ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΑ ΣΥΣΤΗΜΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΚΑΙ
ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Βιολογική αντιμετώπιση του μύκητα *Rhizoctonia solani* σε φυτά βαμβακιού απο το φυτοπραστευτικό στέλεχος P*aenibacillus alvei* K165

Κυριάκος Β. Βαβαρούτσος

Επιβλέπων καθηγητής:
Σωτήρης Τζάμος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ
2021

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Βιολογική αντιμετώπιση του μύκητα *Rhizoctonia solani* σε φυτά βαμβακιού απο το φυτοπροστατευτικό στέλεχος *Paenibacillus alvei* K165

"Biological treatment of *Rhizoctonia solani* fungus in cotton plants by the plant strain *Paenibacillus alvei* K165"

Κυριάκος Β. Βαβαρούτσος

Εξεταστική Επιτροπή:
Σωτήρης Τζάμος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)
Επαμεινώνδας Παπλωματάς, Καθηγητής ΓΠΑ
Αλίκη Τζίμα, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

Βιολογική αντιμετώπιση του μύκητα Rhizoctonia solani σε φυτά βαμβακιού από το φυτοπροστατευτικό στέλεχος Paenibacillus alvei K165

ΠΜΣ Ολοκληρωμένα Συστήματα Φυτοπροστασίας και Διαχείρισης Περιβάλλοντος
Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής
Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι σηψιρριζίες αποτελούν μερικά από τα πιο σημαντικά προβλήματα σε πολλές καλλιέργειες και προκαλούνται από εδαφογενείς μύκητες που προσβάλλουν τις περισσότερες φορές νεαρά φυτά. Ο μύκητας *Rhizoctonia solani* είναι ένας από τους σημαντικότερους μύκητες που προκαλούν σηψιρριζίες κυρίως σε νεαρά φυτά και ένας από τους σπουδαιότερους ξενιστές τους το βαμβάκι. Τα τελευταία χρόνια γίνονται εντατικές προσπάθειες για την εύρεση βιολογικών παραγόντων τα οποία θα ανταγωνίζονται εδαφογενή παθογόνα προκειμένου να μειωθεί η χημική καταπολέμηση. Στην παρούσα εργασία στόχος ήταν η παρατήρηση της αλληλεπίδρασης του στελέχους K165 του βακτηρίου *Paenibacillus alvei* στην πρόληψη/καταστολή έναντι μυκητολογικών ασθενειών που προσβάλλουν την καλλιέργεια του βαμβακιού και πιο συγκεκριμένα της ριζοκτονίας που προκαλείται από τον μύκητα *Rhizoctonia solani.* Από την επεξεργασία των δεδομένων της 1^{ης} πειραματικής διαδικασίας προκύπτει ότι οι τιμές στο ύψος και το βάρος των φυτών είναι υψηλότερες για την εφαρμογή όπου πραγματοποιήθηκε εφαρμογή ριζοκτονίας σε συνδυασμό με το στέλεχος K-165 σε στερεή και υγρή μορφή. Από την επεξεργασία των δεδομένων της πειραματικής διαδικασίας προέκυψε ότι το στέλεχος K165 του βακτηρίου *Paenibacillus alvei* επάγει την έκφραση του γονιδίου της χιτινάσης και της γλυκουνάσης. Από την επεξεργασία των δεδομένων προκύπτει επίσης ότι η έκφραση αυξάνεται περισσότερο κατά την μόλυνση με τον μύκητα *Rhizoctonia solani.* Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι το φυτό βαμβακιού παρουσία του μύκητα *Rhizoctonia solani* επάγει την έκφραση του γονιδίου της χιτινάσης αλλά όχι σε μεγαλύτερο βαθμό συγκριτικά με την εφαρμογή που περιλαμβάνει το στέλεχος K165 σε συνδυασμό με τον μύκητα *Rhizoctonia solani.*

Επιστημονική περιοχή: Αντιμετώπιση Ριζοκτόνιας

Λέξεις κλειδιά: ριζοκτόνια, K165, βαμβάκι

Biological treatment of Rhizoctonia solani in cotton plants by the plant protection strain paenibacillus alvei K165

MSc Integrated Plant protection and Management Systems
Department of Plant Science
Laboratory phytopathology

ABSTRACT

Roots are some of the most important problems in many crops and are caused by soil-borne fungi that most often infect young plants. *Rhizoctonia solani* is one of the most important fungi that causes rot mainly on young plants and one of their most important hosts is cotton. In recent years, intensive efforts have been made to find biological agents that will compete with soil pathogens in order to reduce chemical control. In the present study we observed the interaction of strain K165 of the bacterium *Paenibacillus alvei* in the prevention / suppression against fungal diseases that affect the cultivation of cotton and more specifically the rhizoicide caused by the fungus *Rhizoctonia solani*. From the processing of the data of the 1st experimental procedure it results that the values in the height and the weight of the plants are higher for the application 4, where root application was carried out in combination with the strain K-165 in solid and liquid form. Processing of the data of the 2nd experimental procedure showed that strain K165 of the bacterium *Paenibacillus alvei* induces the expression of the chitinase and gluconase gene. The processing of the data also shows that the expression increases more during the infection with the fungus *Rhizoctonia solani*. Characteristic is the fact that the cotton plant in the presence of *Rhizoctonia solani* induces the expression of the chitinase gene but not to a greater extent compared to the application of strain K165 in combination with *Rhizoctonia solani.*

Scientific area: Rhizoctonia treatment

Key words rhizoctonia, K165, cotton

Ευχαριστίες

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους εκείνους που συνέβαλλαν και βοήθησαν στην πραγματοποίηση αυτής της πτυχιακής διατριβής. Τις θερμές ευχαριστίες μου εκφράζω στον επιβλέποντα καθηγητή μου Σωτήρη Τζάμο, Αναπληρωτή Καθηγητή, για την πολύτιμη βοήθεια του ώστε να έρθει εις πέρας το πείραμα αυτό. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Επαμεινώνδα Παπλωματά και την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Αλίκη Τζίμα, Μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής μου για τον χρόνο που αφιέρωσαν στην πτυχιακή μου διατριβή καθώς επίσης και για τις σημαντικές παρατηρήσεις και συμβουλές τους. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια μου για την οικονομική και ηθική υποστήριξη, υπομονή και κατανόηση σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

«Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της».

Περιεχόμενα

Περίληψη.....iii

Abstract.....iv

Ευχαριστίες.....v

Εισαγωγή.....9

Κεφάλαιο 1ο: Η καλλιέργεια του βαμβακιού.....11

1.1 Γενικά στοιχεία και μορφολογικά χαρακτηριστικά του βαμβακιού.....11

1.2 Οι οικολογικές απαιτήσεις του φυτού.....13

1.3 Η σημασία της καλλιέργειας για την οικονομία χώρα μας.....15

1.4 Οι σπουδαιότερες ασθένειες του βαμβακιού.....17

Κεφάλαιο 2ο: Ο μύκητας *Rhizoctonia solani*.....20

2.1 Ταξινόμηση του μύκητα *Rhizoctonia solani*.....20

2.2 Ιστορική αναδρομή.....21

2.3 Ξενιστές του μύκητα *Rhizoctonia solani*.....21

2.4 Επιδημιολογία του μύκητα *Rhizoctonia solani*.....23

2.5 Συμπτώματα.....23

2.6 Αντιμετώπιση του μύκητα *Rhizoctonia solani*.....25

2.6.1 Βιολογική καταπολέμηση του μύκητα.....25

2.6.2 Καλλιεργητικές τεχνικές για την αντιμετώπιση του μύκητα.....26

2.6.3 Χημική καταπολέμηση……27

Κεφάλαιο 3ο: Κεφάλαιο 3ο: Φυτά βαμβακιού από το φυτοπροστατευτικό στέλεχος *Paenibacillus alvei* K165.....28

3.1 Γενικά στοιχεία για την βιολογική καταπολέμηση.....28

3.1.1 Ανταγωνισμός.....29
3.1.2 Αντιβίωση.....29
3.1.3 Παρασιτισμός.....30
3.1.4 Αποικισμός.....31
3.1.5 Ανοσοποίηση.....32
3.2 Παράγοντες βιολογικής καταπολέμησης.....32
3.3 Το βακτήριο *Paenibacillus alvei* K165 ως βιολογικός παράγοντας.....33

Κεφάλαιο 4ο: Βιοδείκτες και Μοριακοί Δείκτες.....35
4.1 Βιοδείκτες.....35
4.2 Μοριακές μέθοδοι.....37
4.2.1 Ο μετασχηματισμός των μυκήτων.....37
4.2.2 *Agrobacterium tumefaciens - Mediated Transformation*.....37
4.3 Γενικά στοιχεία για την PCR.....40
4.3.1 Τα βήματα της PCR.....40
4.3.2 Ανίχνευση των προϊόντων της PCR.....42

Σκοπός της εργασίας.....43

Υλικά και μέθοδοι.....44
1η πειραματική διαδικασία.....44
2η πειραματική διαδικασία.....47
Μέθοδος qPCR.....48

Αποτελέσματα.....52
1η πειραματική διαδικασία.....52
2η πειραματική διαδικασία.....60

Συμπεράσματα - Συζήτηση.....62

Βιβλιογραφία.....66

Περιεχόμενα Εικόνων

Εικόνα 1: Βοτανικά χαρακτηριστικά του βαμβακιού……..……..11

Εικόνα 2: Σχηματισμός όγκων (κάλων) σε φυτά μέσω της μόλυνσης τους με ορισμένα είδη του βακτηρίου *Agrobacterium*……...……38

Εικόνα 3: Η παρασκευή του ng…….…45

Εικόνα 4: Η φυτρωτικότητα των σπόρων βαμβακιού στις 18/6/20 και για τις 4 εφαρμογές……..47

Εικόνα 5: Ο καθαρισμός των δειγμάτων από DNA με την χρήση Nanodrop στους 75°C για 10 min……..50

Εικόνα 6: Στην παρακάτω φωτογραφία απεικονίζεται ένα υγιές και ένα προσβεβλημένο από τον μύκητα φυτό…….54

Περιεχόμενα Πινάκων

Πίνακας 1: Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη έκφρασης γονιδίων βαμβακιού……..51

Περιεχόμενα Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Η φυτρωτική ικανότητα και για τις 4 εφαρμογές του πειράματος…….52

Διάγραμμα 2: Απεικόνιση συμπτωμάτων στις 29/6/2020…….55

Διάγραμμα 3: Απεικόνιση συμπτωμάτων στις 09/7/2020…….56

Διάγραμμα 4: Τα ύψη (σε cm) των φυτών των 4 εφαρμογών……...…55

Διάγραμμα 5: Τα βάρη (σε g) των φυτών των 4 εφαρμογών……57

Διάγραμμα 6: Έκφραση γονιδίου χιτινάσης και για τις 4 εφαρμογές του πειράματος…….57

Διάγραμμα 7: Έκφραση γονιδίου γλουκανάσης και για τις 4 εφαρμογές του πειράματος…….58

Εισαγωγή

Οι ασθένειες των φυτών δημιουργούν σημαντικά προβλήματα για τη προστασία της φυτικής παραγωγής, ιδιαιτέρως στις εντατικές καλλιέργειες όπως αυτή του βαμβακιού. Η αντιμετώπιση των ασθενειών των φυτικών οργανισμών τις τελευταίες δεκαετίες στηρίχθηκε κατά κύριο λόγο στην χρήση χημικών ενώσεων που στόχο είχαν να νεκρώσουν ή να εμποδίσουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του παθογόνου ωστόσο τα τελευταία χρόνια εντείνονται οι προσπάθειες για περιορισμό των προσβολών των φυτών με την χρήση ανθεκτικών ποικιλιών, με την αμειψισπορά και με διάφορες άλλες καλλιεργητικές πρακτικές.

Η αντιμετώπιση των ασθενειών των φυτών έχει σημαντική θεωρητική διάσταση κυρίως λόγω της αναζητήσεως και αξιολογήσεως χημικών ενώσεων ως μυκητοκτόνων, ενώ παράλληλα είναι και μια εφαρμοσμένη γεωργική πρακτική που κατευθύνει την εφαρμογή μεθόδων και μέσων ώστε να παρεμποδιστούν τα παθογόνα των φυτών να προκαλέσουν ασθένειες στα φυτά. Είναι γεγονός πως η χρήση φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων θεωρείται αναγκαία για την όσο το δυνατόν μεγαλύτερη παραγωγή και την καλύτερη δυνατή ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος.

Στο σημείο αυτό ωστόσο είναι ιδιαίτερα σημαντικό να τονίσουμε πως ολοένα και μεγαλύτερη προσθήκη χημικών ενώσεων στο περιβάλλον τις τελευταίες δεκαετίες είναι πιθανό να βλάψει οργανισμούς που δεν αποτελούν στόχος και να υποβαθμίσει την ποιότητα των υδάτων και των εδαφών μιας περιοχής. Τα γεγονότα αυτά σε συνδυασμό με την ολοένα και αυξανόμενη ευαισθητοποίηση των καταναλωτών έχουν οδηγήσει στην θέσπιση αυστηρών όρων στην χρήση χημικών ενώσεων στην γεωργία.

Όπως γίνεται κατανοητό η αντιμετώπιση των ασθενειών των φυτών εισέρχεται σε μια περίοδο μεγάλων αλλαγών με νέα μυκητοκτόνα στην διάθεση του παραγωγού. Είναι προφανές ότι θα ανακαλύπτονται νέες χημικές ενώσεις και θα αναπτύσσονται με τις διαδικασίες τυχαίας επιλογής και της αξιολογήσεως φυσικών προϊόντων. Η συμβολή

σύγχρονων βιοχημικών τεχνικών για την διαπίστωση νέων τρόπων δράσεως των μυκητοκτόνων, θα είναι σημαντική στον έλεγχο κατά τα πρώτα στάδια της διαδικασίας αξιολογήσεως τους.

Η αποκτώμενη γνώση στην περιοχή των σχέσεων ξενιστών - παθογόνων θα στηρίξει την ανάπτυξη νέων μυκητοκτόνων τις επόμενες δεκαετίες. Η εξέλιξη της εξειδικευμένης και στοχοποιημένης επεμβάσεως θα είναι συμβατή με την ταχεία διάγνωση της φύσεως του παθογόνου αιτίου.

Είναι βεβαίως παραδεκτό ότι η πίεση της κοινής γνώμης έχει συμβάλλει στον καθορισμό αυστηρών περιβαλλοντικών και τοξικολογικών απαιτούμενων για την εγγραφή/καταχώριση ενός νέου μυκητοκτόνου, διότι ο καταναλωτής συνεχίζει να απαιτεί υψηλή ποιότητα προϊόντων. Αυτό όμως για τα σημαντικά εμπορικά προϊόντα δεν μπορεί να επιτευχθεί χωρίς την εφαρμογή αποτελεσματικών μυκητοκτόνων. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον των επιστημόνων στρέφεται ιδιαίτερα στην σχέση που έχουν κάποιοι μικροοργανισμοί κυρίως αυτοί που διαβιούν στο έδαφος με στόχο να αξιοποιηθούν στο μέλλον χάρη στις ανταγωνιστικές τους ιδιότητες ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς.

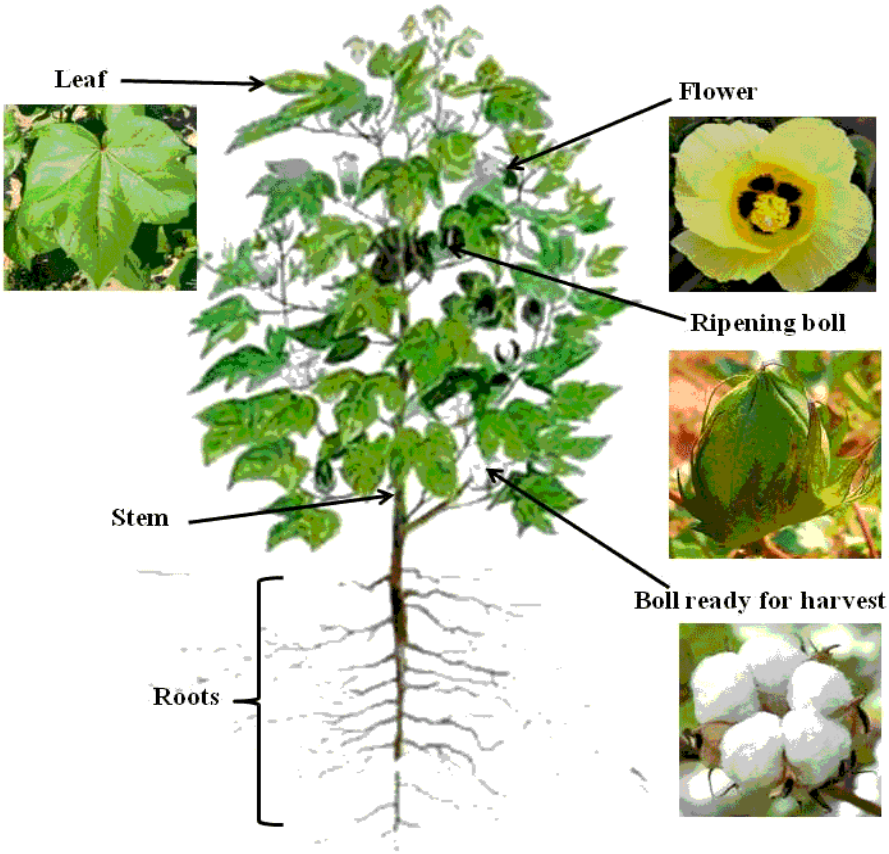
Έτσι, τα μυκητοκτόνα θα παραμείνουν τουλάχιστον για το άμεσο μέλλον ως αναπόφευκτη επιλογή καταπολέμησης των μυκητολογικών ασθενειών των φυτών. Το ιδανικό όμως θα ήταν η βιομηχανία των φυτοπροστατευτικών προϊόντων να ζητήσει και να δημιουργήσει στρατηγικές που θα ενσωματώνουν αποτελεσματικά βιοχημικούς και γενετικούς παράγοντες που θα παρέχουν αποτελεσματικά μέτρα ευρέος φάσματος αντιμετώπισης των ασθενειών των φυτών.

Κεφάλαιο 1ο: Η καλλιέργεια του βαμβακιού

1.1 Γενικά στοιχεία και μορφολογικά χαρακτηριστικά του βαμβακιού

Το βαμβάκι ανήκει στο γένος Gossypium της οικογένειας Malvaceae. Το γένος Gossypium περιλαμβάνει 49 είδη κατανεμημένα σε πολλές τροπικές και υποτροπικές περιοχές του κόσμου. Από αυτά εξημερώθηκαν τα 4 είδη. Όσον αφορά το γένος Gossypium υπάρχει μια μεγάλη παραλλακτικότητα σχετικά με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του, το φυτό είναι θάμνος που φτάνει συνήθως το ένα μέτρο ανάλογα με την εκάστοτε ποικιλία, τις κλιματολογικές συνθήκες και τις καλλιεργητικές πρακτικές (Χρηστίδης, 1965).

Εικόνα 1: Βοτανικά χαρακτηριστικά του βαμβακιού



Η ρίζα του φυτού είναι πασσαλώδης, η οποία σε γρήγορο ρυθμό αναπτύσσει πολλές δευτερεύουσες ρίζες. Σε γενικές γραμμές το βάθος του ριζικού συστήματος κυμαίνεται γύρω στα 50 εκατοστά και εξαρτάται όπως είναι λογικό από την εδαφική υγρασία. Το βαμβάκι μπορεί να αναπτύσσεται ικανοποιητικά σε αλκαλικό έδαφος αλλά δεν προτιμά εδάφη που έχουν ακόμη και μικρή περιεκτικότητα αργίλου (Γαλανοπούλου - Σενδούκα Σ., 2002).

Τα φύλλα του βαμβακιού μορφολογικά διαφέρουν ως προς το μέγεθος, το σχήμα και άλλα χαρακτηριστικά ανάλογα με την εκάστοτε ποικιλία που επιλέγεται. Σε γενικές γραμμές σχηματίζουν από 3 έως 5 λοβούς και αποτελούνται από το έλασμα και τον μίσχο. Οι ανθοφόροι οφθαλμοί του φυτού με την πάροδο του χρόνου εξελίσσονται σε άνθη και ονομάζονται κτένια, στην πρώτη φάση τα κτένια καλύπτονται από τρία βράκτια φύλλα, τα βράκτια έχουν σχήμα τριγωνικό και φέρουν έως και 14 δόντια (Γαλανοπούλου - Σενδούκα Σ., 2002).

Ο καρπός του φυτού είναι κάψα και ονομάζεται καρύδι, από μορφολογικής άποψης και το καρύδι ενδέχεται να έχει μεγάλες διαφορές ως προς το σχήμα, σε γενικές γραμμές είναι επίμηκες ή σφαιρικό και αποτελείται από 3 έως 5 χώρους. Οι σπόροι του φυτού καλύπτονται από ένα παχύ στρώμα ινών και από χνούδι (κοντές ίνες). Σε είκοσι ημέρες περίπου μετά την άνθιση οι ίνες αποκτούν το τελικό τους μήκος, το μήκος της ίνας είναι ένα πολύ σημαντικό ποιοτικό χαρακτηριστικό του βαμβακιού. Ο σπόρος του αποτελείται από το περισπέρμιο, το έμβρυο και δύο κοτυλιδόνες και είναι πλούσιος σε λάδι και σε διάφορες πρωτεΐνες (Γαλανοπούλου - Σενδούκα Σ., 2002).

Το βαμβάκι αποτελεί ένα πολύ σημαντικό αγροτικό προϊόν αφού οι χρήσεις του ξεπερνούν τις χίλιες, η παραγωγή υφασμάτων θεωρείται η σημαντικότερη. Το βαμβάκι αφότου συγκομιστεί μεταφέρεται στο εκκοκκιστήριο όπου πραγματοποιείται ο αποχωρισμός των ινών από τον σπόρο. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως από έναν τόνο σύσπορου βαμβακιού παράγονται περίπου 400 κιλά ίνας που με την σειρά τους παράγουν μέχρι και 3.000 μέτρα υφάσματος. Το βαμβακερό ύφασμα είναι προϊόν

υψηλής ποιότητας ωστόσο τα τελευταία χρόνια έχει αντικατασταθεί από συνθετικά υφάσματα εξαιτίας του χαμηλότερου κόστους των δεύτερων. Παρόλο που η σπουδαιότερη χρήση του βαμβακιού είναι η παραγωγή υφασμάτων μόνο το 35% του παγκοσμίως παραγόμενου βαμβακιού χρησιμοποιείται για λόγους ένδυσης (Σφήκας Γ., 1988).

Ο παραγόμενος σπόρος μαζί με τις ξένες ύλες και ίνες κοντές αποτελούν το 65% του χρησιμοποιούμενου βαμβακιού με ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών. Οι σπόροι συνθλίβονται προκειμένου να παραχθεί λάδι. από τους σπόρους του βαμβακιού (περίπου 700 κιλά σε έναν τόνο σύσπορου βαμβακιού) παράγονται γύρω στα 100 κιλά λάδι. Το λάδι αυτό βρίσκει ευρεία εφαρμογή στην παραγωγή σαπουνιών, κεριών μαργαρίνης και διάφορων καλλυντικών σκευασμάτων. Από την άλλη πλευρά οι κοντές ίνες οι οποίες είναι ακατάλληλες για παραγωγή υφάσματος βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στην παραγωγή βαμβακιού για ιατρική χρήση, στην βιομηχανία χάρτου, συσκευασίας κ.α. Επίσης ένας τόνος σύσπορου βαμβακιού δίνει γύρω στα 500 κιλά βαμβακόπιτας, προϊόν ιδιαίτερα χρήσιμο στην εκτροφή των ζώων (Ισραηλίτης, 2003).

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την αξιοποίηση των στελεχών για παραγωγή ενέργειας. Με αυτή την αξιοποίηση η καλλιέργεια προστατεύεται από μύκητες, που θα προκαλέσουν προβλήματα στην καλλιέργεια την επόμενη καλλιεργητική περίοδο. Επίσης από τα απόβλητα των εκκοκκιστηρίων μπορεί να παραχθεί λίπασμα άριστης ποιότητας μετά από κομποστοποίηση. Με την αξιοποίηση των στελεχών και των απόβλητων εκκοκκιστηρίων στην ουσία εκμεταλλευόμαστε ολόκληρη η βιομάζα της καλλιέργειας (Ισραηλίτης, 2003).

1.2 Οι οικολογικές απαιτήσεις του φυτού

Το βαμβάκι σαν φυτό έχει ανάγκη από άφθονη ηλιοφάνεια και αρκετή υγρασία. Όπως όλες τις καλλιέργειες έτσι και η καλλιέργεια του βαμβακιού επηρεάζεται σε σημαντικό βαθμό από τις κλιματολογικές συνθήκες που επικρατούν στην περιοχή κατά την διάρκεια

της καλλιεργητικής περιόδου. Στο βαμβάκι όμως πολλές φορές παρατηρείται μείωση της απόδοσης της καλλιέργειας που οφείλεται στις χαμηλές θερμοκρασίες που επικρατούσαν κατά την διάρκεια της σποράς ή/και στις χαμηλές θερμοκρασίες λίγο πριν την συγκομιδή του προϊόντος. (Danalatos N., et al. 1998) Ιδανικές συνθήκες για την ανάπτυξη του φυτού θεωρείται η δροσερή άνοιξη με ελαφρές και τακτές βροχοπτώσεις, το θερμό και ελαφρώς υγρό καλοκαίρι και το ξηρό και παρατεταμένο φθινόπωρο.

Θερμοκρασία

Πιο αναλυτικά, η κατώτερη θερμοκρασία για το βαμβάκι είναι οι 15°C, ιδανική θεωρείται γύρω στους 33 με 34°C, ενώ η μέγιστη οι 39°C. Ανάλογα με τις εκάστοτε θερμοκρασίες της άνοιξης ενδέχεται να καθυστερήσει η σπορά από μια μέχρι και τρεις εβδομάδες, το γεγονός αυτό έχει σαν συνέπεια να καθυστερήσει η ωρίμανση του φυτού και κατ' επέκταση η συγκομιδή του. Η θερμοκρασία όπως είναι φυσικό επηρεάζει και την έναρξη της ανθοφορίας, πειράματα έχουν δείξει πως όταν επικρατούν υψηλές θερμοκρασίες κατά την διάρκεια της νύχτας έχουν σαν αποτέλεσμα να καθυστερεί η εμφάνιση της άνθισης. Αντίθετα, θερμοκρασίες κατά την διάρκεια της νύχτας γύρω στους 20°C και γύρω στους 25°C κατά την διάρκεια της ημέρας επιταχύνουν την εμφάνιση της ανθοφορίας. (Danalatos N., et al. 1998)

Υγρασία

Η υγρασία είναι ένας ακόμη πολύ σημαντικός παράγοντας για την ανάπτυξη της καλλιέργειας, έχει αποδειχθεί ότι η έλλειψη νερού επηρεάζει τόσο την απόδοση της καλλιέργειας όσο και την ποιοτική υποβάθμιση του τελικού προϊόντος με την πτώση χτενιών και την εμφάνιση μικρών καρυδιών να είναι τα σημαντικότερα συμπτώματα από την έλλειψη υγρασίας (Γαλανοπούλου - Σενδούκα Σ., 2002).

Οι απαιτήσεις της καλλιέργειας σε υγρασία ποικίλει ανάλογα με την ποικιλία που επιλέγεται, τους κλιματολογικούς παράγοντες και την εδαφική σύσταση. από την άλλη πλευρά οι πολλές βροχοπτώσεις κατά την διάρκεια της ανοιξιάτικης περιόδου ενδέχεται να καθυστερήσουν την σπορά της καλλιέργειας ή ακόμη και να ευθύνονται για ασθένειες στο ριζικό σύστημα της καλλιέργειας. Υπερβολικές βροχοπτώσεις κατά την φθινοπωρινή

περίοδο συνοδεύονται από ποιοτική υποβάθμιση του προϊόντος και καθυστέρηση στην συγκομιδή του. Για την βέλτιστη απόδοση θα πρέπει να δέχεται το φυτό επαρκή ποσότητα νερού την περίοδο που σχηματίζονται τα καρύδια (Γαλανοπούλου - Σενδούκα Σ., 2002).

Φως

Εκτός από την θερμοκρασία και την υγρασία το φυτό του βαμβακιού είναι απαιτητικό σε άφθονο φωτισμό. Για να αναπτυχθεί επιτυχώς η καλλιέργεια η ηλιοφάνεια θα πρέπει να κυμαίνεται στο 50%, περιοχές με ηλιοφάνεια χαμηλότερη από 40% θεωρούνται ακατάλληλες για την καλλιέργεια. Φυτά που δεν δέχονται επαρκή φωτισμό παραμένουν κοντά, καχεκτικά και με μικρή καρποφορία, αντίθετα αύξηση της φωτοπεριόδου από 8 σε 14 ώρες μειώνει το ποσοστό καρπόπτωσης. Όπως σε όλα τα φυτά έτσι και στην καλλιέργεια βαμβακιού η φωτοσύνθεση αυξάνεται όταν αυξάνεται το διοξείδιο του άνθρακα στην ατμόσφαιρα, ωστόσο στο βαμβάκι αυξάνεται ο αριθμός των ανθέων και μειώνεται το ποσοστό της καρπόπτωσης. (Kohel R., and Lewis C., 1984)

Έδαφος

Όσον αφορά της εδαφικές απαιτήσεις της καλλιέργειας, το φυτό μπορεί να αναπτυχθεί σε μια μεγάλη ποικιλία εδαφών από αμμώδη ως βαριά αργιλώδη, ωστόσο ιδανικά θεωρούνται τα εδάφη που έχουν ίδιες αναλογίες άμμου, πηλού και αργίλου, pH από 5,5 μέχρι 8,5 καλή περιεκτικότητα σε οργανική ουσία και μέση γονιμότητα. Από την άλλη πλευρά δεν αναπτύσσεται καλά σε όξινο περιβάλλον, σε κακώς αεριζόμενα και μη στραγγιζόμενα εδάφη. (Kohel R., and Lewis C., 1984)

1.3 Η σημασία της καλλιέργειας για την οικονομία χώρα μας

Η καλλιέργεια βαμβακιού κατέχει την μεγαλύτερη συμμετοχή στο Ακαθάριστο γεωργικό Προϊόν με ποσοστό που κυμαίνεται περίπου 9%, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό είναι πολύ μεγαλύτερο στις κλασσικές βαμβακοπαραγωγικές περιοχές. Το βαμβάκι καλλιεργείτε κυρίως στην Θεσσαλίας, στη Μακεδονία (στους νομούς Θεσσαλονίκης, Σερρών,

Δράμας, Πέλλης, Κιλκίς, Ημαθίας), στη Θράκη και τέλος στη Στερεά Ελλάδα (στους νομούς Φθιώτιδος, Βοιωτίας και Αιτωλοακαρνανίας). Πιο συγκεκριμένα στην Θεσσαλία η καλλιέργεια αποτελεί το 60% των αρόσιμων εκτάσεων, με μία τάση για μονοκαλλιέργεια. Στη Στερεά Ελλάδα η καλλιέργεια του βαμβακιού αποτελεί το μισό περίπου της συνολικής καλλιεργήσιμης γης (http://www.opekepe.gr/).

Στο παρελθόν η καλλιέργεια παρουσίασε αλματώδη αύξηση σε όλους τους νομούς της χώρας, χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο νομός Εύβοιας στον οποίο το 1991 δεν καλλιεργούνταν καθόλου βαμβάκι ενώ το 1999 οι καλλιεργούμενες εκτάσεις βάμβακος έφτασαν τα 18.237 στρέμματα. Την ίδια χρονική περίοδο και στην Θράκη η συνολική καλλιεργούμενη έκταση βάμβακος αυξήθηκε κατά 200% (185.000 στρέμματα το 1991 σε 556.320 στρέμματα το 1999). Η περιφέρεια της Θεσσαλίας θεωρείται μια από τις σημαντικότερες παραδοσιακά βαμβακοκαλλιεργούμενες περιοχές της χώρας. Ο πυρήνας της βαμβακοκαλλιέργειας θεωρείται η Λάρισα. Στην Δυτική Ελλάδα η καλλιέργεια του βαμβακιού άρχισε να κερδίζει έδαφος μετά ο 1992 με σημαντικότερο βαμβακοπαραγωγικό νομό αυτό της Αιτωλοακαρνανίας, με ποσοστό που στο παρελθόν άγγιξε ακόμη και το 70%. Τα παραδείγματα αυτά αποδεικνύουν την σημασία της καλλιέργειας βάμβακος στην χώρα (http://www.opekepe.gr/).

Το βαμβάκι είναι σήμερα η πιο διαδεδομένη δυναμική καλλιέργεια, ανάμεσα στα φυτά μεγάλης καλλιέργειας καταλαμβάνει μία έκταση 3.000.000 στρεμμάτων και συνολικής παραγωγής 294.000 τόνους (795.000 τόνους βάμβακος) σύμφωνα με τα στοιχεία του ΟΠΕΚΕΠΕ. (http://www.opekepe.gr/)

Η μέση στρεμματική απόδοση της καλλιέργειας (*σε σύσπορο βαμβάκι) το 1931 ήταν μόλις 55Kg, 284Kg το 1981, 292 Kg το 1991, 329Kg το 2001, ενώ το 2010 η απόδοση ανήλθε σε 196Kg/στρ. Η αύξηση των αποδόσεων οφείλεται στην χρήση αγροχημικών λιπασμάτων, στην βελτίωση των καλλιεργούμενων ποικιλιών, στην εκμηχάνιση της καλλιέργειας, στην βελτίωση των καλλιεργητικών τεχνικών, στην αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση των εχθρών και των ασθενειών της καλλιέργειας αλλά και στην επέκταση των αρδευόμενων εκτάσεων. (Αυγουλάς & Κούτρου, 1997).

Το βαμβάκι εξασφαλίζει βασική απασχόληση και ικανοποιητικό εισόδημα σε 71.000 περίπου παραγωγούς που ασχολούνται άμεσα την καλλιέργεια, καθώς επίσης και σε άλλες 200.000 περίπου αγροτικές ή αστικές οικογένειες που εμπλέκονται άμεσα ή έμμεσα (οι εργαζόμενοι στα εκκοκκιστήρια, στην κλωστοϋφαντουργία, οι έμποροι, οι εξαγωγείς, οι εργαζόμενοι στις προμήθειες γεωργικών εφοδίων, χειριστές βαμβακοσυλλεκτικών μηχανών, οι εργαζόμενοι στα συνεργία επισκευών γεωργικών μηχανημάτων και αρκετά άλλα επαγγέλματα) με το προϊόν (Στατιστική Επετηρίδα 2009 & 2010).

Το βαμβάκι είναι το πρώτο αγροτικό προϊόν από άποψη συναλλαγματικής αξίας. Παράλληλα με το συνάλλαγμα που φέρνει το βαμβάκι στην χώρα εξασφαλίζει μεγάλα ποσά από οικονομικές ενισχύσεις που εισρέουν από τα Ταμεία της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τις επιδοτήσεις στην παραγωγή αλλά και για επενδύσεις που αφορούν μηχανολογικό εξοπλισμό (Στατιστική Επετηρίδα 2009 & 2010).

1.4 Οι σπουδαιότερες ασθένειες του βαμβακιού

Οι πιο σπουδαίες ασθένειες που προσβάλλουν την καλλιέργεια του βαμβακιού οφείλονται είτε σε μύκητες είτε σε βακτήρια και η σοβαρότητα της προσβολής τους διαφέρει από περιοχή σε περιοχή. Το είδος του βαμβακιού, οι συνθήκες του περιβάλλοντος και οι καλλιεργητικές φροντίδες που εφαρμόζονται είναι μερικοί από τους σπουδαιότερους παράγοντες που επηρεάζουν την εξάπλωση της ασθένειας (Σφήκας Γ., 1988)

Η προσβολή της καλλιέργειας του βαμβακιού από κάποια ασθένεια έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση της τελικής παραγωγής ή/και την ποιοτική υποβάθμιση του τελικού προϊόντος. Οι απώλειες της παραγωγής που οφείλονται στην προσβολή της καλλιέργειας από κάποια ασθένεια δεν είναι εύκολο να εκτιμηθεί και τις πιο πολλές φορές υποεκτιμάται. Τα παθογόνα στο σύνολο τους έχουν ικανότητα να εξασθενούν τα φυτά με

συνέπεια τα καρύδια του φυτού στο τέλος της καλλιεργητικής περιόδου να είναι λιγότερα γεγονός που σημαίνει ότι και η παραγωγή θα είναι μειωμένη. Επιπλέον, οι απώλειες της παραγωγής που προκαλούνται από κάποιο παθογόνο δεν μπορεί να εκτιμηθούν εύκολα εξαιτίας και της αλληλεπίδρασης που παρατηρείται με άλλα παθογόνα, με τους νηματώδεις που υπάρχουν στο έδαφος κ.α. (Γαλανοπούλου - Σενδούκα Σ., 2002).

Η αδρομύκωση είναι η σημαντικότερη ασθένεια του βαμβακιού αφού είναι ικανή να προκαλέσει μεγάλες απώλειες στην παραγωγή. Η ασθένεια αυτή οφείλεται στους μύκητες του γένους Verticillium και Fusarium και τα συμπτώματα της περιλαμβάνουν νέκρωση του φυτού όταν η προβολή γίνει όταν το φυτό βρίσκεται στα πρώτα στάδια ανάπτυξης του και περιορισμό της ανάπτυξης και της απόδοσης σε όψιμες προσβολές. Η αλτερνάρια απαντά στις περισσότερες περιοχές παγκοσμίως που καλλιεργείται το βαμβάκι και θεωρείται η σοβαρότερη ασθένεια μετά τις αδρομυκώσεις. Τα συμπτώματα της προσβολής περιλαμβάνουν κηλίδες μικρού μεγέθους και στρόγγυλου σχήματος και καστανού χρωματισμού που αργότερα ξεραίνονται. Η προσβολή από αλτερνάρια οδηγεί σε αποφύλλωση και πέσιμο των καρυδιών. Η βακτηρίωση προκαλείται από το βακτήριο *Xanthomonas campestris* και προσβάλλει το φυτό του βαμβακιού σε όλα τα στάδια της καλλιεργητικής περιόδου προκαλώντας σοβαρές ζημιές (Τόλης Ι, 1988)

Ο σπόρος του βαμβακιού όταν τοποθετείται στον αγρό και το νεαρό φυτάριο που φυτρώνει και για τις επόμενες 7 ημέρες είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο σε προσβολές από διάφορα παθογόνα. Το χρονικό αυτό διάστημα η καλλιέργεια είναι ιδιαίτερα ευάλωτη στην προσβολή από κάποιο παθογόνο, με την πάροδο του χρόνου τα φυτά της καλλιέργειας αποκτούν περισσότερη ανθεκτικότητα έναντι στα παθογόνα. Τα παθογόνα που προσβάλλουν τον σπόρο ή τα νεαρά φυτάρια προέρχονται από παθογόνα που είτε βρίσκονται πάνω είτε μέσα στον σπόρο και το έδαφος (Τόλης Ι, 1988).

Οι σηψιρριζίες είναι ένα ιδιαίτερα σημαντικό πρόβλημα στην καλλιέργεια του βαμβακιού. Οι μύκητες που ευθύνονται για την εμφάνιση σηψιρριζίας στο βαμβάκι είναι οι *Fusarium sp. Rhizoctonia solani, Thielaviaopsis basicola, Alternaria sp*. και ο *Pythium*

sp. Δύο είναι οι κατηγορίες τήξεων που προκαλούν αυτοί οι μύκητες στο βαμβάκι, η προφυτρωτική και η μεταφυτρωτική τήξη. Πιο αναλυτικά, στην πρώτη περίπτωση το νεαρό φυτάριο νεκρώνεται πριν εξέλθει από το έδαφος, ενώ στην δεύτερη περίπτωση η νέκρωση παρατηρείται στο νεαρό φυτάριο αμέσως μόλις φυτρώσει. Στην μεταφυτρωτική τήξη, τα φυτά που έχουν προσβληθεί μεταβάλουν τον χρωματισμό τους στην περιοχή υποκοτυλίου και στην συνέχεια το σημείο αυτό νεκρώνει με αποτέλεσμα το φυτό να πλαγιάζει στο έδαφος (Agrios, 2005).

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφέρουμε πως τα συμπτώματα που προκαλούνται από τις σηψιρριζίες μοιάζουν για όλα τα παθογόνα και η γενικότερη εικόνα του φυτού περιλαμβάνει σήψη του ριζικού συστήματος και της περιοχής του λαιμού του φυτού. Από το εκάστοτε παθογόνο εξαρτάται εάν η σήψη θα είναι ξηρή, υγρή ή εάν θα εμφανίζεται ολόκληρο το στέλεχος ή μόνο σε κάποιο τμήμα του φλοιού. Από την προσβολή το φυτό δεν μπορεί να αναπτυχθεί φυσιολογικά με αποτέλεσμα να παρατηρούνται συμπτώματα νανισμού, χλωρώσεων, ξηράνσεων ή μαράνσεων (Παναγόπουλος, 1995).

Τόσο η εμφάνιση όσο και η ένταση της προσβολής επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από την θερμοκρασία αλλά και την υγρασία του εδάφους. Οι ιδανικές συνθήκες για τα πιο πολλά παθογόνα θεωρούνται τα υψηλά επίπεδα υγρασίας, ενώ οι ιδανικές θερμοκρασίες μπορεί να είναι είτε υψηλές είτε χαμηλές. Για να αντιμετωπιστούν τέτοια προβλήματα σε μια καλλιέργεια προληπτικά γίνεται επικάλυψη των σπόρων με μυκητοκτόνα ενώ σε εδάφη που αντιμετωπίζουν αυτό το πρόβλημα συνίσταται η απολύμανση του εδάφους με εγκεκριμένα μυκητοκτόνα γεγονός που αυξάνει το κόστος παραγωγής (Τόλης Ι., 1989).

Κεφάλαιο 2ο: Ο μύκητας *Rhizoctonia solani*

Ο μύκητας *Rhizoctonia solani* είναι ένας από τους πιο διαδεδομένους μύκητες σε παγκόσμιο επίπεδο τόσο σε καλλιεργούμενα όσο και σε αυτοφυή φυτά. Πιο αναλυτικά, ο μύκητας αυτός προσβάλλει σχεδόν όλα τα κηπευτικά, πολλά καλλωπιστικά ακόμη και δέντρα στα σπορεία και τα φυτώρια. Όσον αφορά την καλλιέργεια του βαμβακιού ο μύκητας *R. solani* αποτελεί μια σοβαρή ασθένεια και εντάσσεται στο σύμπλεγμα των αιτιών που προκαλούν τήξεις φυταρίων (Τόλης, 1999).

2.1 Ταξινόμηση του μύκητα *Rhizoctonia solani*

Οι προσβολές που προκαλούν ριζοκτονία (αγγ. Rhizoctonia stem cancer, damping-off, root rot, foot rot, fruit rot) οφείλονται στον βασιδιομύκητα *Thanatephorus cucumeris* συν. *Corticium solani, Pellicularia filamentosa* (Basidiomycetes, Tulasnellales), που έχει ατελή μορφή τον *Rhizoctonia solani* (Deuterromycotina, Agonomycetes). Η τέλεια μορφή (βασιδιακή) σχηματίζεται σπανίως και δεν φαίνεται να παίζει ρόλο στην μετάδοση του μύκητα. Διαχειμάζει με μυκήλιο και με τα σκληρώτια του. Ο *R. solani* είναι ένα σύνθετο είδος το οποίο αποτελείται από απομονώσεις με πολυπύρηνο μυκήλιο που διαφέρουν ως προς τον κύκλο των ξενιστών, την παθογένεια, τα καλλιεργητικά χαρακτηριστικά και την απόκριση τους στο περιβάλλον (Τζάμος, 2004).

Μερικά από τα σπουδαιότερα χαρακτηριστικά που είναι ιδιαίτερα σημαντικά για την ταξινόμηση του μύκητα είναι τα εξής:

- δεν υπάρχουν καρποφορίες
- είναι συχνό το φαινόμενο πολυπύρηνων κυττάρων
- διακρίνονται χαρακτηριστικές διακλαδώσεις 90° καθώς επίσης και η χαρακτηριστική στένωση και το διάφραγμα που δημιουργούνται στο σημείο της διακλάδωσης
- οι κύριες υφές έχουν διάμετρο μεγαλύτερη των 7μm

•δεν παρατηρούνται κρίκοι ή άλλοι σχηματισμοί που συμμετέχουν στον γενετικό ανασυνδιασμό

•δεν υπάρχουν ριζόμορφα

•τα σκληρώτια έχουν καστανό χρωματισμό και ακανόνιστο σχηματισμό χωρίς ωστόσο να παρουσιάζουν διαχωρισμό σε φλοιό και εντεριώνη

•τα μυκήλια έχουν χρωματισμό που κυμαίνεται από ανοικτό έως σκούρο καφέ

•οι ιδανικές θερμοκρασίες για την ανάπτυξη του μύκητα θεωρούνται οι θερμοκρασίες από 20 μέχρι 30°C.

(Parmeter and Whitney, 1970).

Στο σημείο αυτό είναι σημαντικό να αναφέρουμε πως τα στελέχη του μύκητα που φέρουν αυτά τα χαρακτηριστικά αλλά έχουν διπύρηνα κύτταρα κατατάσσονται στην οικογένεια *Ceraobasidiaceae* του γένους *Ceratobasidium.*

Οι απομονώσεις του μύκητα σύμφωνα με την δυνατότητα σχηματισμού αναστομώσεων μεταξύ των υφών των διάφορων απομονώσεων, διαφοροποιούνται σε τουλάχιστον 13 ομάδες αναστομώσεως διαφόρου φυσιολογικής και γενετικής συστάσεως. Οι ομάδες αυτές διαφέρουν μεταξύ άλλων χαρακτηριστικών και ως προς το κύκλο των ξενιστών και τους τύπους των ασθενειών που προκαλούν. Το παθογόνο είναι ένας ευρύτατα διαδεδομένος μύκητας εδάφους (Carling et al., 2002).

Η ικανότητα του μύκητα να αναπαράγεται χωρίς να παράγει σπόρια είχε σαν αποτέλεσμα να δυσκολέψει τους επιστήμονες στο παρελθόν στην ταξινόμηση του. Για τον λόγο αυτό οι επιστήμονες στηρίζονταν σε διάφορες δοκιμές μολυσματικότητας σε συνδυασμό με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της καλλιέργειας του μύκητα σε πληθώρα θρεπτικών υποστρωμάτων. Αργότερα χρησιμοποιήθηκε το φαινόμενο της αναστόμωσης προκειμένου να ταξινομηθεί ο μύκητας. Σήμερα πλέον υπάρχουν 13 ομάδες αναστόμωσης (AG-1 έως AG-13) ενώ τα διπύρηνα στελέχη του παθογόνου χωρίζονται σε 19 ομάδες αναστόμωσης (AG-A έως AG-U). Πλέον χρησιμοποιούνται μοριακές μέθοδοι για να χωρίσουν τον μύκητα σε γενετικά διαφορετικές ομάδες αλλά επιπλέον

υποδεικνύουν και αξιόλογες γενετικές διαφορές ανάμεσα στα στελέχη της ίδιας ομάδας αναστόμωσης (Buntin et al., 2002).

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφέρουμε ότι στην περίπτωση του βαμβακιού η σημαντικότερη ομάδα αναστόμωσης είναι η AG-4 ωστόσο έχουν βρεθεί και άλλες ομάδες αναστόμωσης όπως είναι για παράδειγμα η AG-7 και η AG-13 (Buntin et al., 2002, Carling et al., 2002)

2.2 Ιστορική αναδρομή

Ο μύκητας *Rhizoctonia solani* περιγράφτηκε για πρώτη φορά το 1858 και από τότε μέχρι σήμερα έχει γίνει σαφές ότι αποτελεί έναν μύκητα που έχει εξαπλωθεί σε ολόκληρο τον πλανήτη και προσβάλλει πληθώρα ξενιστών (Τζάμος, 2004).

2.3 Ξενιστές του μύκητα *Rhizoctonia solani*

Ο μύκητας *Rhizoctonia solani* δεν προσβάλλει μόνο το βαμβάκι αλλά πάρα πολλές καλλιέργειες, αρκεί να αναφέρουμε πως περισσότερα από 250 φυτικά είδη που ανήκουν σε περισσότερες από 66 διαφορετικές οικογένειες προσβάλλονται από το συγκεκριμένο παθογόνο (Sneh, 1996).

Μερικοί από τους σπουδαιότερους ξενιστές είναι η τομάτα, η μελιτζάνα, η πατάτα, το βαμβάκι, η πιπεριά, διάφορα καλλωπιστικά όπως για παράδειγμα το γαρύφαλλο, τα σταυρανθή που προκαλεί προσυλλεκτικές και μετασυλλεκτικές σήψεις των κεφαλών και διάφορα δέντρα τα οποία τα προσβάλλει στα φυτώρια ή στα σπορεία (Sneh, 1996).

2.4 Επιδημιολογία του μύκητα *Rhizoctonia solani*

Ο μύκητας *Rhizoctonia solani* είναι ένα εδαφογενές παθογόνο που προσβάλλει κατά κύριο λόγο φυτά νεαρής ηλικίας αν και μπορεί να προσβάλλει ακόμη και μεγαλύτερης ηλικίας φυτά. Ο μύκητας αυτός δεν παράγει σπόρια αλλά έχει την ικανότητα να αναπαράγεται μόνο με μυκήλιο ή μάζες μυκηλίου σκληρωτιακής μορφής. Στα πρώτα στάδια της ζωής του ζει σαπροφυτικά επάνω σε νεκρά υπολείμματα φυτών. Στο στάδιο αυτό παράγει πληθώρα μυκηλιακών συσσωμάτων, τα σκληρώτια . Όταν οι υφές αυτές έρθουν σε επαφή με ζωντανούς υπόγειους φυτικούς ιστούς (ρίζες, υπόγειους βλαστούς) τότε γίνεται παράσιτο. Σε ορισμένες συνθήκες ο μύκητας μπορεί να παράγει βασιδιοσπόρια, τα οποία είναι αναπαραγωγικά όργανα της τέλειας μορφής του. Στους φυτικούς ιστούς που εγκαθίσταται ο μύκητας σχηματίζει σκληρώτια, τα οποία αρχικά έχουν τον ίδιο χρωματισμό αλλά με την πάροδο του χρόνου γίνονται μαύρα. Τα σκληρώτια μπορούν να παραμείνουν στο έδαφος για πολλά χρόνια μέχρι να βρεθούν οι ιδανικές συνθήκες και να βλαστήσουν προσβάλλοντας εκ νέου τους ξενιστές τους (Sneh, 1996).

2.5 Συμπτώματα

Σε φυτά όπως είναι η τομάτα, η μελιτζάνα και το βαμβάκι ο μύκητας προκαλεί τήξη φυταρίων, ενώ σε μεγαλύτερα φυτικά είδη ο μύκητας ευθύνεται για έλκος λαιμού, προσβολή των ριζών, των φύλλων και σήψη καρπών. Η προσβολή του λαιμού στα ανεπτυγμένα φυτά εκδηλώνεται στη βάση του στελέχους και λίγο κάτω από την επιφάνεια του εδάφους με την μορφή μικρών ερυθρωπών κηλίδων οι οποίες εξελίσσονται σε ελαφρά βυθισμένες ερυθροκαστανές μέχρι καστανές νεκρωτικές περιοχές με σαφή όρια και ξηρής συστάσεως. Οι κηλίδες αυτές συχνά σχίζονται με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ανοικτών ελκών, τα οποία συχνά καλύπτονται από αραιό μυκήλιο χρώματος ανοικτού καστανού ή καστανού. Τα προσβεβλημένα φυτά παρουσιάζουν καχεξία, συχνά χλώρωση, καρούλιασμα φύλλων και τελικά, αν το έλκος περιβάλλει το στέλεχος αποξηραίνονται.

Ο μύκητας αυτός στους καρπούς που είτε βρίσκονται σε μικρή απόσταση από το έδαφος είτε το ακουμπούν προκαλεί σκληρές κηλίδες καστανού χρωματισμού που στην συνέχεια μεγαλώνουν σε συγκεντρωτικούς κύκλους και καλύπτονται από καστανή εξάνθηση. Είναι σημαντικό στο σημείο αυτό να αναφέρουμε πως τα συμπτώματα διαφέρουν και εξαρτώνται από τον εκάστοτε ξενιστή (Παναγόπουλος Χ., 2000)

Στην περίπτωση του βαμβακιού ο μύκητας προκαλεί τήξη φυταρίων και ευνοείται ιδιαίτερα από υψηλή υγρασία και θερμοκρασία. Στην χώρα μας ο μύκητας έχει βρεθεί σε όλη την έκταση της και προκαλεί προβλήματα σε πολλές καλλιέργειες. Πιο αναλυτικά, η προσβολή από τον συγκεκριμένο μύκητα επηρεάζεται από το στάδιο ανάπτυξης της καλλιέργειας όταν θα γίνει η προσβολή. Στην περίπτωση που η προσβολή γίνει όταν έχει εγκατασταθεί η καλλιέργεια αλλά πριν ακόμη φυτρώσει ο σπόρος τότε παρατηρείται αδυναμία του να φυτρώσει ή ακόμη και αν φυτρώσει το νεαρό φυτάριο σαπίζει πριν εξέλθει από το έδαφος. Όταν ο μύκητας προσβάλλει την καλλιέργεια αφού το νεαρό φυτάριο έχει εξέλθει από το έδαφος τότε εμφανίζεται στον λαιμό του φυτού μια υδατώδης κηλίδα. Στο στάδιο αυτό ο μύκητας εισέρχεται στους ξυλώδεις ιστούς και προχωράει στην εντεριώνη. Με την πάροδο του χρόνου η προσβολή προκαλεί λέπτυνση και σήψη του υποκότυλου του φυτού και στην συνέχεια κατάρρευση του φυτού. Από την άλλη πλευρά όταν η προσβολή γίνει όταν το φυτό έχει αναπτυχθεί λίγο περισσότερο τότε εμφανίζεται μια στένωση και η ανάπτυξη του είναι καχεκτική (Αντωνόπουλος, 2006).

Πολύ σημαντικό είναι το γεγονός που σχετίζεται με την επιδημιολογία των ασθενειών που προκαλούνται από τον συγκεκριμένο μύκητα αφού έχει την ικανότητα να ζει σαπροφυτικά στο έδαφος, στα φυτικά υπολείμματα διάφορων καλλιεργειών ακόμη και στην ριζόσφαιρα κάποιων ζιζανίων μέχρι οι συνθήκες να του επιτρέψουν να προσβάλλει εκ νέου τους ξενιστές του (Αντωνόπουλος, 2006).

2.6 Αντιμετώπιση του μύκητα *Rhizoctonia solani*

Βασική προϋπόθεση για την επιτυχή ανάπτυξη των φυτών μιας καλλιέργειας αποτελεί η εξασφάλιση της υγείας τους. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται παραδοσιακές πρακτικές ή άλλες πολύπλοκες μέθοδοι και μέσα για να αντιμετωπιστούν με επιτυχία οι ασθένειες που προσβάλλουν μια καλλιέργεια. Στο σημείο αυτό είναι χρήσιμο να αναφέρουμε πως στην σύγχρονη φυτοπαθολογία δεν επιδιώκουμε την πλήρη παρεμπόδιση της ασθένειας ή την πλήρη θεραπεία της καλλιέργειας αλλά μια ισορροπία μεταξύ ξενιστών και παθογόνων που δεν θα προκαλούν μείωση της απόδοσης ή ποιοτική υποβάθμιση του παραγόμενου προϊόντος της καλλιέργειας (Αντωνόπουλος, 2006).

Τα παθογόνα *Rhizoctonia solani, Pythium sp.* και *Phytophthora sp* ευθύνονται σε πολλές περιπτώσεις για την μείωση της τελικής παραγωγής βαμβακιού ή/και την ποιοτική υποβάθμιση του τελικού προϊόντος για τον λόγο αυτό θα πρέπει να λαμβάνονται κάποια μέτρα προληπτικά (Παναγόπουλος, 1995).

Σύμφωνα με την Ολοκληρωμένη Διαχείριση Καλλιεργειών η φυτοπροστασία της καλλιέργειας του βαμβακιού θα πρέπει να στηρίζεται σε μια συνδυασμένη εφαρμογή μεθόδων με την προϋπόθεση πάντα ότι η μη χημική καταπολέμηση που περιλαμβάνει διάφορα καλλιεργητικά, μηχανικά και βιολογικά μέτρα θα αποτελεί την πρώτη λύση και αφού δεν αντιμετωπιστεί το πρόβλημα τότε θα γίνεται χρήση φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων. Σε πρώτη φάση θα πρέπει να λαμβάνονται κάποια προληπτικά μέτρα που περιλαμβάνουν διάφορες καλλιεργητικές φροντίδες και διάφορους άλλους βιολογικούς παράγοντες που η μέχρι τώρα έρευνα έχει δείξει αξιόλογη αποτελεσματικότητα (Αντωνόπουλος, 2006).

2.6.1 Βιολογική αντιμετώπιση του μύκητα

Η βιολογική αντιμετώπιση του μύκητα *Rhizoctonia solani* περιγράφεται αναλυτικά στο επόμενο κεφάλαιο.

2.6.2 Καλλιεργητικές τεχνικές για την αντιμετώπιση του μύκητα

Οι καλλιεργητικές τεχνικές για την αντιμετώπιση μιας ασθένειας περιλαμβάνουν μια σειρά μέτρων στα οποία πρωτεύουσα θέση κατέχουν η χρησιμοποίηση ανθεκτικών ή ανεκτικών ποικιλιών, υβριδίων, οι καλλιεργητικές πρακτικές όπως η εφαρμογή αμειψισποράς, η εφαρμογή κανόνων φυτοϋγιεινής κ.α. Στην περίπτωση της καταπολέμησης του μύκητα *Rhizoctonia solani* είναι ιδιαίτερα σημαντικό ο σπόρος που θα τοποθετείται στον αγρό να είναι καθαρός και απαλλαγμένος από εχθρούς και ασθένειες. Επίσης, θα πρέπει οι καλλιεργητικές φροντίδες της καλλιέργειας να γίνονται την σωστή χρονική περίοδο (σπορά της καλλιέργειας την κατάλληλη χρονική στιγμή) με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνονται οι όσο το δυνατόν καλύτερες συνθήκες που θα εξασφαλίσουν ένα καλό φύτρωμα των σπόρων και την καλύτερη δυνατή ανάπτυξη της καλλιέργειας. Ενώ θα πρέπει να αποφεύγεται η δημιουργία πληγών με καλλιεργητικά εργαλεία στο λαιμό και το ριζικό σύστημα των φυτών (Τζάμος, 2004) .

Μερικές άλλες από τις καλλιεργητικές φροντίδες που χρησιμοποιούνται προκειμένου να αποφευχθεί η προσβολή της καλλιέργειας από τον μύκητα *Rhizoctonia solani* είναι η αποφυγή της πυκνής σποράς διότι κάτι τέτοιο θα εντείνει τις κακές συνθήκες αερισμού ευνοώντας την ανάπτυξη του παθογόνου. Η συχνή άρδευση των καλλιεργειών είναι ένα ακόμη καλλιεργητικό μέτρο που πολλές φορές ενδέχεται να ευνοήσει την ανάπτυξη του μύκητα. Σε περιπτώσεις που έχουν εμφανιστεί περιπτώσεις προσβολών από το συγκεκριμένο παθογόνο μύκητα η ηλιοαπολύμανση πριν την εγκατάσταση της καλλιέργειας είναι ένα ακόμη μέτρο στα χέρια του παραγωγού, ενώ και η εναλλαγή αγρωστωδών με ψυχανθή είναι μια ακόμη μέθοδος που συνίσταται για τον περιορισμό του προβλήματος. Η καταπολέμηση των ζιζανίων πολλά εκ των οποίων αποτελούν ξενιστές του παθογόνου και ευνοούν την αύξηση και την διάδοση του μολύσματος (Τζάμος, 2004).

2.6.3 Χημική καταπολέμηση

Σήμερα υπάρχουν περισσότερα από 110 δραστικά συστατικά τα οποία χρησιμοποιούνται ως μυκητοκτόνα παγκοσμίως. Ανεξαρτήτως από την υφιστάμενη δυνατότητα επιλογής αποτελεσματικών μυκητοκτόνων, είναι απαραίτητο να εξευρεθούν νέες αντιμυκητιακές ενώσεις για να εξασφαλίζεται ποσότητα και ποιότητα αγροτικών προϊόντων.

Μια σημαντική ώθηση για την συνέχιση των ερευνητικών προγραμμάτων αποτελεί και η απαίτηση του καταναλωτικού κοινού για παράγοντες φυτοπροστασίας που αναμένεται να εφαρμόζονται σε απειροελάχιστες ποσότητες, θα έχουν κατά το δυνατόν ήπια επίδραση στο περιβάλλον ενώ ταυτόχρονα θα έχουν μικρή τοξικότητα στον άνθρωπο αλλά και στο περιβάλλον. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφέρουμε την αναγκαιότητα για εξεύρεση μυκητοκτόνων ικανών να αντιμετωπίσουν ασθένειες που δεν μπορούν να αντιμετωπιστούν αποτελεσματικά σήμερα με τα υφιστάμενα μέσα. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι και η περίπτωση της ριζοκτονίας που μελετάται στην παρούσα εργασία (Τζάμος, 2004).

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονίσουμε πως σε περιπτώσεις που υπάρχουν προβλήματα προσβολών από τα συγκεκριμένα παθογόνα θα πρέπει προληπτικά να εφαρμόζεται το κατάλληλο μυκητοκτόνο πριν ή μετά την εγκατάσταση της καλλιέργειας. Η χρήση χημικών φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων δίνει την δυνατότητα στον παραγωγό να νεκρώσει το παθογόνο, να παρεμποδίσει ή να επιβραδύνει την ανάπτυξη του. Χρήση φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων συνίσταται σε περιπτώσεις εκδήλωσης συμπτωμάτων με τα σκευάσματα thiopnanate και methyl (Τζάμος, 2004).

Κεφάλαιο 3ο: Φυτά βαμβακιού από το φυτοπροστατευτικό στέλεχος *Paenibacillus alvei* K165

3.1 Γενικά στοιχεία για την βιολογική αντιμετώπιση

Η βιολογική αντιμετώπιση των ασθενειών περιλαμβάνει την χρησιμοποίηση μικροοργανισμών που καταστέλλουν την δραστηριότητα ενός φυτοπαθογόνου αιτίου και παρεμποδίζουν την μόλυνση ή περιορίζουν την εκδήλωση μιας ασθένειας. Η βιολογική αντιμετώπιση τις περισσότερες φορές αξιοποιεί σαπροφυτικούς μικροοργανισμούς που δρουν ως καταστολείς των ασθενειών με απώτερο στόχο την εξασφάλιση της υγείας του φυτού. Η καταστολή των ασθενειών με την χρήση παραγόντων βιολογικής αντιμετώπισης στηρίζεται στην εκδήλωση αλληλεπιδράσεων του φυτού, του παθογόνου, του βιολογικού παράγοντα, της μικροβιακής χλωρίδας πάνω και γύρω από το φυτό και του φυσικού περιβάλλοντος (Τζάμος, 2004).

Η βιολογική αντιμετώπιση των ασθενειών έχει τα θεμέλια της τόσο στην αξιολόγηση όσο και στην χρήση μυκήτων και βακτηρίων που δεν βλάπτουν την καλλιέργεια. Η βιολογική καταπολέμηση των εδαφογενών παθογόνων όπως αυτό του μύκητα *Rhizoctonia solani* είναι είναι μια ιδιαίτερα περίπλοκη διαδικασία (Τζάμος, 2004).

Η βιολογική αντιμετώπιση χρησιμοποιεί κάποιους μηχανισμούς ανταγωνιστικής δράσης διάφορων βιολογικών παραγόντων. Τέτοιοι μηχανισμοί είναι ο ανταγωνισμός για διάφορα θρεπτικά συστατικά, η παραγωγή τοξινών και αντιβιοτικών, η επαγωγή λανθάνοντων μηχανισμών αντοχής (ανοσοποίηση), ο παρασιτισμός (η αποδιοργάνωση κυτταρικών τοιχωμάτων του παθογόνου από την δράση λυτικών ενζύμων του ανταγωνιστικού παράγοντα) και ο συνδυασμός όλων αυτών των μηχανισμών που ειπώθηκαν (Παναγόπουλος, 2007).

3.1.1 Ανταγωνισμός

Στην περίπτωση του μηχανισμού ανταγωνιστικής δράσης για την εξασφάλιση των απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων διάφοροι μικροοργανισμοί που αξιοποιεί η βιολογική αντιμετώπιση ανταγωνίζονται με το παθογόνο με στόχο να εξασφαλίσουν τα απαραίτητα για την διαβίωση τους θρεπτικά συστατικά (άζωτο, άνθρακα κ.α.), έτσι μειώνεται η δραστηριότητα και ο πολλαπλασιασμός του παθογόνου (Παναγόπουλος, 2007).

Ο ανταγωνισμός για σίδηρο αποτελεί ένα από τα σπουδαιότερα παραδείγματα ανταγωνισμού για την εξασφάλιση του σιδήρου. Διάφοροι μικροοργανισμοί όπως τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* διαθέτουν μηχανισμούς οι οποίοι δεσμεύουν τον σίδηρο εντός του κυττάρου. Ο συγκεκριμένος μηχανισμός περιλαμβάνει ένα σιδηροφόρο ο οποίος έχει την ικανότητα να δεσμεύει τον σίδηρο αλλά και μια πρωτεΐνη που τον μεταφέρει εντός του κυττάρου. Με τον τρόπο αυτό βακτήρια του συγκεκριμένου γένους χρησιμοποιούνται για τον περιορισμό διάφορων μυκήτων όπως για παράδειγμα του *Fusarium spp* και του *Pythium spp* αφού περιορίζουν σημαντικά τον αφομοιώσιμο σίδηρο που υπάρχει στο έδαφος (Loper & Buyer, 1991).

3.1.2 Αντιβίωση

Ο μηχανισμός της αντιβίωσης βασίζεται στην παραγωγή κάποιων ειδικών μεταβολιτών οι οποίοι προέρχονται είτε από διάφορες μυκοτοξίνες του εδάφους είτε από κάποια ένζυμα. Τα αντιβιοτικά λοιπόν έχουν την ικανότητα να εμποδίζουν την φυσιολογική ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών ή διάφορες μεταβολικές διαδικασίες τους ακόμη και όταν χρησιμοποιούνται σε μικρές συγκεντρώσεις. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι πολλοί βιολογικοί παράγοντες συμβάλλουν στην αντιμετώπιση μιας ασθένειας μέσω του ανταγωνισμού με τα παθογόνα παράγοντας αντιβιοτικά που παρεμποδίζουν και μειώνουν τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη του παθογόνου. Για τον λόγο αυτό αποτελεί τον συχνότερα χρησιμοποιούμενο μηχανισμό βιολογικής αντιμετώπιση από τις προσβολές που δέχονται οι καλλιέργειες. Ένα ακόμη σπουδαίο πλεονέκτημα αυτού του μηχανισμού

δράσης είναι η ευκολία με την οποία χρησιμοποιούνται οι πιθανοί ανταγωνιστές (Whipps, 2009).

Ένα παράδειγμα για να γίνει κατανοητός ο συγκεκριμένος μηχανισμός δράσης είναι η παραγωγή της βακτηριοσίνης 84 από το μη παθογόνο στέλεχος K84 του βακτηρίου Agrobacterium tumefaciens το οποίο έχει αντιβιοτικές ιδιότητες και είναι δραστική κατά των περισσότερων παθογόνων στελεχών του Agrobacterium (Παναγόπουλος, 2007).

Τον ίδιο μηχανισμό δράσης χρησιμοποιεί και το βακτήριο *Bacillus subtilis* το οποίο παράγει πτητικές ουσίες που συμβάλλουν στην καταπολέμηση των μυκήτων *Rhizoctonia solani* και *Pythium ultimum.* Μάλιστα συνδυασμός του μύκητα *Gliocladium virens* και του *Bacillus subtilis* καταστέλλει σε μεγάλο ποσοστό την φουζαρίωση του βαμβακιού μετά από επικάλυψη των σπόρων του με τους δύο ανταγωνιστές. Οι βάκιλοι είναι ιδιαίτερα εύχρηστοι για πρακτική χρήση, επειδή παράγουν ενδοσπόρια, με τα οποία μπορούν να επιβιώσουν σε υψηλές θερμοκρασίες ή σε συνθήκες ξηρασίας. Πειραματικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι ανταγωνιστικοί βάκιλοι της ριζόσφαιρας που ανήκουν στο είδος P*aenibacillus alvei,* όπως το στέλεχος K-165, είναι ανταγωνιστές των μυκήτων *Verticillium dahliae και Fusarium oxysporum f.sp radicis cucumerinum* αλλά και του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* μέσω μιας σειράς μηχανισμών δράσεως που περιλαμβάνει παραγωγή αντιβιοτικών, ινδολοβουτυρικού οξέος και χιτινασών. Παράλληλα, ο ανταγωνιστής K-165 είναι και διεγέρτης μηχανισμών διασυστηματικής αντοχής εναντίον των παθογόνων που αναφέρθηκαν (Τζάμος, 2004).

3.1.3 Παρασιτισμός

Με τον όρο παρασιτισμός εννοείται η κυτταρόλυση που προκαλούν διάφοροι μικροοργανισμοί σε άλλους. Το φαινόμενο αυτό είναι πολύ συχνό στην φύση και κυρίως στα βακτήρια. Οι μύκητες ή τα βακτήρια αυτά παράγουν διάφορα ένζυμα τα οποία προκαλούν λύση των κυτταρικών τοιχωμάτων του παθογόνου κυττάρου. Η λύση αυτή προκαλείται με πρωτεάσες και χητινάσες των βακτηρίων, ενώ στην περίπτωση των

μυκήτων εκτός από αυτά τα ένζυμα συμμετέχουν και γλουκανάσες και κυτταρινάσες (Παναγόπουλος, 2007).

Το παράσιτο προσκολλάται στα κύτταρα του ξενιστή αρχικά σχηματίζοντας κατευθυνόμενες διακλαδώσεις και στην συνέχεια εισχωρώντας σε αυτό. Αφού εισχωρήσει λοιπόν στον ξενιστή αποικίζει ή αποδομεί τα κύτταρα του ξενιστή, έτσι ελέγχει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του παθογόνου. Μερικά παραδείγματα από την χρήση του παρασιτισμού στην βιολογική αντιμετώπιση ασθενειών είναι η χρήση του μύκητα *Trichoderma harzianum* ενάντια στους μύκητες *Sclerotium rolfsii* και *Rhizoctonia solani.* Ο παρασιτισμός και η παραγωγή εξωκυτταρικών λυτικών ενζύμων έχει μελετηθεί έντονα τα τελευταία χρόνια σαν ένα μέτρο για την βιολογική αντιμετώπιση πολλών παθογόνων οργανισμών. Επίσης μελετάται η παραγωγή ενζύμων από βιολογικούς παράγοντες που αποδομούν εκκρινόμενες ουσίες παθογόνων φυτών περιορίζοντας με τον τρόπο αυτό την μολυσματικότητα τους (Kapat et al., 1998, Elad & Kapat, 1999).

3.1.4 Αποικισμός

Η αποίκιση του ξενιστή μύκητα από τον βιολογικό ανταγωνιστή του είναι απαραίτητος για την βιολογική αντιμετώπιση μιας ασθένειας. Ο βαθμός του αποικισμού καθώς επίσης και το μέγεθος του πληθυσμού επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την εξέλιξη της προσβολής. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι κάποιοι δραστικοί ανταγωνιστές όπως είναι για παράδειγμα τα στελέχη του βακτηρίου *Bacillus cereus* καταφέρνουν μέτριες συγκεντρώσεις πληθυσμών στο ριζικό σύστημα των φυτών, που αναπτύσσονται στον αγρό και όπως προκύπτει υποκαθιστούν τον πληθυσμό των ενδογενών μελών αυτών των ειδών (Τζάμος, 2004).

3.1.5 Ανοσοποίηση

Με τον όρο ανοσοποίηση εννοούμε την λειτουργία είτε της βιολογικής είτε της βιοχημικής διέγερσης λανθανόντων μηχανισμών αντοχής προκειμένου το φυτό να μπορεί να είναι περισσότερο ανθεκτική ενάντια σε ένα ή περισσότερα παθογόνα. Οι σπουδαιότεροι παράγοντες που επιδρούν σε έναν ξενιστή προκαλούνται από κάποιο παθογόνο, από μια μικροβιακή ή όχι ουσία ή από κάποιο ριζοβακτήριο το οποίο προκαλείται από τις ενώσεις από τις αλληλεπιδράσεις ξενιστή – παθογόνου (Αντωνόπουλος, 2006).

3.2 Παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης

Με βάση την βιβλιογραφία οι παράγοντες που έχουν εμπλοκή στην βιολογική αντιμετώπιση των ασθενειών είναι το παθογόνο, ο ανταγωνιστής, το φυτό ξενιστής και το αβιοτικό περιβάλλον (Cook & Baker, 1983).

Στο παρελθόν έχουν γίνει πολλές έρευνες που σχετίζονται με την αντιμετώπιση του παθογόνου *Rhizoctonia solani* μερικές από αυτές έκαναν χρήση μυκήτων, βακτηρίων, ή ακόμη και νηματωδών προκειμένου να βρεθεί η καλύτερη δυνατή βιολογική αντιμετώπιση του. Μερικές από τις έρευνες αυτές έκαναν χρήση των μυκήτων *Gliocladium virens, Corticium sp,* αλλά και μύκητες του γένους *Trihoderma* και τα αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά (Δεληγιάννη, 1994).

Στην περίπτωση των ανταγωνιστών, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να επεμβαίνουν στον βιολογικό κύκλο των παθογόνων και το ανταγωνίζονται προκειμένου να εξασφαλίσουν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά. Πλήθος ερευνών έχει πραγματοποιηθεί για την χρήση μυκήτων του γένους Trichoderma οι οποίοι όπως δείχνουν τα επιστημονικά δεδομένα ανταγωνίζονται διάφορα σοβαρά παθογόνα *in vivo* (Δεληγιάννη, 1994).

Τέλος, θα πρέπει να τονίσουμε πως το παθογόνο, ο ξενιστής αλλά και το φυτό που προσβάλλει το παθογόνο έχουν πολύ συγκεκριμένες απαιτήσεις όσον αφορά τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Είναι απόλυτα φυσικό λοιπόν το αβιοτικό περιβάλλον να επηρεάζει άμεσα την βιολογική αντιμετώπιση μιας ασθένειας. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση της προσβολής από τον μύκητα *Rhizoctonia solani* το θερμοκρασιακό εύρος για την επιβίωση του είναι από τους 5 μέχρι τους 35°C ενώ ιδανικές θεωρούνται οι θερμοκρασίες μεταξύ 24 και 28°C. Όσον αφορά τις τιμές του pH ιδανικές θεωρούνται από 4,5 μέχρι 7, ενώ ο μύκητας δεν μπορεί να επιβιώσει σε τιμές χαμηλότερες του 2,4 και υψηλότερες του 9. Όσον αφορά το υδατικό δυναμικό το ύψιστο επιτρεπτό για την ανάπτυξη του μύκητα είναι από -1 έως -10 bars ενώ θα πρέπει να τονίσουμε πως ο μύκητας παύει να αναπτύσσεται σε τιμές υψηλότερες από -50 έως -60 bars (Δεληγιάννη 1994).

3.3 Το βακτήριο *Paenibacillus alvei* K165 ως βιολογικός παράγοντας

Το είδος *Paenibacillus alvei* ανήκει στην κατηγορία των αυξητικών ριζοσφαιρικών βακτηρίων τα οποία βρίσκονται στις άκρες του ριζικού συστήματος των φυτών και ευνοούν την ανάπτυξη της καλλιέργειας. Το στέλεχος Κ 165 του βακτηρίου *Paenibacillus alvei* απομονώθηκε το 2004 από φυτά τομάτας σε έδαφος που είχε υποστεί ηλιοαπολύμανση. Το στέλεχος αυτό βρέθηκε ότι έχει θετική επίδραση στην ανάπτυξη φυτών μελιτζάνας και πατάτας. (Tjamos et al., 2004).

Η θετική αυτή επίδραση στην ανάπτυξη των φυτών οφείλεται εκτός από την προστασία που προσφέρει έναντι στα παθογόνα και σε άλλους μηχανισμούς όπως για παράδειγμα αυτό της αύξησης της διαθεσιμότητας του αζώτου, του φωσφόρου και διάφορων άλλων βασικών μετάλλων στο έδαφος. Επίσης, έχουν ενεργό δράση και στην παραγωγή ρυθμιστών ανάπτυξης των φυτών όπως είναι οι αυξίνες. Επίσης, το στέλεχος Κ165 στο ριζικό σύστημα ενός φυτού έχει την ικανότητα να επηρεάζει την συγκέντρωση αιθυλενίου με συνέπεια όταν οι συγκεντρώσεις του να είναι μεγάλες να προκαλείται

γήρανση του φυτού. Οι μηχανισμοί που χρησιμοποιούν βακτήρια όπως αυτό είναι ο ανταγωνισμός για θρεπτικά συστατικά, η αντιβίωση, ο αποικισμός κ.α. (Τζάμος, 2004).

Σε γενικές γραμμές μπορούμε να αναφέρουμε πως το στέλεχος K 165 ανήκει στα βακτήρια εκείνα τα οποία προωθούν την ανάπτυξη των φυτών και μπορούν μεταξύ άλλων να ενεργοποιούν την άμυνα των φυτικών οργανισμών της καλλιέργειας. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 2004 από τους Van Loon and Glick προέκυψε ότι τέτοιου είδους βακτήρια μπορούν να μειώσουν όχι μόνο την ένταση αλλά και την συχνότητα προσβολών που οφείλονται σε παθογόνα που είναι χωρικά διαχωρισμένα από τον βιολογικό παράγοντα. Βακτήρια τέτοιου είδους μπορούν να λειτουργούν ευνοϊκά για την καλλιέργεια απλά και μόνο επειδή τα προστατεύουν από διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς (Van Loon and Glick, 2004).

Κεφάλαιο 4ο: Βιοδείκτες και Μοριακοί Δείκτες

4.1 Βιοδείκτες

Οι βιοδείκτες είναι γονίδια τα οποία έχουν την ικανότητα να ενώνονται με γονίδια στόχους σε μικροοργανισμούς, ζώα,, φυτά αλλά και σε κυτταροκαλλιέργειες. Ως βιοδείκτες επιλέγονται γόνοι των οποίων η έκφραση αναγνωρίζεται και υπολογίζεται εύκολα. Γενικά χρησιμοποιούνται για την διαπίστωση της έκφρασης του γονιδίου – στόχου στα κύτταρα ή στους οργανισμούς. Ακόμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση κάποιων κυτταρικών συστατικών ή και οργανισμών (Lorang et al., 2001).

Κοινοί βιοδείκτες σε φυτικούς ή μικροβιακούς οργανισμούς είναι η πράσινη και η κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP και DsRed) και το ένζυμο λουσιφεράση (το ένζυμο αυτό παράγει φως καταλύοντας τη λουσιφερίνη)

Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος βιοδείκτης είναι η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (green fluorescent protein, GFP). Η πρωτεΐνη αυτή απομονώθηκε το 1962 από μέδουσα (*Aequora victoria*) που ζει στον Ειρηνικό Ωκεανό. Τα χρόνια που ακολούθησαν ήταν κομβικά για τον επαναπροσδιορισμό του τρόπου μελέτης της πρωτεϊνικής λειτουργίας βοηθώντας ταυτόχρονα την μοριακή λειτουργία να σημειώσει τεράστια άλματα. Ο συγκεκριμένος βιοδείκτης σήμερα χρησιμοποιείται ευρέως τόσο για την παρακολούθηση κυττάρων στο μικροσκόπιο όσο και για την παρατήρηση και ποσοτικοποίηση της έκφρασης γονιδίων σε μονοκύτταρους και πολυκύτταρους οργανισμούς (Prasher, 1995).

Η χρήση αυτού του βιοδείκτη όπως αναφέρθηκε και παραπάνω είχε σημαντικά οφέλη αφού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πολλούς οργανισμούς (μύκητες, βακτήρια, φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς). Επίσης έχει πολύ μικρές απαιτήσεις σε φθορισμό (UV ή μπλε φωτισμό και οξυγόνο) (Lorang et al., 2001).

Ωστόσο θα πρέπει να αναφερθούν και κάποια μειονεκτήματα της συγκεκριμένης μεθόδου που σχετίζονται με την μειωμένη έκφραση της σε πληθώρα κυτταρικών τύπων, την χαμηλή ένταση φθορισμού της στον μπλε φωτισμό, την απώλεια του ακόμη και την τοξικότητα που ενδέχεται να προκαλέσει. Τα μειονεκτήματα αυτά οδήγησαν στην ανάπτυξη μιας νέας γενιάς φθοριζουσών πρωτεϊνών, οι οποίες είναι σταθερότερες σχετικά με την φωτολεύκανση, περισσότερο φωτεινές, μάλιστα πολλές από αυτές εμφανίζουν διαφορετικές βιοχημικές και φωτοχημικές ιδιότητες (Mishin et al., 2008, Zang et al., 1996).

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφέρουμε πως έχουν απομονωθεί και πρωτεΐνες από άλλους οργανισμούς με όμοιες φωτοχημικές ιδιότητες αλλά και έχουν παραχθεί τεχνητές φθορίζουσες πρωτεΐνες με διαφορετικά φάσματα απορρόφησης και εκπομπής. Τέτοια παραδείγματα είναι η κυανή φθορίζουσα (Cyan fluoresent protein, CFP) και η κίτρινη φθορίζουσα YFP (Yellow fluorescent protein) (Ando, 2004).

4.2 Μοριακές μέθοδοι

4.2.1 Ο μετασχηματισμός των μυκήτων

Για την αποτελεσματική μελέτη της βιολογίας και των μηχανισμών δράσης των μυκήτων μπορούν να αποδιοργανωθούν τα γονίδια τους είτε στοχευμένα είτε τυχαία. Με τον τρόπο αυτό μπορούν να απομονωθούν μεταλλαγές τους με τροποποιημένες ιδιότητες. Παρόλο που έχει χρησιμοποιηθεί ένας μεγάλος αριθμός για μια τέτοια ανάλυση, οι πιο συνηθισμένες είναι οι τεχνικές του μετασχηματισμού (Mullins & Kang, 2001).

Μια από τις πιο χρησιμοποιούμενες μεθόδους για τον μετασχηματισμό των μυκήτων είναι η απομόνωση των πρωτοπλαστών. Ωστόσο η μέθοδος αυτή είναι αρκετά απαιτητική σε χρόνο και η συχνότητα με την οποία μετασχηματίζεται δεν είναι ιδιαίτερα υψηλή σήμερα χρησιμοποιούνται περισσότερο δύο άλλες μέθοδοι μετασχηματισμού (Mullins et al., 2001).

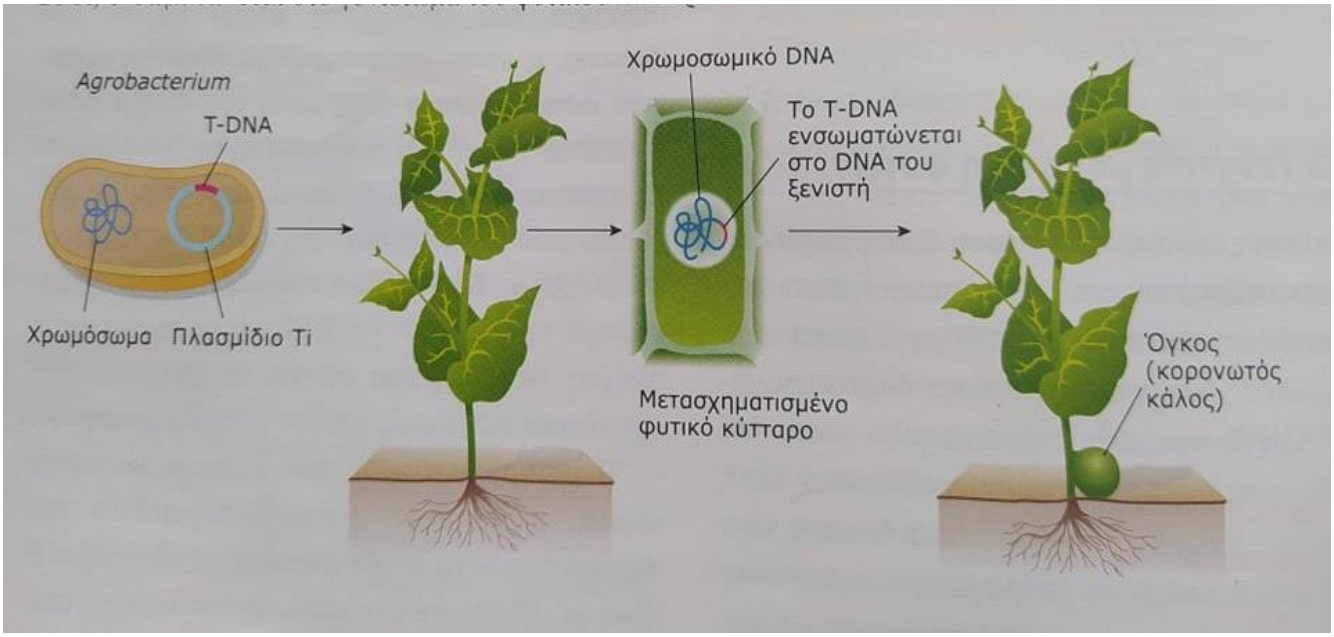
Η μέθοδος REMI (Restriction Enzyme – Mediated Integration) περιλαμβάνει την χρήση περιοριστικών ενζύμων για την μεταχείριση τόσο του γονιδιώματος του ξενιστή όσο και του πλασμιδίου. Αυτό έχει σαν συνέπεια την αύξηση της αποτελεσματικότητας του μετασχηματισμού αλλά και ένα ποσοστό μορίων DNA, συνήθως παραμένει μη μετασχηματισμένο ή φέρει ανεπιθύμητες ανακατατάξεις γεγονός που αποτελεί ένα από τα σπουδαιότερα προβλήματα της μεθόδου (Mullins & Kang, 2001).

Από την άλλη πλευρά η μέθοδος ATMT (*Agrobacterium tumefaciens* – Mediated Transformation) περιλαμβάνει την χρήση του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens.* Το βακτήριο αυτό έχει την ικανότητα να μεταφέρει τμήμα του γονιδιώματος του σε ευκαριωτικά κύτταρα. Η μέθοδος παράγει ένα υψηλό ποσοστό μεταλλάξεων και εμφανίζει μεγάλη προσαρμοστικότητα στο αρχικό υλικό (είναι δυνατή η χρήση υφών, κονιδίων ή και καρποφοριών μυκήτων) (Michielse et al., 2005).

4.2.2 *Agrobacterium tumefaciens - Mediated Transformation*

Τα τελευταία χρόνια οι επιστήμονες έχουν αξιοποιήσει το φυσικό μηχανισμό που διαθέτει το βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens* προκειμένου να μεταφέρει ένα καθορισμένο τμήμα DNA στο γονιδίωμα των φυτικών κυττάρων. Το βακτήριο προκαλεί το μετασχηματισμό των φυτικών κυττάρων στην περιοχή της πληγής, γεγονός που οδηγεί σε ανεξέλεγκτες κυτταρικές διαιρέσεις και στον σχηματισμό όγκων (Russell, 2005).

Εικόνα 2: Σχηματισμός όγκων σε φυτά μέσω της μόλυνσης τους με το βακτήριο *Agrobacterium.*



Πηγή: Russell, 2005

Ο μετασχηματισμός των φυτικών κυττάρων γίνεται μέσω ενός φυσικού πλασμιδίου του *Agrobacterium* που ονομάζεται πλασμίδιο Ti (Tumor-inducing). Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στο βακτήριο και το φυτικό κύτταρο – ξενιστή ενεργοποιεί την εκτομή μιας περιοχής 30kb του Ti η οποία ονομάζεται T-DNA. Το T-DNA περιβάλλεται από δύο επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 25bp που ονομάζονται όρια, οι οποίες εμπλέκονται στην εκτομή του. Η εκτομή ξεκινά με μια εγκοπή στον ένα κλώνο του δεξιού ορίου. Μια δεύτερη εγκοπή στο αριστερό όριο απελευθερώνεται ένα μονόκλωνο μόριο T-DNA, το οποίο στην συνέχεια μεταφέρεται από το βακτήριο στον πυρήνα του φυτικού κυττάρου μέσω μιας διαδικασίας ανάλογης με αυτής της βακτηριακής σύζευξης. Αφού εισέλθει στον πυρήνα του φυτικού κυττάρου, το T-DNA ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του φυτού. Έτσι εκφράζονται στο φυτικό κύτταρο τα γονίδια που εκφράζονται στο T-DNA προκαλώντας το μετασχηματισμό του (Russell, 2005).

Χρησιμοποιώντας τις τεχνικές του ανασυνδυασμένου DNA, οι ερευνητές έχουν διαπιστώσει ότι για την εκτομή, την μεταφορά και την ένθεση του T-DNA τα μόνα cis-ρυθμιστικά στοιχεία που απαιτούνται είναι τα δύο όρια: οι δύο επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 25bp. Επομένως, το πλασμίδιο Ti αποτελεί ένα χρήσιμο μέσο για την εισαγωγή νέων αλληλουχιών DNA στο πυρηνικό γονιδίωμα των σωματικών κυττάρων, εκείνων των φυτικών ειδών πουν προσβάλλονται από το *Agrobacterium*. Εφόσον κάθε γονίδιο που τοποθετείται ανάμεσα στα δύο όρια μπορεί με την βοήθεια των γονιδίων της περιοχής vir να ενταθεί στο γονιδίωμα του φυτού – ξενιστή, είναι δυνατόν να δημιουργηθούν διάφοροι φορείς μετασχηματισμού φυτικών κυττάρων με βάση το πλασμίδιο Ti (Michielse et al., 2005).

Το βαμβάκι είναι ένα δικοτυλήδονο φυτό, και στην περίπτωση των δικοτυλήδωνων φυτών το σύστημα μετασχηματισμού που βασίζεται στο πλασμίδιο Ti είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό. Η αποτελεσματικότητα αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι τα περισσότερα δικοτυλήδονα ανήκουν στους φυσικούς ξενιστές του *Agrobacterium tumefaciens* (Russell, 2005).

Κατά την μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης, το DNA προστίθεται σε πρωτοπλάστες φυτικών κυττάρων (φυτικά κύτταρα τα οποία έχουν απομακρυνθεί από το κυτταρικό τοίχωμα) και το μείγμα εκτίθεται στιγμιαία σε υψηλή τάση, γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα την εισαγωγή του DNA στο κύτταρο. Κατόπιν τα κύτταρα αυτά αναπτύσσονται σε καλλιέργεια ώστε να αναγεννήσουν το κυτταρικό τους τοίχωμα και να αρχίσουν να πολλαπλασιάζονται. Με κατάλληλους χειρισμούς γίνεται παράλληλα η επιλογή των κυττάρων που μετασχηματίστηκαν με επιτυχία και στην συνέχεια η αναγέννηση από αυτά ολόκληρων φυτών (Russell, 2005).

Υπάρχει μια ακόμη μέθοδος η οποία βασίζεται στην χρήση του λεγόμενου γονιδιακού πιστολιού (gene gun). Στην περίπτωση αυτή, το DNA επιστρώνεται στην επιφάνεια μικροσκοπικών σφαιριδίων από βολφράμιο, τα οποία τοποθετούνται στο άκρο της πλαστικής σφαίρας. Η σφαίρα βάλλεται από έναν ειδικό εκτοξευτή (το γονιδιακό πιστόλι) και προσκρούει σε μια οπή μιας σταθερής επιφάνειας. Έτσι η πορεία του

βλήματος ανακόπτεται από την σταθερή επιφάνεια, ενώ τα σφαιρίδια βολφραίμιο διέρχονται από τη μικρή οπή και καταλήγουν με μεγάλη ταχύτητα σε ένα θάλαμο στον οποίο έχουν τοποθετηθεί τα κύτταρα στόχοι. Λόγω της μεγάλης ταχύτητας τους, τα σφαιρίδια εισέρχονται μεταφέροντας σε αυτά το DNA. Στην συνέχεια., μπορούν να εφαρμοστούν κατάλληλες τεχνικές για την επιλογή των κυττάρων που μετασχηματίστηκαν με επιτυχία. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν για την αναγέννηση ολόκληρων φυτών (Michielse et al., 2005).

4.3 Γενικά στοιχεία για την PCR

Στα μέσα της δεκαετίας του 80 αναπτύχθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) η οποία έφερε μια νέα επανάσταση στον τομέα της γονιδιακής ανάλυσης και αποτελεί πλέον ένα από τα σπουδαιότερα εργαλεία της σύγχρονης μοριακής βιολογίας. Μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται πολλαπλασιασμός η PCR επιτρέπει την παραγωγή in vitro από κάποιο δείγμα DNA ενός μεγάλου αριθμού αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Με τον τρόπο αυτό προσφέρονται νέοι τρόποι ανάλυσης των γονιδίων και των λειτουργιών τους (Russell, 2005).

4.3.1 Τα βήματα της PCR

Η PCR αρχίζει με την αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA το οποίο περιέχει την αλληλουχία – στόχο. Ο πολλαπλασιασμός πραγματοποιείται με πολλούς γύρους αντιγραφής της αλληλουχίας – στόχου και κάνοντας χρήση ως εκκινητές ένα ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων τα οποία προσδένονται στο μονόκλωνο DNA στα άκρα της αλληλουχίας – στόχου. Το ζεύγος των εκκινητών σχεδιάζεται με τρόπο τέτοιο ώστε να είναι συμπληρωματικοί και κατά συνέπεια να υβριδίζουν σε θέσεις με αντίθετες αλυσίδες της μήτρας του δίκλωνου DNA, περικλείοντας της περιοχή της οποίας είναι επιθυμητή η παραγωγή μεγάλου αριθμού αντιγράφων και οδηγώντας στην σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας (Russell, 2005).

Η PCR διεξάγεται ως εξής:

•Αποδιατάσσεται με θέρμανση σε θερμοκρασία 95°C το δίκλωνο μόριο DNA, το οποίο φέρει την αλληλουχία – στόχο.

•Στην συνέχεια ψύχεται το μείγμα της αντίδρασης σε ένα θερμοκρασιακό εύρος από τους 37 μέχρι τους 65°C ανάλογα με το μέγεθος και την αλληλουχία των εκκινητών. Στο στάδιο αυτό οι εκκινητές προσδένονται στο αποδιαταγμένο DNA. Οι δύο εκκινητές έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε στην ιδανική θερμοκρασία να προσδένεται με υψηλή ειδικότητα σε μια από τις δύο αλυσίδες του DNA που χρησιμοποιείται ως μήτρα, στα άκρα της αλληλουχίας η οποία πρόκειται να πολλαπλασιαστεί.

•Ακολουθεί η θέρμανση στους 70 με 75°C όπου οι εκκινητές επιμηκύνονται από μια ανθεκτική στην θερμοκρασία DNA πολυμεράση (συνήθως η Taq πολυμεράση)

•επαναλαμβάνονται οι διαδικασίες αποδιάταξης του δίκλωνου DNA και πρόσδεσης των εκκινητών.

•Ακολουθεί η σύνθεση DNA μέσω της επιμήκυνσης των εκκινητών DNA πολυμεράση Taq. Σε κάθε ένα από τα δύο δίκλωνα μόρια που παράγονται η αλυσίδα έχει το επιθυμητό μήκος της αλληλουχίας.

•Επαναλαμβάνονται οι διαδικασίες αποδιάταξης του δίκλωνου DNA και πρόσδεσης των εκκινητών.

•Ακολουθεί εκ νέου σύνθεση DNA μέσω της επιμήκυνσης των εκκινητών από την DNA πολυμεράση Taq. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή δίκλωνων μορίων DNA σε μοναδιαίο μήκος.

(Russell, 2005).

Συνοψίζοντας, ξεκινώντας από ένα μόριο DNA, μετά από έναν κύκλο παράγονται δύο μόρια, μετά από δύο κύκλους τέσσερα μόρια και μετά από τρεις κύκλους οκτώ μόρια, τα δύο από τα οποία έχουν μοναδιαίο μήκος και αποτελούν το επιθυμητό προϊόν. Μετά από δέκα ακόμη κύκλους παράγονται 1.024 αντίγραφα (2^{10}) του επιθυμητού προϊόντος (Russell, 2005).

4.3.2 Ανίχνευση των προϊόντων της PCR

Όπως η συνηθισμένη PCR έτσι και η PCR αντίστροφης μεταγραφάσης είναι μια ιδιαίτερα ευαίσθητη τεχνική η οποία χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του RNA. Τα προϊόντα της PCR αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Το DNA καθίσταται ορατό μετά από χρώση με βρομιούχο αιθίδιο και έκθεση του πηκτώματος σε ακτινοβολία UV. Η ένταση του φθορισμού αποτελεί ένα μέτρο της ποσότητας των προϊόντων και αυτή σχετίζεται άμεσα με την αρχική ποσότητα της μήτρας στο δείγμα που εξετάστηκε (Russell, 2005).

Στην συνέχεια το cDNA πολλαπλασιάζεται παρουσία μιας φθορίζουσας χρωστικής με μεγάλη ευαισθησία. Καθώς η αντίδραση προχωρά, ο φθορισμός των προϊόντων της μετριέται σε πραγματικό χρόνο με την βοήθεια ενός ειδικού θερμοκυκλοποιητή. Ο ρυθμός συγκέντρωσης των προϊόντων επιτρέπει τον υπολογισμό της ποσότητας του mRNA στο δείγμα. Προκειμένου να είναι συγκρίσιμες μεταξύ τους, οι μετρήσεις σε διαφορετικά δείγματα κανονικοποιούνται με βάση τις μετρήσεις σε δείγματα αναφοράς. Η μέθοδος αυτή σε πραγματικό χρόνο, λόγω της μεγάλης ακρίβειας, χρησιμοποιείται πλέον ευρέως για τον ποσοτικό προσδιορισμό του RNA (Russell, 2005).

Σκοπός της εργασίας

Οι σηψιρριζίες αποτελούν μερικά από τα πιο σημαντικά προβλήματα σε πολλές καλλιέργειες και προκαλούνται από εδαφογενείς μύκητες που προσβάλλουν τις περισσότερες φορές νεαρά φυτά. Ο μύκητας *Rhizoctonia solani* είναι ένας από τους σημαντικότερους μύκητες που προκαλούν σηψιρριζίες κυρίως σε νεαρά φυτά και οι σπουδαιότεροι ξενιστές τους είναι, η τομάτα, η μελιτζάνα, το βαμβάκι, η πιπεριά κ.α. Τα τελευταία χρόνια γίνονται εντατικές προσπάθειες για την εύρεση βιολογικών παραγόντων τα οποία θα ανταγωνίζονται εδαφογενή παθογόνα προκειμένου να μειωθεί η χημική καταπολέμηση.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η παρατήρηση της αλληλεπίδρασης του στελέχους K165 του βακτηρίου *Paenibacillus alvei* στην πρόληψη/καταστολή έναντι μυκητολογικών ασθενειών που προσβάλλουν την καλλιέργεια του βαμβακιού και πιο συγκεκριμένα της ριζοκτονίας που προκαλείται από τον μύκητα *Rhizoctonia solani*.

Υλικά και Μέθοδοι

Το πείραμα της εργασίας αυτής έγινε με στόχο να μελετήσει την θετική επίδραση του στελέχους K165 του βακτηρίου *Paenibacillus alvei* στην πρόληψη/καταστολή έναντι μυκητολογικών ασθενειών που προσβάλλουν την καλλιέργεια του βαμβακιού και πιο συγκεκριμένα της ριζοκτονίας.

1η πειραματική διαδικασία

Η σπορά πραγματοποιήθηκε στις 10 Ιουνίου του 2020 στις θερμοκηπιακές εγκαταστάσεις του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στην Αθήνα. Οι σπόροι ήταν της εταιρείας Pioneer και δόθηκαν για τις ανάγκες του πειράματος από τον συνάδελφο και παραγωγό κ. Χαράλαμπο Ηλιάδη. Στο σημείο αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό να αναφέρουμε πως οι σπόροι ήταν αποστειρωμένοι, απαλλαγμένοι από διάφορα φυτοπαθογόνα ενώ το ποσοστό φυτρωτικότητας τους ήταν υψηλό.

Πριν την σπορά, στο θερμοκήπιο του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών έγινε η καλλιέργεια του βακτηρίου. Το βακτήριο βρίσκονταν σε τριβλίο σε υπόστρωμα NAG, με την χρήση αποστειρωμένης εργαστηριακής βελόνας αφαιρέθηκε τμήμα και προστέθηκε σε κωνική φιάλη με NG υπόστρωμα χωρίς άγαρ.

Εικόνα 3: Η παρασκευή του NG

Για την παρασκευή του για να θεωρηθεί μια ουσία ασφαλής θα πρέπει η αρμόδια επιτροπή να ελέγξει και να αξιολογήσει πιθανή τοξικότητα της μέσα από διάφορα πειράματα. NG για 100ml χρειάστηκαν 2gr glycerol, 100 ml H_2O και 0,8 nutrient broth. Στην συνέχεια το μείγμα αναδεύτηκε για 1 λεπτό με το χέρι και αφού προστέθηκε το βακτήριο παρέμεινε 48 ώρες για να επωάσει. Αφού ολοκληρώθηκε αυτή η διαδικασία το βακτήριο ήταν έτοιμο για χρήση.

Ο σχεδιασμός του πειράματος περιελάμβανε ξεχωριστές εφαρμογές. Η πρώτη εφαρμογή ήταν ο μάρτυρας, η δεύτερη εφαρμογή περιελάμβανε τον μύκητα *Rhizoctonia solani.* Ο μύκητας ελήφθη από ήδη μολυσμένους σπόρους οι οποίοι βρίσκονταν στο εργαστήριο του Γεωπονικού Πανεπιστημίου οι οποίοι με την βοήθεια ομογενοποιητή συνεθλίβησαν. Στην συνέχεια αφού υπολογίστηκε η ποσότητα χώματος που απαιτούνταν για 20 γλαστράκια τοποθετήθηκε και το μείγμα με τον μύκητα, πραγματοποιήθηκε μικρής διάρκειας αναμόχλευση με το χέρι και έπειτα φυτεύτηκαν οι σπόροι του βαμβακιού. Όμοια για την εφαρμογή 3, εφαρμογή ριζοκτονίας σε συνδυασμό με το στέλεχος K165 στερεό (μορφή πολύ ψιλής άσπρης σκόνης “TALK) ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία. Στην 4 εφαρμογή, εφαρμογή ριζοκτονίας σε συνδυασμό με το στέλεχος K165 σε στερεή και υγρή μορφή ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με την διαφορά ότι πριν γίνει η τοποθέτηση των σπόρων προστέθηκε το στέλεχος K-165 σε υγρή μορφή έτσι όπως κατασκευάστηκε στο εργαστήριο.

1η εφαρμογή	Μάρτυρας
2η εφαρμογή	Μύκητας *Rhizoctonia solani*
3η εφαρμογή	Μύκητας *Rhizoctonia solani* σε συνδυασμό με το στέλεχος K165 σε στερεή μορφή (TALK)
4η εφαρμογή	Μύκητας *Rhizoctonia solani* σε συνδυασμό με το στέλεχος K165 σε στερεή και σε υγρή μορφή

Στην σπορά χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος αριθμός σπόρων για κάθε εφαρμογή. Οι σπόροι τοποθετήθηκαν ανά 3 σε γλαστράκια διαστάσεων 7*7*6 cm. Τα γλαστράκια ανά 20 τεμάχια τοποθετήθηκαν σε έναν δίσκο. Κάθε δίσκος ήταν και μια διαφορετική εφαρμογή. Συμπερασματικά θα πρέπει να αναφέρουμε πως ο συνολικός αριθμός των φυτών και από τις 4 εφαρμογές ήταν 3σπόροι/γλαστράκι * 20 γλαστράκια κάθε δίσκου = 60 σπόροι. Το σύνολο των σπόρων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 240 σπόροι και για τις 4 εφαρμογές του πειράματος.

Μετά την σπορά οι δίσκοι ποτίζονταν σταθερά 2 με 3 φορές την εβδομάδα προκειμένου το χώμα να εξασφαλίσει την απαιτούμενη υγρασία για το φύτρωμα των σπόρων.

Η πρώτη παρατήρηση έγινε στις 18 Ιουνίου του 2020 με σκοπό να ελεγχθεί η φυτρωτικότητα των σπόρων και για τις 4 εφαρμογές.

Εικόνα 4: Η φυτρωτικότητα των σπόρων βαμβακιού στις 18/6/20 και για τις 4 εφαρμογές

2η πειραματική διαδικασία

Η ίδια ακριβώς διαδικασία επαναλήφθηκε στις 12/10/2020, και σε αυτή την περίπτωση η πρώτη εφαρμογή ήταν ο μάρτυρας, η 2η εφαρμογή ήταν η ριζοκτονία, η 3η εφαρμογή ήταν η ριζοκτονία σε συνδυασμό με το στέλεχος K165 σε μορφή σκόνης και η 4η εφαρμογή ήταν η ριζοκτονία σε συνδυασμό με το στέλεχος K165 σε υγρή και στερεή μορφή. Η διαφορά αυτής της επανάληψης ήταν ότι αυτή την φορά ακολουθήθηκε η μέθοδος της αντίδρασης της πολυμεράσης – PCR.

Και σε αυτήν την σπορά χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος αριθμός σπόρων για κάθε εφαρμογή. Οι σπόροι τοποθετήθηκαν ανά 3 σε γλαστράκια διαστάσεων 7*7*6 cm. Τα γλαστράκια ανά 20 τεμάχια τοποθετήθηκαν σε έναν δίσκο. Κάθε δίσκος ήταν και μια διαφορετική εφαρμογή. Συμπερασματικά θα πρέπει να αναφέρουμε πως ο συνολικός αριθμός των φυτών και από τις 4 εφαρμογές ήταν 3σπόροι/γλαστράκι * 20 γλαστράκια κάθε δίσκου =

60 σπόροι. Το σύνολο των σπόρων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 240 σπόροι και για τις 4 εφαρμογές του πειράματος.

Τα γλαστράκια τοποθετήθηκαν εντός του θερμοκηπίου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και κάθε δύο ημέρες γινόταν έλεγχος και πότισμα αυτών.

Στις 11/11/2020 γίνεται η πρώτη συγκομιδή των φυτών και στις 13/11/2020 ακολουθεί η δεύτερη συγκομιδή των φυτών. Μετά την συγκομιδή των φυτών ακολουθεί τεμαχισμός τους και σύνθλιψη τους στο γουδί. Στην συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται στην κατάψυξη όπου και παραμένουν μέχρι τις 10/1/2021 οπότε και εξέρχονται προκειμένου να ακολουθηθεί η μέθοδος της qPCR και να ολοκληρωθεί το πείραμα.

Μέθοδος qPCR

Η απομόνωση του ολικού RNA από τους φυτικούς ιστούς έγινε με την χρήση του αντιδραστηρίου NucleoZOL (Macherey – Nagel) όπως προτείνει ο κατασκευαστής. Σε πρώτη φάση σε 50mg κονιορτοποιημένου ιστού προστίθεται 200 μl H_2O και 500 μl NucleoZOL και ακολουθεί έντονη ανάδευση (vortex) για 15 δευτερόλεπτα. Τα δείγματα αφήνονται για 5min σε ηρεμία για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, στην συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 15min, στους 4^oC. Μετά την φυγοκέντριση μεταφέρονται από 500 μl από την υπερκείμενη φάση σε νέο σωλήνα και γίνεται προσθήκη 500 μl ισοπροπανόλης. Τα δείγματα αφήνονται για 10min σε θερμοκρασία δωματίου έτσι ώστε να κατακρημνιστούν τα νουκλεϊκά οξέα. Ακολουθεί ξανά φυγοκέντριση για 10min στα 12.000g. Όταν ολοκληρωθεί η φυγοκέντριση παρατηρείται η δημιουργία ιζήματος (pellet), το οποίο περιέχει το RNA. Στην συνέχεια γίνεται απομάκρυνση των υπερκείμενων με στόχο να απομονωθεί το pellet, το οποίο στην συνέχεια ξεπλένεται με 500ml αιθανόλης (EtOH) 75% έτσι ώστε να ενυδατωθεί το δείγμα αλλά και να

αποβληθούν τα άλατα. Επόμενο βήμα είναι η φυγοκέντριση για 3min στους 4°C για 8.000g και η απομάκρυνση της υπερκείμενης φάσης. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται ακόμη μια φορά. Αφού ολοκληρωθεί λοιπόν αυτή η διαδικασία το pellet στεγνώνεται για 5 με 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στην συνέχεια επαναδιαλύεται σε νερό απαλλαγμένο από ριβονουκλεάσες. Τέλος, το RNA φυλάσσεται στην κατάψυξη (σε θερμοκρασία -20°C) για περαιτέρω χρήση.

Επόμενο βήμα του πειράματος ήταν ο καθαρισμός των δειγμάτων από DNA με την χρήση DNAse I (New England Biolabs) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για να γίνει ο καθαρισμός των δειγμάτων από το DNA σε πρώτη φάση προστέθηκε στο κάθε ένα δείγμα 1ml DNAse (1 unit) και στην συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν για επώαση σε θερμοκρασία 37°C για 10 λεπτά. Αμέσως μετά έγινε προσθήκη 0,5ml EDTA (5mM τελική συγκέντρωση) και τα δείγματα επωάστηκαν στους 75°C για 10min έτσι ώστε να απενεργοποιηθεί η DNAse I.

Η συγκέντρωση και η καθαρότητα των δειγμάτων προσδιορίστηκε με την χρήση Nanodrop. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφέρουμε πως πριν την μελέτη της έκφρασης των γονιδίων πραγματοποιήθηκε αντίστροφη μεταγραφή του mRNA σε cDNA με την χρήση του Prime Script RT reagent kit (TAKARA BIO INC) σύμφωνα πάντα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αρχικά 500ng RNA από κάθε δείγμα, αραιώθηκαν με δις-απεσταγμένο και αποστειρομένο νερό μέχρι τελικό όγκο 7mL. Στην συνέχεια για αντιδράσεις τελικού όγκου 10 μl σε κάθε δείγμα προστέθηκαν:

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

Εικόνα 5: Ο καθαρισμός των δειγμάτων από DNA με την χρήση Nanodrop στους 75°C για 10 min

Η Real-time PCR έγινε σε θερμοκυκλοποιητή Applied Biosystems StepOnePlus Real – Time PCR, για τις αντιδράσεις ενίσχυσης χρησιμοποιήθηκε το master mix FastGene IC Green 2x qpcr universal mix της NIPPON Genetics EUROPE και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό StepOne v.2.3. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της ακτίνης του φυτού *Gossypium hirsutum*, ως γονίδιο αναφοράς, χρησιμοποιήθηκαν σαν σταθερά για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των άλλων γονιδίων. Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τα γονίδια της ακτίνης, της χιτίνης (CHIT) και της γλουκοσιδάσης (GLUC) δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1: Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη έκφρασης γονιδίων βαμβακιού

Γονίδιο	Εκκινητές
GhAct2	F5'- CTCTCAACCCCAAGGCCAA-3’ F 5’-CTGTTGTACGACCACTGGCATAC-3’
GhGlu	F 5’-CATTGATATGACCTTGATCG-3’ R 5’-GTGAGATATCCCTTGGATTG-3’
GhCht	F 5’-ACCAAGCTACTCGCAAG-3’ R 5’-CGGAAGCGCAGTAAGATGA-3’

Ο υπολογισμός της έκφρασης κάθε γονιδίου έγινε με την εξίσωση: Έκφραση γονιδίου = $2^{-\Delta ct}$

όπου ΔCt είναι η διαφορά του μέσου κύκλου ουδού (threshold cycle) του εξεταζόμενου γονιδίου για μια πειραματική εφαρμογή από τον μέσο κύκλου ουδού του γονιδίου αναφοράς για την ίδια εφαρμογή.

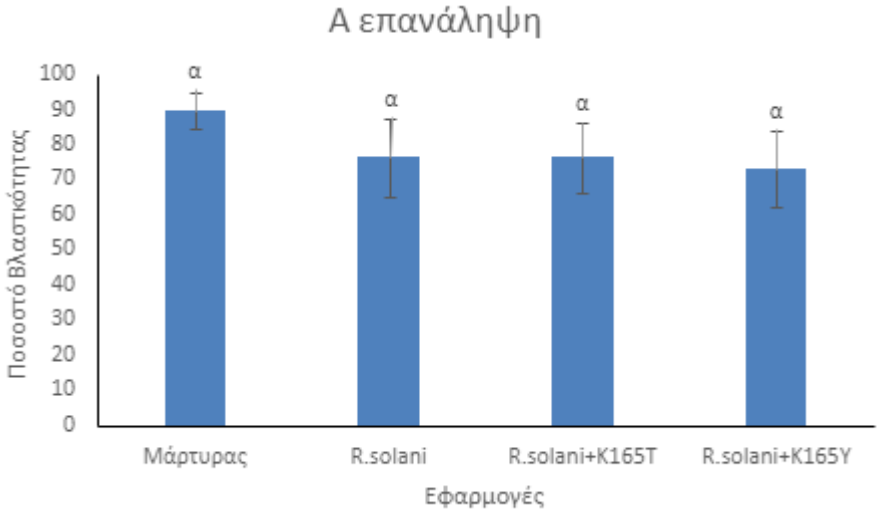
Η απουσία τυχαίων προϊόντων και διμερών εκκινητών βεβαιώθηκε με την ανάλυση των καμπύλων αποδιάταξης. Οι θερμοκρασίες στις οποίες αποδιατάσσονται διαφορετικά προϊόντα της PCR εξαρτώνται από το μέγεθος και την αλληλουχία των προϊόντων για αυτό και οι καμπύλες προϊόντων με ίδιο μήκος και ίδια αλληλουχία πρέπει να ταυτίζονται.

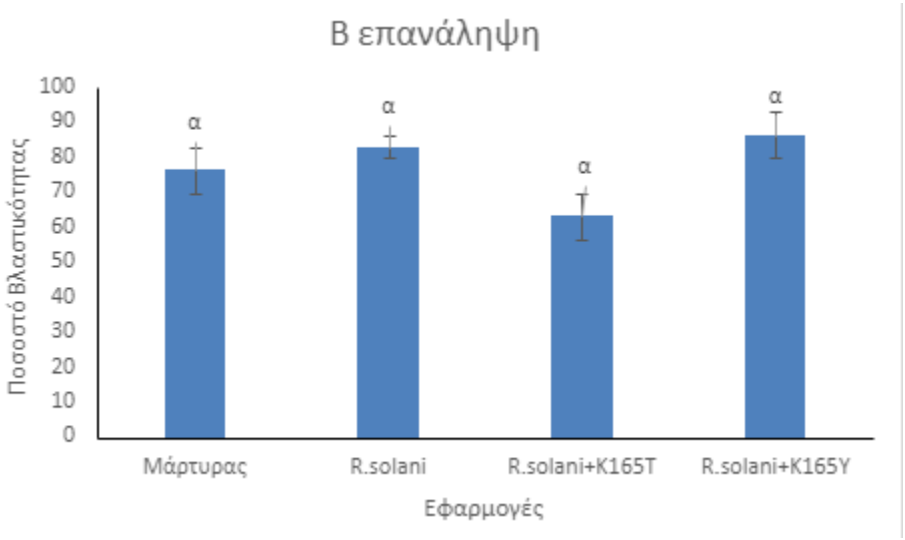
Αποτελέσματα

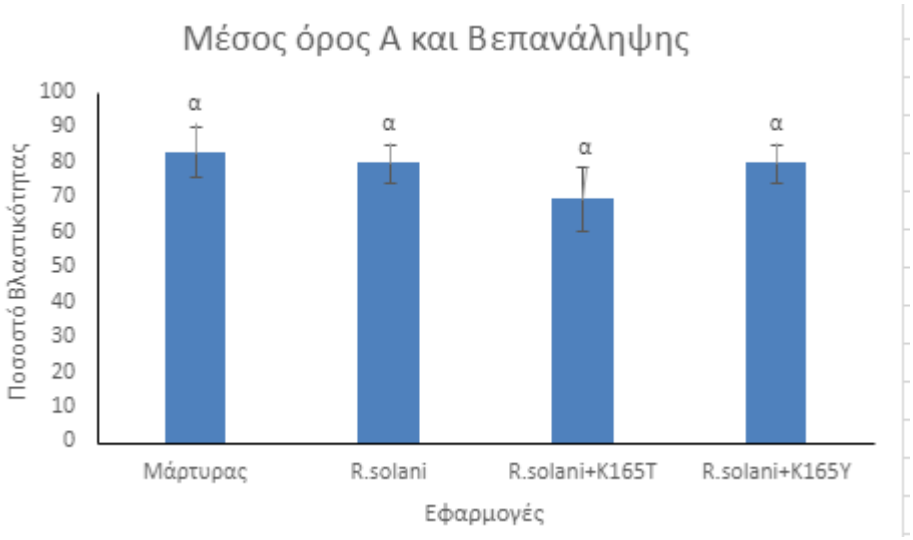
1η πειραματική διαδικασία

Στην πρώτη πειραματική διαδικασία μελετήθηκε στις 18 Ιουνίου 2020 η φυτρωτική ικανότητα των σπόρων βαμβακιού και για τις 4 εφαρμογές.

Διάγραμμα 1: Η φυτρωτική ικανότητα και για τις 4 εφαρμογές του πειράματος (Α επανάληψη, Β επανάληψη και μέσος όρος αυτών)







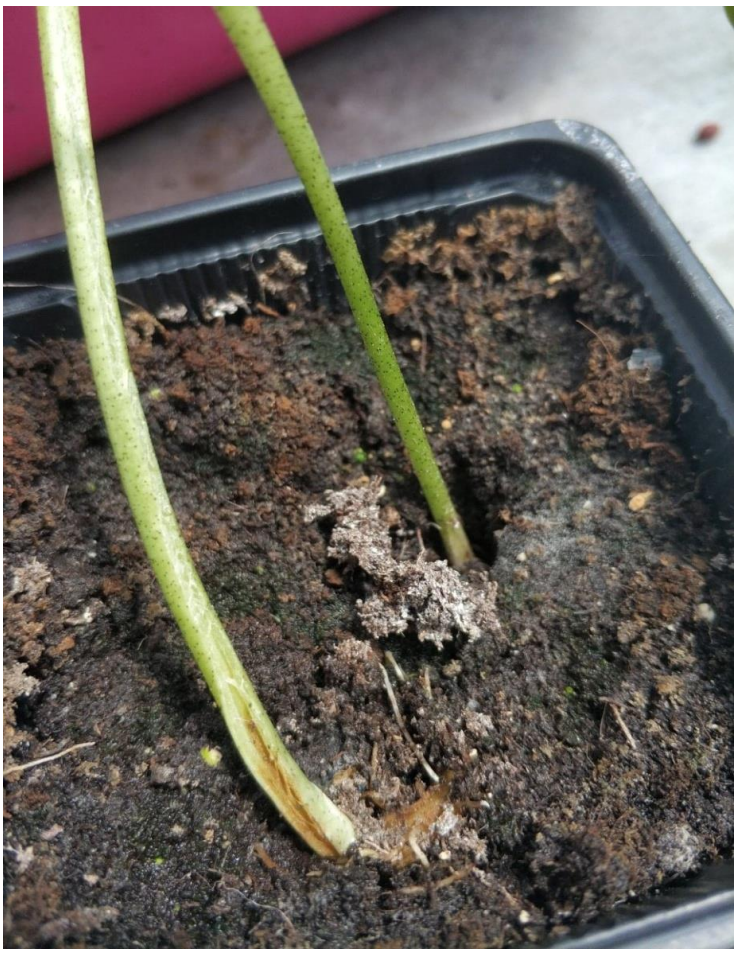
Από την επεξεργασία των δεδομένων προκύπτει ότι η φυτρωτική ικανότητα των σπόρων είναι υψηλή για όλες τις εφαρμογές του πειράματος. Πιο αναλυτικά, όπως μπορούμε να διαπιστώσουμε και από τα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται ότι στην 1η επανάληψη του πειράματος που πραγματοποιήθηκε στις 18/6/2020 η 1η εφαρμογή (μάρτυρας) παρουσίασε την υψηλότερη φυτρωτική ικανότητα συγκριτικά με τις άλλες τρεις εφαρμογές. Η 2η και η 3η η εφαρμογή η εφαρμογή της ριζοκτονίας και της ριζοκτονίας σε συνδυασμό με το K165 σε στερεή μορφή αντίστοιχα φαίνεται ότι η φυτρωτική ικανότητα των σπόρων κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα. Αντίθετα, στην 4η εφαρμογή (εφαρμογή ριζοκτονίας σε συνδυασμό με K165 σε στερεή και υγρή μορφή) φαίνεται πως παρουσιάζει με μικρή διαφορά από τις δύο προηγούμενες διαφορές το χαμηλότερο ποσοστό φυτρωτικής ικανότητας.

Στην 2η επανάληψη του πειράματος που πραγματοποιήθηκε στις 12/10/2020 τα αποτελέσματα παρουσιάζουν αξιόλογες διαφορές. Σε αυτή την περίπτωση το υψηλότερο ποσοστό φυτρωτικής ικανότητας καταγράφτηκε στην 4η εφαρμογή. Λίγο χαμηλότερο ήταν το ποσοστό στην 2η εφαρμογή και ακολούθησε η 1η. Σε αυτό το πείραμα το χαμηλότερο ποσοστό φυτρωτικής ικανότητας των σπόρων βαμβακιού καταγράφτηκε στην 3η εφαρμογή.

Συνολικά και από τις δύο επαναλήψεις του πειράματος η φυτρωτική ικανότητα των σπόρων βαμβακιού κυμαίνεται σε υψηλά επίπεδα, ωστόσο φαίνεται να υπάρχουν αξιόλογες διαφορές μεταξύ των εφαρμογών. Πιο αναλυτικά, η υψηλότερη φυτρωτική ικανότητα και των δύο επαναλήψεων καταγράφτηκε στην πρώτη εφαρμογή, δηλαδή στην εφαρμογή του μάρτυρα όπου δεν προστέθηκε ο μύκητας *Rhizoctonia solani*. Ακολουθούν η εφαρμογή 2 και η εφαρμογή 4 που κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα, ενώ η εφαρμογή 3 κατέγραψε κατά μέσο όρο τα χαμηλότερα επίπεδα φυτρωτικής ικανότητας των σπόρων βαμβακιού.

Στις 29 Ιουνίου 2020 πραγματοποιήθηκε η 2η παρατήρηση στην οποία μετρήθηκε ο δείκτης ασθενείας των φυτών εκφραζόμενος επί %.

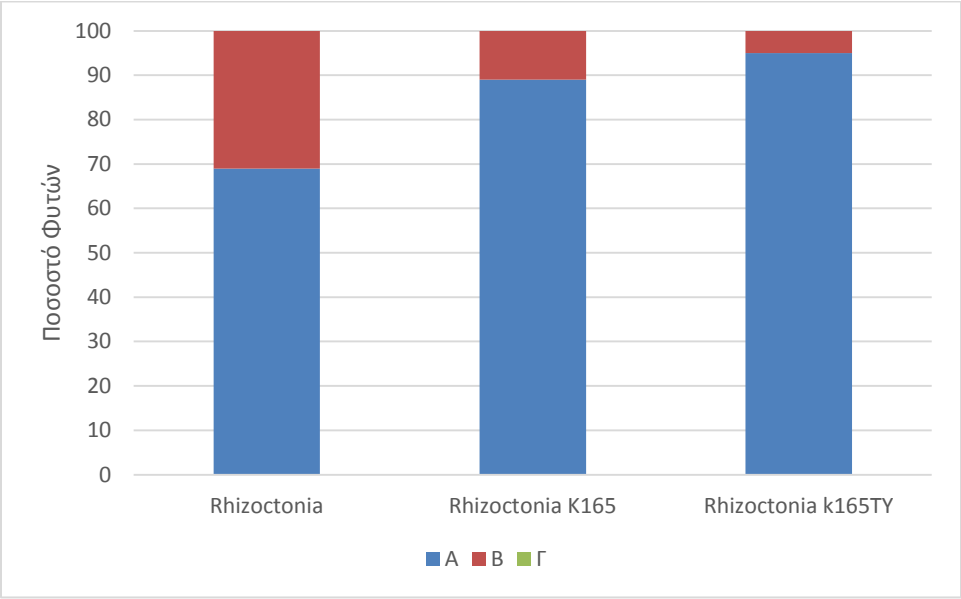
Εικόνα 6: Στην παρακάτω φωτογραφία απεικονίζεται ένα υγιές και ένα προσβεβλημένο από τον μύκητα φυτό.



Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφέρουμε ότι στην ομάδα Α εντάσσεται το ποσοστό των προσβεβλημένων φυτών με ποσοστό 0% (Α=0%), στην ομάδα Β εντάσσεται το ποσοστό των προσβεβλημένων φυτών από 1 μέχρι 25% (Β=1-25%) και στην ομάδα Γ από 26 μέχρι 50% (Γ=26-50%).

Στη 2η εφαρμογή, αυτή της ριζοκτονίας, στις 29/6/2020 τα προσβεβλημένα φυτά εντάσσονται στην ομάδα Α σε ποσοστό 20% και στην ομάδα Β σε ποσοστό 31%. Η 3η εφαρμογή που περιλαμβάνει την προσθήκη του μύκητα Rhizoctonia σε συνδυασμό με το στέλεχος K165 σε στερεή μορφή Talk, την ίδια ημερομηνία τα προσβεβλημένα φυτά εντάσσονται στην ομάδα Α σε ποσοστό 38% και στην ομάδα Β σε ποσοστό 11%. Η 4η εφαρμογή που περιλαμβάνει την εφαρμογή του μύκητα Rhizoctonia σε συνδυασμό με το στέλεχος K165 σε στερεή και υγρή μορφή στις 29/6/2020 τα προσβεβλημένα φυτά εντάσσονται στην ομάδα Α σε ποσοστό 46% και στην ομάδα Β σε ποσοστό 5%.

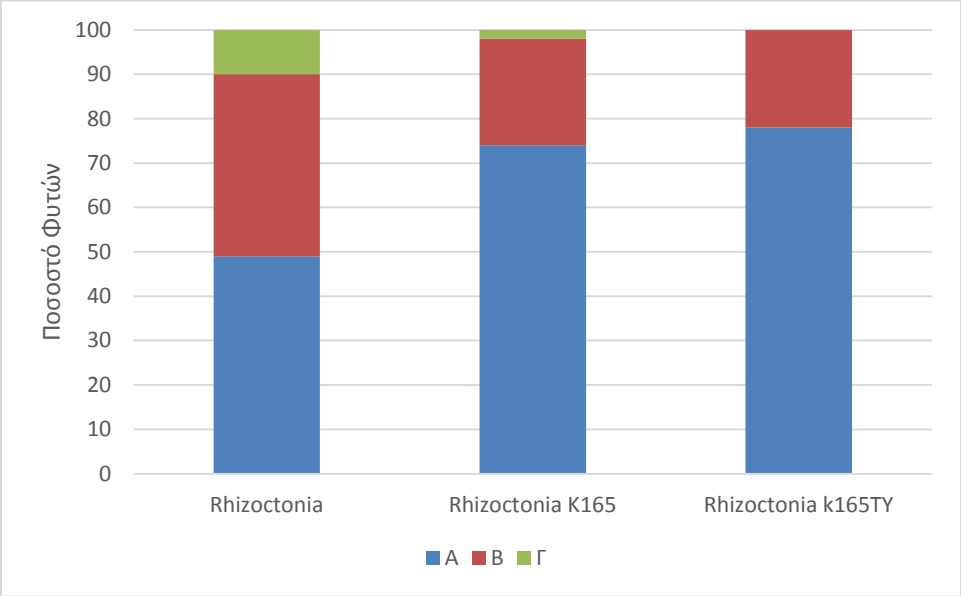
Διάγραμμα 2: Απεικόνιση συμπτωμάτων στις 29/6/2020



Στις 9/7/2020 πραγματοποιήθηκε η τρίτη και η τελευταία παρατήρηση αυτής της πειραματικής διαδικασίας με στόχο να διευκρινιστεί η εξέλιξη της ασθένειας. Έτσι στην 2η εφαρμογή, αυτή της ριζοκτονίας, τα προσβεβλημένα φυτά που εντάσσονται στην Α ομάδα είναι 0%, στην Β ομάδα 41% και στην Γ ομάδα 10%. Στην 3η εφαρμογή τα

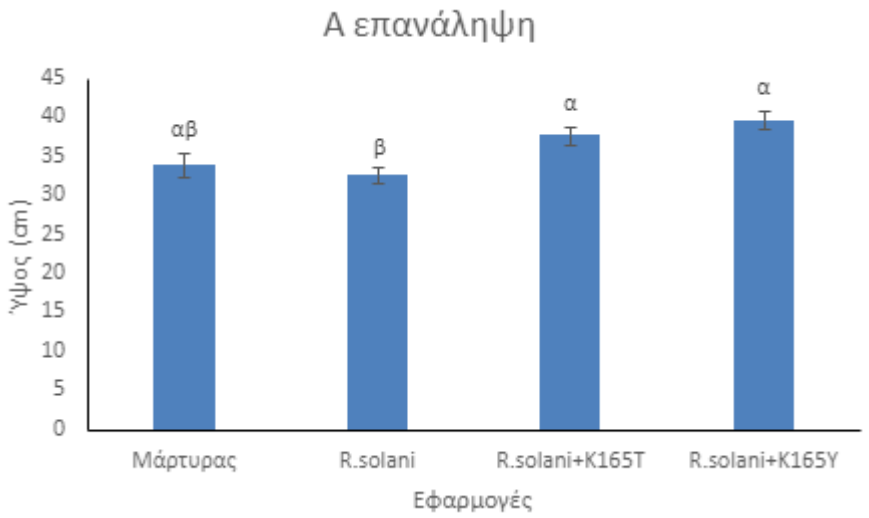
προσβεβλημένα φυτά εντάσσονται στην Α ομάδα σε ποσοστό 15%, στην Β ομάδα σε ποσοστό 24% και στην Γ ομάδα σε ποσοστό 2%. Τέλος, στην 4η εφαρμογή, που περιλαμβάνει την προσθήκη του μύκητα Rhizoctonia σε συνδυασμό με το στέλεχος K165 σε στερεή και υγρή μορφή, στις 9/7/2020 τα προσβεβλημένα φυτά που ανήκουν στην ομάδα Α φτάνουν το 25%, στην ομάδα Β φτάνουν το 22% και στην ομάδα Γ το 0%.

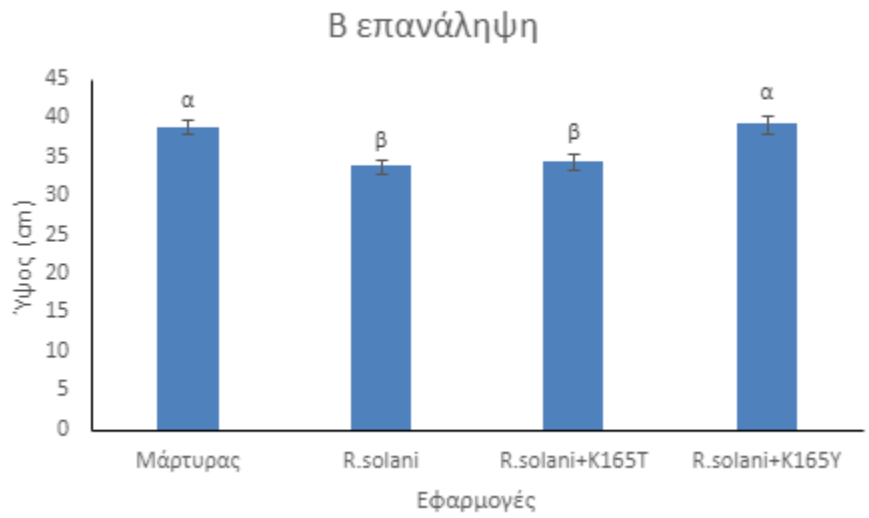
Διάγραμμα 3: Απεικόνιση συμπτωμάτων στις 9/7/20

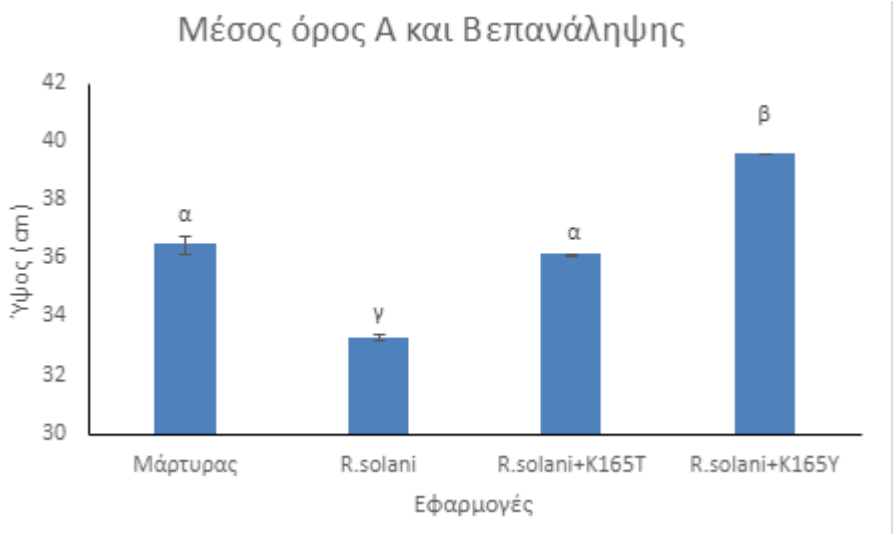


Επίσης στην 1η πειραματική διαδικασία μετρήθηκαν τα ύψη και τα βάρη των φυτών βαμβακιού και για τις 4 εφαρμογές. Παρακάτω παρουσιάζονται σε 2 διαφορετικά διαγράμματα τα ύψη και τα βάρη των φυτών και των 4 εφαρμογών.

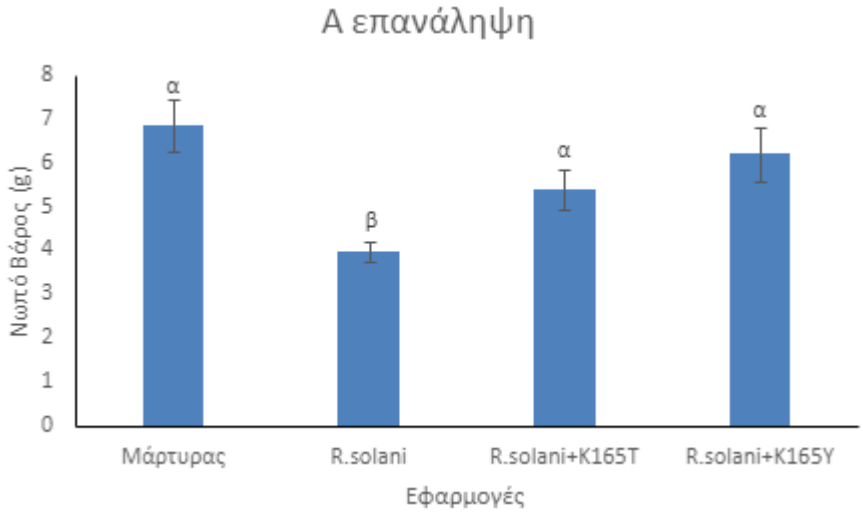
Διάγραμμα 4: Τα ύψη (σε cm) των φυτών των 4 εφαρμογών(Α επανάληψη, Β επανάληψη, μέσος όρος Α/Β επανάληψης)

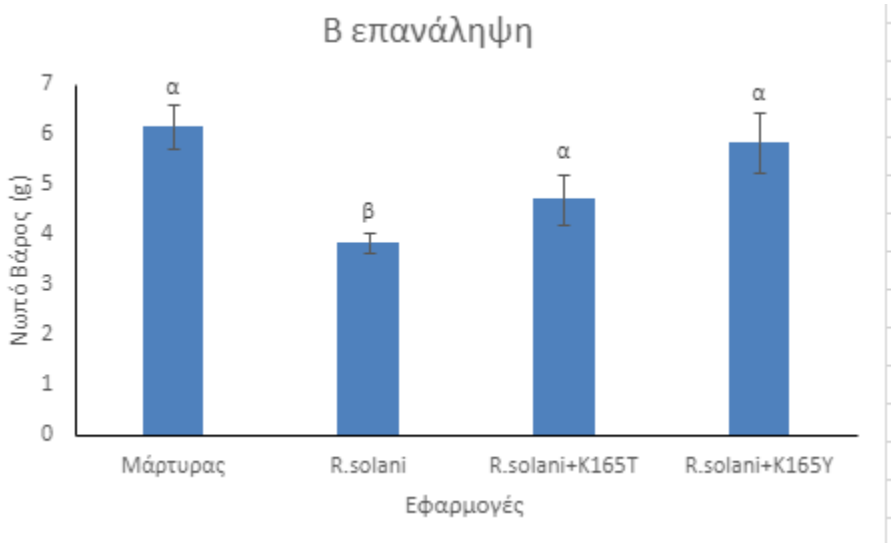


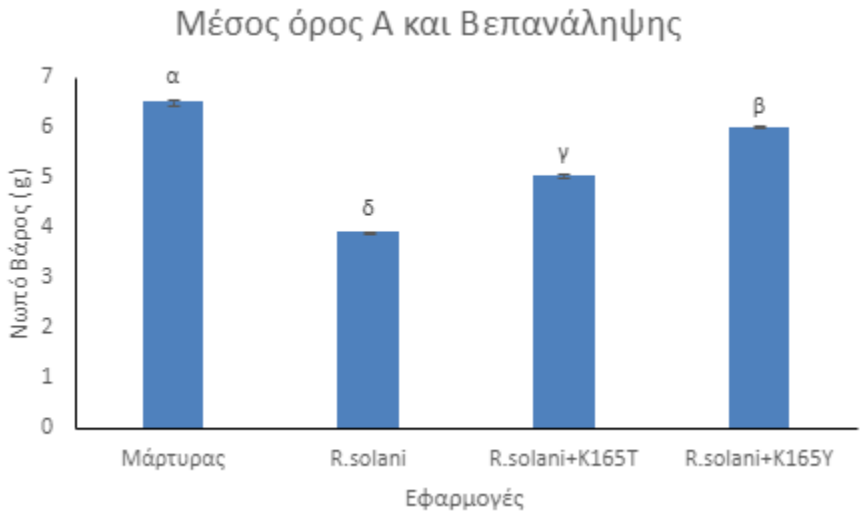




Διάγραμμα 5: Τα βάρη (σε g) των φυτών των 4 εφαρμογών(Α επανάληψη, Β επανάληψη, μέσος όρος Α/Β επανάληψης)







Από το Διάγραμμα 4 και το Διάγραμμα 5 προκύπτει ότι οι τιμές τόσο στο ύψος των φυτών όσο και στο βάρος τους είναι υψηλότερες για την εφαρμογή 4, η εφαρμογή που περιελάμβανε την εφαρμογή ριζοκτονίας σε συνδυασμό με το στέλεχος K165 σε υγρή και στερεή μορφή, συγκριτικά με τις άλλες 3 εφαρμογές του πειράματος. Αντίθετα, οι χαμηλότερες τιμές τόσο στο βάρος όσο και στο ύψος των φυτών καταγράφονται στην εφαρμογή 2, στην εφαρμογή δηλαδή που περιελάμβανε τον μύκητα *Rhizoctonia solani*. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφέρουμε πως και η εφαρμογή 1, δηλαδή ο μάρτυρας, παρουσιάζει υψηλές τιμές στα βάρη και στα ύψη των φυτών βαμβακιού.

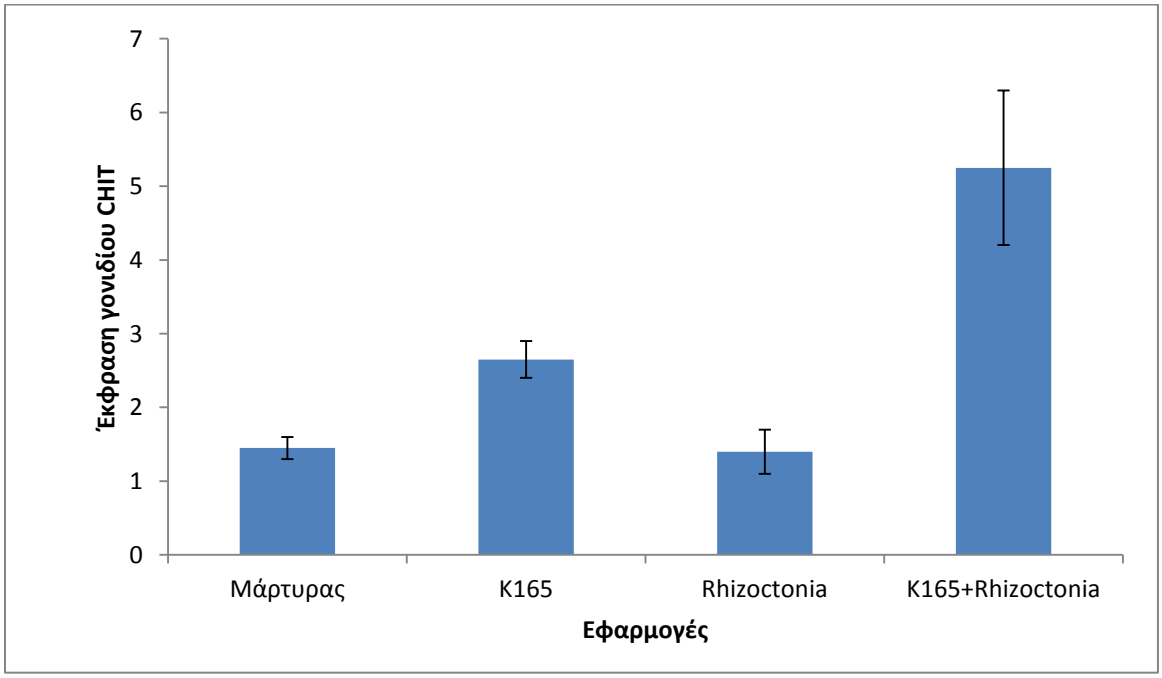
2η πειραματική διαδικασία

Στην 2η πειραματική διαδικασία ακολουθήθηκε η ίδια ακριβώς διαδικασία με την μόνη διαφορά ότι στην περίπτωση αυτή ακολουθήθηκε η μέθοδος της αντίδρασης της πολυμεράσης - PCR. Τα δείγματα μετά την συγκομιδή παρέμειναν στους -80 C μέχρι τις 10/1/21 όπου και ξεκίνησε η μέθοδος της PCR.

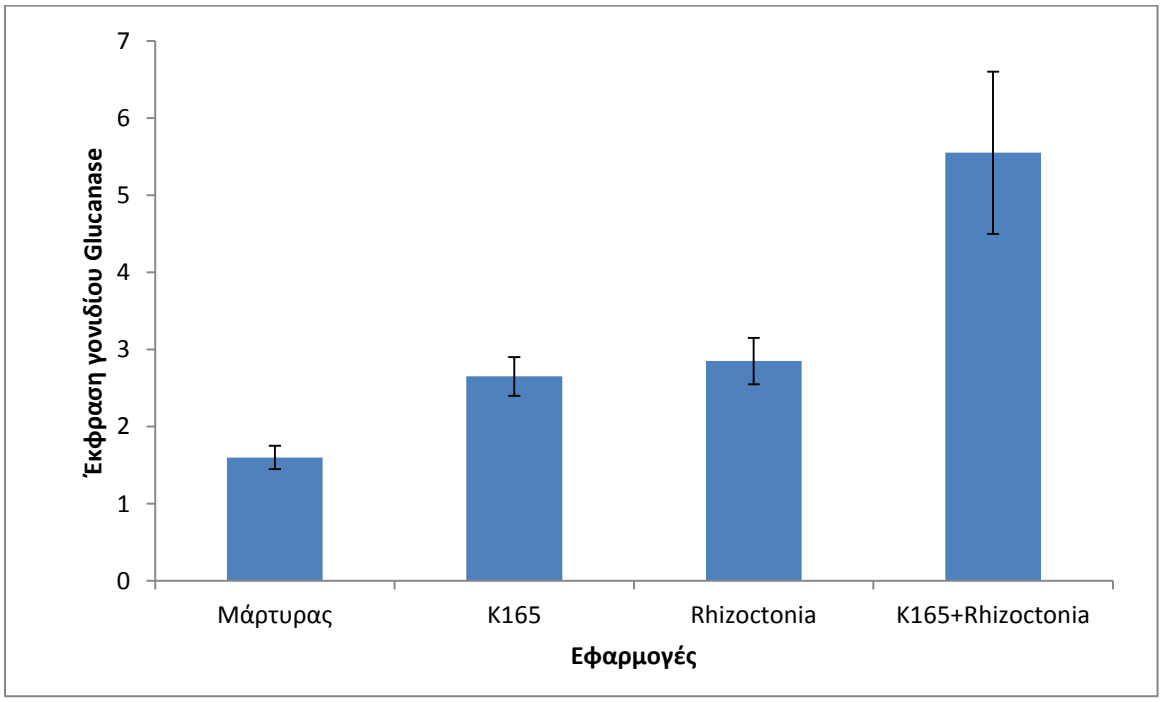
Από την PCR προέκυψε ότι το K165 επάγει την έκφραση του γονιδίου τόσο της χιτινάσης όσο και της γλουκανάσης. Μάλιστα, θα πρέπει να αναφερθεί ότι η έκθεση αυξάνεται περισσότερο κατά την μόλυνση με τον μύκητα *Rhizoctonia solani*.

Χαρακτηριστικό είναι επίσης το γεγονός ότι τα φυτά βαμβακιού παρουσία του μύκητα *Rhizoctonia solani* επάγουν την έκφραση του γονιδίου της χιτινάσης αλλά όχι σε μεγαλύτερο βαθμό συγκριτικά με την εφαρμογή K165 και *Rhizoctonia solani*.

Διάγραμμα 6: Έκφραση γονιδίου χιτινάσης και για τις 4 εφαρμογές του πειράματος.



Διάγραμμα 5: Έκφραση γονιδίου γλουκανάσης και για τις 4 εφαρμογές του πειράματος



Συμπεράσματα - Συζήτηση

Ο μύκητας *Rhizoctonia solani* είναι ένας από τους πιο διαδεδομένους μύκητες σε παγκόσμιο επίπεδο, προσβάλλει πολλά καλλιεργούμενα φυτά και ευθύνεται για σημαντικές οικονομικές απώλειες. Η υψηλή εδαφική υγρασία σε συνδυασμό με τις συνθήκες μειωμένου αερισμού του εδάφους. Τα συμπτώματα του μύκητα είναι όμοια σε όλα τα φυτά που προσβάλλει με σημαντικότερο σύμπτωμα την σήψη των ριζών και του λαιμού που προκαλεί νανισμό, μαράνσεις και ξηράνσεις σε νεαρό κυρίως στάδιο.
(Παναγόπουλος Χ., 2000)

Στο βαμβάκι ο μύκητας προκαλεί τήξη φυταρίων. Η προσβολή του λαιμού στα ανεπτυγμένα φυτά εκδηλώνεται στη βάση του στελέχους και λίγο κάτω από την επιφάνεια του εδάφους με την μορφή μικρών ερυθρωπών κηλίδων οι οποίες εξελίσσονται σε ελαφρά βυθισμένες ερυθροκαστανές μέχρι καστανές νεκρωτικές περιοχές με σαφή όρια και ξηρής συστάσεως. Οι κηλίδες αυτές συχνά σχίζονται με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ανοικτών ελκών, τα οποία συχνά καλύπτονται από αραιό μυκήλιο χρώματος ανοικτού καστανού ή καστανού. Τα προσβεβλημένα φυτά παρουσιάζουν καχεξία, συχνά χλώρωση, καρούλιασμα φύλλων και τελικά, αν το έλκος περιβάλλει το στέλεχος αποξηραίνονται (Αντωνόπουλος, 2006).

Η ικανότητα του μύκητα να αναπαράγεται χωρίς να παράγει σπόρια είχε σαν αποτέλεσμα να δυσκολέψει τους επιστήμονες στο παρελθόν στην ταξινόμηση του. Για τον λόγο αυτό οι επιστήμονες στηρίζονταν σε διάφορες δοκιμές μολυσματικότητας σε συνδυασμό με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της καλλιέργειας του μύκητα σε πληθώρα θρεπτικών υποστρωμάτων. Αργότερα χρησιμοποιήθηκε το φαινόμενο της αναστόμωσης προκειμένου να ταξινομηθεί ο μύκητας. Σήμερα πλέον υπάρχουν 13 ομάδες αναστόμωσης (AG-1 έως AG-13) ενώ τα διπύρηνα στελέχη του παθογόνου χωρίζονται σε 19 ομάδες αναστόμωσης (AG-A έως AG-U). Πλέον χρησιμοποιούνται μοριακές μέθοδοι για να χωρίσουν τον μύκητα σε γενετικά διαφορετικές ομάδες αλλά επιπλέον υποδεικνύουν και αξιόλογες γενετικές διαφορές ανάμεσα στα στελέχη της ίδιας ομάδας αναστόμωσης (Buntin et al., 2002).

Βασική προϋπόθεση για την επιτυχή ανάπτυξη των φυτών μιας καλλιέργειας αποτελεί η εξασφάλιση της υγείας τους. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται παραδοσιακές πρακτικές ή άλλες πολύπλοκες μέθοδοι και μέσα για να αντιμετωπιστούν με επιτυχία οι ασθένειες που προσβάλλουν μια καλλιέργεια. Στο σημείο αυτό είναι χρήσιμο να αναφέρουμε πως στην σύγχρονη φυτοπαθολογία δεν επιδιώκουμε την πλήρη παρεμπόδιση της ασθένειας ή την πλήρη θεραπεία της καλλιέργειας αλλά μια ισορροπία μεταξύ ξενιστών και παθογόνων που δεν θα προκαλούν μείωση της απόδοσης ή ποιοτική υποβάθμιση του παραγόμενου προϊόντος της καλλιέργειας.

Σύμφωνα με την Ολοκληρωμένη Διαχείριση Καλλιεργειών η φυτοπροστασία της καλλιέργειας του βαμβακιού θα πρέπει να στηρίζεται σε μια συνδυασμένη εφαρμογή μεθόδων με την προϋπόθεση πάντα ότι η μη χημική καταπολέμηση που περιλαμβάνει διάφορα καλλιεργητικά, μηχανικά και βιολογικά μέτρα θα αποτελεί την πρώτη λύση και αφού δεν αντιμετωπιστεί το πρόβλημα τότε θα γίνεται χρήση φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων. Σε πρώτη φάση θα πρέπει να λαμβάνονται κάποια προληπτικά μέτρα που περιλαμβάνουν διάφορες καλλιεργητικές φροντίδες και διάφορους άλλους βιολογικούς παράγοντες που η μέχρι τώρα έρευνα έχει δείξει αξιόλογη αποτελεσματικότητα.

Στο παρελθόν έχουν γίνει πληθώρες ερευνών που σχετίζονται με την αντιμετώπιση του παθογόνου *Rhizoctonia solani* μερικές από αυτές έκαναν χρήση μυκήτων, βακτηρίων, εντόμων ή ακόμη και νηματωδών προκειμένου να βρεθεί η καλύτερη δυνατή βιολογική αντιμετώπιση του. Μερικές από τις έρευνες αυτές έκαναν χρήση των μυκήτων *Gliocladium virens, Corticium sp,* αλλά και μύκητες του γένους *Trihoderma* και τα αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά (Δεληγιάννη, 1994).

Τα τελευταία χρόνια γίνονται εντατικές προσπάθειες προκειμένου να περιοριστεί η χρήση φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων για τον έλεγχο των εχθρών και των ασθενειών. Μεταξύ άλλων το βακτήριο *Paenibacillus alvei* και συγκεκριμένα το στέλεχος Κ165 έδειξε ότι περιορίζει τα συμπτώματα που προκαλεί ο μύκητας *Rhizoctonia solani*. Σε γενικές γραμμές μπορούμε να πούμε πως το στέλεχος Κ 165

ανήκει στα βακτήρια εκείνα τα οποία προωθούν την ανάπτυξη των φυτών και μπορούν μεταξύ άλλων να ενεργοποιούν την άμυνα των φυτικών οργανισμών της καλλιέργειας. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 2004 από τους Van Loon and Glick προέκυψε ότι τέτοιου είδους βακτήρια μπορούν να μειώσουν όχι μόνο την ένταση αλλά και την συχνότητα προσβολών που οφείλονται σε παθογόνα που είναι χωρικά διαχωρισμένα από τον βιολογικό παράγοντα. Βακτήρια τέτοιου είδους μπορούν να λειτουργούν ευνοϊκά για την καλλιέργεια απλά και μόνο επειδή τα προστατεύουν από διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), έφερε μια νέα επανάσταση στον τομέα της γονιδιακής ανάλυσης και αποτελεί πλέον ένα από τα σπουδαιότερα εργαλεία της σύγχρονης μοριακής βιολογίας. Μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται πολλαπλασιασμός η PCR επιτρέπει την παραγωγή in vitro από κάποιο δείγμα DNA ενός μεγάλου αριθμού αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Με τον τρόπο αυτό προσφέρονται νέοι τρόποι ανάλυσης των γονιδίων και των λειτουργιών τους. Τα τελευταία χρόνια ωστόσο έχουν αναπτυχθεί μοριακές τεχνικές που επιτρέπουν την καλύτερη παρατήρηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των παθογόνων και των φυτών, όπως η Real Time PCR.

Στην παρούσα μελέτη σε πρώτη φάση μετρήθηκε η φυτρωτική ικανότητα των σπόρων βαμβακιού. Ακολούθησε η μέτρηση του βάρους και του ύψους των φυτών βαμβακιού για όλες τις εφαρμογές. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω οι τιμές τόσο στο ύψος όσο και στο βάρος των φυτών βαμβακιού είναι υψηλότερες για την εφαρμογή που περιλαμβάνει την εφαρμογή ριζοκτονίας σε συνδυασμό με το στέλεχος K-165 σε στερεή και υγρή μορφή.

Από την επεξεργασία των δεδομένων προέκυψε ότι το στέλεχος K165 του βακτηρίου *Paenibacillus alvei* επάγει την έκφραση του γονιδίου της χιτινάσης και της γλυκουνάσης. Από την επεξεργασία των δεδομένων προκύπτει επίσης ότι η έκφραση αυξάνεται περισσότερο κατά την μόλυνση με τον μύκητα *Rhizoctonia solani*. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι το φυτό βαμβακιού παρουσία του μύκητα *Rhizoctonia solani* επάγει την

έκφραση του γονιδίου της χιτινάσης αλλά όχι σε μεγαλύτερο βαθμό συγκριτικά με την εφαρμογή που περιλαμβάνει το στέλεχος K165 σε συνδυασμό με τον μύκητα *Rhizoctonia solani*.

Συνοψίζοντας την παρούσα μελέτη είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι θα πρέπει στο μέλλον να γίνουν περεταίρω έρευνες προκειμένου να ερευνηθεί ο τρόπος δράσης του στελέχους K165 του βακτηρίου *Paenibacillus alvei* και να μελετηθεί η τυχόν δράση του σε άλλους φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς.

Βιβλιογραφία

Ελληνική βιβλιογραφία

- Αντωνόπουλος Δ., 2006. Συμβολή της διαγονιδιακής τεχνολογίας στη μελέτη του μηχανισμού παθογένεσης του μύκητα *Verticillium dahliae,* καθώς και στην αλληλεπίδραση του με το ανταγωνιστικό βακτηριακό παράγοντα Κ-165 (*Paenibacillus alvei*). Διδακτορική διατριβή, Αθήνα.
- Αυγουλάς Χ. και Κούτρου Α., 1997. Βαμβάκι στο: Μέρος Γ. Εξελίξεις και Προοπτικές του Αγροτικού Τομέα: Μια Κριτική παρουσίαση Όλων των Παραγωγικών Κλάδων, Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα.
- Γαλανοπούλου – Σενδούκα Σ., 2002. Βιομηχανικά Φυτά. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα.
- Δεληγιάννη Σ., 1994. Μελέτη της παρασιτικής ικανότητας του *Trichoderma koningii* επί του *Rhizoctonia solani* και η συμβολή της στη βιολογική καταπολέμηση των τήξεων του καπνού. Διδακτορική Διατριβή, Θεσσαλονίκη.
- Ισραηλίτης Κ., 2003. Αξιοποίηση στερεών οργανικών αποβλήτων, Ινστιτούτο Τεχνολογίας γεωργικών προϊόντων – ΕΘΙΑΓΕ.
- Παναγόπουλος Γ., 1995. Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών. Β' Έκδοση. Εκδόσεις Σταμούλης.
- Παναγόπουλος Γ., 2000. Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών. Εκδόσεις Σταμούλης.
- Παναγόπουλος Γ., 2007. Ασθένειες καρποφόρων δέντρων και αμπέλου. 4η Έκδοση. Εκδόσεις Σταμούλης.
- Russell P., 2009. iGenetics Μια Μεντελική Προσέγγιση. Pearson Education, Inc. - Benjamin Cummings. Το βιβλίο εκδίδεται στα Ελληνικά από τις Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε. στην Αλεξανδρούπολη.
- Σφήκας Γ., 1988. Ειδική Γεωργία, Βιομηχανικά Φυτά ΙΙ. Θεσσαλονίκη.
- Τζάμος Κ., 2004. Φυτοπαθολογία. Εκδόσεις Σταμούλης.
- Τόλης Ι., 1988. Βαμβάκι: Εχθροί, Ασθένειες, Ζιζάνια. Οργανισμός Βάμβακος, Αθήνα.

- Τόλης Ι., 1989. Καλλιέργεια και Φυτοπροστασία του Βαμβακιού στην Ελλάδα. Αθ. Τριανταφυλλίδης 1η Έκδοση, Αθήνα.
- Χρηστίδης Γ., 1965. Το βαμβάκι. Θεσσαλονίκη.

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Agrios N., 2005. Plant Pathology. Elsevier, CA, Academy Press.
- Ando R., 2004. Regulated Fast Nucleocytoplasmic Shuttling Observed Protein Highlighting. Science 306(5700):1370-1373.
- Buntin D., Raymer L., Bednarz W., Phillips V. and Baird E., 2002. Winter Crop, Tillage and Planting Date Effectson Double - Crop Cotton. Agronomy Journal 94: 273-280.
- Carling E., Baird E., Gitaitis T., Brainard A. and Kuninaga S., 2002. Charactirization of AG-13, a newly reported anastomosis group of Rhizoctonia solani. Phytopathology 92: 893-899.
- Danalatos N., Galanopoulou S., Gertsis A., and Kosmidou K., 1998. Comparative review of the most important weather parameters and their impact on cotton yield under Greek conditions. Proceeding: Second World Cotton Research Conference. New Frontiers in Cotton Research, Athens 6-12 Sept. Vol 1 p.p. 379-383.
- Elad Y., Kapat A., 1999. The role of *Thrichoderma harzanum* protease in biocontrol of *Botrytis cinerea*. European Journal of Plant Pathology.
- Kapat A., Zimand G., Elad Y., 1998. Effect of two isolates of *Trichoderma harzanumon* the activity of hydrolytic enzymes produced by *Botrytis cinerea*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 52 pp. 127-137.
- Kohel R. and Lewis C., 1984. Cotton. American Society of Agronomy.
- Loper E., Buyer S., 1991. Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. Molecular Plant-Microbe Interaction.
- Lorang M., tuori P., martinez P., Sawyer L., Redman S., Rollins A., Wolpert J., Johnson B., rodriguez J., Dickman B., Ciuffetti M., 2001. Green Fluorescent Protein is Lighting up Fungal Biology. Applied and Environmetal Microbiology.

- Michielse B., Paul Z., hooKaas J., Cees M., Van den Hondel J., Arthur Z., Ram J., 2005. Agrobacterium -mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. Curr. Genet., 48:1-17.
- Mishin A., Subach F., Yampolsky I., King W., 2008. The first mutant of the Aequorea victoria green fluorescent protein that forms a red chromophore. Biochemistry. American Chemical Society.
- Mullins D., Chen X., Romaine p., Raina R., Geiser M. and Kang S., 2001. Agrobacterium - Mediated Transformation of Fusarium oxysporum. An Effective Tool for Insertional Mutagenesis and Gene Transfer, Phytopathology.
- Mullins D. and Kang S., 2001. Transformation: a tool for studing fungal pathogens of plants. Cell Mol. Life Sci., 58: 2043-2052.
- Parmeter R. and Whitney, 1970. Taxonomy and nomenclature of the imperfect state. Rhizoctonia solani: Biology and Pathology. J. R. Parmeter Jr. (Ed.), University of California Press, Berkeley.
- Prasher C., 1995. Using Gfp to see the light. Trends Genet.
- Sneh B., Jabaji - Hare S., Neate S., Dijst G., 1996. Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Kluwer Academic.
- Tjamos S., Flemetakis E., Paplomatas E. and Katinakis P., 2004. Induction of resistance to Vericillium dahlia in Arabidopsis thalianaby the Biocontrol Agent K-165 and Pathogenesis - Related Proteins Gene Expression, MPMI Vol. 18, No 6, pp.555-561.
- Van Loon C. and Bakker 2003. Signalling in rhizobacteria - plant interactions. In H.De Kroon & E.J.W. Visser (Eds.), Root ecology.
- Whipps M. and McQuilken D., 2009. Biological control agents in plant disease control. In Dale Walters Ed., Disease Control in Crops. Blackwell Publ. Ltd.
- Zhang G., Gurtu V., Kain R., 1996. An enhanced Green Flurescent Protein allows Sensitive Detection of Gene Transfer in Mammalian Cells. Biochemical and Biophysical Research Communications.

Πηγές διαδικτύου

•http://www.opekepe.gr

•Στατιστική Επετηρίδα 2009 & 2010, Ελληνική Στατιστική Αρχή, Πειραιάς 2011. http://dlib.statistics.gr/Book/GRESYE_01_0002_00061.pdf