις μόλυνσης και λόγω του ότι είχε νεκρώσει τις ρίζες του φυτού, με αποτέλεσμα να μην μολύνονται από τον *V. dahliae*.

Αντίθετα, οι νηματώδεις επάγουν την μόλυνση από τον *V. dahliae*, τραυματίζοντας τις ρίζες του φυτού και διευκολύνοντας την είσοδο του μύκητα, αλλά και λόγω διαφόρων φυσιολογικών αλλαγών στο φυτό που ευνοούν την μόλυνση από τον μύκητα (Fradin and Thoma 2006, Schnathorst 1981). Σε ένα πείραμα, όπου η ρίζα φυτού διαχωρίστηκε και προστέθηκαν στο ένα τμήμα νηματώδεις και στο άλλο μόλυσμα από τον *V. dahliae*, ενώ δεν υπήρξε άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο μικροοργανισμών, η ένταση της ασθένειας αυξήθηκε. Το πείραμα αυτό, δείχνει πως εκτός από περισσότερες θέσεις μόλυνσης, ο νηματώδης αλλάζει τον μεταβολισμό ή την άμυνα του φυτού.

1.2.5 Επιδημιολογία

Ο *V. dahliae* διατηρείται και επιβιώνει στο έδαφος για πολλά χρόνια, ακόμα και με την απουσία ξενιστών. Ο μύκητας επιβιώνει συνήθως με την μορφή μικροσκληρωτίων. Σπάνια όμως, μπορεί να επιβιώσει για μικρά χρονικά διαστήματα και μέσω μυκηλιακών υφών του ή μέσω κονιδίων του σε προσβεβλημένα υπολείμματα της καλλιέργειας.

Ένας άλλος τρόπος διαίωσης του φυτοπαθογόνου και αυξήσεως των μολυσμάτων του στο έδαφος, είναι τα ζιζάνια – ξενιστές. Κάποια από αυτά, όταν μολυνθούν εμφανίζουν συμπτώματα, ενώ άλλα παρότι έχουν τον μύκητα στα αγγεία τους παραμένουν ασυμπτωματικά, συντελώντας όμως στον εμπλουτισμό του εδάφους με μολύσματα (Παναγόπουλος, 2007).

Η διασπορά του μολύσματος επιτυγχάνεται, με το νερό της βροχής και της άρδευσης, τα υπολείμματα των καλλιεργειών, τα ζιζάνια, με το έδαφος που μεταφέρεται μέσω των γεωργικών μηχανημάτων και με το πολλαπλασιαστικό υλικό (μοσχεύματα, σπόροι, κόνδυλοι πατάτας, εμβόλια) όπου πραγματοποιείται μεταφορά του μολύσματος σε μεγάλες αποστάσεις.

Παρόλο που ο μύκητας είναι τυπικά εδαφογενής, έχει αναφερθεί μόλυνση δένδρων από τις πληγές κλαδέματος. Αυτό συμβαίνει όταν υπάρχει άφθονο μόλυσμα στο σημείο τομής του ασθενούς δένδρου και δεν έχει ακολουθήσει απολύμανση εργαλείων. Η περίπτωση όμως, να προσβληθούν τα δένδρα από τα υπέργεια τμήματα τους σε φυσικές συνθήκες, είναι σπάνια (Παναγόπουλος, 2007).

1.2.6 Αντιμετώπιση

Ο μύκητας *V. dahliae* είναι δύσκολο να αντιμετωπισθεί εξαιτίας, του μεγάλου εύρους ξενιστών, της αδυναμίας των μυκητοκτόνων να περιορίσουν την ανάπτυξη του αφού αποικίσει τα αγγεία του ξύλου και από την ικανότητα του να επιβιώνει στο έδαφος με την μορφή μικροσκληρωτίων για πολλά χρόνια.

Η καταπολέμηση του *V. dahliae* στηρίζεται για χρόνια στην απολύμανση του εδάφους με την χρήση βρωμιούχου μεθυλίου. Με την ανακοίνωση όμως της απαγόρευσης αυτού του χημικού, λόγω της καταστροφής που προκαλεί στο όζον, η έρευνα κινήθηκε προς την εύρεση εναλλακτικών χειρισμών για την αντιμετώπιση του μύκητα. Επί του παρόντος, δεν υπάρχουν αποτελεσματικά μυκητοκτόνα για την αντιμετώπιση των αδρομυκώσεων. Έτσι λοιπόν, ο έλεγχος της ασθένειας βασίζεται στα παρακάτω μέτρα:

Ανθεκτικές ποικιλίες

Η καλλιέργεια με ανθεκτικές ή ανεκτικές ποικιλίες έχει αποδειχθεί αποτελεσματική για την αντιμετώπιση του *V. dahliae*. Η μέθοδος αυτή είναι οικονομική και δεν αποτελεί κίνδυνο για το περιβάλλον. Ανθεκτικές ποικιλίες χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στην τομάτα, ενώ έχουν ταυτοποιηθεί κάποιες και στην πατάτα, στον ηλιάνθο και στην φράουλα (Lynch, 1997). Ακόμα, έχουν δημιουργηθεί ανθεκτικές ή ανεκτικές ποικιλίες και υβρίδια διαφόρων κηπευτικών, όπως επίσης ανθεκτικές ποικιλίες καρποφόρων δένδρων που χρησιμοποιούνται ως υποκείμενα. Ωστόσο, σε ένα μεγάλο ποσοστό καλλιεργειών δεν υπάρχουν ανθεκτικές ποικιλίες (Fradin and Thoma, 2006). Για αυτό, η αντιμετώπιση της βερτισιλλίωσης στηρίζεται κυρίως σε προληπτικές επεμβάσεις.

Καλλιεργητικές τεχνικές

Ο καλύτερος τρόπος για να αντιμετωπισθεί η βερτισιλλίωση είναι η πρόληψη της εξάπλωσης της ασθένειας. Η αμειψισπορά είναι μία από τις μεθόδους που μπορεί να φέρει θετικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση της βερτισιλλίωσης, σε περιπτώσεις που καλλιεργούνται ευπαθείς ποικιλίες. Ωστόσο, η επιτυχία της μεθόδου εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως είναι, η πυκνότητα του μολύσματος, τα φυτικά είδη που χρησιμοποιούνται και οι καλλιεργητικές συνθήκες της περιοχής. Παρ' όλα αυτά, η ικανότητα του μύκητα να επιβιώνει για πολλά χρόνια στο έδαφος

και να μολύνει μεγάλο εύρος φυτών, μειώνει την αποτελεσματικότητα της πρακτικής αυτής (Subbarao et al., 2007).

Διάφορες άλλες καλλιεργητικές τεχνικές που συνιστώνται είναι (Παναγόπουλος 2007, Τζάμος 2007):

- Χρήση φυτών εμβολιασμένων σε ανθεκτικά υποκείμενα. Αφορά κυρίως δενδρώδεις καλλιέργειες αλλά και ορισμένα κηπευτικά.
- Αποφυγή φυτέματος όπου προηγήθηκαν ευπαθή στην ασθένεια φυτά.
- Αποφυγή συγκαλλιέργειας ή γειτνίασεως με άλλα ευπαθή φυτά.
- Άρδευση με σταγόνες και αποφυγή κατακλύσεως ή αυλακιών ώστε να αποφευχθεί η υπερβολική εδαφική υγρασία.
- Αποφυγή οργωμάτων.
- Καταστροφή υπολειμμάτων προηγούμενης καλλιέργειας όπου θα μπορούσε το παθογόνο να επιβιώσει.
- Εκρίζωση και καταστροφή μολυσμένων φυτών ή μολυσμένων τμημάτων.
- Χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού.
- Αποφυγή δημιουργίας πληγών με καλλιεργητικά εργαλεία στην περιοχή του λαιμού και των ριζών.
- Αποφυγή καλλιέργειας σε εδάφη όπου ευνοείται το παθογόνο (ουδέτερο προς αλκαλικό pH) ή διόρθωση του pH με κατάλληλη λίπανση.
- Συστηματική καταπολέμηση ζιζανίων.
- Λήψη μέτρων υγιεινής για την αποφυγή μετάδοσης του παθογόνου, π.χ. καθαρισμός και απολύμανση γεωργικών μηχανημάτων και εργαλείων.

Ηλιοαπολύμανση

Μέχρι σήμερα τα πιο ενθαρρυντικά αποτελέσματα για την αντιμετώπιση της βερτισιλλίωσης τα έχει αποφέρει η ηλιοαπολύμανση, τόσο σε θερμοκηπιακές όσο και σε υπαίθριες καλλιέργειες (Εικόνα 1.10). Πρόκειται για μία υδροθερμική μέθοδο, που βασίζεται στην εκμετάλλευση της ηλιακής ακτινοβολίας, για αυτό και εφαρμόζεται τους καλοκαιρινούς μήνες, ιδανικά τον Ιούλιο και τον Αύγουστο. Το υγρό έδαφος καλύπτεται από λεπτά και διάφανα φύλλα πολυαιθυλενίου που τα άκρα τους

καλύπτονται επιφανειακά από χώμα, ώστε να παγιδεύεται η θερμότητα και καθώς το υλικό απορροφά την ηλιακή ακτινοβολία η θερμοκρασία ανυψώνεται (Tjamos et al., 1991). Η θερμοκρασία στα πρώτα 5 εκ. του εδάφους μπορεί να φτάσει έως και 52-55 °C, ενώ στο ακάλυπτο έδαφος η μέγιστη θερμοκρασία κυμαίνεται μεταξύ 37-38°C (Helena & Tjamos 1992). Οι δυσμενείς συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας που δημιουργούνται στο έδαφος δυσχεραίνουν την επιβίωση των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών που διαβιούν στο έδαφος, καθώς και ορισμένων εντόμων, νηματωδών και ζιζανίων που βρίσκονται στα ανώτερα 5-10 εκ του εδάφους.

Η μέθοδος αυτή μειώνει σημαντικά την ποσότητα του μολύσματος στο έδαφος και συνεπώς τις πιθανότητες να εκδηλωθεί η ασθένεια. Ωστόσο, σε άλλες περιπτώσεις όπου έγινε ταυτόχρονη εφαρμογή ηλιοαπολύμανσης και ενός χημικού



Εικόνα 1-10 Εφαρμογή ηλιοαπολύμανσης στον αγρό.

(Πηγή: <https://chrisdeper.com>)

απολυμαντικού εδάφους (π.χ. metham sodium) ή ενός θερμοανθεκτικού βιολογικού παράγοντα (π.χ. *Raenibacillus alvei* K-165), φάνηκε ότι μπορεί να δώσει καλύτερα αποτελέσματα και να καθυστερήσει την επανεγκατάσταση του παθογόνου (Antonίου et al., 1993, Rodrigo et al., 2009, Benyephet et al., 1988). Ακόμα, αξίζει να αναφερθεί πως η θετική επίδραση αυτής της μεθόδου δεν είναι παροδική, αλλά διαρκεί για αρκετές καλλιεργητικές περιόδους.

Αποστείρωση με θερμό ατμό

Σε ορισμένες χώρες, η εφαρμογή αυτής της μεθόδου σε θερμοκήπια κηπευτικών είναι εύκολη και οικονομικά συμφέρουσα, ωστόσο στην Ελλάδα

εφαρμόζεται σπάνια λόγω υψηλού κόστους. Σε πειράματα που έγινε αποστείρωση με θερμό ατμό 40-80°C σε χώμα μολυσμένο με τους μύκητες *V. dahliae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum*, *Pythium ultimum*, με τους νηματώδεις *Globodera pallida* και *Globodera rostochiensis* και με τα ζιζάνια *Chenopodium album* και *Agropyron repens*, η μέθοδος ήταν επιτυχής 100% στην θανάτωση όλων των παθογόνων και των ζιζανίων (Van Loenen et al., 2003). Παρ' όλα αυτά, η μέθοδος δεν είναι κατάλληλη, διότι εκτός των παθογόνων και των ζιζανίων, θανατώνονται και ωφέλιμοι οργανισμοί (Roux-Michollet et. al., 2008).

Βιολογική αντιμετώπιση

Πρόκειται για μία πολλά υποσχόμενη μέθοδο, η οποία είναι φιλικότερη προς το περιβάλλον και λύνει το πρόβλημα των χημικών υπολειμμάτων στα γεωργικά προϊόντα, καθώς στηρίζεται στην χρήση μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί αυτοί, έχουν την δυνατότητα να καταστέλλουν την δραστηριότητα ενός παθογόνου αιτίου και να παρεμποδίζουν την μόλυνση ή να περιορίζουν την εκδήλωση μιας ασθένειας. Οι βιολογικοί παραγόντες που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι μη φυτοπαθογόνοι μύκητες και βακτήρια (Τζάμος 2007).

Τα τελευταία χρόνια, διεξάγονται ενδελεχείς έρευνες για την εύρεση βιολογικών παραγόντων, αλλά και για τον τρόπο δράσης τους. Η θετική βιολογική τους δράση μπορεί να οφείλεται στους εξής ακόλουθους μηχανισμούς (Τζάμος 2007, Ζιώγας & Μαρκόγλου 2007):

- Ανταγωνισμός.
- Αντιβίωση.
- Παρασιτισμός.
- Επαγωγή διασυστηματικής αντοχής των φυτών ξενιστών.

Ανταγωνισμός

Οι μικροοργανισμοί ανταγωνίζονται μεταξύ τους για τροφή και για θέση στο φυτό ξενιστή. Ο τροφικός ανταγωνισμός για βασικά θρεπτικά στοιχεία γίνεται στο έδαφος αλλά και στην περιοχή της ριζόσφαιρας και της φυλλόσφαιρας. Ο βιολογικός παράγοντας αποστερώντας τα θρεπτικά συστατικά από το παθογόνο, μπορεί να οδηγήσει στην μείωση των δραστηριοτήτων του. Επιπλέον, είναι πιθανόν με την γρήγορη ανάπτυξη του βιολογικού παράγοντα να υπάρξει ανταγωνισμός και για κατάληψη χώρου στην επιφάνεια ή στο εσωτερικό του φυτού ξενιστή.

Η πιο συνηθισμένη περίπτωση ανταγωνισμού μεταξύ βιολογικών παραγόντων και παθογόνων είναι ο θρεπτικός ανταγωνισμός για το σίδηρο (Fe). Στο έδαφος υπάρχουν άφθονες ποσότητες σιδήρου, όμως η μεγαλύτερη ποσότητα βρίσκεται σε αδιάλυτη μορφή του υδροξειδίου του σιδήρου. Επομένως, ο σίδηρος που είναι διαθέσιμος στο έδαφος για τους οργανισμούς είναι σε συγκεντρώσεις 10^{-18} M και χαμηλότερες. Οι συγκεντρώσεις αυτές του σιδήρου, είναι ανεπαρκείς για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών που χρειάζονται συγκεντρώσεις της τάξεως 10^{-6} M. Τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν το σίδηρο μέσα στο κύτταρο τους. Ένας τυπικός μηχανισμός δέσμευσης σιδήρου, περιλαμβάνει έναν σιδηροφόρο που δεσμεύει το σίδηρο και μία πρωτεΐνη που τον μεταφέρει μέσα στο κύτταρο. Κατ'αυτόν τον τρόπο, συμβάλλουν στον περιορισμό των ιόντων σιδήρου στην ριζόσφαιρα, όπου παρεμποδίζεται η ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός πολλών φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens*. Έχουν βρεθεί αρκετά στελέχη αυτού του βακτηρίου, όπου αποδείχθηκε η σημαντικότητα της παραγωγής σιδηροφόρων για την βιολογική αντιμετώπιση του παθογόνου *Erwinia caratovora* όπως, *Pseudomonas fluorescens* A1, BKQ, TL3B1 και B10 (Klopper et al., 1980).

Η ευαισθησία των παθογόνων που προκύπτει από τους σιδηροφόρους των ανταγωνιστικών παραγόντων οφείλεται σε:

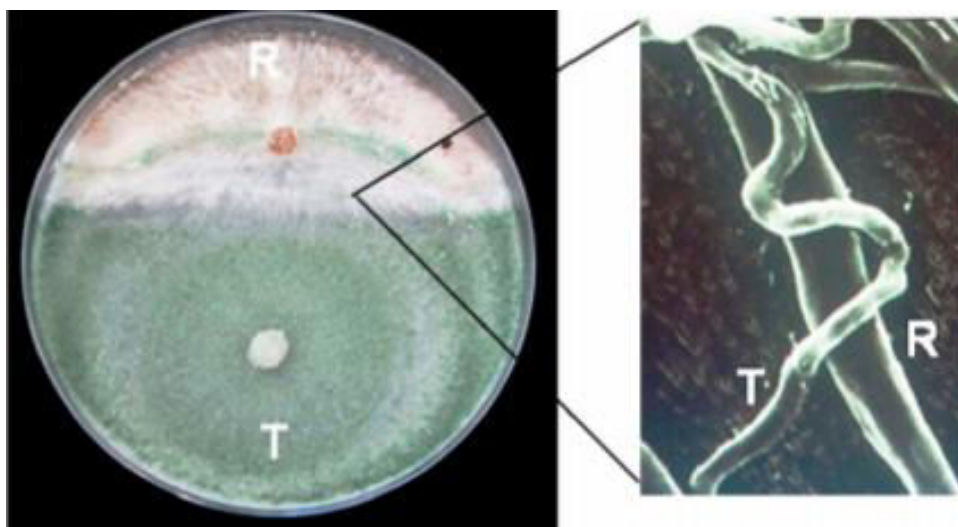
- Ανικανότητα παραγωγής σιδηροφόρων.
- Ανικανότητα χρήσης σιδηροφόρων που παράγονται από βακτήρια ή από άλλους μικροοργανισμούς.
- Παραγωγή μικρών ποσοτήτων σιδηροφόρων ή σιδηροφόροι με μικρή ικανότητα έλξης σε σύγκριση με αυτών των βακτηρίων για σίδηρο.
- Παραγωγή σιδηροφόρων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τους ανταγωνιστές.

Αντιβίωση

Οι αντιμικροβιακές ενώσεις που παράγουν οι βιολογικοί παράγοντες έχουν σημαντικό ρόλο στην ανταγωνιστική τους δράση κατά των εδαφογενών φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών. Ο μηχανισμός αυτός στηρίζεται στην παραγωγή τοξικών μεταβολιτών μικροβιακής προελεύσεως, μυκοτοξινών εδάφους, ενζυμικών λυτικών παραγόντων ή άλλων ενζύμων. Τα περισσότερα αντιβιοτικά παράγονται από εδαφογενείς μικροοργανισμούς και για να είναι αποτελεσματικά θα πρέπει να

παράγονται σε επαρκείς ποσότητες κοντά στο παθογόνο (Thomashow et al., 2002). Ακόμα, ο βιολογικός παράγοντας που παράγει τα αντιβιοτικά θα πρέπει να διαθέτει επάρκεια θρεπτικών στοιχείων, μεταξύ των οποίων πηγές άνθρακα, ώστε να είναι αποτελεσματικός.

Η αντιβίωση είναι από τις πιο κοινές βιολογικές δράσεις των βιολογικών παραγόντων. Παράδειγμα αποτελεί ο μύκητας *Talaromyces flavus* που παράγει το ένζυμο της υπεροξειδάσης της γλυκόζης, το οποίο νεκρώνοντας τα μικροσκληρώτια του *Verticillium dahliae* περιορίζει την ένταση της ασθένειας στο βαμβάκι και στην μελιτζάνα. Επίσης, σημαντική είναι και η περίπτωση του στελέχους K-165 που ανήκει στο είδος *Paenibacillus alvei*. Στο στέλεχος αυτό, γίνεται συνδυασμός βιολογικών δράσεων, ένας από τους οποίους είναι η παραγωγή αντιβιοτικών, ινδολοβουτυρικού οξέος και χιτινασών. Το *Paenibacillus alvei* K-165 ανταγωνίζεται τους μύκητες *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum*, αλλά και το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* (Τζάμος 2007, Tjamos S. et al., 2007).



Εικόνα 1-11 Αριστερά ο παρασιτισμός του *Rhizoctonia solani* (R) από τον *Trichoderma* (T), και δεξιά οι υφές του *Trichoderma* περιελιγμένες γύρω από τον *R. Solani*.

(Πηγή: <https://www.cell.com>)

Παρασιτισμός

Ένα αρκετά γνωστό φαινόμενο, είναι ο παρασιτισμός ενός παθογόνου μικροοργανισμού από έναν άλλον μικροοργανισμό. Διάφοροι μύκητες και βακτήρια προκαλούν κυτταρόλυση των παθογόνων μέσω της έκκρισης διαφόρων ενζύμων (π.χ. χιτινάσες, γλουκανάσες, πρωτεάσες) και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικοί παράγοντες εναντίον μυκήτων των γενών *Fusarium* και *Pythium*. Το παράσιτο

αναπτύσσεται με διακλαδώσεις των υφών του προς τον ξενιστή μύκητα, περιελίσσεται και προσκολλάται σε αυτόν με κατασκευές (π.χ. πλάκες συγκρατήσεως), οι οποίες διατρυπούν το μυκήλιο του παθογόνου (Τζάμος 2007). Ο *Trichoderma* spp. έχει μελετηθεί εκτεταμένα, λόγω του μυκοπααρασιτισμού που τον χαρακτηρίζει εναντίον φυτοπαθογόνων μυκήτων όπως, ο *Rhizoctonia solani* (Εικόνα 1.11). Συγκεκριμένα, το είδος *T. harzianum* παράγει τουλάχιστον τρεις χιτινάσες και γλουκανάσες (Chet & Baker, 1981).

Επαγωγή της διασυστηματικής αντοχής των φυτών ξενιστών

Διάφοροι βιολογικοί παράγοντες (μύκητες, βακτήρια ή ιοί) μπορούν να προκαλέσουν την διέγερση λανθανόντων μηχανισμών αντοχής των φυτών. Πρόκειται ουσιαστικά για μία μορφή «ανοσοποίησης», όπου το φυτό αυξάνει την αντοχή του και προετοιμάζεται για μία ενδεχόμενη μόλυνση από ένα δυνητικό παθογόνο, μέσω διαφόρων βιοχημικών αλλαγών που υφίσταται το φυτό από την διέγερση που δέχεται. Η αντοχή αυτή του φυτού, διακρίνεται σε επίκτητη διασυστηματική αντοχή (Systemic Acquired Resistance / SAR), όταν ενεργοποιείται κατόπιν μόλυνσεως του φυτού από το παθογόνο και επαγόμενη διασυστηματική αντοχή (Induced Systemic Resistance / ISR), όταν ενεργοποιείται από βιολογικούς παράγοντες που δεν προκαλούν τοπική νέκρωση (π.χ. ριζοβακτήρια). Επιπλέον, η διασυστηματική αντοχή εμφανίζεται με δύο μορφές, μία τοπικού και μία διασυστηματικού χαρακτήρα. Η τοπικά επαγόμενη αντοχή εκφράζεται στο σημείο εισβολής του παθογόνου στον ξενιστή, με νέκρωση και ξήρανση των ιστών και σχετίζεται με την αντίδραση της υπερευαισθησίας (Hypersensitive response / HR). Από την άλλη, η διασυστηματικά επαγόμενη αντοχή εκφράζεται και σε σημεία μακράν του σημείου διεγέρσεως (Τζάμος 2007).

Πίνακας 1 Παράγοντες διεγέρσεως λανθανόντων μηχανισμών αντοχής των φυτών (Τζάμος 2007).

Παθογόνα
Μη συμβατές φυλές παθογόνων μικροοργανισμών
Μη παθογόνα στελέχη παθογόνων μικροοργανισμών
Μη παθογόνοι μικροοργανισμοί (σαπρόφυτα) π.χ ριζοσφαιρικά βακτήρια
Παράγοντες αβιοτικής καταπονήσεως (π.χ. ξηρασία και έλλειψη θρεπτικών στοιχείων)
Χημικές ενώσεις

Μη παθογόνοι μικροοργανισμοί όπως είναι τα ριζοβακτήρια, ενεργοποιούν μονοπάτια σήματος, στα οποία συμμετέχουν το ιασμονικό οξύ και το αιθυλένιο, πυροδοτώντας την ISR σε όλη την έκταση του φυτού. Ως διεγέρτης της ISR μπορεί να δράσει και το βακτήριο *Bacillus subtilis*, όπου βρέθηκε ότι τα λιποπεπτίδια του εκλαμβάνονται από τα φυτικά κύτταρα ως σήματα ενεργοποίησης των αμυντικών μηχανισμών (Ongena et al., 2007).

1.3 Το μη παθογόνο στέλεχος *Fusarium oxysporum* F2 ως βιολογικός παράγοντας

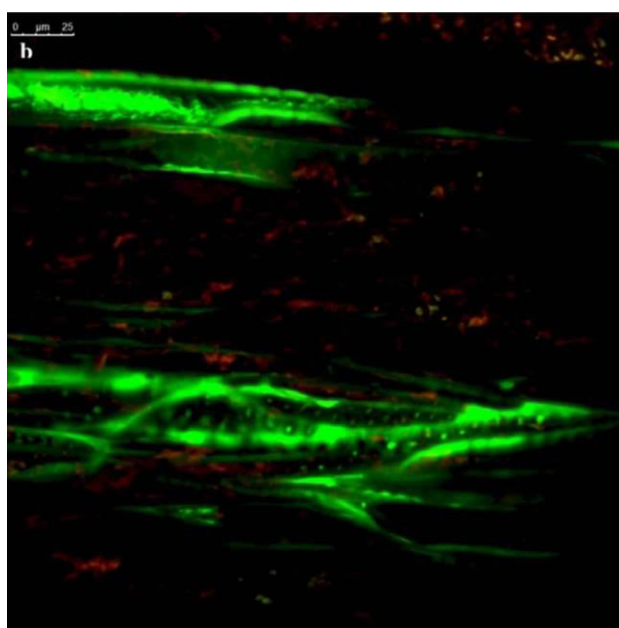
Η στρατηγική που ακολουθείται για την αντιμετώπιση των ασθενειών, ειδικά για την αδρομύκωση που προκαλεί ο *V.dahliae*, είναι η πρόληψη. Μέχρι σήμερα, έχουν αναφερθεί διάφορα βακτήρια και μύκητες ως βιολογικοί παράγοντες εναντίον του *V. dahliae* (Gizi et al., 2011). Οι περισσότεροι από αυτούς τους βιολογικούς παράγοντες ανήκουν στα γένη *Pseudomonas* και *Bacillus*. Αυτοί οι βιολογικοί παράγοντες, μπορούν να αποικίσουν το ριζικό σύστημα και να προστατεύσουν τα φυτά από τον *V. dahliae*, εφαρμόζοντας διάφορους μηχανισμούς δράσης όπως είναι, ο ανταγωνισμός, η αντιβίωση και η επαγωγή της ISR. Παράλληλα, έχουν δημοσιευθεί αρκετές μελέτες, στις οποίες μη παθογόνα φουζάρια φαίνεται πως μπορούν να ανταγωνιστούν και να καταστείλλουν παθογόνους μικροοργανισμούς, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της άμυνας των φυτών.

Τα είδη του *Fusarium oxysporum*, θεωρούνται ως φυσικά συστατικά των εδαφών και των μυκήτων που περιέχονται στην ριζόσφαιρα των φυτών (Gordon et al., 1997). Όλα τα στελέχη του μύκητα *F. oxysporum* είναι σαπροφυτικά και ικανά να αναπτυχθούν και να επιβιώσουν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε οργανική ύλη στο έδαφος, αλλά και στην ριζόσφαιρα πολλών φυτών (Garrett 1970). Επίσης, ορισμένα στελέχη αυτού του είδους είναι παθογόνα σε διαφορετικά είδη φυτών. Εισέρχονται στο αγγειακό σύστημα των φυτών μέσω των ριζών και προκαλούν αδρομυκώσεις. Άλλα είδη *Fusarium*, εισχωρούν στις ρίζες και χωρίς να εισέλθουν στο αγγειακό σύστημα προκαλούν σηψιρριζίες και ασθένειες (Olivain et al., 2006).

Σε προηγούμενες μελέτες που χρησιμοποιήθηκαν στελέχη του *F. oxysporum* ως βιολογικοί παράγοντες, ο μηχανισμός δράσης τους έδειξε ότι σχετίζεται με τον ανταγωνισμό (Lemanceau et al., 1993, Larkin et al., 1993) και με την επαγόμενη διασυστηματική αντοχή των φυτών (Olivain et al., 2006, Kroon et al., 1992, Biles et al., 1989). Ο πιο πιθανός μηχανισμός δράσης φαίνεται να είναι ο ανταγωνισμός, που

γίνεται είτε για θρεπτικά στοιχεία στο έδαφος και στην ριζόσφαιρα, όπως διαπιστώθηκε για τα στελέχη C5 και C14 (Mandeeel και Baker, 1991) και για το στέλεχος Fo47 (Larkin και Fravel, 1999), είτε για τον παρασιτισμό και τον ανταγωνισμό για σημεία μόλυνσης στο ριζικό σύστημα των φυτών.

Μέσα από διάφορα πειράματα, έχουν δοκιμασθεί πολλά μη παθογόνα στελέχη *F. oxysporum* για την αντιμετώπιση ασθενειών σε διάφορες καλλιέργειες όπως, στο λινάρι (Alabouvette et al., 1993), στη τομάτα (Lemancheu & Alabouvette, 1991), στη μελιτζάνα (Gizi et al., 2011), στη μπανάνα (Gerlach et al., 1999), στο βασιλικό (Fravel & Larkin, 2002), στο αγγούρι (Mandeeel & Baker, 1991), στη φράουλα (Tezuka & Makino 1991) στο κυκλάμινο (Minuto et al., 1995) και στο καρπούζι



Εικόνα 1.12 Αποικισμός των ριζών φυτών μελιτζάνας από το μη παθογόνο στέλεχος *F.oxysporum*F2. Επάνω, όπως φαίνεται μία ημέρα μετά την έγχυση 10μl του F2 (10^7 cfu/ml). Κάτω, ο αποικισμός των αγγείων του φυτού μία εβδομάδα μετά την εφαρμογή έγχυσης.

(Πηγή: Gizi et. al., 2011)

(Larkin et al., 1996).

Το μη παθογόνο στέλεχος *F. oxysporum* F2 απομονώθηκε από ένα τροποποιημένο είδος οργανικά ζυμωμένου υποστρώματος, το οποίο αναφέρθηκε ότι μειώνει τα συμπτώματα της ασθένειας που προκαλεί ο *V. dahliae* και τα συμπτώματα της αδρομύκωσης σε φυτά μελιτζάνας τόσο στην ύπαιθρο όσο και στο θερμοκήπιο (Gizi et al., 2011, Malandraki et al., 2008, Pantelides et al., 2009). Στα πειράματα που διεξήγαγαν οι Malandraki et al. το 2008, έδειξαν την αποτελεσματικότητα του στελέχους F2 στο θερμοκήπιο και στον αγρό. Στα φυτά που εφαρμόστηκε ο

βιολογικός παράγοντας, η σχετική AUDPC (Area Under Disease Progress Curve) μειώθηκε σχεδόν τέσσερις φορές, σε σύγκριση με τον μάρτυρα (Εικόνα 1.12). Αντίστοιχα, οι Pantelides et al. το 2009, έδειξαν πως το ποσοστό της ασθένειας σε φυτά μελιτζάνας μολυσμένα με το παθογόνο *V. dahliae* και με το μη παθογόνο στέλεχος F2, ήταν πολύ μικρότερο σε σχέση με τον μάρτυρα. Από τα αποτελέσματα αυτά, συμπεράνθηκε πως υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ παθογόνου και βιολογικού παράγοντα και ακόμα πως ο κύριος μηχανισμός δράσης του F2 είναι ο ανταγωνισμός για θρεπτικά στοιχεία και χώρο στην επιφάνεια της ρίζας.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η ασθένεια βερτισιλλίωση που προκαλείται από τον μύκητα *Verticillium dahliae*, αποτελεί σοβαρότατη ασθένεια για ένα μεγάλο εύρος φυτών ξενιστών. Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχουν χημικά μέσα για την αντιμετώπιση της ασθένειας.

Στην εργασία αυτή, σκοπός ήταν η βιολογική αντιμετώπιση της βερτισιλλίωσης σε φυτά τομάτας με το μη παθογόνο στέλεχος *Fusarium oxysporum* F2. Για τον σκοπό αυτό, επιτελέστηκαν τρία πειράματα, στα οποία μελετήθηκαν:

- Η επίδραση του F2 στην εξέλιξη της ασθένειας.
- Η εφαρμογή του F2 με τρεις διαφορετικούς τρόπους: με ριζοπότισμα αιωρήματος κονιδίων και με δύο διαφορετικά υλικά επικάλυψης σπόρων.
- Η επίδραση του F2 στην ανάπτυξη των φυτών, όσον αφορά το ύψος και το νωπό βάρος τους.

2 ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Στην μελέτη αυτή, οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν, ο φυτοπαθογόνος μύκητας *V. dahliae*, το μη παθογόνο στέλεχος *Fusarium oxysporum* F2 και το μετασχηματισμένο στέλεχος *Fusarium oxysporum* F2 με το γονίδιο EGFP. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκήπιο με ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας, του εργαστηρίου της φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

2.1 Προετοιμασία μικροοργανισμών

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των μυκήτων ήταν τα ακόλουθα:

- Εκχύλισμα πατάτας με δεξτρόζη και άγαρ (Potato Dextrose Agar / PDA)

Συστατικά	gr/L H ₂ O
Εκχύλισμα πατάτας	200gr
Άγαρ	20gr
Δεξτρόζη	20gr

Διαδικασία: Μικροί κύβοι πατάτας 0,5 – 0,10εκ. τοποθετούνται σε υδατόλουτρο για 45 λεπτά και κατόπιν συλλέγεται το εκχύλισμα τους στο δεδομένο όγκο απιονισμένου νερού. Ακολουθεί η μίξη με τα υπόλοιπα δύο συστατικά και αφού αναδευθεί καλά το διάλυμα, αποστειρώνεται στον κλίβανο στους 120°C, πίεσης 1atm για 20 λεπτά.

- Παρασκευή διαλύματος σουκρόζης και νιτρικού νατρίου (Sodium Nitrate Solution / SSN)

Συστατικά	gr/L H ₂ O
Σακχαρόζη (ή Σουκρόζη)	15gr
K ₂ HPO ₄ (όξινο φωσφορικό κάλιο)	1gr

MgSO ₄ ·7H ₂ O (θειικό μαγνήσιο)	0,5gr
NaNO ₃ (νιτρικό νάτριο)	2gr
KCl (χλωριούχο κάλιο)	0,5
Διάλυμα ιχνοστοιχείων	1ml

- Για την παρασκευή 100ml διαλύματος ιχνοστοιχείων απαιτούνται:

FeSO ₄ x 7H ₂ O	249mg
CuSO ₄ x 5H ₂ O	40mg
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	44mg
MnSO ₄ x 4H ₂ O	41mg
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	51mg

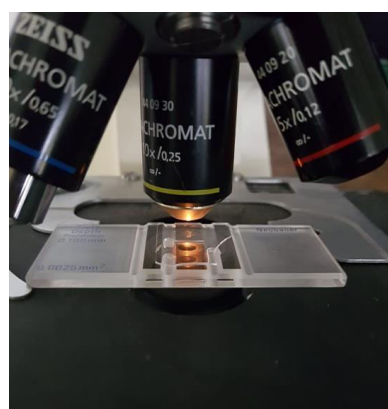
Ακολουθεί αποστείρωση στον κλίβανο στους 120°C, πίεσης 1atm και για 20 λεπτά.

Για την προετοιμασία του παθογόνου μολύσματος, χρησιμοποιήθηκε απομόνωση του μύκητα *V.dahliae* από την συλλογή του εργαστηρίου φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Διαδικασία: Μικρή ποσότητα DNA, που βρισκόταν αποθηκευμένη στους -80°C, παραλαμβάνονταν και εμβολιαζόταν σε στερεό θρεπτικό διάλυμα PDA. Η διαδικασία αυτή γινόταν υπό ασηπτικές συνθήκες και σε αποστειρωμένα τρυβλία. Τα τρυβλία στην συνέχεια, τοποθετούνταν σε θάλαμο επώασης, με σταθερή θερμοκρασία στους 20-25°C. Περίπου 4 ημέρες μετά, ο μύκητας είχε αναπτυχθεί αρκετά ώστε να μεταφερθεί μικρή ποσότητα της βιομάζας του μαζί με ποσότητα θρεπτικού υλικού PDA σε κωνικές φιάλες με υγρό θρεπτικό διάλυμα SSN, επίσης υπό ασηπτικές συνθήκες. Εν συνεχεία, οι κωνικές φιάλες μεταφέρονταν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 25°C με ταχύτητα ανάδευσης 100στροφές/λεπτό. Πέντε ημέρες μετά, στις κωνικές φιάλες, είχε σχηματισθεί πυκνό αιώρημα κονιδίων μαζί με μυκήλιο του μύκητα. Η επιθυμητή συγκέντρωση του μολύσματος για να επιτευχθεί

τεχνητή μόλυνση ήταν 10^7 κονίδια/ml μολύσματος. Ο έλεγχος της συγκέντρωσης του μολύσματος γινόταν ως εξής:

- Μεταφορά αιωρήματος κονιδίων, αφού φιλτραριζόταν με ειδικό τούλι, σε δοχείο ζέσεως τοποθετημένο σε μαγνητικό αναδευτήρα για ομοιόμορφη κατανομή των κονιδίων στο αιώρημα.
- Παραλαβή 1ml με πιπέτα από το πυκνό αιώρημα κονιδίων και μεταφορά σε φιαλίδιο McCartney που περιείχε 9ml νερό και στην συνέχεια γινόταν δεύτερη δεκαδική αραιώση (10^{-2}), ώστε να εξασφαλιστεί ευκολότερη μέτρηση των κονιδίων.
- Τοποθέτηση περίπου 25μl από την δεύτερη αραιώση σε αιματοκυτταρόμετρο (Εικόνα 2.1) για την εκτίμηση της τελικής πυκνότητας του μολύσματος με μικροσκόπιο CarlZeiss.
- Υπολογισμός αριθμού κονιδίων/ml σύμφωνα με τον τύπο: άθροισμα κονιδίων σε z τετραγωνάκια / αριθμός τετραγώνων (z) x 4×10^{-6} .
- Πολλαπλασιασμός της τιμής που προέκυπτε επί 10 για τον υπολογισμό των κονιδίων/ml στο αρχικό αιώρημα πριν την δεκαδική αραιώση.
- Υπολογισμός του τελικού όγκου για την επιθυμητή συγκέντρωση των κονιδίων (10^7 κονίδια/ml) με τον τύπο της αραιώσης $C_1 V_X = C_2 V_2$.



Εικόνα 2-1 Μέτρηση κονιδίων σε αιματοκυτταρόμετρο.

Για την προετοιμασία του βιολογικού παράγοντα, χρησιμοποιήθηκε απομόνωση του μύκητα *F. oxysporum* F2 από την συλλογή του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Διαδικασία: Μικρή ποσότητα DNA, που βρισκόταν αποθηκευμένη στους -80°C , παραλαμβάνονταν και εμβολιαζόταν σε στερεό θρεπτικό διάλυμα PDA. Η διαδικασία αυτή γινόταν υπό ασηπτικές συνθήκες και σε αποστειρωμένα τρυβλία. Τα τρυβλία στην συνέχεια, τοποθετούνταν σε θάλαμο επώασης, με σταθερή θερμοκρασία στους $20-25^{\circ}\text{C}$. Περίπου 5 ημέρες μετά, ο μύκητας είχε αναπτυχθεί αρκετά ώστε να μεταφερθεί μικρή ποσότητα της βιομάζας του μαζί με ποσότητα θρεπτικού υλικού PDA, σε κωνικές φιάλες με υγρό θρεπτικό διάλυμα SSN, επίσης υπό ασηπτικές

συνθήκες. Στη συνέχεια, οι κωνικές φιάλες μεταφέρονταν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 28°C με ταχύτητα ανάδευσης 100στροφές/λεπτό. Δύο ημέρες μετά, στις κωνικές φιάλες είχε σχηματισθεί πυκνό αιώρημα κονιδίων μαζί με μυκήλιο του μύκητα. Η επιθυμητή συγκέντρωση του μολύσματος για να επιτευχθεί τεχνητή μόλυνση ήταν 10^7 κονίδια/ml μολύσματος. Ο έλεγχος της συγκέντρωσης του μολύσματος γινόταν όπως αναφέρθηκε και με το παθογόνο.

2.2 Πειράματα παθογένειας

Για να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα του *F. oxysporum* F2 σε φυτά τομάτας προσβεβλημένα από τον *V. dahliae*, πραγματοποιήθηκαν τρία πειράματα παθογένειας. Σε κάθε πείραμα γινόταν καταγραφή των συμπτωμάτων της ασθένειας, ενώ στο τέλος των μετρήσεων καταγραφόταν το ύψος και το νωπό βάρος των φυτών.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε στα πειράματα ήταν η εξής:

Αρχικά, εφαρμόστηκε ο βιολογικός παράγοντας κατά το στάδιο του δεύτερου πραγματικού φύλλου με ριζοπότισμα, 10ml αιωρήματος κονιδίων συγκέντρωσης 10^7 κονίδια/ml. Πέντε ημέρες αργότερα, πραγματοποιήθηκε η μόλυνση των φυτών με το παθογόνο, κατά τον ίδιο τρόπο, στις ίδιες ποσότητες και στην ίδια συγκέντρωση με τον βιολογικό παράγοντα.

Οι μετρήσεις ξεκινούσαν 7-10 ημέρες μετά την μόλυνση με το παθογόνο, όπου εμφανιζόντουσαν συμπτώματα της ασθένειας (φύλλο σημαίας, μαρασμός, χλώρωση). Κάθε μέτρηση γινόταν ανά 2-4 ημέρες για περίπου έναν μήνα. Το ποσοστό της ασθένειας προέκυπτε από το κλάσμα των προσβεβλημένων φύλλων προς το συνολικό αριθμό των φύλλων επί τοις 100 (%).

Πείραμα 1^ο: χρησιμοποιήθηκαν σπόροι τομάτας Montfavet H63-5 F1 (υβρίδιο με ανθεκτικότητα στο παθογόνο). Οι επεμβάσεις που έγιναν ήταν οι εξής:

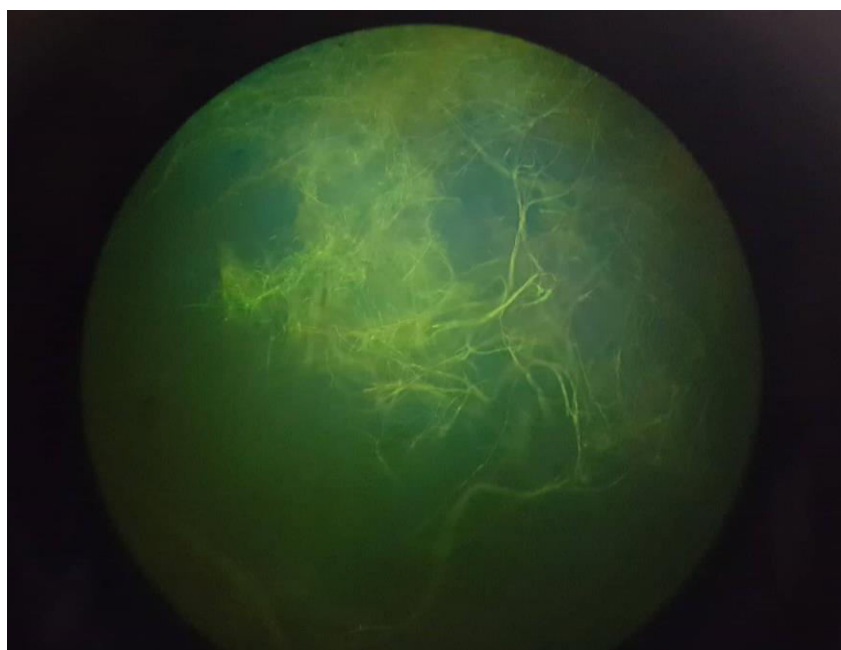
- 30 φυτά ως μάρτυρες, τα οποία μολύνθηκαν μόνο με το παθογόνο.
- 30 φυτά ως μάρτυρες, στα οποία εφαρμόστηκε μόνο ο βιολογικός παράγοντας.
- 30 φυτά στα οποία έγινε εφαρμογή του παθογόνου μαζί με τον βιολογικό παράγοντα.
- 20 φυτά στα οποία δεν έγινε καμία επέμβαση (Mock).

Πείραμα 2^ο: χρησιμοποιήθηκαν σπόροι τομάτας Ailsa Craig (ποικιλία με ευπάθεια στο παθογόνο). Οι επεμβάσεις που έγιναν ήταν οι εξής:

- 30 φυτά ως μάρτυρες, τα οποία μολύνθηκαν μόνο με το παθογόνο.
- 30 φυτά στα οποία έγινε εφαρμογή του παθογόνου μαζί με τον βιολογικό παράγοντα.
- 12 φυτά ως μάρτυρες, στα οποία εφαρμόστηκε μόνο ο βιολογικός παράγοντας.
- 7 φυτά στα οποία δεν έγινε καμία επέμβαση (Mock).

Πείραμα 3^ο: χρησιμοποιήθηκαν σπόροι τομάτας Ailsa Craig και το μετασχηματισμένο στέλεχος του μη παθογόνου *F. oxysporum* F2 που εκφράζει το γονίδιο EGFP, ως βιολογικός παράγοντας, από την συλλογή του εργαστηρίου φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Για την προετοιμασία του μετασχηματισμένου βιολογικού παράγοντα ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με τον μη μετασχηματισμένο βιολογικό παράγοντα. Ωστόσο, πριν από την ανάπτυξη του σε υγρό διάλυμα SSN, πραγματοποιήθηκε έλεγχος σε τρία διαφορετικά τρυβλία που περιείχαν PDA και μυκήλιο του μύκητα. Από αυτά, επιλέχθηκε το τρυβλίο με τις περισσότερες φθορίζουσες υφές με την χρήση μικροσκοπίου φθορισμού (Εικόνα 2.2).

Όσον αφορά τις επεμβάσεις, πραγματοποιήθηκαν οι ίδιες με τα δύο προηγούμενα πειράματα και επιπλέον το παθογόνο εφαρμόστηκε σε φυτάρια από



Εικόνα 2-2 Φθορίζουσες υφές του μετασχηματισμένου στελέχους *F. oxysporum* F2 (μικροσκόπιο φθορισμού).

επικαλυμμένους σπόρους τομάτας Ailsa Craig. Η επικάλυψη των σπόρων έγινε με talc ή με διάλυμα αλγινικού νατρίου (sodium alginate), όπου είχε προστεθεί ο μετασχηματισμένος βιολογικός παράγοντας. Η διαδικασία επικάλυψης των σπόρων έγινε ως ακολούθως:

Διαδικασία επικάλυψης σπόρων τομάτας με ταλκ

Μέσα σε ειδικό διάφανο, πλαστικό σακουλάκι αναμείχθηκαν 50γρ. ταλκ και 10ml αιωρήματος κονιδίων μετασχηματισμένου βιολογικού παράγοντα συγκέντρωσης 10^7 κονίδια/ml. Στη συνέχεια, ακολούθησε η προσθήκη και η ανάμειξη των σπόρων τομάτας με το υλικό και τον βιολογικό παράγοντα. Τελειώνοντας, το σακουλάκι τοποθετήθηκε για διατήρηση στο ψυγείο.

Διαδικασία επικάλυψης σπόρων με διάλυμα αλγινικού νατρίου (sodium alginate)

Σε 18ml απιονισμένο νερό ομογενοποιήθηκαν με ομογενοποιητικό όργανο (blender), 1γρ. αλγινικό νάτριο και 2ml αιωρήματος κονιδίων μετασχηματισμένου βιολογικού παράγοντα συγκέντρωσης 10^7 κονίδια/ml. Ακολούθησε η ανάμειξη των σπόρων τομάτας με το ομογενοποιημένο υλικό αλγινικού νατρίου. Παράλληλα, σε δοχείο ζέσεως ομογενοποιήθηκαν 250ml απιονισμένο νερό και 5,55γρ. CaCl_2 (calcium chloride) με την χρήση μαγνητικού αναδευτήρα. Στη συνέχεια, με την χρήση πιπέτας, όπου είχε κοπεί η άκρη της ρύγχης (tip) για μεγαλύτερη απορρόφηση, ρίχνονταν μεμονωμένα και περιοδικά οι σπόροι τομάτας μαζί με μικρή ποσότητα ομογενοποιημένου υλικού αλγινικού νατρίου μέσα στο δοχείο ζέσεως που αναδευόταν το διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου. Το υλικό γύρω από τους σπόρους



Εικόνα 2-3 Επικαλυμμένοι σπόροι τομάτας με αλγινικό νάτριο πριν την εξάτμιση του υλικού.

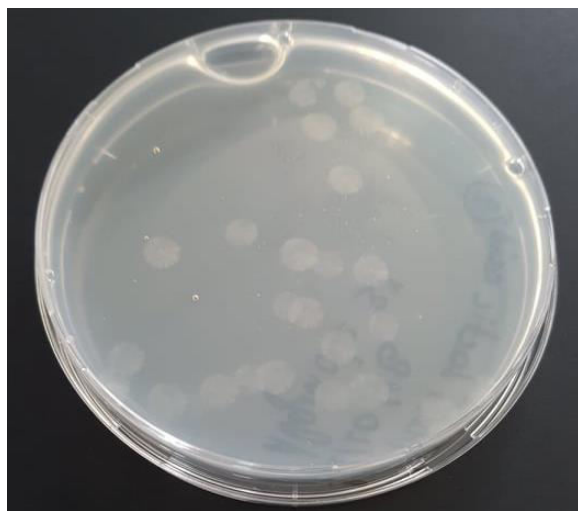
στερεοποιούνται επικαλύπτοντας ομοιόμορφα τους σπόρους (ιονοτροπική πήξη-ιονοτροπική gelation). Τέλος, οι καλυμμένοι πλέον σπόροι, απλώθηκαν πάνω σε αλουμινοχαρτο για μία ημέρα, έτσι ώστε να στεγνώσουν. Κατόπιν, τοποθετήθηκαν σε falcon και διατηρήθηκαν στο ψυγείο (Εικόνα 2.3).

Επιπλέον, επικαλύφθηκαν σπόροι τομάτας με τα ίδια υλικά χωρίς την προσθήκη του μετασχηματισμένου βιολογικού παράγοντα. Ο σκοπός ήταν να χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρες, για να ελεγχθεί η επίδραση των υλικών στην βλαστικότητα των σπόρων, στην μολυσματικότητα του παθογόνου μύκητα και στην επιβίωση του βιολογικού παράγοντα.

Μετά το πέρας των επικαλύψεων, πέντε σπόροι από το κάθε υλικό επικάλυψης χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση αποικιών του EGFP-F2. Πραγματοποιήθηκαν τρεις διαδοχικές αραιώσεις με αποστειρωμένο νερό. Από την τρίτη αραιώση (10^{-2}) κάθε υλικού επικάλυψης, με την χρήση πιπέτας, μεταφέρθηκε 0,5ml σε τρυβλίο που περιείχε PDA και lactic acid (0,5ml lactic acid 85% w/w σε 450ml PDA). Στην συνέχεια, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στο θάλαμο επώασης στους 20 – 25 °C. Δύο ημέρες μετά, με γυμνό μάτι πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων ήταν:

Μέτρηση αποικιών του EGFP-F2 από τους σπόρους που επικαλύφθηκαν με αλγινικό νάτριο (Εικόνα 2.4)

- Τρυβλίο 1^ο: 23×10^2 αποικίες
 - Τρυβλίο 2^ο: 27×10^2 αποικίες
 - Τρυβλίο 3^ο: 29×10^2 αποικίες
- } Δηλαδή 526 αποικίες/σπόρο



Εικόνα 2-4 Αποικίες του EGFP-F2 από επικαλυμμένους σπόρους με αλγινικό νάτριο.

Μέτρηση αποικιών του EGFP-F2 από τους σπόρους που επικαλύφθηκαν με ταλκ
(Εικόνα 2.5)

- Τρυβλίο 1^ο: 55×10^2 αποικίες
 - Τρυβλίο 2^ο: 47×10^2 αποικίες
 - Τρυβλίο 3^ο: 50×10^2 αποικίες
- Δηλαδή 1013 αποικίες/σπόρο



Εικόνα 2-5 Αποικίες EGFP-F2 από επικαλυμμένους σπόρους με ταλκ.

Επίσης, έγινε ακόμα ένας έλεγχος για τους σπόρους που επικαλύφθηκαν με το αλγινικό νάτριο και τον μετασχηματισμένο βιολογικό παράγοντα. Σε ένα τρυβλίο που περιείχε PDA και lactic acid (0,5ml lactic acid 85% w/w σε 450ml PDA) μεταφέρθηκαν 3 επικαλυμμένοι σπόροι και τοποθετήθηκαν στο θάλαμο επώασης στους 20-25 °C για δύο ημέρες. Το αποτέλεσμα ήταν θετικό, καθώς ο μύκητας κατάφερε να αναπτυχθεί (Εικόνα 2.6).



Εικόνα 2-6 Ανάπτυξη EGFP-F2 από επικαλυμμένους σπόρους με το αλγινικό νάτριο.

Η μόλυνση των φυτών με το παθογόνο, πραγματοποιήθηκε σε όλες τις επεμβάσεις την ίδια ημέρα. Δηλαδή, πέντε ημέρες μετά την εφαρμογή του μετασχηματισμένου παράγοντα στις επεμβάσεις που έγιναν σύμφωνα με τα δύο προηγούμενα πειράματα, εφαρμόστηκε το παθογόνο. Επομένως, οι επεμβάσεις που έγιναν ήταν οι εξής:

- 30 φυτά ως μάρτυρες, τα οποία μολύνθηκαν μόνο με το παθογόνο.
- 30 φυτά στα οποία έγινε εφαρμογή του παθογόνου παρουσία του μετασχηματισμένου βιολογικού παράγοντα.
- 30 φυτά από σπόρους επικαλυμμένους με το υλικό του αλγινικού νατρίου και με τον μετασχηματισμένο βιολογικό παράγοντα, στα οποία έγινε εφαρμογή του παθογόνου.
- 30 φυτά από σπόρους επικαλυμμένους με το υλικό του αλγινικού νατρίου, στα οποία έγινε εφαρμογή του παθογόνου (Εικόνα 2.7).
- 30 φυτά από σπόρους επικαλυμμένους με talc και με τον μετασχηματισμένο βιολογικό παράγοντα, στα οποία έγινε εφαρμογή του παθογόνου.
- 30 φυτά από σπόρους επικαλυμμένους με talc, στα οποία έγινε εφαρμογή του παθογόνου (Εικόνα 2.8).
- 20 φυτά στα οποία δεν έγινε καμία επέμβαση (Mock).



Εικόνα 2-7 Σπορά των επικαλυμμένων σπόρων με το αλγινικό νάτριο.



Εικόνα 2-8 Σπορά επικαλυμμένων σπόρων με ταλκ.

Θα πρέπει να αναφερθεί πως οι σπόροι που επικαλύφθηκαν με ταλκ, βλάστησαν 3 ημέρες μετά την σπορά, ενώ οι σπόροι που επικαλύφθηκαν με αλγινικό νάτριο, βλάστησαν 10 ημέρες μετά την σπορά, ανεξάρτητα από την προσθήκη ή όχι του βιολογικού παράγοντα. Επίσης, οι σπόροι που δεν επικαλύφθηκαν βλάστησαν 7 ημέρες μετά την σπορά.

2.3 Ποσοτικοποίηση της ενδοφυτικής παρουσίας του *V. dahliae* στα μολυσμένα φυτά τομάτας

Για να διαπιστωθεί αν η μείωση των συμπτωμάτων στα φυτά τομάτας οφείλεται στην δράση του βιολογικού παράγοντα *F. oxysporum* F2, ελέγχθηκε η ποσότητα του DNA του παθογόνου στους φυτικούς ιστούς των μολυσμένων φυτών. Αφότου τελείωσε το δεύτερο πείραμα, επιλέχθηκαν τυχαία έξι φυτά από κάθε επέμβαση που εφαρμόστηκε το παθογόνο και συλλέχθηκε τμήμα (5-10εκ.) από την βάση του στελέχους τους. Τα τμήματα αυτά, αποτελούσαν τον φυτικό ιστό από όπου θα γινόταν η απομόνωση DNA. Η απομόνωση του DNA έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Dellaporta et. al. (1983) (τροποποιημένο με φαινόλη):

1. Κονιορτοποίηση του φυτικού ιστού σε γουδί από πορσελάνη με υγρό άζωτο και τοποθέτηση 80-100mg σε σωληνάριο τύπου erendorff χωρητικότητας 1,5ml (Εικόνα 2.9).

2. Προσθήκη 500μl από το διάλυμα εξαγωγής DNA (500μl ανά 100ml ιστού).
3. Έντονη ανάμειξη (vortex) για 2 λεπτά.
4. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 14000rpm.
5. Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο σωληνάριο τύπου erendorf.
6. Προσθήκη 500μl φαινόλης:χλωροφόρμιου:ισοαμυλαλκοόλης.
7. Έντονη ανάμειξη (vortex) για 10 δευτερόλεπτα.
8. Μεταφορά υπερκείμενου (400-450μl) σε νέο σωληνάριο τύπου erendorf αποφεύγοντας την ενδιάμεση φάση.
9. Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης.
10. Ελαφρά ανάδευση και επώαση για 5-10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
11. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 14000rpm.
12. Απομάκρυνση υπερκείμενου.
13. Στέγνωμα ιζήματος.
14. Επαναιωρηματοποίηση του ιζήματος σε 25μl αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό και ανάμειξη εως ότου διαλυθεί το ίζημα.
15. Φυγοκέντρηση για λίγα δευτερόλεπτα.



Εικόνα 2-9 Κονιορτοποίηση φυτικών ιστών με υγρό άζωτο.

Μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA

Μετά την απομόνωση του DNA από τα φυτά, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της συγκέντρωσης του κάθε δείγματος με την χρήση φασματοφωτόμετρου Nanodrop, η λειτουργία του οποίου βασίζεται στην μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος, ώστε να προσδιοριστεί η καθαρότητα του και η συγκέντρωση του. Η απορρόφηση στα 260nm μετράει την συγκέντρωση του DNA και η απορρόφηση στα 280nm μετράει τις δευτερεύουσες ουσίες που απομονώθηκαν μαζί με το DNA (π.χ. πρωτεΐνες). Ο λόγος 260/280 αποτελεί μέτρηση της καθαρότητας του δείγματος DNA. Κατ'επέκταση, τα δείγματα DNA αραιώθηκαν με δις-απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικής συγκέντρωσης 100ng/μl.

Εφαρμογή της Real-time RCR (qPCR):

Η qPCR έγινε σε θερμοκυκλοποιητή της Stratagene Mx3005PTM και για τις αντιδράσεις ενίσχυσης χρησιμοποιήθηκε mastermix της FastGene® IC Green 2 x qPCR Universal Mix, ενώ τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το MxPRO QPCR. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της ακτίνης (actin/XM004249818) του φυτού τομάτας, που είναι γονίδιο αναφοράς και χρησιμοποιείται σαν σταθερά για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης άλλων γονιδίων, ανιχνεύθηκαν με την χρήση κατάλληλου ζεύγους εκκινητών (Πίνακας 2). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις RT-PCR, σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας της οποίας το mastermix χρησιμοποιήθηκε ήταν:

Component	10μl rxn	Final conc.
PCR-grade water	Up to 20μl	N/A
2X FastGene® IC Green	10 μl	1X
Forward primer (10M)	0.8 μl	400nM
Reverse primer (10M)	0.8 μl	400nM
Template DNA	1μg genomic DNA	As required

Κάθε αντίδραση έγινε σε όγκο 50μl.

Η ποσοτικοποίηση του *V. dahliae* έγινε με την χρήση ενός ζεύγους εκκινητών σχεδιασμένων για τις περιοχές ITS1 και ITS2 (Πίνακας 2).

Πίνακας 2 Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση του DNA του *V. dahliae*.

Γονίδιο στόχος	Εκκινητές	Πηγή
ITS15.8S rRNA	5'-CCGCCGGTCCATCAGTCTCTCTGTTTATAC-3'	Pantelides et. al., 2010
ITS25.8S rRNA	5'-CGCCTGCGGGACTCCGATGCGAGCTGTAAC-3'	Pantelidese t. al., 2010
actin	5'-TTGCCGCATGCCATTCT-3'	Fousia et al., 2015
actin	5'-TCGGTGAGGATATTCATCAGGTT-3'	Fousia et. al., 2015

Οι συνθήκες της αντίδρασης της qPCR δίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3

Step	Temperature(°C)	Duration	Cycles
Initial denaturation	95	2 min	1
Denaturation	95	5 sec	40
Annealing & Elongation	60-65	20-30 sec	40

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

2.4 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

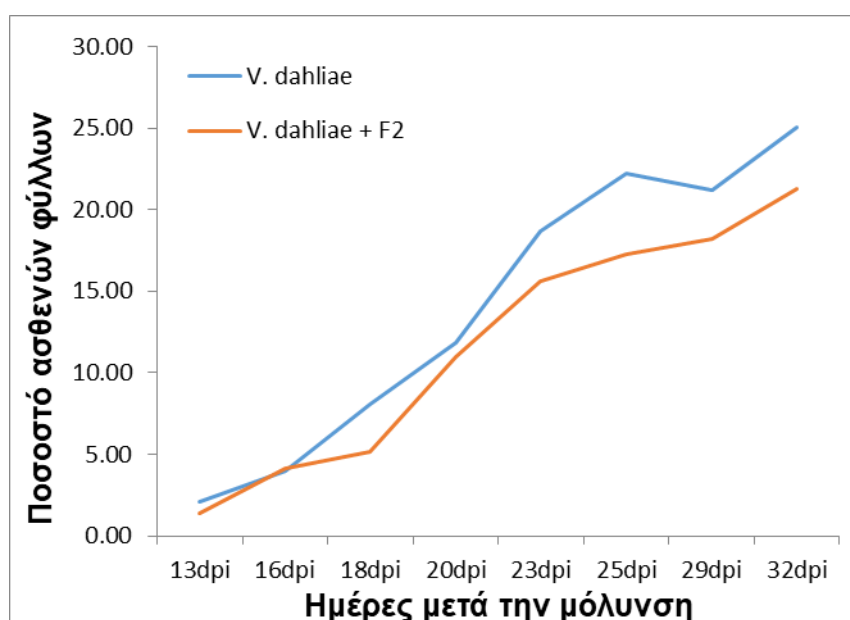
Πριν τη στατιστική ανάλυση έγινε υπολογισμός του εμβαδού ασθενείας (Area Under Disease Progress Curve / AUDPC) (Campbell & Madden, 1990). Επίσης, υπολογίστηκε η σχετική τιμή του εμβαδού ασθενείας (relative AUDPC, η τιμή του εμβαδού ασθενείας εκφρασμένη ως ποσοστό του μέγιστου δυνατού εμβαδού ασθενείας για όλη την χρονική διάρκεια των παρατηρήσεων). Οι τιμές του σχετικού εμβαδού ασθενείας της κάθε εφαρμογής αναλύθηκαν στατιστικά με το πρόγραμμα

SGWIN και η σύγκριση των μέσων των επεμβάσεων πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο ANOVA και εν συνεχεία με το στατιστικό έλεγχο Tukey ($p < 0,05$).

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

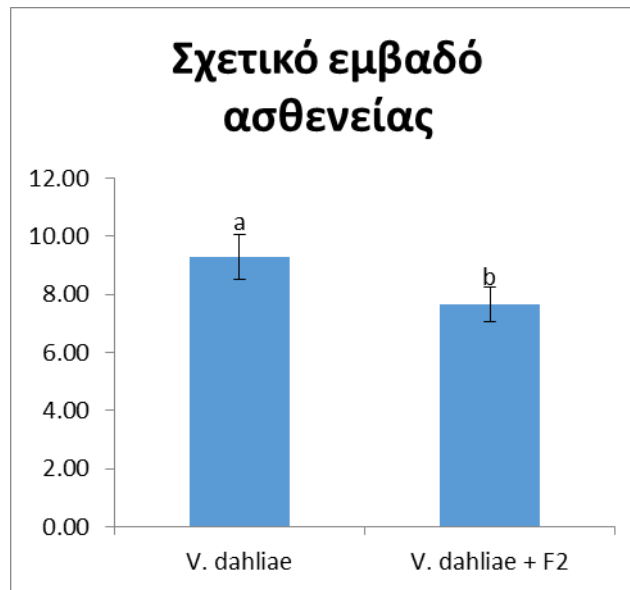
3.1 Πείραμα παθογένειας 1^ο

Στο πρώτο πείραμα παθογένειας, αξιολογήθηκε η μολυσματική ικανότητα του παθογόνου μύκητα *V. dahliae*, καθώς επίσης η επίδραση του βιολογικού παράγοντα *F. oxysporum* F2 σε φυτά τομάτας. Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές παθογένειας ανάμεσα σε φυτά με τον βιολογικό παράγοντα που μολύνθηκαν με το παθογόνο και σε φυτά που είχαν μόνο το παθογόνο. Τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από αυτό το πείραμα, έδειξαν ότι τα φυτά με τον βιολογικό παράγοντα και το παθογόνο εμφάνισαν λιγότερα συμπτώματα σε σύγκριση με τον μάρτυρα, καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος (Γράφημα 1).



Γράφημα 1 Συγκριτική απεικόνιση της χρονικής εξέλιξης της ασθένειας στα φυτά που μολύνθηκαν με τον μύκητα *V.dahliae*. Όπου *V. dahliae*=φυτά μολυσμένα μόνο με το παθογόνο και *V. dahliae*+F2=φυτά που εφαρμόστηκε ο βιολογικός παράγοντας και το παθογόνο. Η σοβαρότητα της ασθένειας για κάθε φυτό υπολογίστηκε από τον αριθμό των φύλλων που εμφάνισαν συμπτώματα ως ποσοστό του συνολικού αριθμού φύλλων για το αντίστοιχο φυτό. Κάθε γραμμή αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο για 30 φυτά.

Όσον αφορά την σοβαρότητα της ασθένειας, τα φυτά που εφαρμόστηκε ο βιολογικός παράγοντας και μολύνθηκαν με τον παθογόνο μύκητα, στατιστικά είχαν λιγότερα συμπτώματα από τον μάρτυρα με το παθογόνο (Γράφημα 2).



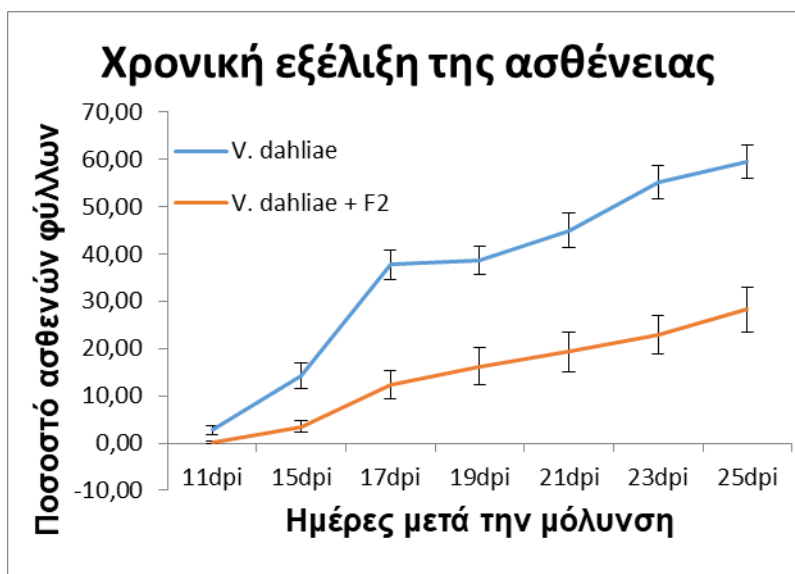
Γράφημα 2 Συγκριτική απεικόνιση του εμβαδού της καμπύλης εξέλιξης της ασθένειας (Cambell & Madden, 1990) για τα φυτά που εφαρμόστηκε ο βιολογικός παράγοντας και το παθογόνο (*V. dahliae* + F2) και για τα φυτά μάρτυρες (*V. dahliae*). Τα γράμματα που βρίσκονται πάνω από τις στήλες δείχνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές με βάση την μέθοδο Tukey σε επίπεδο σημαντικότητας $P < 0,05$.

Επομένως, φαίνεται πως το μη παθογόνο στέλεχος *F. oxysporum* F2 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση μεταξύ του *V. dahliae* και των φυτών τομάτας.

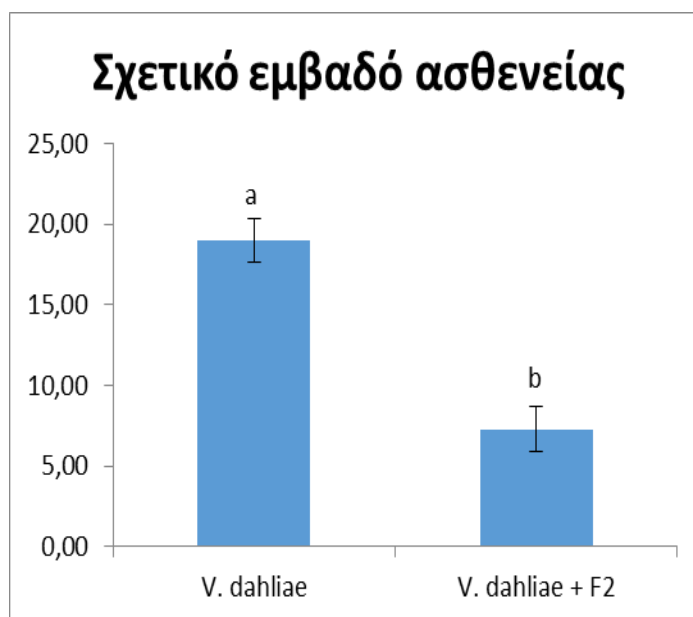
3.2 Πείραμα παθογένειας 2^ο

Στο δεύτερο πείραμα παθογένειας, αξιολογήθηκαν οι ίδιοι παράμετροι με το πρώτο πείραμα, με την διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκε πιο ευπαθής ποικιλία τομάτας. Έτσι λοιπόν, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές παθογένειας ανάμεσα σε φυτά όπου εφαρμόστηκε το παθογόνο και ο βιολογικός παράγοντας και σε φυτά που είχαν μολυνθεί μόνο με το παθογόνο. Τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από αυτό το πείραμα, έδειξαν ότι τα φυτά με τον βιολογικό παράγοντα και το παθογόνο εμφάνισαν πολύ λιγότερα συμπτώματα σε σύγκριση με τον μάρτυρα, καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος (Γράφημα 3).

Σχετικά με την ένταση της ασθένειας, στο δεύτερο πείραμα ο χειρισμός με το παθογόνο και τον βιολογικό παράγοντα είχε περίπου 2,5 φορές λιγότερα συμπτώματα από τον μάρτυρα με το παθογόνο ως προς το σχετικό εμβαδό ασθενείας (Γράφημα 4). Οπότε, η προστασία που φαίνεται να παρέχει στο φυτό το μη παθογόνο στέλεχος *F. oxysporum* F2 ήταν ακόμα πιο έντονη στην αλληλεπίδραση μεταξύ παθογόνου και

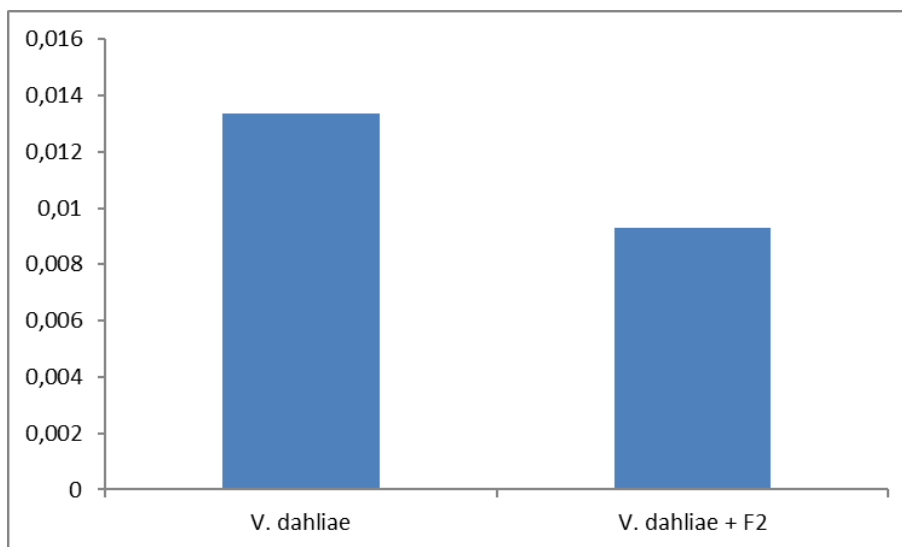


Γράφημα 3 Συγκριτική απεικόνιση της χρονικής εξέλιξης της ασθένειας στα φυτά που μολύνθηκαν με τον μύκητα *V.dahliae*. Όπου *V. dahliae*=φυτά μολυσμένα μόνο με το παθογόνο και *V. dahliae*+F2=φυτά που εφαρμόστηκε ο βιολογικός παράγοντας και το παθογόνο. Η σοβαρότητα της ασθένειας για κάθε φυτό υπολογίστηκε από τον αριθμό των φύλλων που εμφάνισαν συμπτώματα ως ποσοστό του συνολικού αριθμού φύλλων για το αντίστοιχο φυτό. Κάθε γραμμή αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο για 30 φυτά.



Γράφημα 4 Συγκριτική απεικόνιση του εμβαδού της καμπύλης εξέλιξης της ασθένειας (Cambell&Madden, 1990) για τα φυτά που εφαρμόστηκε ο βιολογικός παράγοντας και το παθογόνο (*V. dahliae*+F2) και για τα φυτά μάρτυρες (*V.dahliae*). Τα γράμματα που βρίσκονται πάνω από τις στήλες δείχνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές με βάση την μέθοδο Tukey σε επίπεδο σημαντικότητας $P < 0,05$.

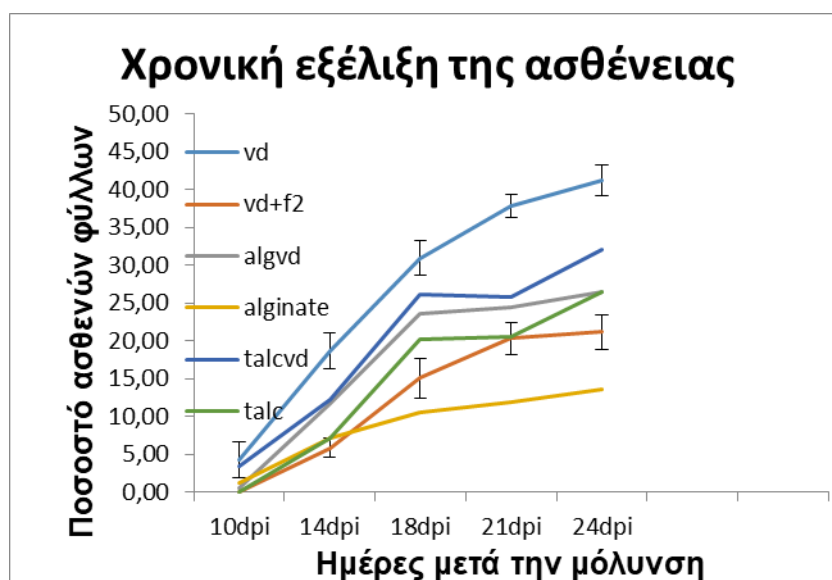
ευπαθής ποικιλίας τομάτας. Επίσης, στο γράφημα 5 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης της ενδοφυτικής παρουσίας του *V. dahliae* στα μολυσμένα φυτά τομάτας. Σύμφωνα με αυτά, η παρουσία του παθογόνου φαίνεται να ήταν μικρότερη στα φυτά που δέχτηκαν την εφαρμογή με τον βιολογικό παράγοντα.



Γράφημα 5 Ενδοφυτική ποσοτικοποίηση του μύκητα *V. dahliae* στα φυτά που δέχτηκαν μεμονωμένη ή συνδυασμένη εφαρμογή με τον F2 με την χρήση της μεθόδου *Real-time PCR*.

3.3 Πείραμα παθογένειας 3^ο

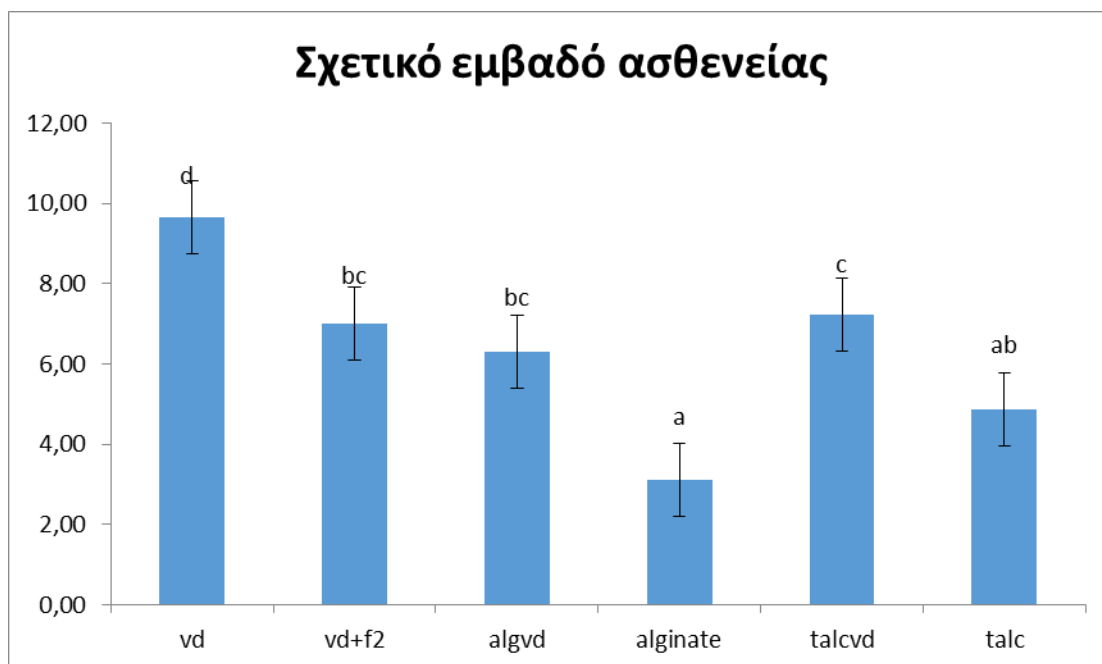
Στο τρίτο πείραμα παθογένειας, εκτός από τις επεμβάσεις των δύο προηγούμενων πειραμάτων, εξετάστηκε και η περίπτωση να εφαρμοστεί ο βιολογικός παράγοντας στο σπόρο με δύο διαφορετικά υλικά επικάλυψης (ταλκ και αλγινικό νάτριο) στην ευπαθή ποικιλία πάλι. Τα αποτελέσματα όπως απεικονίζονται στα



Γράφημα 6 Συγκριτική απεικόνιση της χρονικής εξέλιξης της ασθένειας στα φυτά που μολύνθηκαν με τον μύκητα *V.dahliae*. Όπου Vd=φυτά μάρτυρες μολυσμένα μόνο με το παθογόνο, Vd+F2=φυτά που εφαρμόστηκε ο βιολογικός παράγοντας και το παθογόνο, algvd=φυτά μάρτυρες από επικαλυμμένους σπόρους με το αλγινικό νάτριο και μολυσμένα με το παθογόνο, alginate=μολυσμένα φυτά με το παθογόνο από σπόρους επικαλυμμένους με το αλγινικό νάτριο και με τον βιολογικό παράγοντα, talc vd= φυτά μάρτυρες από επικαλυμμένους σπόρους με talc και μολυσμένα με το παθογόνο, και talc= μολυσμένα φυτά με το παθογόνο από σπόρους επικαλυμμένους με talc και με τον βιολογικό παράγοντα. Η σοβαρότητα της ασθένειας για κάθε φυτό υπολογίστηκε από τον αριθμό των φύλλων που εμφάνισαν συμπτώματα ως ποσοστό του συνολικού αριθμού φύλλων για το αντίστοιχο φυτό. Κάθε γραμμή αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο για 30 φυτά.

παρακάτω γραφήματα 6 και 7, δείχνουν ότι το μη παθογόνο *F.oxysporum* F2 εξακολούθησε να παρουσιάζει την θετική του δράση, όπως στα δύο προηγούμενα πειράματα. Επιπλέον όμως, φάνηκε πως όταν επικαλύπτει τον σπόρο μπορεί να προστατεύσει το φυτό από το βερτισίλλιο με ακόμα καλύτερα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, τα συμπτώματα που εμφανίστηκαν στα φυτά των επεμβάσεων όπου επικαλύφθηκαν οι σπόροι με αλγινικό νάτριο και τον βιολογικό παράγοντα, ήταν στατιστικά λιγότερα από τους μάρτυρες και από τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Ωστόσο, ο επόμενος χειρισμός που εμφάνισε λιγότερα συμπτώματα ήταν τα φυτά από επικαλυμμένους σπόρους με talc και με τον βιολογικό παράγοντα. Γεγονός που ίσως να δείχνει ότι τα υλικά επικάλυψης συνέβαλαν κατά κάποιο τρόπο, στην εμφάνιση

λιγότερων συμπτωμάτων ή ακόμα και να ενίσχυσαν τον μηχανισμό δράσης του βιολογικού παράγοντα.



Γράφημα 7 Συγκριτική απεικόνιση του εμβαδού της καμπύλης εξέλιξης της ασθένειας (Cambell & Madden, 1990) για τα φυτά που εφαρμόστηκε ο βιολογικός παράγοντας και το παθογόνο και για τα φυτά μάρτυρες. Όπου Vd=φυτά μάρτυρες μολυσμένα μόνο με το παθογόνο, Vd+F2=φυτά που εφαρμόστηκε ο βιολογικός παράγοντας και το παθογόνο, algvd=φυτά μάρτυρες από επικαλυμμένους σπόρους με το αλγινικό νάτριο και μολυσμένα με το παθογόνο, alginate=μολυσμένα φυτά με το παθογόνο από σπόρους επικαλυμμένους με το αλγινικό νάτριο και με τον βιολογικό παράγοντα, talc vd= φυτά μάρτυρες από επικαλυμμένους σπόρους με talc και μολυσμένα με το παθογόνο, και talc= μολυσμένα φυτά με το παθογόνο από σπόρους επικαλυμμένους με talc και με τον βιολογικό παράγοντα. Τα γράμματα που βρίσκονται πάνω από τις στήλες δείχνουν τις στατιστικές σημαντικές διαφορές με βάση την μέθοδο Tukey σε επίπεδο σημαντικότητας $P < 0,05$.

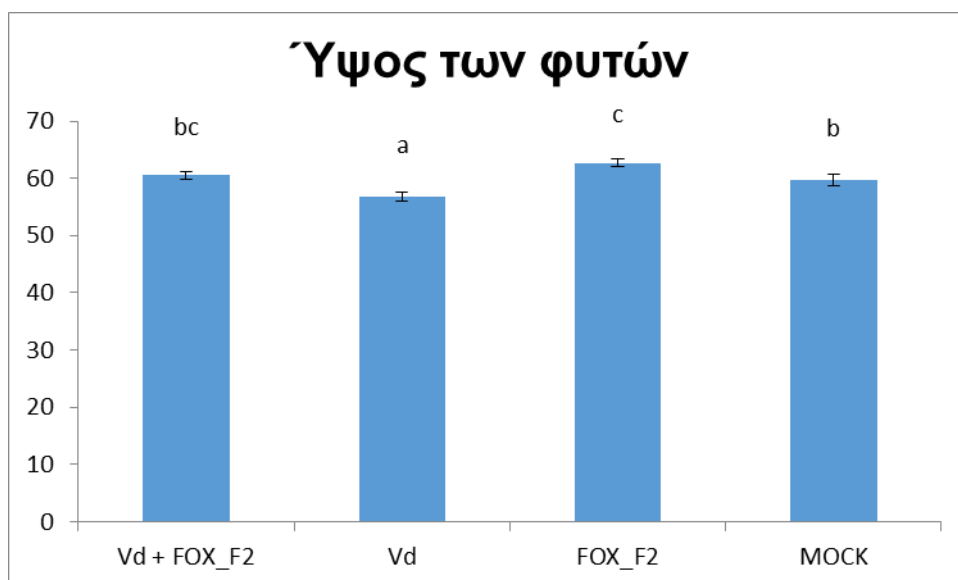
3.4 Μετρήσεις νωπού βάρους και ύψους των φυτών

Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, με το τέλος της καταγραφής των συμπτωμάτων ακολουθούσε η μέτρηση του νωπού βάρους και του ύψους των φυτών.

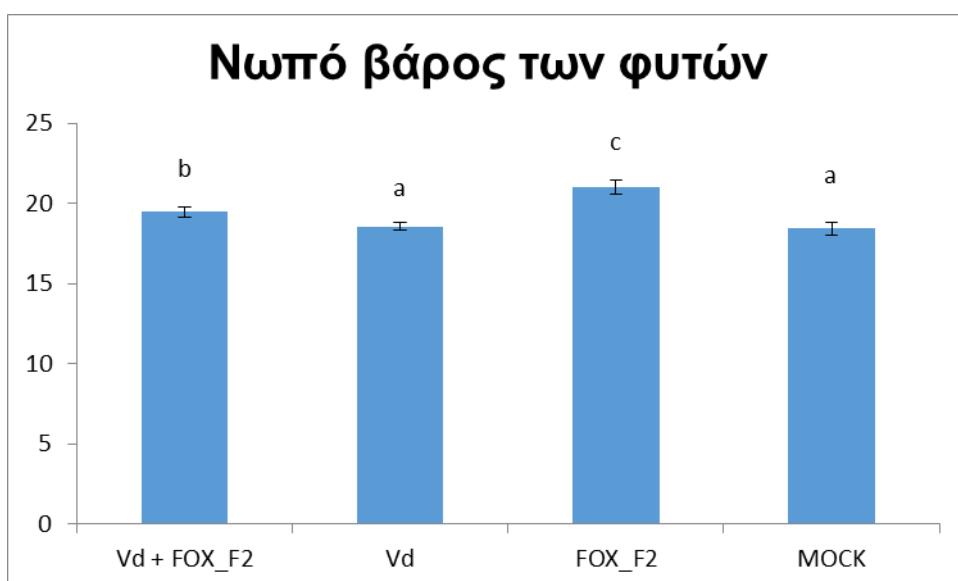
Στα γραφήματα 8 και 9, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του πρώτου πειράματος. Όσον αφορά το νωπό βάρος των φυτών, τα φυτά με τον βιολογικό παράγοντα είχαν το υψηλότερο νωπό βάρος, ενώ τις αμέσως επόμενες στατιστικά υψηλές τιμές είχαν τα φυτά που εφαρμόστηκε το παθογόνο μαζί με τον βιολογικό παράγοντα. Τα φυτά που δεν μολύνθηκαν (mock) και τα φυτά μόνο με το παθογόνο, είχαν το χαμηλότερο νωπό βάρος, ενώ μεταξύ τους δεν υπήρχε στατιστική διαφορά.

Παρόμοια αποτελέσματα έδειξαν οι χειρισμοί και στην μέτρηση του ύψους των φυτών. Το χαμηλότερο ύψος το είχαν οι μάρτυρες με το παθογόνο, ενώ το

υψηλότερο το είχαν οι μάρτυρες με τον βιολογικό παράγοντα. Τα φυτά που μολύνθηκαν με το παθογόνο και εφαρμόστηκε ο βιολογικός παράγοντας είχαν και



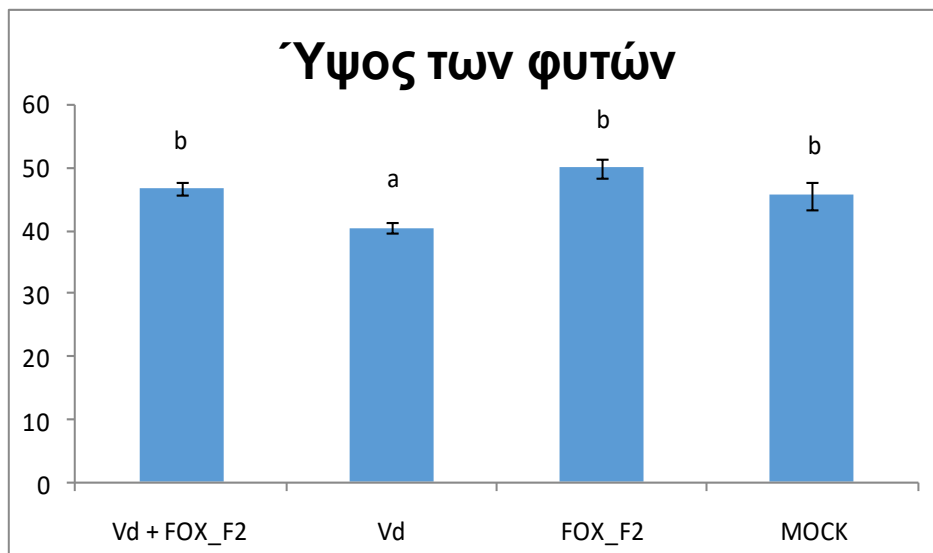
Γράφημα 8 Συγκριτική απεικόνιση των μέσων όρων του ύψους κάθε χειρισμού. Όπου Vd = φυτά μάρτυρες μολυσμένα μόνο με το παθογόνο, Vd+FOX_F2 = φυτά που εφαρμόστηκε ο βιολογικός παράγοντας και το παθογόνο, FOX_F2 = φυτά μάρτυρες με τον βιολογικό παράγοντα, και MOCK = φυτά που δεν μολύνθηκαν.



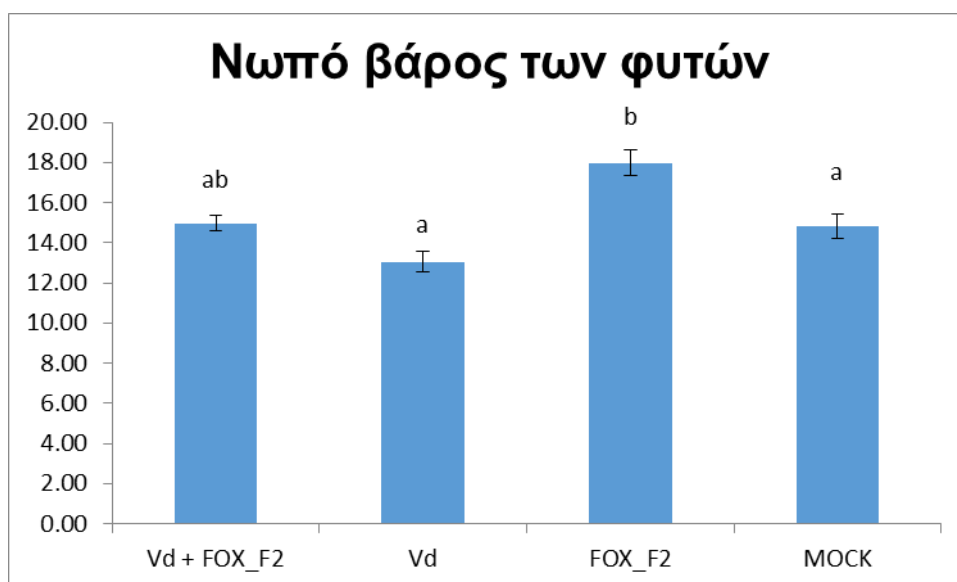
Γράφημα 9 Συγκριτική απεικόνιση των μέσων όρων του νωπού βάρους κάθε χειρισμού. Όπου Vd = φυτά μάρτυρες μολυσμένα μόνο με το παθογόνο, Vd+FOX_F2 = φυτά που εφαρμόστηκε ο βιολογικός παράγοντας και το παθογόνο, FOX_F2 = φυτά μάρτυρες με τον βιολογικό παράγοντα, και MOCK = φυτά που δεν μολύνθηκαν.

αυτά υψηλό μέσο όρο ύψους, καθώς στατιστικά βρέθηκαν μεταξύ φυτών που εφαρμόστηκε το στέλεχος F2 και φυτών που δεν μολύνθηκαν.

Στα γραφήματα 10 και 11, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του δεύτερου πειράματος. Με τα φυτά τομάτας της ευπαθής ποικιλίας, παρότι υπήρξαν διαφορές



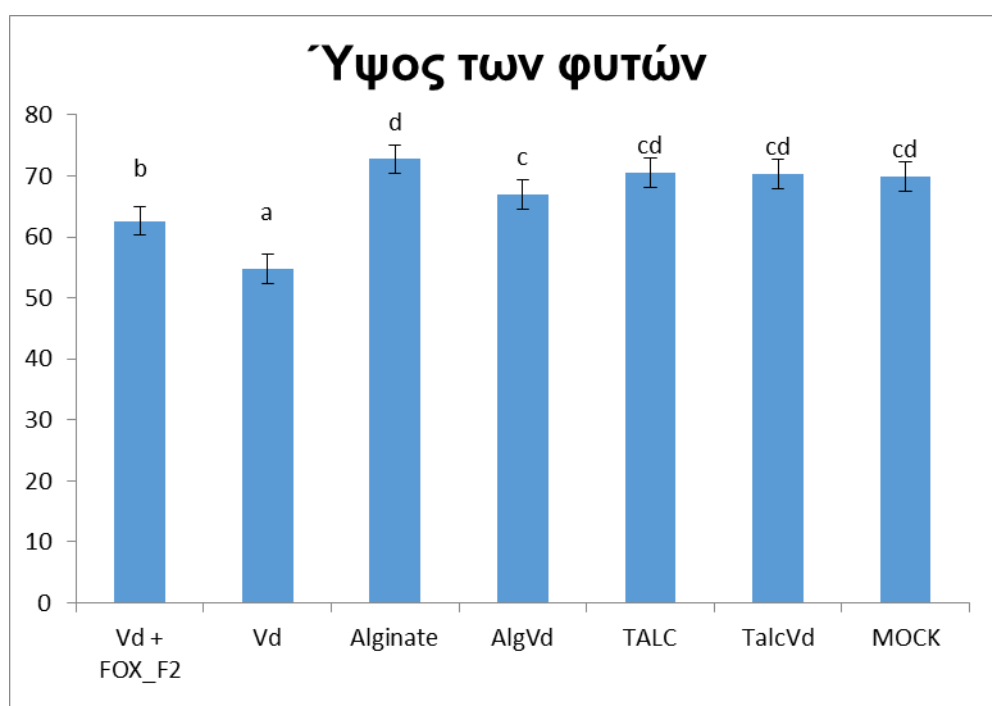
Γράφημα10 Συγκριτική απεικόνιση των μέσων όρων του ύψους κάθε χειρισμού. Όπου Vd = φυτά μάρτυρες μολυσμένα μόνο με το παθογόνο, Vd+FOX_F2 = φυτά που εφαρμόστηκε ο βιολογικός παράγοντας και το παθογόνο, FOX_F2 = φυτά μάρτυρες με τον βιολογικό παράγοντα, και MOCK = φυτά που δεν μολύνθηκαν.



Γράφημα 11 Συγκριτική απεικόνιση των μέσων όρων του νωπού βάρους κάθε χειρισμού. Όπου Vd = φυτά μάρτυρες μολυσμένα μόνο με το παθογόνο, Vd+FOX_F2 = φυτά που εφαρμόστηκε ο βιολογικός παράγοντας και το παθογόνο, FOX_F2 = φυτά μάρτυρες με τον βιολογικό παράγοντα, και MOCK = φυτά που δεν μολύνθηκαν.

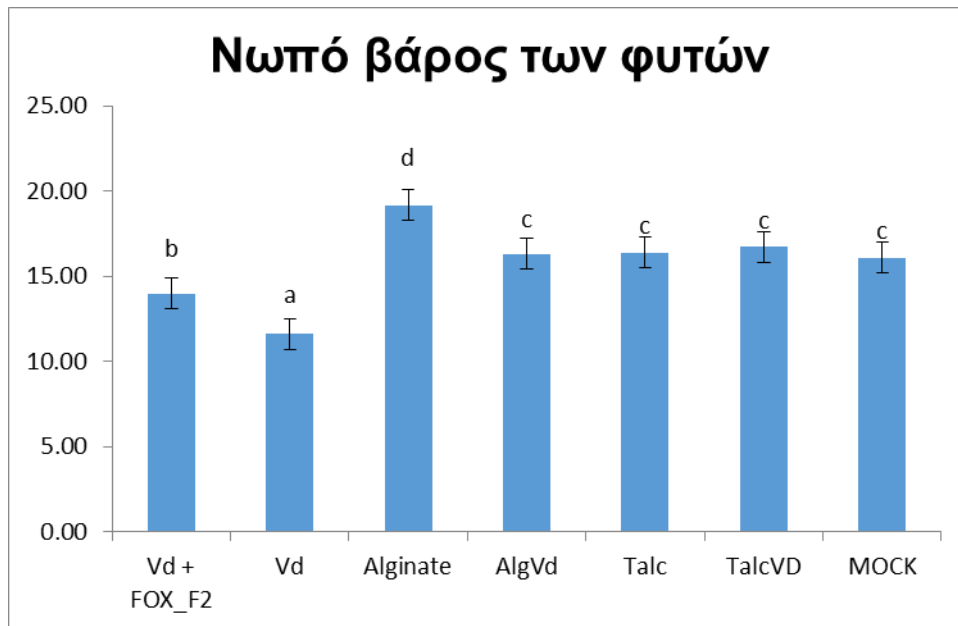
στο ύψος και στο νωπό βάρος, δεν διέφεραν εξίσου σημαντικά με τα φυτά της ποικιλίας που χρησιμοποιήθηκε στο πρώτο πείραμα. Συγκεκριμένα, οι μέσοι όροι του ύψους των χειρισμών που εφαρμόστηκε ο βιολογικός παράγοντας στατιστικά δεν διέφεραν, ενώ ο μάρτυρας με το παθογόνο είχε τις χαμηλότερες τιμές. Από τις μετρήσεις του νωπού βάρους, ο χειρισμός με το στέλεχος F2 είχε στατιστικά τις μεγαλύτερες τιμές. ενώ ο μάρτυρας με το παθογόνο και τα mock είχαν το χαμηλότερο νωπό βάρος χωρίς να διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Από την άλλη, ο χειρισμός με τον βιολογικό παράγοντα και το παθογόνο δεν διέφερε σημαντικά από τους υπόλοιπους χειρισμούς.

Στο τρίτο πείραμα, το μεγαλύτερο ύψος είχαν τα φυτά από επικαλυμμένους σπόρους με το αλγινικό νάτριο και το EGFP-F2 που μολύνθηκαν με το βερτισίλλιο, ενώ το χαμηλότερο ύψος είχαν οι μάρτυρες με το παθογόνο (Γράφημα 12). Οι αμέσως επόμενες υψηλότερες τιμές, δόθηκαν από τα mock και από τους δύο χειρισμούς με ταλκ. Παρόμοιες τιμές είχε και ο μάρτυρας από επικαλυμμένους σπόρους με αλγινικό νάτριο που εφαρμόστηκε το παθογόνο. Σχετικά με τον χειρισμό που εφαρμόστηκε το βερτισίλλιο και το μετασχηματισμένο στέλεχος, οι τιμές για το ύψος ήταν αρκετά χαμηλές, παρ' όλο που στατιστικά ήταν πιο υψηλές από τον μάρτυρα με το παθογόνο.



Γράφημα 12 Συγκριτική απεικόνιση των μέσων όρων του ύψους κάθε χειρισμού. Όπου Vd=φυτά μάρτυρες μολυσμένα μόνο με το παθογόνο, Vd+F2=φυτά που εφαρμόστηκε ο βιολογικός παράγοντας και το παθογόνο, algvd=φυτά μάρτυρες από επικαλυμμένους σπόρους με το αλγινικό νάτριο και μολυσμένα με το παθογόνο, alginate=μολυσμένα φυτά με το παθογόνο από σπόρους επικαλυμμένους με το αλγινικό νάτριο και με τον βιολογικό παράγοντα, talcvd= φυτά μάρτυρες από επικαλυμμένους σπόρους με talc και μολυσμένα με το παθογόνο, talc= μολυσμένα φυτά με το παθογόνο από σπόρους επικαλυμμένους με ταλκ και με τον βιολογικό παράγοντα, και mock= φυτά που δεν μολύνθηκαν.

Αντίστοιχα αποτελέσματα έδειξαν οι χειρισμοί για το νωπό βάρος. Το μεγαλύτερο ύψος είχαν πάλι τα φυτά από επικαλυμμένους σπόρους με το αλγινικό νάτριο και το F2 που μολύνθηκαν με το βερτισίλλιο, ενώ το χαμηλότερο ύψος είχαν οι μάρτυρες με το παθογόνο (Γράφημα 13). Οι αμέσως επόμενες υψηλότερες τιμές, δόθηκαν από τα mock, από τους δύο χειρισμούς με ταλκ και από το μάρτυρα με το αλγινικό νάτριο που εφαρμόστηκε το παθογόνο. Επίσης, ο χειρισμός που εφαρμόστηκε το βερτισίλλιο και το μετασχηματισμένο στέλεχος είχε σχετικά χαμηλές



Γράφημα 13 Συγκριτική απεικόνιση των μέσων όρων του ύψους κάθε χειρισμού. Όπου Vd=φυτά μάρτυρες μολυσμένα μόνο με το παθογόνο, Vd+F2=φυτά που εφαρμόστηκε ο βιολογικός παράγοντας και το παθογόνο, algvd=φυτά μάρτυρες από επικαλυμμένους σπόρους με το αλγινικό νάτριο και μολυσμένα με το παθογόνο, alginate=μολυσμένα φυτά με το παθογόνο από σπόρους επικαλυμμένους με το αλγινικό νάτριο και με τον βιολογικό παράγοντα, talcnd= φυτά μάρτυρες από επικαλυμμένους σπόρους με talc και μολυσμένα με το παθογόνο, talc= μολυσμένα φυτά με το παθογόνο από σπόρους επικαλυμμένους με talc και με τον βιολογικό παράγοντα, και mock= φυτά που δεν μολύνθηκαν.

τιμές, παρ' όλο που στατιστικά ήταν πάλι πιο υψηλές από τον μάρτυρα με το παθογόνο.

Στις παρακάτω εικόνες, απεικονίζονται οι χειρισμοί που εφαρμόστηκε ο βιολογικός παράγοντας και το παθογόνο σε σύγκριση με τον μάρτυρα που εφαρμόστηκε το παθογόνο (Εικόνες 3.1 - 3.4).



Εικόνα 3-1 Πείραμα δεύτερο. Αριστερά ο μάρτυρας με το παθογόνο και δεξιά ο χειρισμός που εφαρμόστηκε ο βιολογικός παράγοντας και το παθογόνο.



Εικόνα 3-2 Πείραμα τρίτο. Αριστερά ο μάρτυρας με το παθογόνο και δεξιά φυτά από σπόρους επικαλυμμένους με το αλγινικό νάτριο και τον βιολογικό παράγοντα που μολύνθηκαν με το παθογόνο.



Εικόνα 3-3 Πείραμα τρίτο. Αριστερά ο μάρτυρας με το παθογόνο και δεξιά ο χειρισμός που εφαρμόστηκε το παθογόνο και ο βιολογικός παράγοντας.



Εικόνα 3-4 Τρίτο πείραμα. Αριστερά ο μάρτυρας με το παθογόνο και δεξιά φυτά από σπόρους επικαλυμμένους με ταλκ και τον βιολογικό παράγοντα που μολύνθηκαν με το παθογόνο.

4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η βερτισιλλίωση που προκαλείται από τον εδαφογενή μύκητα *V. dahliae* αποτελεί σοβαρότατη ασθένεια για ένα πλήθος φυτών που είναι ξενιστές του παθογόνου. Η εναλλαγή των καλλιεργειών με ποικιλίες ευαίσθητες στο παθογόνο, είναι μία διαδικασία που οδηγεί στην αέναη διατήρηση των μολυσμάτων στο έδαφος και στην επαναμόλυνση των ξενιστών φυτών από τις διαχειμάζουσες μορφές (μικροσκληρώτια) του μύκητα που επιβιώνουν στο έδαφος.

Με την κατάργηση των περισσότερων χημικών απολυμαντικών εδάφους, όπως το βρωμιούχο μεθύλιο, η χημική καταπολέμηση του μύκητα είναι ανύπαρκτη. Επομένως, η αντιμετώπιση του μύκητα έγκειται στα προληπτικά καλλιεργητικά μέτρα, στην εφαρμογή της ηλιοαπολύμανσης, στην καλλιέργεια ανθεκτικών ή ανεκτικών ποικιλιών και στην χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού (Τζάμος, 2007).

Τα τελευταία χρόνια, έχουν ανακαλυφθεί αρκετοί βιολογικοί παράγοντες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο των αδρομυκώσεων και να συμβάλλουν στην εμφάνιση λιγότερων συμπτωμάτων στα φυτά. Οι μηχανισμοί δράσης που φαίνεται να έχουν οι βιολογικοί παράγοντες είναι, ο ανταγωνισμός για θρεπτικά συστατικά, ο ανταγωνισμός για θέση στην ριζόσφαιρα και για την είσοδο στο ριζικό σύστημα του φυτού, ο παρασιτισμός του παθογόνου και η αδρανοποίηση ενζύμων του που οδηγεί στην μείωση ή στην απώλεια της μολυσματικότητας του, η αντιβίωση που δημιουργεί ο βιολογικός παράγοντας με την παραγωγή τοξικών μεταβολιτών για το παθογόνο, καθώς και η επαγωγή μηχανισμών άμυνας του φυτού ξενιστή.

Οι βιολογικοί παράγοντες που έχουν χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση του *V. dahliae*, ως επί το πλείστον, ανήκουν στα γένη *Pseudomonas* και *Bacillus*. Ωστόσο, έχουν μελετηθεί και μη παθογόνα στελέχη του μύκητα *F.oxysporum* (C5, C14, Fo47, κ.α.) που έχουν επιφέρει θετικά αποτελέσματα εναντίον του παθογόνου. Ο μηχανισμός δράσης τους φαίνεται να είναι είτε ο ανταγωνισμός για θρεπτικά στοιχεία στο έδαφος και στην ριζόσφαιρα (Mandeeel & Baker, 1991, Larkin & Fravel, 1999) ή ο παρασιτισμός του παθογόνου είτε ο ανταγωνισμός για την είσοδο στο ριζικό σύστημα των φυτών.

Το μη παθογόνο στέλεχος *Fusarium oxysporum* F2 που απομονώθηκε από ένα τροποποιημένο είδος κομπόστας, διαπιστώθηκε ότι μειώνει τα συμπτώματα της βερτισιλλίωσης που προκαλεί ο *Verticillium dahliae* σε φυτά μελιτζάνας τόσο στην

ύπαιθρο όσο και στο θερμοκήπιο (Malandraki et al., 2008, Gizi et al., 2011, Pantelides et al., 2009). Συγκεκριμένα, οι Malandraki et al. το 2008, έδειξαν την αποτελεσματικότητα του μη παθογόνου στελέχους F2 σε πειράματα που έγιναν στο θερμοκήπιο, αλλά και στον αγρό. Σε αυτά τα πειράματα, η εφαρμογή του F2 μείωσε την σχετική AUDPC σχεδόν 4 φορές, σε σύγκριση με τον μάρτυρα.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη, δείχνουν την προστατευτική δράση του βιολογικού παράγοντα F2 και οδηγούν σε κοινά συμπεράσματα με άλλες δημοσιευμένες εργασίες (Pantelides et al., 2009, κ.α.). Συγκεκριμένα, στα πειράματα παθογένειας, το F2 μείωσε τα συμπτώματα της βερτισιλλίωσης σε όλες τις επεμβάσεις που εφαρμόστηκε είτε με ριζοπότισμα είτε με επικάλυψη σπόρων, σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Ιδιαίτερα όμως, στις επεμβάσεις που εφαρμόστηκε με τα υλικά επικάλυψης στους σπόρους, τα συμπτώματα της ασθένειας μειώθηκαν περισσότερο και από τις επεμβάσεις που εφαρμόστηκε με ριζοπότισμα.

Ακόμα, στα αποτελέσματα των μετρήσεων του ύψους και του νωπού βάρους των φυτών, οι χειρισμοί με τον βιολογικό παράγοντα είχαν αρκετά υψηλές τιμές, ειδικά στον χειρισμό που εφαρμόστηκε το αλγινικό νάτριο, σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Αντίστοιχες υψηλές τιμές, καταγράφηκαν και στις περιπτώσεις των φυτών που οι σπόροι τους επικαλύφθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες για να ελεγχθεί η επίδραση των υλικών επικάλυψης στο φυτό και στο παθογόνο. Γεγονός που δείχνει, ότι τα υλικά επικάλυψης συμβάλλουν στον έλεγχο της ασθένειας.

Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο, η βλάστηση των επικαλυμμένων σπόρων παρουσίασε μία καθυστέρηση. Η βλάστηση σπόρων με επικάλυψη ταλκ, ξεκίνησε 3 ημέρες μετά την σπορά, ενώ οι επικαλυμμένοι σπόροι με αλγινικό νάτριο καθυστέρησαν 10 ημέρες, ανεξάρτητα από το αν είχε εφαρμοστεί ο βιολογικός παράγοντας. Παρ' όλα αυτά, τα φυτά από επικαλυμμένους σπόρους με το αλγινικό νάτριο και τον βιολογικό παράγοντα που εφαρμόστηκε το παθογόνο, είχαν την μεγαλύτερη ανάπτυξη και στο νωπό βάρος και στο ύψος.

Από τα αποτελέσματα αυτά, επιβεβαιώνεται η ανταγωνιστική δράση του μη παθογόνου στελέχους *F. oxysporum* F2 εναντίον του παθογόνου *V. dahliae* και συμπεραίνεται η αποτελεσματική επίδραση των υλικών επικάλυψης σε συνδυασμό με το F2. Οι Pantelides et al. το 2009, χρησιμοποίησαν μετασηματισμένα στελέχη από τον *V. dahliae* και το F2, για να μελετήσουν την παρουσία τους στην ριζόσφαιρα των φυτών μελιτζάνας. Τα αποτελέσματα τους έδειξαν ότι ο κύριος μηχανισμός δράσης

του F2 εναντίον του *V. dahliae* είναι ο ανταγωνισμός για χώρο ή θρεπτικά στοιχεία στην επιφάνεια της ρίζας και ακόμη πως η εφαρμογή του συντελεί στην μείωση των συμπτωμάτων και στον έλεγχο της ασθένειας. Σε αντίστοιχα συμπεράσματα, καταλήγουν τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής, καθώς όσα φυτά δέχτηκαν την εφαρμογή του βιολογικού παράγοντα F2 είχαν στατιστικά λιγότερα συμπτώματα από τον μάρτυρα με το φυτοπαθογόνο. Επιπρόσθετα, η εφαρμογή του F2 με ταλκ ή αλγινικό νάτριο στο σπόρο φαίνεται να είναι αποτελεσματικότερη, ενώ είναι πιθανόν να διεγείρει μηχανισμούς που προωθούν την ανάπτυξη των φυτών και την προστασία των φυτών από παθογόνα.

Τα προβλήματα που μπορούν να δημιουργηθούν από την χρήση βιολογικών παραγόντων, συνήθως σχετίζονται με την έλλειψη σταθερότητας που έχουν όσον αφορά την εφαρμογή τους. Για αυτόν τον λόγο, είναι ελάχιστα τα σκευάσματα που κυκλοφορούν στο εμπόριο για την αντιμετώπιση σοβαρών ασθενειών.

Πέρα από τις εφαρμογές που θα πρέπει να γίνουν στον αγρό, θα πρέπει να γίνει και μεγαλύτερη εμβάθυνση στον τρόπο δράσης του μη παθογόνου στελέχους *F. oxysporum* F2 εναντίον του *V. dahliae*. Επίσης, σημαντικό είναι να διευκρινιστεί εάν αυτός ο βιολογικός παράγοντας είναι μη παθογόνος και σε άλλα είδη φυτών.

Επιπλέον, ενδιαφέρον θα ήταν να εξεταστεί στο μέλλον η διασυστηματική επαγόμενη αντοχή που πιθανόν να ενεργοποιείται με την εφαρμογή του F2. Παράλληλα, θα μπορούσαν να δοκιμασθούν και άλλοι τρόποι επικάλυψης των σπόρων με τον βιολογικό παράγοντα.

Καταλήγοντας, η ικανότητα του F2 να μειώνει την εμφάνιση συμπτωμάτων μιας ασθένειας ή να συμβάλλει στην αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων, διαπιστώθηκε σε διάφορες μελέτες, συμπεριλαμβανομένης της παρούσας. Επομένως, με την διεξαγωγή και άλλων πιο σύνθετων ερευνών, όπου θα εξετάζονται περισσότεροι παράμετροι και θα χρησιμοποιούνται περισσότερες μοριακές μέθοδοι, θα έχουμε την δυνατότητα να διερευνήσουμε σε μεγαλύτερο βάθος την αλληλεπίδραση του F2 με το φυτό ή ακόμα και με τον παθογόνο μύκητα *V. dahliae*. Τέλος, θα πρέπει να τονίσουμε την σημαντικότητα της εφαρμογής πειραμάτων στον αγρό, καθώς πολλές είναι οι φορές που τα αποτελέσματα των πειραμάτων του εργαστηρίου και του θερμοκηπίου διαφέρουν από αυτά του αγρού.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση

- Agrios, G.N. (2005). Plant Pathology. Elsevier, Ca, Academy Press. Recent advances in biological control of *Fusarium* wilts. Pesticide sciences 37: 365-373.
- Barbara D. J., and Clewes E., 2003. Review: Plant pathogenic *Verticillium* species: how many of them are there? Molecular Plant Pathology, 4 (4): 297-305.
- Biles CL, Martyn RD. 1989. Local and systemic resistance induced in watermelons by forma especiales of *Fusarium oxysporum* Phytopathology 79: 856-860.
- Campbell C.L., Madden L.V., 1990. Introduction to plant disease epidemiology. Wiley- Interscience, New York pp: 532.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B., 1983. A plant DNA miniprep: version 2. Plant Molecular Biology Reporter 1, 19–21.
- Fousia S., Tjamos S.E., and Paplomatas E.J. 2015. *Bacillus subtilis* QST 713 Confers Protection to Tomato Plants Against *Pseudomonas syringae* pv tomato and Induces Plant Defence-related Genes.
- Fradin E., and Thomma B., 2006. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. Molecular Plant Pathology, 7 (2): 71-86.
- Fravel D.R., Larkin R.P., 2002. Reduction of fusarium wilt hydroponically-grow basil by *Fusarium oxysporum* strain CS-20. Crop protection 21:539-543.
- Garrett SD. 1970. Pathogenic root-infection fungi. London, UK: Cambridge University Press.
- Gerlach K.S, Bentley S, Moore N.Y, Aitken E.A.B, Pegg K.G. 1999. Investigation of Non-Pathogenic Strains of *Fusarium oxysporum* for Suppression of *Fusarium* Wilt of Banana in Australia, 28. In: Alabouvette C, ed. Second International *Fusarium* Workshop. Dijon, France: INRA-CMSE, 54.
- Gizi D., Striglis I.A., Tjamos S.E., and Paplomatas E.J. 2011. Seedling vaccination by stem injecting a conidial suspension of F2, a non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strain, suppresses *Verticillium* wilt of eggplant.

- Gordon – Weeks R, Sugars JM, Antoniw JF, White RF. 1997. Accumulation of a novel PR1 protein in *Nicotiana Langsdorfi* in response to virus infection of treatment with salicylic acid. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 50: 263 + 273.
- Klebahn, H. (1913). Beitrag zur Kenntnis der fungi Imperfecti I. Eine Verticillium-Krankheit auf Dahliaen. *Mycologisches Zentralblatt* 3: 49-66.
- Kloeppen, J.W., and Schroth, M.N. (1981). Relationship of in vitro antibiosis of plant growth promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. *Phytopathology* 71:1020-1024.
- Kroon B.A., Scheffer R.J., Elgersma D.M. 1992. Induced resistance in tomato plants against *Fusarium* wilt involved by *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 97:401-408.
- Larkin RP., Hopkins DL., Martin FN. 1993a. Effect of successive watermelon plantings on *Fusarium oxysporum* and other microorganisms in soils suppressive and conducive to *Fusarium* wilt of watermelon. *Phytopathology* 83: 1097-1105.
- Larkin RP., Hopkins DL., Martin FN. 1993b. Ecology of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in soils suppressive and conducive to *Fusarium* wilt of watermelon. *Phytopathology* 83:1105-1116.
- Larkin RP., Hopkins DL., Martin FN. 1996. Suppression of *Fusarium* wilt of watermelon by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other microorganisms recovered from a disease suppressive soil. *Phytopathology* 86: 812-819.
- Lemanceau, P., Alabouvette, C., 1991. Biological control of fusarium diseases by fluorescent *Pseudomonas* and non-pathogenic *Fusarium*. *Crop Protection* 10, 279–286.
- Lemanceau, P., Bakker, P.A.H.M., De Kogel, W.J., Alabouvette, C., Schippers, B., 1993. Antagonistic effect on nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 and pseudobactin 358 upon pathogenic *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 74–82.

- Lynch D.R., Kawchuck L.M., and Hackey J., 1997. Identification of a gene conferring high levels of resistance to *Verticillium* wilt in solanum chacoense. *Plant Disease*, 81:1001-1014.
- Mandeel, Q., Baker, R., 1991. Mechanisms involved in biological control of *Fusarium* wilt of cucumber with strains of non pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 81, 462–469.
- Melouk, H.A. (1992). *Verticillium*. In methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. Pp. 175-178.
- Minuto A, Migheli Q, Garibaldi A. 1995. Evaluation of antagonistic strains of *Fusarium* spp. in the biological and integrated control of *Fusarium* wilt of cyclamen. *Crop Protection* 14: 221–226
- Olivain, C., Humbert, C., Nahalkova, J., Fatehi, J., L'Harridon, F., Alabouvette, C., 2006. Colonization of tomato root by pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strains inoculated together and separately into the soil. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1523–1531.
- Olsson S., and Nordbring – Mertz B., 1985. Microsclerotial germination of *Verticillium dahliae* as affected by rape rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 31: 293-299.
- Pegg G.f. 1981, Biochemistry and physiology of pathogenesis. In: Mace, M.E., Bell, A.A., Beckman, C.H. (Eds), *Fungal wilt Diseases of Plants*. Academic Press, New York, p. 193-253.
- Pegg G.F., 1989 Pathogenesis in vascular diseases of plants. In: Tjamos, E.C., and Beckman, C.H. (Eds), *vascular wilt diseases of plants*. Springer – Verlag, Berlin, p. 51-94.
- Pantelides I.S., Tjamos S.E., Striglis I.A. Chatzipavlidis I., and Paplomatas E.J. 2009. Mode of action of a non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strain against *Verticillium dahliae* using Real Time qPCR analysis and biomarker transformation.
- Pantelides I.S., Tjamos S.E., and Paplomatas E.J. 2009. Ethylene perception via ETR1 is required in *Arabidopsis* infection by *Verticillium dahliae*.

- Reinke, J. and Berthold, G. (1879) Die zersefung der kartoffel durchpilze. Untersuchungen Aus Dem Bot. Laboratorium Universitaf Gottingen 1: 67-96.
- Rowe, R.C. (1985). Potato early dying-a serius threat to the potato industry. Am. Potato J. 62: 157-161.
- Schnathorst W.C., 1981. Life cycle and epidemiology of *Verticillium*. In fungal wilt Diseases of Plants (MaCl, M.E., Bell, A.A. and Beckman, C.H. eds), New York: Academic Press, p. 81-111.
- Subbarao, K.V., Kabin, Z., Martin, F.N., and Koike, S.T. (2007) Management of soilborne diseases in strawberry using vegetable rotations. Plant Di 91: 964-972.
- Tezuka N, Makino T. 1991. Biological control of *Fusarium* wilt of strawberry by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* isolated from strawberry. Annals of Phytopathology Society of Japan 57: 506–511
- Thomashow, L.S., Bonsall, R.P., and Weller, D.M. (2002). Antibiotic production by soiland rhizosphere unkrobes in situ. Pages 638-647 in: Manual of Enviromental Microbiology (2ndEd), ASM Press, Washington DC.
- Tjamos, E.C., Biris, D.A., and Paplomatas, E.J. (1991). Recovery of olive trees with *Verticillium* wilt after individual application of soil solarization in established olive orchards. Plant Disease 75: 557-562.
- Tjamos, S.E., Flemetakis, E., Paplomatas, E.J., and Katinakis, P. (2005). Induction of resistance to *Verticillium dahliae* in *Arabidopsis thaliana* by the biocontrol agent K165 and pathogenesis – related proteins gene expression: Mol. Plant Microb in.18: 555-561.
- Varlad G.E., and Subbarao K.V., 2008. Colonization of Resistant and Susceptible Lettuce Cultivars bya Green Fluorescent Protein-Tagged Isolate of *Verticillium dahliae*. Phytopathology, 98: 871-885.
- Zare, R. and Gams, W. (2001). A revision of *Verticillium* section Prostata. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen.nov. Nova Hedwigia 73Q 1-50.

Ελληνική

- Παναγόπουλος, Χ.Γ. (2007). Ασθένειες καρποφόρων δένδρων και αμπέλων. Εκδόσεις ΑΘ. Σταμούλης, Αθήνα.
- Τζάμος Ε.Κ. (2007). Φυτοπαθολογία. Εκδόσεις ΑΘ. Σταμούλης, Αθήνα.

Διαδικτυακή

<https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/MPMI-18-0555>

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>