



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΑΕΙΦΟΡΙΚΗ ΓΕΩΡΓΙΑ,  
ΣΤΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΦΥΤΩΝ & ΣΤΗΝ ΑΓΡΟΜΕΤΕΩΡΟΛΟΓΙΑ**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Αξιολόγηση της επίδρασης του χρόνου εφαρμογής βιολογικών παραγόντων  
στην αντιμετώπιση του μύκητα *Verticillium dahliae*

**Γεώργιος Καλιαμάνης**

Επιβλέπων καθηγητής:

Τζάμος Σωτήρης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ  
2023**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Αξιολόγηση της επίδρασης του χρόνου εφαρμογής βιολογικών παραγόντων  
στην αντιμετώπιση του μύκητα *Verticillium dahliae*

Evaluation of the impact of the application time of biocontrol agents on the  
control of *Verticillium dahliae*

**Γεώργιος Καλιαμάνης**

Εξεταστική επιτροπή:

Τζάμος Σωτήρης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Μπιλάλης Δημήτριος, Καθηγητής ΓΠΑ

Τζίμα Αλίκη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

## Αξιολόγηση της επίδρασης του χρόνου εφαρμογής βιολογικών παραγόντων στην αντιμετώπιση του μύκητα *Verticillium dahliae*

ΠΜΣ Καινοτόμες Εφαρμογές στην Αειφορική Γεωργία, στη Βελτίωση Φυτών & στην Αγρομετεωρολογία  
Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής  
Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας

### Περίληψη

Η χρήση φυτοπροστατευτικών μικροοργανισμών στη γεωργική πρακτική αποτελεί μια φιλική προς το περιβάλλον στρατηγική αντιμετώπισης των ασθενειών των φυτών, η οποία αυξάνεται συνεχώς λόγω του περιορισμού των χημικών σκευασμάτων. Κρίσιμος παράγοντας στη βιολογική αντιμετώπιση είναι η εφαρμογή των μικροβιακών βιολογικών σκευασμάτων στη σωστή χρονικά στιγμή, ώστε να εξασφαλισθεί η δράση τους εναντίον των παθογόνων. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση του χρόνου εφαρμογής στην δράση δύο γνωστών βιολογικών παραγόντων, *Bacillus velezensis* K165 και *Pseudomonas fluorescens* B6, εναντίον του μύκητα *Verticillium dahliae*. Για το σκοπό αυτό, εφαρμόστηκαν τα στελέχη K165 και B6 στο ριζικό σύστημα φυτών μελιτζάνας στις επτά ημέρες πριν την εφαρμογή του μύκητα *V. dahliae*, ταυτόχρονα με το μύκητα *V. dahliae* και μία ημέρα μετά την εφαρμογή του μύκητα *V. dahliae*. Παρατηρήθηκε ότι η φυτοπροστατευτική δράση του στελέχους K165 εξαρτάται από το χρόνο εφαρμογής του, αφού η εφαρμογή του στις επτά ημέρες πριν την τεχνητή μόλυνση με το μύκητα *V. dahliae* οδήγησε σε μείωση του ποσοστού ασθενών φύλλων, ενώ η δράση του εξαλείφθηκε όταν η εφαρμογή πραγματοποιήθηκε μία ημέρα μετά την εφαρμογή του παθογόνου. Αντίθετα, η δράση του στελέχους B6 παρουσίασε καλύτερα αποτελέσματα στην εφαρμογή του μία ημέρα μετά την εφαρμογή του παθογόνου μύκητα. Η εξάρτηση της δράσης του στελέχους K165 από το χρόνο εφαρμογής του, πιθανόν να σχετίζεται με το γεγονός ότι ο μηχανισμός της φυτοπροστατευτικής του δράσης είναι η ενεργοποίηση της άμυνας των φυτών, ενώ η φυτοπροστατευτική δράση του στελέχους B6 στηρίζεται στη παραγωγή αντιβιοτικών ενώσεων.

**Επιστημονική περιοχή:** Φυτοπαθολογία

**Λέξεις κλειδιά:** βιολογική αντιμετώπιση, χρόνος εφαρμογής, *Verticillium dahliae*, βακτήρια, *Bacillus velezensis*, *Pseudomonas fluorescens*

## **Evaluation of the impact of the application time of biocontrol agents on the control of *Verticillium dahliae***

*MSc Innovative Applications in Sustainable Agriculture, Plant Breeding & Agrometeorology*

*Faculty of Crop Science*

*Laboratory of Phytopathology*

### **Abstract**

The use of plant protection microorganisms in agricultural practice is an eco-friendly plant disease management strategy, which is constantly increasing due to the limitation of agrochemicals. A crucial factor in biological control is the application of microbial biocontrol agents (BCAs) at the right time, to ensure the efficacy of their action against pathogens. In this study, the effect of the application time on the biocontrol efficacy of two known biological agents, *Bacillus velezensis* K165 and *Pseudomonas fluorescens* B6, against the *Verticillium dahliae*, was examined. For this purpose, strains K165 and B6 were applied to the root system of young eggplants at seven days before the application of *V. dahliae*, simultaneously with *V. dahliae* and one day after application of *V. dahliae*. It was observed that the plant protective activity effect of strain K165 depends on the time of its application, since its best performance against the pathogen was observed when applied at 7 days before *V. dahliae* inoculation and it was completely abolished when applied at one day after *V. dahliae* inoculation. Whereas B6 best performance against the pathogen was observed when applied at one day after *V. dahliae* inoculation. The time dependence of the plant protective activity of K165 against *V. dahliae* may lie on the fact that its mode of action is the triggering of the induced systemic resistance, while B6 acts against *V. dahliae* by producing antibiotic compounds having therefore a direct action against the pathogen.

**Scientific area:** Phytopathology

**Key words:** biological control, application time, *Verticillium dahliae*, bacteria, *Bacillus velezensis*, *Pseudomonas fluorescens*

# Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή .....	7
1.1. Ο φυτοπαθογόνος μύκητας <i>Verticillium dahliae</i> .....	7
1.1.1. Βιολογικός κύκλος του παθογόνου .....	8
1.1.2. Μορφολογία του μύκητα .....	9
1.1.3. Συμπτώματα της ασθένειας .....	10
1.1.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την εξάπλωση της ασθένειας .....	11
1.1.5. Αντιμετώπιση της Βερτισιλλίωσης .....	12
1.1.5.1. Καλλιεργητικά μέτρα .....	12
1.1.5.2. Ανθεκτικές ποικιλίες .....	13
1.1.5.3. Χημική καταπολέμηση .....	13
1.1.5.4. Μέθοδος της ηλιοαπολύμανσης .....	13
1.1.6. Βιολογική αντιμετώπιση .....	14
1.1.6.1. Ριζόσφαιρα και μικροβιακοί πληθυσμοί .....	14
1.1.6.2. Μηχανισμοί δράσεις των βιολογικών παραγόντων .....	17
1.1.6.2.1. Ανταγωνισμός θέσης και θρεπτικών στοιχείων .....	18
1.1.6.2.2. Αντιβίωση .....	20
1.1.6.2.3. Υπερπαρασιτισμός .....	25
1.1.6.2.4. Επαγωγή της άμυνας .....	26
1.1.7. Μικροοργανισμοί με δυνατότητες αντιμετώπισης του <i>Verticillium dahliae</i> .....	29
1.1.7.1. Το βακτήριο <i>Bacillus velezensis</i> .....	29
1.1.7.2. Το βακτήριο <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	31
1.2. Σκοπός της μελέτης .....	32
2. Υλικά και Μέθοδοι .....	34
2.1. Παρασκευή θρεπτικών υλικών ανάπτυξης μικροοργανισμών .....	34
2.2. Προετοιμασία του μύκητα <i>Verticillium dahliae</i> .....	37
2.3. Προετοιμασία των βακτηρίων <i>Bacillus velezensis</i> K165 και <i>Pseudomonas fluorescens</i> B6 .....	38
2.4. Φυτικό υλικό .....	39
2.5. Δοκιμές παθογένειας .....	39
2.6. Καταγραφή των συμπτωμάτων της ασθένειας .....	41
2.7. Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων .....	42

2.8. Προσδιορισμός των επίπεδων έκφρασης των γονιδίων PR1 και PR4.....	42
2.8.1. Απομόνωση RNA.....	43
2.8.2. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης RNA .....	46
2.8.3. Καταστροφή υπολειμμάτων DNA .....	47
2.8.4. Εφαρμογή αντίστροφης μεταγραφάσης.....	48
2.8.5. Real-time PCR.....	48
3. Αποτελέσματα.....	51
3.1. Ένταση της ασθένειας.....	51
3.2. Εξέλιξη της ασθένειας.....	53
3.3. Έκφραση γονιδίου PR1 στην εφαρμογή <i>B. velezensis</i> K165 στις 2 dpi .....	54
3.4. Έκφραση γονιδίου PR1 στην εφαρμογή <i>B. velezensis</i> K165 στις 7 dpi .....	56
3.5. Έκφραση γονιδίου PR4 στην εφαρμογή <i>B. velezensis</i> K165 στις 2 dpi .....	57
3.6. Έκφραση γονιδίου PR4 στην εφαρμογή <i>B. velezensis</i> K165 στις 7 dpi .....	59
3.7. Έκφραση γονιδίου PR1 στην εφαρμογή <i>P. fluorescens</i> B6 στις 2 dpi .....	60
3.8. Έκφραση γονιδίου PR1 στην εφαρμογή <i>P. fluorescens</i> B6 στις 7 dpi .....	62
3.9. Έκφραση γονιδίου PR4 στην εφαρμογή <i>P. fluorescens</i> B6 στις 2 dpi .....	63
3.10. Έκφραση γονιδίου PR4 στην εφαρμογή <i>P. fluorescens</i> B6 στις 7 dpi .....	65
4. Συζήτηση – Συμπεράσματα .....	67
5. Βιβλιογραφία.....	71

# 1. Εισαγωγή

## 1.1. Ο φυτοπαθογόνος μύκητας *Verticillium dahliae*

Η αλληλεπίδραση ενός φυτού με έναν μικροοργανισμό που του επιφέρει βλάβη ορίζεται ως παθογένεια. Η βλάβη στους φυτικούς ιστούς προκαλείται κυρίως από ουσίες που εκκρίνει ο φυτοπαθογόνος μικροοργανισμός ή παράγονται από το ίδιο το φυτό αντιδρώντας στο ερέθισμα που προήλθε από το παθογόνο (Agiros, 2005). Οι προκαρυωτικοί και ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τις ασθένειες του ξύλου είναι ιδιαίτερα επιβλαβής, καθώς εγκαθίστανται στα αγγεία του ξύλου και παραμένουν εκεί μέχρι τη νέκρωση του ξενιστή (Pegg, 1981). Οι ασθένειες που οφείλονται στη παρουσία και δραστηριότητα των παθογόνων βακτηρίων και μυκήτων στα αγγεία του ξύλου του φυτού, ονομάζονται αδροβακτηριώσεις και αδρομυκώσεις αντίστοιχα. Οι αδρομυκώσεις οφείλονται κυρίως σε εδαφογενείς μύκητες των γενών *Fusarium* και *Verticillium*, τα οποία διαθέτουν ανθεκτικές μορφές επιβίωσης όπως γλαμυδοσπόρια και ανθεκτικά μυκήλια ή μικροσκληρώτια αντίστοιχα.

Πίνακας 1: Η συστηματική κατάταξη του γένους *Verticillium*

Υπερβασίλειο	Eukaryota
Βασίλειο	Fungi
Υποβασίλειο	Dikarya
Φύλο	Ascomycota
Υποφύλο	Pezizomycotina
Κλάση	Sordariomycetes
Υποκλάση	Hypocreomycetidae
Τάξη	Glomerellales
Οικογένεια	Plectosphaerellaceae
Γένος	<i>Verticillium</i>

Έχουν καταμετρηθεί περισσότερα από 200 είδη φυτών τα οποία προσβάλλονται από το συγκεκριμένο παθογόνο (Agris, 2005). Ανάμεσα στα διαφορετικά είδη του *Verticillium*, τη μεγαλύτερη φυτοπαθολογική σημασία παρουσιάζει το είδος *V. dahliae* και ακολουθεί το είδος *V. albo-atrum* (Ligoxiakakis, 2009). Η ασθένεια που προκαλεί ο μύκητας *Verticillium dahliae* ονομάζεται βερτισιλλίωση. Πρόκειται για μια ιδιαίτερα σοβαρή ασθένεια των φυτών και είναι ευρύτατα διαδεδομένη, προκαλώντας σημαντικές οικονομικές ζημιές στους παραγωγούς. Ο μύκητας *V. dahliae* αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες 21-27 °C και επικρατεί σε θερμότερες περιοχές όπως η Μεσόγειος, ενώ ο *V. albo-atrum* επικρατεί σε θερμοκρασίες 20-24 °C και είναι περισσότερο διαδεδομένος στην Βόρεια Ευρώπη, όπου υπάρχει σχετικά ψυχρό και υγρό κλίμα (Pegg, 1974).

### 1.1.1. Βιολογικός κύκλος του παθογόνου

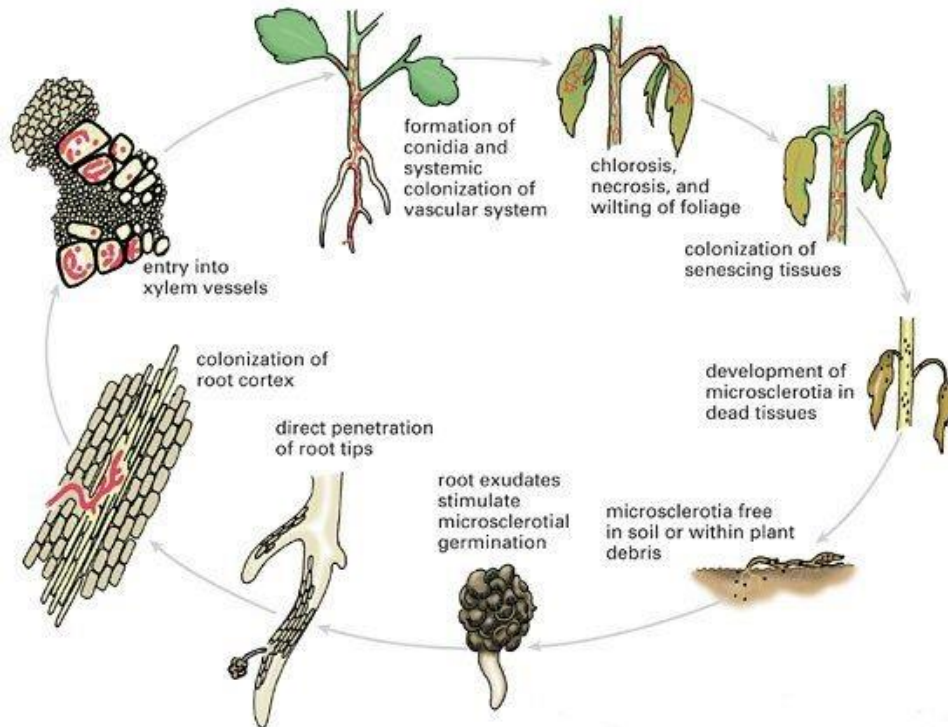
Ο βιολογικός κύκλος του *Verticillium dahliae* μπορεί να διακριθεί σε τρία στάδια. Το στάδιο διαχείμανσης, το παρασιτικό στάδιο και το σαπροφυτικό. Ο σχηματισμός ανθεκτικών μορφών διαχείμανσης, αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την επιβίωση, τη διάδοση και τη μολυσματικότητα του παθογόνου (Vago et al., 2016). Η βλάστηση των μικροσκληρωτίων είναι εξαρτώμενη από το εδαφικό περιβάλλον. Τα μικροσκληρώτια διεγείρονται από τις εκκρίσεις του ριζικού συστήματος και παράγονται μυκηλιακές υφές. Προκειμένου να μολυνθεί η ρίζα του ξενιστή, από το μύκητα, οι βλαστάνουσες υφές δεν πρέπει να είναι σε απόσταση μεγαλύτερη από τα 300 μm (Fradin and Thomma, 2006). Το παρασιτικό στάδιο ξεκινά όταν η βλαστάνουσα υφή διαπεράσει τα κύτταρα στα ριζικά τριχίδια, στην καλύπτρα της ρίζας και στα επιδερμικά κύτταρα της περιοχής αυξήσεως της ρίζας. Αφού ο μύκητας διαπεράσει την επιδερμίδα, το παρέγχυμα και την ενδοδερμίδα καταλήγει στα αγγεία του ξύλου (Huisman and Gerik, 1989). Παράγονται απλοειδή κονίδια και διασπείρονται στο φυτικό οργανισμό μέσω του ανιόντος ρεύματος. Η μόλυνση επεκτείνεται, καθώς τα κονίδια που βρίσκονται στα εγκάρσια τοιχώματα των αγγείων είναι ικανά να βλαστήσουν και να μολύνουν μεμονωμένους βλαστούς σε διάφορα μέρη του υπέργειου τμήματος των φυτών (Gerik and Huisman, 1985).

Κατά την παρασιτική ανάπτυξη μέσα στο φυτό, οι παθογόνοι μύκητες απελευθερώνουν κατά περίπτωση ένζυμα, τοξίνες, ρυθμιστές αύξησης ή πολυσακχαρίτες που επιδρούν στη δομή και φυσιολογία των κυττάρων του ξενιστή (Agris, 2005), με αποτέλεσμα το μαρασμό του φυτού. Μάλιστα λόγω των ενζύμων που παράγει το μυκήλιο, τα αγγεία του ξύλου μεταχρωματίζονται από την οξειδωση των φαινολικών ενώσεων.

Όταν οι ιστοί του μολυσμένου φυτού αποσυντίθενται ξεκινάει το σαπροφυτικό στάδιο του μύκητα. Το μυκήλιο που βρίσκεται στα αγγεία του ξύλου εισέρχεται στα εφαιπόμενα παρεγχυματικά κύτταρα και αποικίζει τον αποδιοργανωμένο φυτικό ιστό σχηματίζοντας πολυάριθμα μικροσκληρώτια. Με την ενσωμάτωση στο έδαφος των αποσυντιθέμενων και μολυσμένων φυτικών υπολειμμάτων, εναποτίθενται σε αυτό και τα μικροσκληρώτια. Η



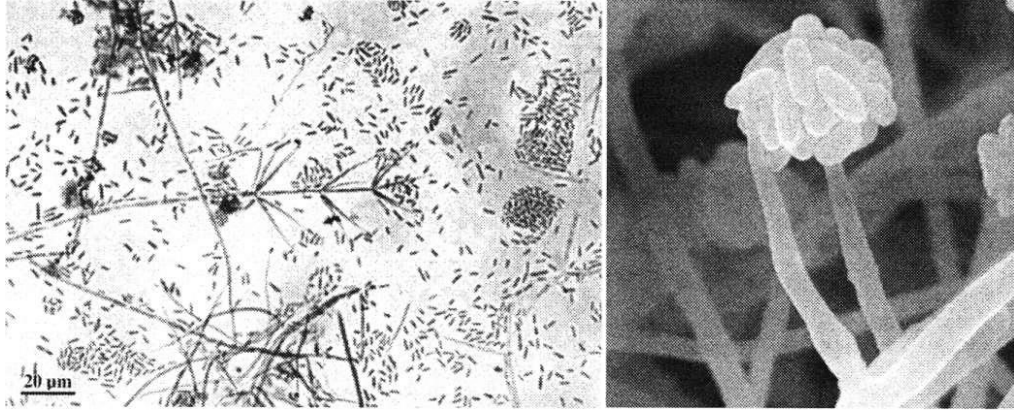
κατασκευή αυτή είναι πολύ ανθεκτική με παχιά τοιχώματα κυτταρικών υφών. Το έντονα σκούρο χρώμα των μικροσκληρωτίων οφείλεται στην εναπόθεση μελανίνης στα κυτταρικά τοιχώματα και στο μεσοκυττάριο χώρο, η οποία φαίνεται να συμβάλει στην ανθεκτικότητά τους και σχηματίζεται από τον οξειδωτικό πολυμερισμό φαινολικών ενώσεων (Perry and Evert, 1984).



Εικόνα 1: Ο βιολογικός κύκλος του *Verticillium dahliae*

### 1.1.2. Μορφολογία του μύκητα

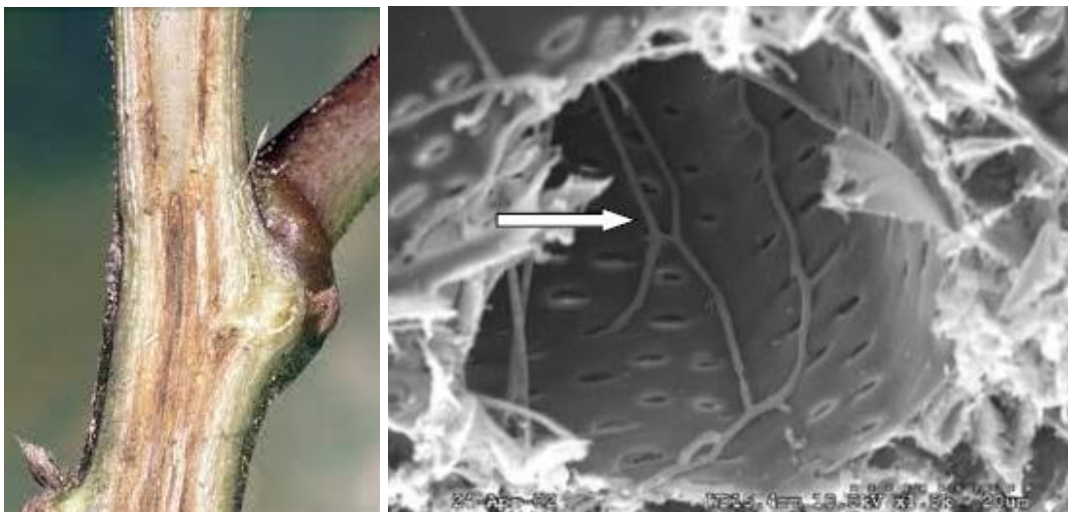
Το μυκήλιο του μύκητα φέρει εγκάρσια διαφράγματα και σχηματίζει στείρες μυκηλιακές υφές ή υφές που παράγουν τα κονίδια (Kiryal et al., 1970). Το παθογόνο σχηματίζει άφθονους, υαλώδεις, πολυκύτταρους, διακλαδιζόμενους κονιδιοφόρους με σπονδυλωτή διακλάδωση σε 3-4 πλάγια, μονοκύτταρα φιαλίδια στις κορυφές των οποίων σχηματίζονται κεφαλές κονιδίων. Η απελευθέρωση των κονιδίων γίνεται με το νερό. Το μυκήλιο είναι πολυκύτταρο και δεν σχηματίζει χλαμυδοσπόρια, παρά μόνο μικροσκληρώτια σκούρου χρώματος. Αποτελούν τη διαχειμάζουσα μορφή του παθογόνου, είναι κομβολογοειδή ή βοτρυοειδή και αποτελούνται από διογκωμένα, σχεδόν σφαιρικά, κύτταρα.



Εικόνες 2, 3: Αριστερά: Κονιδιοφόροι και κονίδια του μύκητα *Verticillium dahliae*  
Δεξιά: Κορυφή του φιαλιδίου που φέρει τα κονίδια

### 1.1.3. Συμπτώματα της ασθένειας

Το κύριο σύμπτωμα των αδρομυκώσεων είναι η απώλεια σπαργής (DeVay, 1989). Αρχικά ο παθογόνος μύκητας βρίσκεται στα αγγεία του ξύλου, ωστόσο τα συμπτώματα μαράνσεως, χλωρώσεως και νεκρώσεων αναπτύσσονται και στα φύλλα λόγω δράσεων τοξικών μεταβολιτών του παθογόνου (Τζάμος, 2007). Στο έλασμα των κατωτέρων φύλλων εμφανίζεται χλώρωση και στη συνέχεια νέκρωση των χλωρωτικών ιστών και αποκοπή των φύλλων. Τα συμπτώματα αυτά εκδηλώνονται στη συνέχεια και στα ανώτερα φύλλα. Το προσβεβλημένο φυτό παρουσιάζει νανισμό, γίνεται καχεκτικό και ξεραίνεται σταδιακά έως και ολόκληρο. Χαρακτηριστικός είναι ο καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου που εμφανίζεται σε επιμήκη ή εγκάρσια τομή του στελέχους, ωστόσο δεν είναι παθογνωμικό σύμπτωμα διότι μπορεί να οφείλεται και σε άλλα αίτια. Στη περίπτωση που επιζήσει, το προσβεβλημένο φυτό παράγει λιγότερους και μικρότερους καρπούς σε σχέση με τα υγιή φυτά. Ο μύκητας μπορεί να ταυτοποιηθεί με κλασικές και μοριακές διαγνωστικές μεθόδους (Keykhasaber et al., 2017).



Εικόνες 4, 5: Αριστερά: Μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου.

Δεξιά: Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης που φαίνεται ο αποικισμός των αγγείων του ξύλου. Στη θέση του βέλους διακρίνονται οι υφές του μύκητα

#### 1.1.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την εξάπλωση της ασθένειας

Οι αβιοτικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη διασπορά και την εξάπλωση του βερτισιλλίου είναι η θερμοκρασία, η υγρασία. Οι περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν στις μεσογειακές χώρες είναι ευνοϊκές για τη διασπορά του μύκητα. Ωστόσο σε υψηλές θερμοκρασίες, άνω των 30° C, μειώνεται αισθητά η μολυσματική του ικανότητα. Ιδανικό ποσοστό υγρασίας για την ανάπτυξη του μύκητα είναι 60–70%. Εξίσου σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η φωτοπερίοδος. Φυτά πατάτας, χρυσάνθεμου και καπνού μολυσμένα με τον *V. dahliae* παρουσίασαν πιο έντονα συμπτώματα και υψηλότερο ποσοστό μόλυνσης όταν αναπτύχθηκαν σε μικρή φωτοπερίοδο, σε σχέση με την ανάπτυξη σε μεγάλη φωτοπερίοδο (Pegg, 1981).

Κρίσιμοι είναι και οι βιοτικοί παράμετροι όπως η πυκνότητα του μολύσματος, η παρουσία εδαφικής μικροχλωρίδας και ανταγωνιστικών μικροοργανισμών. Η εξάπλωση του παθογόνου μπορεί να πραγματοποιηθεί με σπόρους και κονδύλους μολυσμένων φυτών, με φύτευση σε μολυσμένο έδαφος, τη μεταφορά μολυσμένου υλικού με τον άνεμο, τη βροχή, τα ζώα, αλλά και ανθρωπογενείς δραστηριότητες όπως η άρδευση και η χρήση γεωργικών μηχανημάτων. Επίσης ο μύκητας μπορεί να εγκατασταθεί σε φυτά ξενιστές και να επανέλθει στην καλλιέργεια. Η ένταση της ασθένειας εξαρτάται από την επιβίωση και την πυκνότητα του μολύσματος, από το ποσοστό βλαστικότητας των μικροσκληρωτίων και τον αριθμό των βλαστανόντων υφών. Επίσης εξαρτάται από τον τρόπο διασποράς του παθογόνου στο έδαφος, αλλά και την ευαισθησία της ποικιλίας του φυτού (Hawke and Lazarovits, 1994). Οι αδρομυκώσεις θεωρούνται μονοκυκλικές ασθένειες έχοντας έναν μόνο κύκλο ανά καλλιεργητική περίοδο.

## 1.1.5. Αντιμετώπιση της Βερτισιλλίωσης

### 1.1.5.1. Καλλιεργητικά μέτρα

Ο μύκητας *Verticillium dahliae* είναι δύσκολο να καταπολεμηθεί, εξαιτίας του μεγάλου εύρους ξενιστών που προσβάλλει και την αδυναμία των μυκητοκτόνων να περιορίσουν την ανάπτυξη του παθογόνου όταν έχει αποικήσει τα αγγεία του ξύλου. Η αντιμετώπιση δυσχεραίνεται λόγω της δυνατότητας που έχει το παθογόνο να επιβιώνει για πολλά χρόνια στο έδαφος με τη μορφή μικροσκληρωτίων (Tjamos, 1989).

Για την αντιμετώπιση του παθογόνου τα μέτρα που λαμβάνονται είναι κυρίως προληπτικά και καλλιεργητικά. Βασική προϋπόθεση είναι η χρήση πιστοποιημένου υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού. Ο αγρός που καλλιεργείται θα πρέπει να είναι απαλλαγμένος από μόλυσμα. Ο παραγωγός θα πρέπει να ενημερωθεί για την προηγούμενη καλλιέργεια ώστε να γνωρίζει αν καλλιεργήθηκαν για μεγάλο χρονικό διάστημα ευπαθή φυτά στο βερτισίλλιο (σολανώδη, βαμβάκι κ.α.). Η ύπαρξη μικροσκληρωτίων στο έδαφος ακόμα και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσει ασθένεια με πιθανή καταστροφή της καλλιέργειας. Στα μολυσμένα εδάφη μπορεί να βρίσκονται πάνω από 100 μικροσκληρώτια ανά γραμμάριο εδάφους. Έρευνες έχουν δείξει ότι ακόμα και 6-10 μικροσκληρώτια ανά γραμμάριο εδάφους είναι ικανά να μολύνουν το 80% φυτών πατάτας και τομάτας, ενώ έχει αναφερθεί ότι ακόμα και μόλις 2 μικροσκληρώτια ανά γραμμάριο εδάφους μπορούν να προκαλέσουν προσβολή στο ήμισυ της καλλιέργειας φράουλας (Harris and Yang, 1996). Στην περίπτωση που υπάρχουν προσβεβλημένα φυτά, θα πρέπει να αφαιρούνται, να ξεριζώνονται και να καίγονται.

Θα πρέπει να πραγματοποιείται καταπολέμηση των ζιζανίων, πολλά από τα οποία είναι ξενιστές του μύκητα και συμβάλλουν στην επιβίωση, στην αύξηση και στη διάδοση του μολύσματος. Στην περίπτωση που ακολουθηθεί συγκαλλιέργεια θα πρέπει ο παραγωγός να είναι βέβαιος πως τα φυτά που θα επιλέξει δεν θα είναι ξενιστές του βερτισιλλίου. Οι κύκλοι αμειψισποράς με κατάλληλα φυτά βοηθούν στη μείωση του πληθυσμού του παθογόνου στο έδαφος, αλλά και στην ενίσχυση του πληθυσμού ανταγωνιστικών ως προς αυτό μικροοργανισμών. Θα πρέπει να μη χρησιμοποιείται κοπριά που μπορεί να περιέχει υπολείμματα φυτών ευαίσθητων στο μύκητα. Σημαντική παράμετρος στην αντιμετώπιση αποτελεί και η μέθοδος άρδευσης. Θα πρέπει να αποφεύγεται αυστηρά η άρδευση των φυτών με μεθόδους που ευνοείται η διάδοση του μολύσματος, όπως η κατάκλιση και τα αυλάκια. Στα πολυετή φυτά θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην τραυματίζεται το ριζικό τους σύστημα κατά το όργωμα και τη χρήση γεωργικών μηχανημάτων, διότι στη συνέχεια καθίστανται ιδιαίτερα ευπαθή στον αποικισμό τους από το μύκητα.

#### 1.1.5.2. Ανθεκτικές ποικιλίες

Απαραίτητο μέτρο θεωρείται η χρήση ποικιλιών ή υβριδίων ανθεκτικών στην ασθένεια και η χρησιμοποίησή τους σαν υποκείμενα στην περίπτωση εμβολιασμού των φυτών. Η χρησιμοποίηση ανθεκτικών ή ανεκτικών ποικιλιών και υποκειμένων μπορεί να επιφέρει σημαντική αύξηση των αποδόσεων των καλλιεργειών, χωρίς ωστόσο να επιφέρει μείωση του μολύσματος στο έδαφος, διότι οι ανεκτικές ποικιλίες συμπεριφέρονται πολλές φορές ως φορείς χωρίς συμπτώματα. Επομένως, υπάρχει ο κίνδυνος για την επόμενη ευαίσθητη καλλιέργεια.

#### 1.1.5.3. Χημική καταπολέμηση

Η μακροβιότητα των μικροσκληρωτίων στο έδαφος, η εγκατάσταση του μύκητα στο αγγειακό σύστημα των φυτών και η σχετική έλλειψη εξειδίκευσης ως προς τον ξενιστή δυσχεραίνουν την αντιμετώπιση της ασθένειας (Klosterman et al., 2009). Δεν υπάρχουν χημικά σκευάσματα ικανά να καταπολεμήσουν αποτελεσματικά την ασθένεια. Τα παλαιότερα χρόνια χρησιμοποιούταν το βρωμιούχο μεθύλιο για την απολύμανση του εδάφους από το μύκητα, κυρίως σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες. Ωστόσο, η παγκόσμια απαγόρευση της χρήσης της τοξικής αυτής ουσίας για τον άνθρωπο και το περιβάλλον ενίσχυσε την ανάγκη για έρευνα εναλλακτικών χειρισμών για την αντιμετώπιση της ασθένειας.

#### 1.1.5.4. Μέθοδος της ηλιοαπολύμανσης

Η ηλιοαπολύμανση αποτελεί αποτελεσματική πρακτική καταπολέμησης των εδαφογενών παθογόνων και εφαρμόζεται κυρίως σε καλλιέργειες θερμοκηπίου. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ανάπτυξη υψηλών θερμοκρασιών με την κάλυψη του εδάφους με πλαστικά φύλλα πολυαιθυλενίου κατά τους καλοκαιρινούς μήνες (Παναγόπουλος, 2007), καταστρέφοντας τα ανθεκτικά μολύσματα των διαχειμαζουσών μορφών του μύκητα (Chellemi and Olson, 1994). Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου είναι μακροχρόνια και μπορεί να διαρκέσει ακόμα και για τρεις συνεχόμενες καλλιεργητικές περιόδους στην Ελλάδα (Tjamos and Paplomatas, 1988), σε αντίθεση με άλλες περιοχές που οι περιβαλλοντικές συνθήκες δεν είναι κατάλληλες ώστε να καθίσταται εφικτή η συγκεκριμένη μέθοδος (Fradin and Thomma, 2006).

## 1.1.6. Βιολογική αντιμετώπιση

### 1.1.6.1. Ριζόσφαιρα και μικροβιακοί πληθυσμοί

Το ριζικό σύστημα έχει άμεση αλληλεπίδραση με το εδαφικό περιβάλλον και τη μικροχλωρίδα του. Συνθέτει, συσσωρεύει και εκκρίνει χημικές ενώσεις που είναι υπεύθυνες για την προσέλκυση ή την απώθηση διαφόρων μικροοργανισμών. Οι πιο ελκυστικές για τους μικροοργανισμούς είναι σάκχαρα, αμινοξέα και οργανικά οξέα, που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξή τους (Philippot et al., 2013). Επιπλέον, εκκρίνεται μια μεγάλη ποικιλία ενώσεων όπως ένζυμα, λιπαρά οξέα, νουκλεοτίδια, φωσφατίδια, ανόργανα ιόντα, βιταμίνες, τανίνες, αλκαλοειδή, φυτοορμόνες (Dakora and Phillips, 2002), προϊόντα αυτολύσεως των εφήμερων κυττάρων των ριζών και διάφορες διεγερτικές και ανασταλτικές για τους μικροοργανισμούς ενώσεις (Neumann and Romheld, 2001). Οι δραστηριότητες των ριζών επιφέρουν πολλές φυσικοχημικές μεταβολές στο έδαφος που τις περιβάλλει όπως συμπίεση, μεταφορά νερού και χημικών στοιχείων, μεταβολή συγκέντρωσης οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα και αλλαγή των τιμών pH. Επίσης επηρεάζεται η οργανική ουσία της ριζόσφαιρας (Foster, 1986).

Η ριζόσφαιρα είναι η περιοχή του εδάφους που περιλαμβάνει τη ρίζα και μερικά χιλιοστά εδάφους γύρω από αυτή (Gamalero et al., 2003). Αποτελεί το ενδιαίτημα για ένα μεγάλο αριθμό οργανισμών και μικροοργανισμών που περιλαμβάνουν βακτήρια, μύκητες, νηματώδεις, πρωτόζωα, φύκη και διάφορα μικρά αρθρόποδα (Nega, 2014). Η ριζόσφαιρα αποτελεί δυναμικό και πολύπλοκο περιβάλλοντα που συντελούνται εντός του πολλές φυσικοχημικές αλλαγές. Το έδαφος της ριζόσφαιρας χαρακτηρίζεται από τη συνεχή μικροβιακή δραστηριότητα και τους υψηλούς πληθυσμούς βακτηρίων σε σχέση με το υπόλοιπο έδαφος. Οι εκκρίσεις της ρίζας είναι υπεύθυνες για την προσέλκυση των μικροοργανισμών, η ριζόσφαιρα είναι 10 έως 1.000 φορές πιο πλούσια σε μικροοργανισμούς από τον κύριο όγκο του εδάφους (Verbon and Liberman et al., 2016).

Η ριζόσφαιρα αποτελεί περιβάλλον πλούσιο σε άνθρακα, που μπορούν να το αξιοποιήσουν οι μικροοργανισμοί. Ο άνθρακας στην περιοχή της ριζόσφαιρας υπάρχει ως προϊόν αποδόμησης της νεκρής οργανικής ύλης, είτε εκκρίνεται από τα κύτταρα της ρίζας ως προϊόν του μεταβολισμού του φυτού (Nega, 2014). Κατά αυτόν το τρόπο, το έδαφος διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο στη σύνθεση των μικροβιακών πληθυσμών και εδάφη πλούσια σε οργανική ουσία και σε διαθέσιμο άνθρακα αυξάνουν το μικροβιακό φορτίο (Verbon and Liberman et al., 2016). Οι διαφορετικές φυσικοχημικές εδαφικές ιδιότητες επηρεάζουν και τη σύνθεση των μικροβιακών κοινοτήτων (Lareen et al., 2016). Εδάφη με μεγάλη συγκέντρωση αργίλου που συγκρατούν περισσότερη υγρασία, φιλοξενούν μεγαλύτερους βακτηριακούς πληθυσμούς, όπου μετακινούνται πιο εύκολα με την παρουσία νερού (Dupuy and Silk, 2016). Η μικροβιακή αναπνοή επηρεάζεται από τη

διαθεσιμότητα οξυγόνου, με επίδραση στο μικροβιακό φορτίο. Επίσης η οξύτητα του εδάφους επηρεάζει την ανταλλαγή ιόντων από τις ρίζες, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει το πληθυσμών των μικροοργανισμών (Philippot et al., 2013).

Στην περιοχή της ριζόσφαιρας παρατηρούνται ποικίλες αλληλεπιδράσεις. Στα φυτά όταν υπάρχουν κοινά σημεία στη ριζόσφαιρά τους, υπάρχει ανταγωνισμός για θρεπτικά στοιχεία και νερό. Επίσης μπορεί να εμφανιστούν φαινόμενα αλληλοπάθειας με τον ένα φυτικό οργανισμό να εμποδίζει την ανάπτυξη του άλλου. Σημαντική είναι η αλληλεπίδραση μεταξύ ρίζας και μικροοργανισμών, οι οποίοι μπορεί να ευνοούν, να αναστέλλουν ή να μην έχουν καμία επίδραση στην ανάπτυξη του φυτού. Παράγοντες που το καθορίζουν αυτό αποτελούν, ο γονότυπος του φυτού, το είδος και το στέλεχος του μικροοργανισμού και οι συνθήκες του περιβάλλοντος που λαμβάνει χώρα η αλληλεπίδραση. Ο γονότυπος καθορίζει τη σύνθεση των ουσιών που εκκρίνονται από τις ρίζες και κατά συνέπεια ποιοι μικροοργανισμοί θα την αποικίσουν (Lareen et al., 2016). Σημαντικοί παράγοντες για τη ποσότητα των εκκρίσεων αποτελούν, το στάδιο ανάπτυξης των φυτών, η θρέψη τους και η έκθεση τους σε καταπόνηση. Επίσης το αμυντικό σύστημα των φυτών επηρεάζει το μικροβίωμα του εδάφους, καθώς αναστέλλει τη δράση και τη παρουσία φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών (Doornbos et al., 2011).

Οι μικροοργανισμοί που βρίσκονται στο έδαφος, εκτός από την άμεση επίδραση στους φυτικούς οργανισμούς, έχουν και τεράστια έμμεση επίδραση. Η μικροβιακή δραστηριότητα καθορίζει τους βιογεωχημικούς κύκλους των ανόργανων και οργανικών συστατικών του εδάφους. Συμβάλλει καθοριστικά στη βιοδιαθεσιμότητα των θρεπτικών στοιχείων και συντελεί στη γονιμότητα του εδάφους. Η μικροχλωρίδα της ριζόσφαιρας με πολλούς τρόπους έχει σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη, στη θρέψη, στην υγεία των φυτών, όπως και στην παραγωγικότητά τους. (Jeffries et al., 2002). Σημαντική θεωρείται η συμβολή των ωφέλιμων μικροοργανισμών και στην υγεία των φυτών, παρέχοντας προστασία από τους παθογόνους, λόγω των ανταγωνιστικών σχέσεων που αναπτύσσονται μεταξύ τους (Dupuy and Silk, 2016).

Σε αυτό το πλούσιο και σύνθετο οικοσύστημα περιλαμβάνονται και οι εδαφογενείς φυτοπαθογόνοι μικροοργανισμοί, αλλά και αυτοί που τους ανταγωνίζονται. Το μέγεθος και το είδος των παθογόνων και των ωφέλιμων οργανισμών επηρεάζεται από το είδος και την ποσότητα των ριζικών εκκρίσεων, αλλά και από τις αλληλεπιδράσεις των ίδιων των μικροοργανισμών στη ριζόσφαιρα (Somers et al., 2004). Τα μολύσματα διάφορων παθογόνων, βλαστάνουν κοντά στις ρίζες ή σε βλαστάνοντες σπόρους (Rovira, 1991). Τα εδαφογενή παθογόνα για να μολύνουν τα φυτά πρέπει να διαπεράσουν τη ζώνη της ριζόσφαιρας, η οποία όταν διαθέτει έντονο μικροβίωμα, αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας εναντίον της επίθεσης των παθογόνων (Weller, 1988).

Οι μικροοργανισμοί που έχουν δράση εναντίον των φυτοπαθογόνων, ονομάζονται ωφέλιμοι. Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται διάφορα είδη βακτηρίων που κατοικούν στη ριζόσφαιρα. Η διαδικασία εγκατάστασης τους στο ριζικό σύστημα, αποτελεί μια σύνθετη διαδρομή. Αυτή περιλαμβάνει την αναγνώριση των ριζών του φυτού, τη μετακίνηση προς αυτό, την προσκόλληση, το σχηματισμό αποικίας και τη θρέψη από τα φυτά. (Dupuy and Silk, 2016).

Η μετακίνηση των μικροοργανισμών προς την επιφάνεια της ρίζας, γίνεται ενεργητικά ή παθητικά ή και με το συνδυασμό τους. Η ενεργή μεταφορά προϋποθέτει κατανάλωση ενέργειας (ATP) από τα βακτήρια και συντελείται με τη βοήθεια των μαστιγίων ή των βλεφαρίδων (Dupuy and Silk, 2016). Η παθητική κίνηση αντίθετα, πραγματοποιείται με τη ροή του νερού στο εδαφικό περιβάλλον, ακόμα και μέσω αποικισμού των υφών του παθογόνου μύκητα και μεταφορά ακόμη και εντός της ρίζας (Overbeek and Saikkonen, 2016). Η μετακίνηση των μικροοργανισμών προς την περιοχή της ριζόσφαιρας είναι χημειοτακτική (Adler, 1996), δηλαδή προϋπάρχει ένα χημικό ερέθισμα από τα φυτά και κινούνται προς αυτό. Τα βακτήρια εμφανίζουν θετική χημειόταξη ως προς τις οργανικές εκκρίσεις των ριζών (Somers et al., 2004). Τα φυτά μάλιστα έχουν τη δυνατότητα να αντιληφθούν την ύπαρξη ριζόβιων βακτηρίων με τη χρήση εξειδικευμένου ενδοκυτταρικού υποδοχέα που ανιχνεύει τις πεπτιδικές ενώσεις που βρίσκονται στα μαστίγια των βακτηρίων (Parker, 2003).

Η προσκόλληση των βακτηρίων στη ριζική επιφάνεια λαμβάνει χώρα με τη βοήθεια των πολυσακχαριτών που περιβάλλουν το κύτταρο των βακτηρίων. Οι πολυσακχαρίτες συνδέουν τα κύτταρα μεταξύ τους, σχηματίζοντας κατά αυτό τον τρόπο μικροαποικίες (Van Loon et al., 1998). Όταν η προσκόλληση γίνει επιτυχής τα βακτήρια σχηματίζουν βιομεμβράνη (biofilm) (Davey and O' Toole, 2000), η οποία αποτελεί υψηλής δομής μικροβιακή κοινότητα (Hall-Stoodley et al., 2004), στην οποία γίνεται πιο σταθερή η προσκόλληση στη ριζική επιφάνεια (Berry and Armitage, 2008). Κατά αυτό τον τρόπο τα ριζοβακτήρια λειτουργούν ως ένας πολυκύτταρος οργανισμός και μάλιστα διαθέτουν αίσθηση της πυκνότητας του πληθυσμού. Το φαινόμενο αυτό, ονομάζεται αίσθηση απαρτίας (quorum sensing, QS) (Fuqua et al., 2001) και είναι καθοριστικό για τη μετάβαση της κοινότητας των βακτηρίων από την αναπαραγωγική φάση, στην παραγωγή χημικών ενώσεων, εξωενζύμων και αντιβιοτικών. Τα ενδοκυτταρικά αυτά σήματα ακολουθούν και τα παθογόνα προκειμένου να γνωρίζουν ότι έχουν το πληθυσμό που απαιτείται για να επιχειρήσουν να διαπεράσουν την άμυνα του φυτού (Pliego et al., 2011). Αφού καταφέρουν να αποικίσουν το φυτό, οι μικροοργανισμοί αξιοποιούν τις οργανικές πηγές άνθρακα, για να καλύψουν τις μεταβολικές τους ανάγκες (Dupuy and Silk, 2016). Η αποτελεσματική εγκατάσταση και διατήρηση των βακτηρίων που αποικίζουν τη ριζόσφαιρα και έχουν τη δυνατότητα να ανταγωνιστούν τα παθογόνα, είναι βασικό σκέλος στην βιολογική αντιμετώπιση (Lugtenberg and Dekkers, 1999). Στην περίπτωση που υπάρχει αδυναμία των μικροοργανισμών να κινηθούν καθοδικά στη ριζόσφαιρα, πιθανώς



οφείλεται στην δυσκολία τους να ανταγωνιστούν την προϋπάρχουσα εδαφική μικροχλωρίδα (Chao et al., 1986).

Τα φυτά επηρεάζονται ευνοϊκά από διάφορους ριζοσφαιρικούς μικροοργανισμούς, τόσο στην αντιμετώπιση εδαφογενών ασθενειών (Comprant et al., 2005), όσο και στη θρέψη και στην ανάπτυξή τους. Η συμβολή στη θρέψη επιτυγχάνεται με τη διαλυτοποίηση δυσδιάλυτων ενώσεων, όπως φωσφόρου και σιδήρου και τη μετατροπή τους σε μορφές ευκολότερα αφομοιώσιμες από τα φυτά (Whitelaw, 2000). Επίσης πλήθος βακτηρίων λειτουργούν ως βιοδιεγέρτες και επάγουν την ανάπτυξη και την αντοχή των φυτών (Sahebani and Gholamrezaee, 2021) σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, PGPR). Οι βιολογικοί παράγοντες βρίσκονται σε αφθονία σε φυσικά περιβάλλοντα που δεν επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από την εντατική γεωργία, τη χρήση ανόργανων λιπασμάτων και χημικών φυτοφαρμάκων. Η εφαρμογή τους στα εδάφη μπορεί να γίνει μία φορά, αλλά στην περίπτωση που παρατηρείται δυσκολία στην εγκατάστασή τους μπορεί να γίνει διαρκή εισαγωγή με επαναλήψεις (Heydari and Passarakli, 2010).

Οι μικροοργανισμοί που πρόκειται να αξιοποιηθούν ως βιολογικοί παράγοντες προτιμάται να εισαχθούν σε καλλιέργειες με εδαφοκλιματικές συνθήκες παρόμοιες με αυτές που επικρατούν στο περιβάλλον όπου απομονώθηκαν (Weller, 1988). Κάθε στέλεχος που απομονώνεται θα πρέπει να ελέγχεται και να υποβάλλεται σε πολλά πειράματα σε συνθήκες αγρού ή θερμοκηπίου. Θα πρέπει να αξιολογείται η ικανότητα αποικισμού της ριζόσφαιρας και ο βαθμός ανασχεσης των δυσμενών επιπτώσεων των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών, λαμβάνοντας υπόψη τις συνθήκες του περιβάλλοντος.

#### 1.1.6.2. Μηχανισμοί δράσεις των βιολογικών παραγόντων

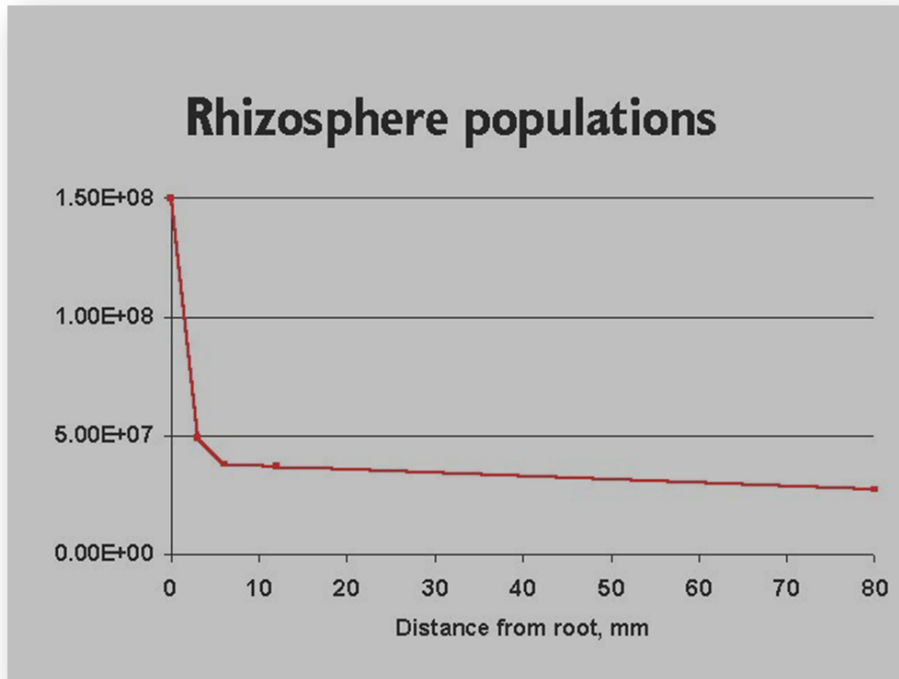
Οι βιολογικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση των ασθενειών των φυτών διαθέτουν διάφορους τρόπους δράσης, που διακρίνονται στους άμεσους και στους έμμεσους. Στην πρώτη κατηγορία εντάσσονται μικροοργανισμοί που ανταγωνίζονται το παθογόνο για το χώρο εγκατάστασης και για θρεπτικά στοιχεία (Lugtenberg and Dekkers, 1999). Άμεση δράση έναντι φυτοπαθογόνων έχουν επίσης οι βιολογικοί παράγοντες που φέρουν εξειδίκευση ως προς το παθογόνο και περιλαμβάνουν μηχανισμούς όπως παρασιτισμός, αρπακτικότητα και την παραγωγή αντιβιοτικών ή άλλων δευτερογενών μεταβολιτών που ανακόπτουν το παθογόνο. Η έμμεση δράση κατά των παθογόνων αφορά το μηχανισμό που επάγει την αντοχή και την άμυνα του φυτού προσφέροντάς του προστασία (Pliego et al., 2011). Υπάρχουν μικροοργανισμοί που συνδυάζουν τους παραπάνω μηχανισμούς για να καταστείλουν την ανάπτυξη και τη δραστηριότητα του παθογόνου, καθιστώντας τους πιο αποτελεσματικούς ως βιολογικούς παράγοντες (Heydari and Passarakli, 2010).

#### 1.1.6.2.1. Ανταγωνισμός θέσης και θρεπτικών στοιχείων

Στη ριζόσφαιρα, λαμβάνει χώρα έντονος ανταγωνισμός μεταξύ των μικροοργανισμών για εγκατάσταση στη ριζική επιφάνεια και για θρεπτικά συστατικά τα οποία εκκρίνονται κυρίως εκεί που παρατηρείται εντονότερη παραγωγή οργανικών ουσιών (Raaijmakers et al., 2009). Οι βιολογικοί παράγοντες ανταγωνίζονται τα παθογόνα ώστε να επιβιώσουν και να πολλαπλασιαστούν. Η ταχύτητα κίνησης προς το χημικό ερέθισμα αλλά και ο γρήγορος πολλαπλασιασμός δίνει πλεονέκτημα σε κάποιο ωφέλιμο μικροοργανισμό να είναι ανταγωνιστικό ως προς το παθογόνο και να εγκατασταθεί πρώτο στις θέσεις αποικισμού. Τα μεσοκυττάρια κενά στην επιφάνεια της ρίζας αποτελούν το χώρο που χρησιμοποιείται από τους μικροοργανισμούς κατά τον αποικισμό του φυτού (Bolwerk et al., 2003).

Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί έχουν καταφέρει εξελικτικά να ανταγωνίζονται σε σημαντικό βαθμό την παρουσία και τις δραστηριότητες των άλλων μικροοργανισμών ώστε να επικρατούν. Τα ωφέλιμα βακτήρια στην περίπτωση που προστίθενται στο έδαφος πρέπει να ανταγωνισθούν και αυτά για τις θέσεις αποικισμού στη ρίζα των φυτών με τους μικροοργανισμούς που βρίσκονται ήδη εκεί. Η ικανότητα ανταγωνισμού είναι αυτή που καθορίζει τόσο τη δημιουργία, όσο και την επικράτηση των μικροβιακών κοινοτήτων.

Η ανάγκη της εξασφάλισης χώρου και θρεπτικών στοιχείων αντίστοιχα, προκύπτει από τις ιδιαίτερες συνθήκες που επικρατούν στη ριζόσφαιρα, δεδομένου ότι οι μικροοργανισμοί, τόσο οι παθογόνοι όσο και οι ωφέλιμοι προσελκύονται και τρέφονται από τις ίδιες ουσίες και συνηθίζουν να εγκαθίστανται στις ίδιες θέσεις. Τα θρεπτικά στοιχεία είναι περιορισμένα και οι μικροοργανισμοί βρίσκονται συχνά υπό συνθήκες τροφικής πενίας, μειώνοντας κατά αυτόν τον τρόπο τις πιθανότητες επιβίωσης τους, ειδικά αν συγκριθούν με τις συνθήκες που παρέχονται στις μικροβιακές καλλιέργειες στο εργαστήριο (Lugtenberg and Kamilova, 2009). Ο χρόνος διπλασιασμού για παράδειγμα του *Pseudomonas* spp. στην ριζόσφαιρα είναι 3 έως 6 ώρες, κατά δέκα φορές πιο αργός συγκριτικά με τις πλούσιες θρεπτικά συνθήκες που παρέχονται σε καλλιέργειες στο εργαστήριο (Haas and Defago, 2005).

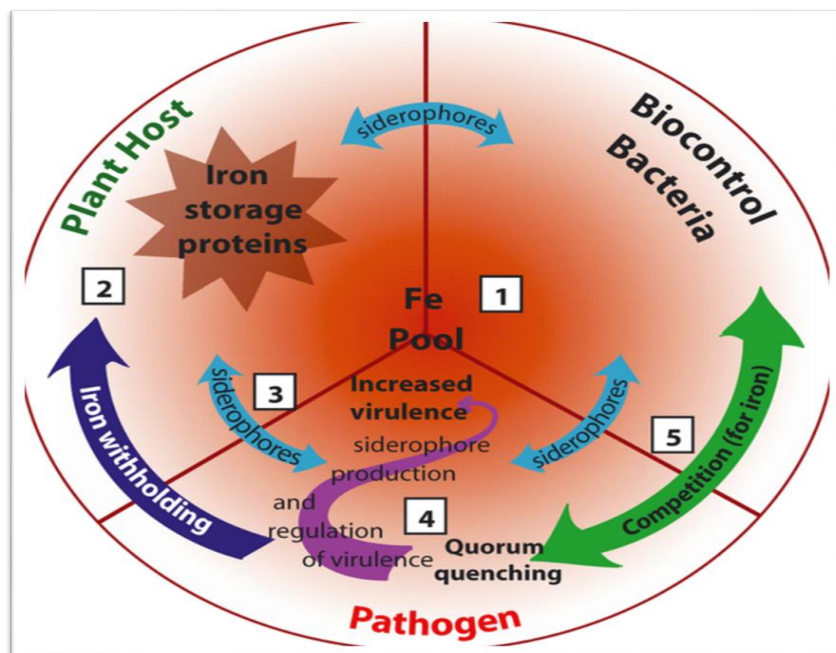


Εικόνα 6: Διάγραμμα του μικροβιακού πληθυσμού ως προς την απόσταση από τη ρίζα

Ο ανταγωνισμός για θρεπτικά στοιχεία είναι ιδιαίτερα σημαντικός και περιλαμβάνει κυρίως πηγές άνθρακα και αζώτου, καθώς προσφέρουν την απαραίτητη ενέργεια για την επακόλουθη αποίκιση της ριζόσφαιρας (Weller, 1988). Εκεί που παρατηρείται εντονότερη παραγωγή οργανικών ουσιών, επικρατεί έντονη μικροβιακή δραστηριότητα. Η στέρηση από τα παθογόνα θρεπτικών στοιχείων έχει ως αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η ολοκλήρωση του κύκλου της μόλυνσης.

Οι μικροοργανισμοί ανταγωνίζονται μεταξύ τους και για πηγές σιδήρου. Το στοιχείο του σιδήρου μπορεί να βρίσκεται σε αφθονία στο έδαφος, αλλά υπάρχει κυρίως σε μορφή υδροξειδίου του σιδήρου. Η μορφή αυτή είναι εξαιρετικά δυσδιάλυτη με αποτέλεσμα να μην είναι διαθέσιμο για τους μικροοργανισμούς του εδάφους, οι οποίοι χρειάζονται το σίδηρο για την ανάπτυξη και την επιβίωσή τους. Ωστόσο ορισμένα βακτήρια έχουν αναπτύξει ειδικούς μηχανισμούς πρόσληψης του σιδήρου (Neilands and Nakamura, 1991). Κάτω από συνθήκες ανεπάρκειας σιδήρου τα ωφέλιμα βακτήρια προσλαμβάνουν τα διαθέσιμα ιόντα σιδήρου σχηματίζοντας χηλικές ενώσεις με υψηλή συγγένεια προς το σίδηρο, που ονομάζονται σιδηροφόροι (Neilands, 1995). Ο τυπικός μηχανισμός περιλαμβάνει ένα σιδηροφόρο, ο οποίος είναι μικρού μοριακού βάρους ένωση μεταφοράς  $Fe^{3+}$  που δεσμεύει το σίδηρο και μια πρωτεΐνη που μεταφέρει το σίδηρο μέσα στο βακτηριακό κύτταρο (Handelsman and Stabb, 1996). Οι σιδηροφόροι κατά αυτό τον τρόπο συμβάλλουν στον περιορισμό των ιόντων σιδήρου στη ριζόσφαιρα, στερώντας τον από τα παθογόνα και μειώνοντας κατά αυτό τον τρόπο την ανάπτυξη τους (Chet et al., 1990). Τα

βακτήρια αυτά μέσω αυτής της διαδικασίας έχουν τη δυνατότητα να προσλαμβάνουν σίδηρο από το περιβάλλον και να τον δεσμεύουν για τις δικές τους ανάγκες, αποκτώντας πλεονέκτημα για την επικράτησή σε σχέση με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς (Malfanova et al., 2013). Ο σίδηρος είναι ουσιώδης για κάθε οργανισμό (Braun and Hantke, 2011) καθώς βρίσκεται στα σύμπλοκα πρωτεϊνών σιδήρου-θείου (Fe-S) και στο μόριο της αίμης (Andrews et al., 2003). Ο ανταγωνισμός για σίδηρο είναι πιο έντονος στα ασβεστούχα εδάφη (pH>7), όπου το υψηλό pH οδηγεί σε χαμηλή διαθεσιμότητα σιδήρου (Raaijmakers et al., 2009). Τα παθογόνα είναι ευαίσθητα στην καταστολή τους από τους σιδηροφόρους διότι αδυνατούν να χρησιμοποιήσουν τους σιδηροφόρους που παράγονται από τα ανταγωνιστικά βακτήρια. Επίσης είτε δεν παράγουν δικούς τους σιδηροφόρους, είτε παράγουν μικρές ποσότητες σιδηροφόρων με μικρότερη ικανότητα έλξης σιδήρου από ότι των αντίστοιχων των βακτηρίων.



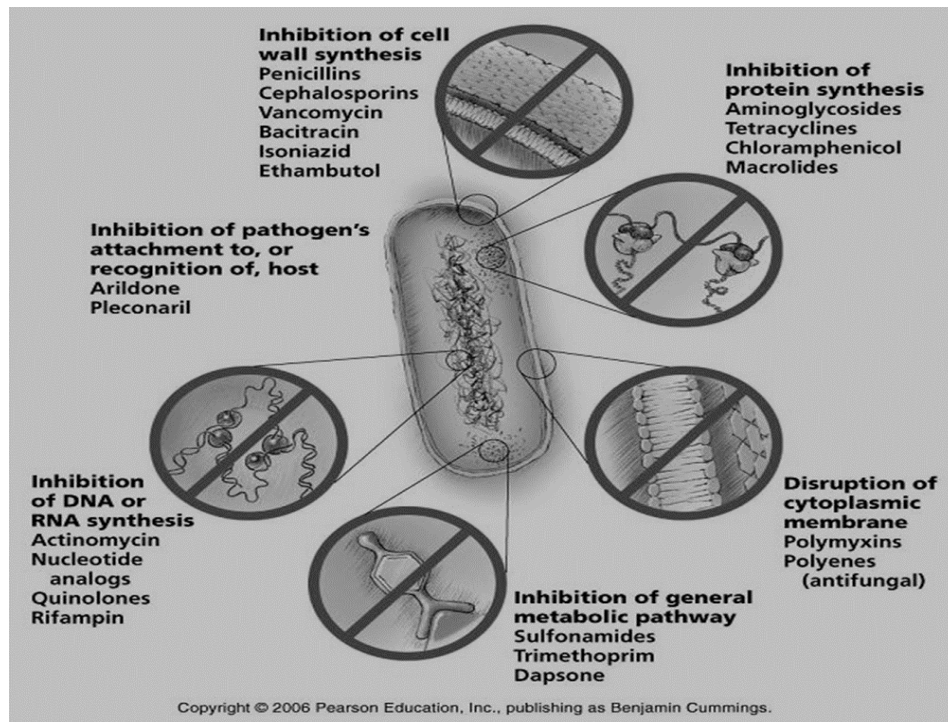
Εικόνα 7: Ο μηχανισμός των σιδηροφόρων

#### 1.1.6.2.2. Αντιβίωση

Η αντιβίωση αποτελεί εξειδικευμένο μηχανισμό βιολογικής αντιμετώπισης που πραγματοποιείται από οργανικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους, τις οποίες συνθέτουν κυρίως εδαφογενείς μικροοργανισμοί και έχουν τη δυνατότητα να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη και άλλες μεταβολικές διεργασίες άλλων μικροοργανισμών (Fravel, 1988).

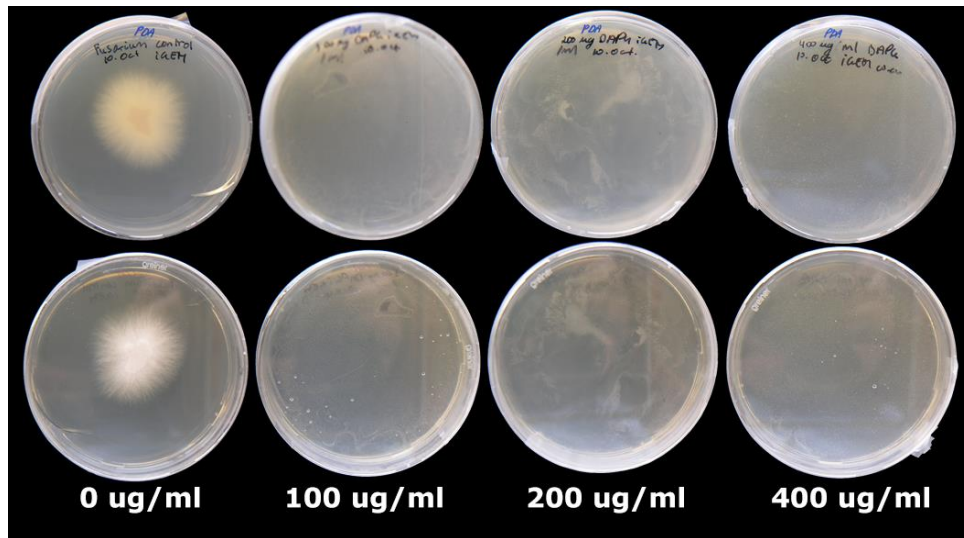
Τα αντιβιοτικά που παράγουν οι μικροοργανισμοί είναι ενώσεις του δευτερογενούς μεταβολισμού τους, οι οποίες παράγονται κατά τη φάση στασιμότητας και ως προϊόντα δεν απαιτούνται για την αύξηση και ανάπτυξη των κυττάρων. Οι ουσίες αυτές έχουν

μυκητοστατική ή μυκητοτοξική δράση. Στην πρώτη περίπτωση αναστέλλεται η ανάπτυξη ή ο πολλαπλασιασμός του μικροοργανισμού, επηρεάζοντας την παραγωγή πρωτεϊνών, την αντιγραφή του DNA και άλλες μεταβολικές διεργασίες (Zimdahl, 2015). Στην δεύτερη περίπτωση οι αντιβιοτικές ενώσεις παρεμβαίνουν στο σχηματισμό του κυτταρικού τοιχώματος και στο πρωτόπλασμα, προκαλώντας εκροή και συρρίκνωσή του (Dennis and Webster, 1971).



Εικόνα 8: Μηχανισμός δράσης αντιβιοτικών

Στην *in vitro* καλλιέργεια των υπό εξέταση μικροοργανισμών για την αξιολόγηση δυνητικών ανταγωνιστών δημιουργείται μια χαρακτηριστική ζώνη παρεμπόδισης, η οποία οφείλεται στην παραγωγή διάφορων αντιβιοτικών ενώσεων (Swadling and Jeffries, 1996). Ο ρόλος των αντιβιοτικών ουσιών στη αντιμετώπιση παθογόνων μικροοργανισμών διερευνάται και μέσω γενετικών αναλύσεων. Η μελέτη μεταλλαγμένων στελεχών σε *in vitro* συνθήκες με αλλαγές στη συσσώρευση αντιβιοτικών παρέχει πληροφορίες για την δραστηρότητά τους (Handelsman and Stabb, 1996). Τα μεταλλαγμένα στελέχη στερούνται της ικανότητας παραγωγής αυτών των ουσιών ή τις υπερπαραγωγή (Chin-A-Woeng et al., 1998).



Εικόνα 9: Επίδραση της αντιβιοτικής ένωσης 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) στο φυτοπαθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum*

Σε πολλές περιπτώσεις βιολογικής αντιμετώπισης έχει παρατηρηθεί ότι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί παράγουν και εκκρίνουν περισσότερες από μία ενώσεις με αντιβιοτική δράση (Pal and McSpadden, 2006). Η ικανότητα ενός βιολογικού παράγοντα να παράγει αντιβιοτικά που μπορεί να καταστέλλουν διαφορετικά παθογόνα ενισχύει την αποτελεσματικότητά του.

Ο κίνδυνος ανάπτυξης πληθυσμών παθογόνων μικροοργανισμών που να είναι ανθεκτικοί στα αντιβιοτικά που παράγονται από τους βιολογικούς παράγοντες είναι περιορισμένος. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί συνήθως παράγουν παραπάνω από ένα αντιβιοτικό (Pal and McSpadden, 2006). Επίσης βρίσκονται κυρίως κοντά στην επιφάνεια της ρίζας, με αποτέλεσμα να μην ασκείται ισχυρή πίεση επιλογής στα παθογόνα, καθώς δεν εκτίθεται το σύνολο του πληθυσμού τους στα αντιβιοτικά, που θα είχε ως κίνδυνο την ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών τους (Handelsman and Stabb, 1996).

Η αντιβίωση ως βιολογικός μηχανισμός δράσης εναντίον παθογόνων μικροοργανισμών μπορεί να δρα παράλληλα και συνεργιστικά με άλλους μηχανισμούς, όπως ο ανταγωνισμός και ο παρασιτισμός (Fravel, 1988). Ο μύκητας *Trichoderma harzianum* έχει την δυνατότητα αντιβίωσης, αλλά και παρασιτισμού εναντίον των μυκήτων *Rhizoctonia solani* και *Sclerotium cepivorum*. Επίσης αντιβιοτική ικανότητα έχει παρατηρηθεί και σε πτητικές ουσίες βακτηρίων, όπως είδη του γένους *Bacillus*, που παρεμποδίζουν την αύξηση παθογόνων μικροοργανισμών χωρίς να προηγηθεί μεταξύ τους επαφή.

Πίνακας 2: Παραδείγματα αντιβιοτικών που έχουν απομονωθεί από βιολογικούς παράγοντες (Raaijmakers et al., 2002)

Αντιβιοτικό	Βιολογικός παράγοντας	Παθογόνο - στόχος	Φυτό ξενιστής
2-4 diacetylphloroglucinol (DAPG)	<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Gaeumannomyces graminis</i> <i>Thielaviopsis basicola</i> , <i>Pythium ultimum</i> <i>Septoria tritici</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>	Σιτάρι Καπνός Ζαχαρότευτλο Βαμβάκι
Phenazines	<i>Pseudomonas spp</i>	<i>Gaeumannomyces graminis</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Pythium splendens</i>	Σιτάρι, Καλαμπόκι Ρύζι Τομάτα Ρεβόθι
Oomycin A	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Hv37a	<i>Pythium ultimum</i>	Κριθάρι
Pyoluteorin	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5 <i>Pseudomonas fluorescens</i> Q8r1-96	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Pythium ultimum</i> <i>Thielaviopsis basicola</i> <i>Pythium ultimum</i>	Βαμβάκι Καπνός
Pyrrolnitrin	<i>Pseudomonas fluorescens</i> BL915 <i>Burkholderia cepacia</i> B37w <i>Enterobacter agglomerans</i> <i>Serratia spp.</i>	<i>Fusarium sambucinum</i> <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Verticillium dahliae</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Βαμβάκι Πατάτα Αμπέλι Ελαιοκράμβη
Viscosinamide	<i>Pseudomonas fluorescens</i> DR54	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Pythium ultimum</i>	Ζαχαρότευτλο
Butyrolactones	<i>Pseudomonas aureofaciens</i> 63-28	<i>Pythium ultimum</i> <i>Pyrenophora teres</i>	Ελαιοκράμβη
Pantocin A and B	<i>Pseudomonas agglomerans</i> EH318	<i>Erwinia herbicola</i>	Μηλιά
Xanthobaccines	<i>Stenotrophomonas</i> SBK88	<i>Pythium ultimum</i>	Ζαχαρότευτλο
Kanosamine Zwittermycin A	<i>Bacillus cereus</i> UW85	<i>Phytophthora medicaginis</i>	Μηδική
AFA	<i>Serratia violaceusniger</i>	<i>Pythium ultimum</i>	Μαρούλι

Η δραστηριότητα αυτών των ουσιών ως προς τους παθογόνους μικροοργανισμούς εξαρτάται από τη συγκέντρωση της χημικής ένωσης και από τον εκάστοτε παθογόνο στόχο. Τα αντιβιοτικά για να είναι αποτελεσματικά, πρέπει να παράγονται σε επαρκείς ποσότητες κοντά στο παθογόνο ώστε να ασκήσουν βιολογική δράση (Nega et al., 2014). Πολλά αντιβιοτικά έχουν ευρύ φάσμα δράσης. Η πυρρολνιτρίνη, η οποία παράγεται από βακτηριακά στελέχη των γενών *Pseudomonas* έχει αποτελεσματική δράση εναντίον Βασιδιομυκήτων, Αδηλομυκήτων και Ασκομυκήτων, όπως *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Verticillium dahliae* και *Sclerotinia sclerotiorum* (Raaijmakers et al., 2002).

Στις χημικές ενώσεις των μικροοργανισμών με αντιβιοτική δράση ανήκουν οι: 2,4-διακέτυλοφλορογλυσινολή (DAPG), ωομυκίνη Α (Van Loon and Bakker 2006) φεναζίνη, πυρρολνιτρίνη, πυουλουτεορίνη, θειοτροποσίνη, τροπολόνη σουμπντυλένιο Α, κανοζαμίνη, ολιγομυκίνη Α, βισκοσιναμίδη, ξανθοβασίνη και σβιτερμυκίνη Α, αμμωνία, βουτυρολακτόνες και υδροκυάνιο (HCN) (Nair et al., 2004). Τα αντιβιοτικά δρουν στους παθογόνους οργανισμούς με πολλούς τρόπους. Μπορεί να επηρεάζουν την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων των συμπλόκων της αναπνοής (φεναζίνες, πυρρολνιτρίνη), αναστέλλουν την οξειδάση του κυτοχρώματος c των ευκαρυωτικών οργανισμών (υδροκυάνιο) (Pal and Mcspadden, 2006). Επηρεάζουν την ακεραιότητα της μεμβράνης (βιοεπιφανειοδραστικά) ή την κυτταρική μεμβράνη και τα ζωοσπόρια (DAPG), οι τρόποι δράσης τους χρήζουν περεταίρω διερεύνησης. (Raaijmakers et al., 2009). Η αντιβιοτική δράση των βιολογικών παραγόντων ωστόσο δεν έχει πάντα σταθερή απόδοση στην αντιμετώπιση των παθογόνων. Η αστάθεια αυτή οφείλεται σε πολλούς παράγοντες, όπως η μεταβαλλόμενη έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την αντιμετώπιση των ασθενειών (Raaijmakers et al., 2002), αλλά και αβιοτικοί παράγοντες όπως η θερμοκρασία (Shanahan et al., 1992), η υγρασία (Georgakopoulos et al., 1994), το pH του εδάφους (Ownley et al., 1992) και τα επίπεδα των διαφόρων μεταλλικών ιόντων, όπως του ψευδάργυρου (Van Rij et al., 2004). Επίσης ουσίες που παράγονται από το παθογόνο στόχο, πιθανώς να αναστείλουν την παραγωγή αντιβιοτικών. Ο μύκητας *F. oxysporum* παράγει μια ένωση που ονομάζεται φουζαρικό οξύ, η οποία φαίνεται να είναι υπεύθυνη για την αναστολή της παραγωγής του αντιβιοτικού (DAPG) από το βακτήριο *P. fluorescens* (Notz et al., 2002).

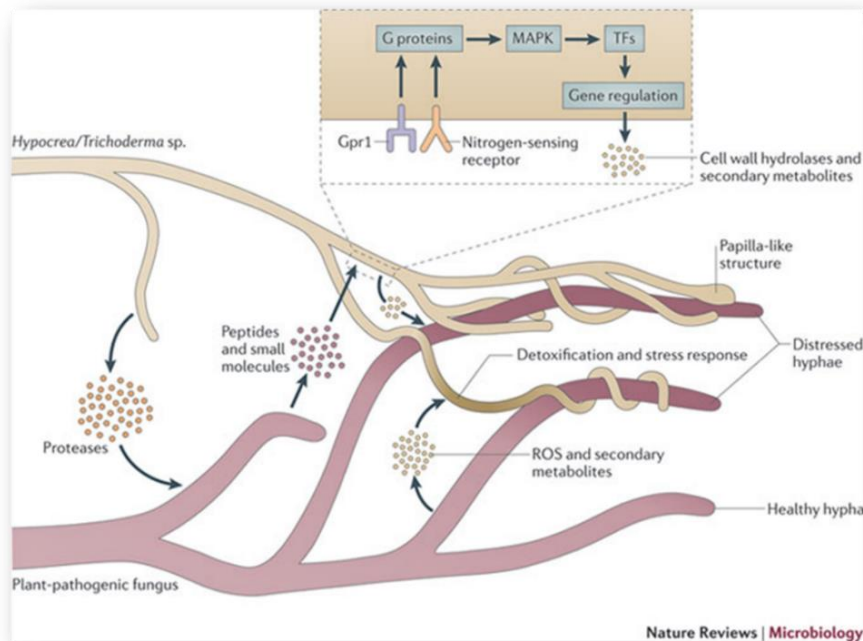
Η παραγωγή των αντιβιοτικών φαίνεται πως καθορίζεται από την αίσθηση απαρτίας (quorum sensing) προάγοντας κατά αυτόν τον τρόπο αποτελεσματικότερα τη συλλογική δράση των βακτηρίων απέναντι σε ένα μικροοργανισμό (Miller and Bassler, 2001). Επίσης η σύνθεση των αντιβιοτικών είναι αποτέλεσμα συνολικής αλληλεπίδρασης φυτού, βιολογικού παράγοντα, παθογόνου και της μεταξύ τους χημικής επικοινωνίας (Jousset et al., 2011). Εξαιτίας αυτής της αλληλεπίδρασης ορισμένα στελέχη τα οποία παρουσιάζουν δράση ενάντια σε παθογόνους μύκητες σε δοκιμές *in vitro*, δεν έχουν την ίδια δράση σε *in vivo* δοκιμές (Chin-A-Woeng et al., 2000).



### 1.1.6.2.3. Υπερπαρασιτισμός

Η παραγωγή εξωκυτταρικών ενζύμων που λύνουν τα κυτταρικά τοιχώματα αποτελεί συνήθη τακτική μεταξύ ανταγωνιστικών μικροοργανισμών. Συμβάλλει στην εδαφική μικροβιακή ισορροπία και μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά στη βιολογική αντιμετώπιση. Οι μικροοργανισμοί οι οποίοι παρασιτούν εναντίον των παθογόνων αρχικά εκκρίνουν λυτικά ένζυμα που αποτελούνται από χιτινάσες, πρωτεάσες, γλουκανάσες και κυτταρινάσες (Paravizas and Lumsden, 1980). Τα ένζυμα αυτά μπορούν να υδρολύουν μια ευρεία ποικιλία πολυμερών ενώσεων συμπεριλαμβανομένης της χιτίνης, της κυτταρίνης και πολυσακχαριτών που αποτελούν δομικά συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων (Chemin and Chet, 2002) προκειμένου να καθίσταται εφικτός ο παρασιτισμός.

Το παράσιτο αναπτύσσεται με τις διακλαδώσεις των υφών του προς τον ξενιστή και ακολουθεί η περαιτέρω επαφή του παρασίτου με το παθογόνο. Κατά την αλληλεπίδραση αυτή, παρατηρούνται φαινόμενα περιέλιξης, προσκόλλησης και διείσδυσης των υφών του παρασίτου εντός των υφών του μύκητα που αποτελεί τον ξενιστή (Paravizas, 1985). Στο σημείο επαφής του άκρου της υφής του παρασίτου και της υφής του ξενιστή παρατηρούνται σχηματισμοί που μοιάζουν με απρεσσόρια και παράγονται χλαμυδοσπόρια του παρασίτου εντός των υφών του ξενιστή. Ακολουθεί συγκέντρωση του πρωτοπλάσματος του ξενιστή κατά θέσεις και εκροή του (Paravizas, 1985).



Εικόνα 10: Τρόπος δράσης του υπερπαρασιτισμού

Οι μικροοργανισμοί που λειτουργούν ως παράσιτα βρίσκονται σε στενή σχέση με άλλους μικροοργανισμούς προκειμένου να αντλήσουν τα απαραίτητα για την ανάπτυξή τους θρεπτικά στοιχεία. Τα παράσιτα διακρίνονται δύο κύριες κατηγορίες, σε υποχρεωτικά και σαπρόφυτα. Τα πρώτα λαμβάνουν τα απαραίτητα για την ανάπτυξή τους θρεπτικά στοιχεία από ζωντανά κύτταρα του ξενιστή τους, αυξανόμενα σε στενή επαφή με αυτόν (Dennis and Webster, 1971), ή διεισδύοντας στο εσωτερικό των κυττάρων του (Wilson et al., 1988). Αντίθετα, τα σαπρόφυτα παράσιτα λαμβάνουν τα θρεπτικά στοιχεία από νεκρά κύτταρα του ξενιστή τους, μέσω της απελευθέρωσης τοξικών ουσιών (Barnett and Binder, 1973), ή κυτταρολυτικών ενζύμων (Chet and Baker, 1980).

Ο υπερπαρασιτισμός παρατηρείται κυρίως από ωφέλιμους μύκητες σε εδαφογενή παθογόνα. Οι μύκητες που δρουν ως υπερπαρασίτα είναι είδη του γένους *Trichoderma*, όπως τα είδη *T. harzianum* και *T. hamatum* το είδος *Gliocladium virens* (Tu, 1980), αλλά και άλλα είδη, όπως το *Coniothyrium minitans* (Huang and Hoes, 1976), το *Trichothecium roseum* (Huang and Kokko, 1993). Παρουσιάζουν ανταγωνιστική δράση με το να παρασιτούν παθογόνους μικροοργανισμούς όπως, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium dahliae* και *Gaeumannomyces graminis* (Harman et al., 2004), *Phytophthora sp.*, *Pythium sp.*, *Fusarium sp.*, *Rhizopus sp.* (Mukerji and Garg, 1988).

Τα ένζυμα έχουν βασικό ρόλο σε αυτή τη σχέση παρασίτου και ξενιστή, διασπώντας την άμυνα και τη δομή του παθογόνου. Έχουν χρησιμοποιηθεί τεχνικές απενεργοποίησης των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεσή των λυτικών αυτών ενζύμων στους παρασιτικούς μικροοργανισμούς ώστε να αποδειχτεί η συνεισφορά τους στη βιολογική αντιμετώπιση (Kobayashi et al., 2002). Τα ένζυμα παρεμβάλλονται στη βιολογική αντιμετώπιση μεταξύ του υπερπαρασιτισμού και αντιβίωσης (Fravel, 1988), με τη γραμμική διαχωρισμού μεταξύ ανταγωνισμού, υπερπαρασιτισμού και αντιβίωσης να μην είναι σε όλες τις περιπτώσεις απόλυτα σαφής.

#### 1.1.6.2.4. Επαγωγή της άμυνας

Τα φυτά έχουν αναπτύξει εξελικτικά διάφορους αμυντικούς μηχανισμούς ώστε να προστατευθούν από τους παθογόνους μικροοργανισμούς και από τις επιβλαβείς περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες εκτίθενται. Οι αμυντικοί μηχανισμοί των φυτών εξελίσσονται παράλληλα με τους μηχανισμούς μόλυσματικότητας των παθογόνων κατά την αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Η αρχική προστασία των φυτών βασίζεται σε μια ποικιλία φυσικών εμποδίων που προϋπάρχουν στο φυτό πολύ πριν την είσοδο του παθογόνου στο φυτό και περιγράφονται ως παθητικοί μηχανισμοί άμυνας. Στην περίπτωση που έχει προκύψει επαφή με το παθογόνο παράγοντα ενεργοποιούνται μηχανισμοί άμυνας του φυτού. Αυτοί οι τοπικού χαρακτήρα αμυντικοί μηχανισμοί συγκροτούν την επίκτητη τοπική ανοχή, οι οποίοι λαμβάνουν χώρα στο σημείο της προσβολής και έχουν ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της νεκρωτικής κηλίδας.

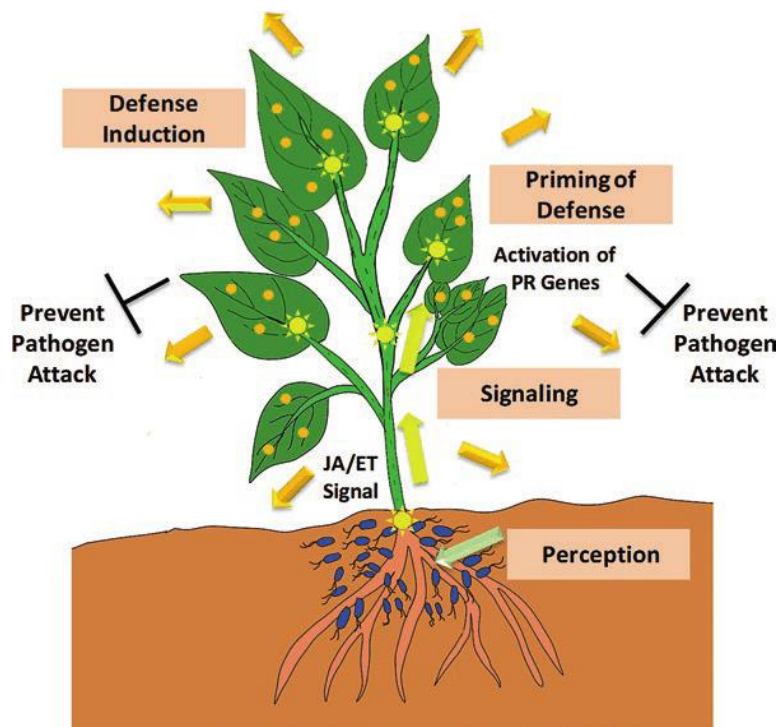
Ορισμένοι βιολογικοί παράγοντες όπως βακτήρια έχουν τη δυνατότητα ενεργοποιήσουν την άμυνα του φυτού, χωρίς να έρθει σε επαφή με το παθογόνο. Η επαγόμενη αυτή άμυνα αναφέρεται ως διασυστηματική καθώς ενεργοποιούνται μηχανισμοί άμυνας σε όλο το φυτό που του επιτρέπουν να έχει αντοχή απέναντι στην ασθένεια (Induced Systemic Resistance, ISR) (Van Loon et al., 1998). Η αντοχή σε κάποια ασθένεια εκδηλώνεται ως καθυστέρηση στην έκφραση των συμπτωμάτων, με μείωση τόσο της έντασης, όσο και της εξέλιξής της. Το παθογόνο δεν καταφέρνει να αναπτύσσεται και να εξαπλώνεται. Η επαγωγή της άμυνας έχει αποδειχθεί αποτελεσματική εναντίον μυκήτων, βακτηρίων και ιών σε αρκετά είδη φυτών, χωρίς να έρχεται απαραίτητα σε επαφή ο βιολογικός παράγοντας με τα παθογόνα, λόγω του διασυστηματικού χαρακτήρα της άμυνας (Somers et al., 2004).

Κατά την ενεργοποίηση της ISR διεγείρονται λανθάνοντες μηχανισμοί άμυνας με αποτέλεσμα σημαντικές βιοχημικές αλλαγές μέσα στο φυτό, αυξάνοντας την αντοχή του φυτού σε ακόλουθη προσβολή μολυσματικών παθογόνων (Ebel and Mithofer, 1998). Για την ενεργοποίηση όλων των λανθανόντων αμυντικών μηχανισμών απαιτείται η σύνθεση ενός ενδογενούς διασυστηματικά μεταφερόμενου σήματος (Mettraux et al., 2002). Το σήμα είναι βιοχημικός ή φυσικο-ηλεκτρικός παράγοντας που παράγεται στο σημείο διέγερσης και μετακινείται διασυστηματικά και ταχύτατα προς όλες τις κατευθύνσεις μέσα στο φυτό. Η αντοχή που αναπτύσσεται με την επαγωγή της διασυστηματικής άμυνας, δεν παρουσιάζει εξειδίκευση αλλά παρέχει ένα ευρύ φάσμα προστασίας (Lugtenberg et al., 2013). Όταν ο βιολογικός παράγοντας διεγείρει την άμυνα, αυτή μπορεί να διατηρηθεί στο φυτό μέχρι και το φυσιολογικό του θάνατό χωρίς να απαιτείται η διαρκής παρουσία του βακτηρίου που την προκάλεσε αρχικά (Van Loon et al., 1998).

Βιοχημικά η επαγωγή της άμυνας από το βακτηριακό διεγέρτη συντελείται μέσω του μονοπατιού του σαλικυλικού οξέος (salicylic acid, SA) (De Meyer and Hofte, 1997), ή του ιασμονικού οξέος (jasmonic acid, JA) και του αιθυλενίου (Pieterse et al., 1998). Στην περίπτωση που τα δύο μονοπάτια επάγονται ταυτόχρονα φαίνεται ότι αυξάνεται η προστασία του φυτού από τους παθογόνους μικροοργανισμούς (Van Wees et al., 2000).

Τα βακτήρια που θα διεγείρουν την άμυνα του φυτού δεν είναι απαραίτητο να αποικίσουν πλήρως το ριζικό σύστημα (Dekkers et al., 2000). Η διέγερση μπορεί να προκληθεί και από μερικό αποικισμό, ακόμα και με στοιχεία του κυτταρικού φακέλου νεκρών βακτηρίων όπως οι λιποπολυσακχαρίτες (Lipopolysaccharides, LPS) που βρίσκονται στην εξωτερική μεμβράνη των βακτηρίων και ιδιαίτερα η αντιγονική αλυσίδα -O του LPS (Audenaert et al., 2002) και κυκλικά λιποπεπτίδια και σιδηροφόρους (Leeman et al., 1996). Στα μαστίγια των βακτηρίων υπάρχει μια πρωτεΐνη που ονομάζεται φλαγγελίνη, την οποία αναγνωρίζει το φυτό και λειτουργεί επίσης ως διεγέρτης. Υπάρχουν αναφορές για διέγερση της άμυνας του φυτού με μόρια σήματα βακτηριακής επικοινωνίας (Schuhegger et al., 2006) και αντιβιοτικές ενώσεις που παράγουν τα βακτήρια όπως το 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) (Maurhofer et al., 1992).

Η ενεργοποίηση της επαγόμενης διασυστηματικής άμυνας προκαλεί σειρά βιοχημικών και φυσιολογικών αλλαγών στο φυτό. Αρχικά συντελούνται δομικές αλλαγές στα κυτταρικά τοιχώματα με την εναπόθεση λιγνίνης (Benhamou et al., 1998) καλλόζης και ακολουθεί συσσώρευση φαινολικών ουσιών σε περίπτωση εισβολής των παθογόνων (M'Piga et al., 1997). Η λιγνίνη συνιστά μηχανικό εμπόδιο για την είσοδο τοξινών των παθογόνων και πρόδρομες ενώσεις της έχουν αντιβιοτικές ιδιότητες. Η αντίδραση της παθητικής αυτής άμυνας, σκοπό έχει να καθυστερήσει την είσοδο του παθογόνου στα κύτταρα, ώστε το φυτό να έχει το χρόνο που απαιτείται για τη δημιουργία ενεργητικών αντιδράσεων άμυνας (Singh, 2013). Οι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται περιλαμβάνουν τις PR πρωτεΐνες (pathogenesis related proteins) (Benhamou et al., 1996), τις φυτοαλεξίνες (Van Peer et al., 1991) και διάφορους άλλους παράγοντες, όπως υπεροξυδάσες και ένζυμα κ.α. (Ramamoorthy et al., 2001). Η παραγωγή των πρωτεϊνών παθογένεσης συντελείται στο σημείο μόλυνσης αλλά και διασυστηματικά. Παράγονται τόσο σε συμβατές όσο και σε ασύμβατες αλληλεπιδράσεις παθογόνου – ξενιστή, αλλά και σε περιπτώσεις βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων. Οι φυτοαλεξίνες είναι αντιμικροβιακές λιπόφιλες ενώσεις μικρού μοριακού βάρους που αρχικά εντοπίζονται στο σημείο προσβολής και συντίθενται σε όλα τα όργανα και τους ιστούς σε μυκητολογικές και βακτηριολογικές προσβολές. Το φυτό επίσης για να περιορίσει τη μόλυνση σε ένα συγκεκριμένο σημείο προβαίνει σε αντίδραση υπερευαισθησίας (Hypersensitive Response, HR). Πρόκειται για προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο ως αποτέλεσμα επιχειρούμενης μόλυνσης από μύκητες, βακτήρια, ιούς.



Εικόνα 11: Ο μηχανισμός της επαγόμενης διασυστηματικής άμυνας (ISR)

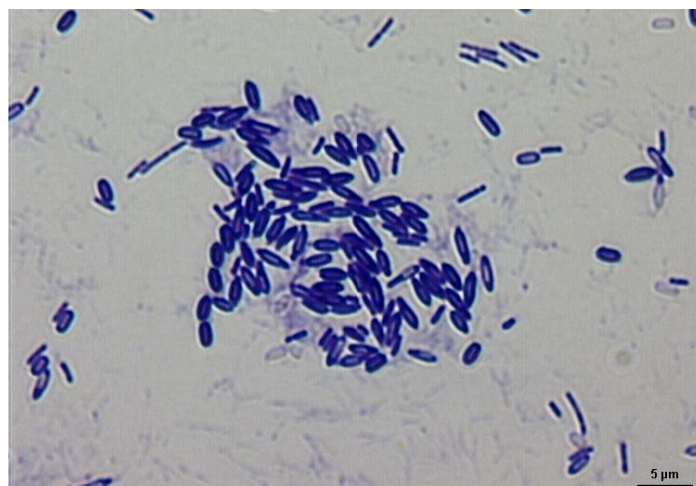
Σημαντικός παράγοντας για την επαγωγή της άμυνας αποτελεί η ταχύτητα αναγνώρισης του παθογόνου ή του παράγοντα καταπόνησης από το φυτό. Από αυτό θα εξαρτηθεί η έγκαιρη ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας που είναι κομβικής σημασίας για την επιτυχή αντίσταση του φυτού (Van Loon, 1997). Η διαδικασία της αναγνώρισης παρουσιάζει υψηλό βαθμό εξειδίκευσης. Τα φυτά μάλιστα έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν υποείδη ή φυλές των παθογόνων μικροοργανισμών. Επειδή οι αμυντικοί μηχανισμοί συχνά ενεργοποιούνται καθυστερημένα μετά τη μόλυνση και έχει ήδη εξαπλωθεί το παθογόνο σε διάφορους ιστούς, σημαντική είναι η παρουσία κάποιου διεγέρτη που θα ενεργοποιήσει από πριν την άμυνα του φυτού, ώστε να αποτραπεί η ασθένεια ή να μειωθεί σε μεγάλο βαθμό η έντασή της.

### 1.1.7. Μικροοργανισμοί με δυνατότητες αντιμετώπισης του *Verticillium dahliae*

#### 1.1.7.1. Το βακτήριο *Bacillus velezensis*

Τα βακτήρια του είδους *Bacillus velezensis* ανήκουν στην οικογένεια Bacillaceae, είναι ριζοσφαιρικά, εντοπίζονται στα ακρορρίζια του φυτού αλλά και ενδοφυτικά. Η παραμονή τους στο αγγειακό σύστημα των φυτών τους δίνει τη δυνατότητα να ανταγωνίζονται αποτελεσματικότερα τα παθογόνα (Wulff et al., 2002). Τα ενδοφυτικά βακτήρια αποικίζουν παρόμοιες θέσεις με τους παθογόνους μικροοργανισμούς που προσβάλλουν τα αγγεία του ξύλου. Η ενδοφυτική συνθήκη είναι ευνοϊκή για τον ανταγωνισμό, αλλά και για την προώθηση της ανάπτυξης των φυτών (Dhouib et al., 2019). Επίσης τα βακτήρια διαθέτουν μεγαλύτερη ικανότητα να επάγουν την άμυνα των φυτών συγκριτικά με στελέχη που εντοπίζονται αποκλειστικά στη ριζόσφαιρα.

Το είδος *Bacillus velezensis* αποτελείται από προαιρετικά αναερόβια βακτήρια, θετικά στη χρώση Gram, ραβδόμορφα με μήκος 2-5 μm, διάμετρο 0,5- 0,8 μm και σχηματίζουν μακριές αλυσίδες και ενδοσπόρια (Ash et al., 1993). Τα βακτήρια που σχηματίζουν ενδοσπόρια έχουν πιο μεγάλη ικανότητα προσαρμογής και είναι ανθεκτικά σε αντίξοες συνθήκες (Szczech and Shoda, 2006).



Εικόνα 12: *Bacillus velezensis*

Πίνακας 3: Συστηματική κατάταξη του είδους *Bacillus velezensis*

Βασίλειο	Bacteria
Φύλο	Firmicutes
Κλάση	Bacilli
Τάξη	Bacillales
Οικογένεια	Bacillaceae
Γένος	<i>Bacillus</i>
Είδος	<i>velezensis</i>

Τα βακτήρια του γένους *Bacillus* παρουσιάζουν εξαιρετικές ιδιότητες αποικισμού λόγω της ταχείας ανάπτυξής τους (Dimkic et al., 2022). Παράγουν ουσίες με δράση ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς. Συνθέτουν ένζυμα όπως η χιτινάση και η γλουκανάση (Ji and Kuc, 1996), φαινολικές ενώσεις (Lebuhn et al., 1997) και τοξίνες με μυκητοκτόνο δράση. Επίσης μπορούν να δράσουν ως προωθητές της ανάπτυξης των φυτών μέσω της βιοσύνθεσης αυξινών, κυτοκινινών, αμπισισικού οξέος και άλλων φυτοδιεγερτικών ουσιών (Araujo et al., 2005).

Η φυτοπροστατευτική δράση του βακτηρίου *Bacillus velezensis* έγκειται επίσης στην ικανότητα επαγωγής της διασυστηματικής άμυνας των φυτών. Έχει αναφερθεί η συμβολή του στην αντιμετώπιση του φυτοπαθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae* μέσω του μεταβολικού μονοπατιού της ISR (Tjamos et al., 2005). Έρευνες αναφέρουν ότι η

προστασία που παρέχει το στέλεχος *Bacillus velezensis* K165 εναντίον του *V. dahliae* διατηρείται και στους απογόνους του φυτού (Gkizi et al., 2021). Το στέλεχος K165 φαίνεται επίσης να μειώνει τη βλαστική ικανότητα των μικροσκληρωτίων του μύκητα (Antonopoulos et al., 2008). Εκτός από τις φυτοπροστατευτικές του ιδιότητες, γνωστή είναι η συμβολή του βακτηριακού στελέχους στην επιτάχυνση του ρυθμού ανάπτυξης φυτών της οικογένειας Solanaceae (Tjamos et al., 2005).

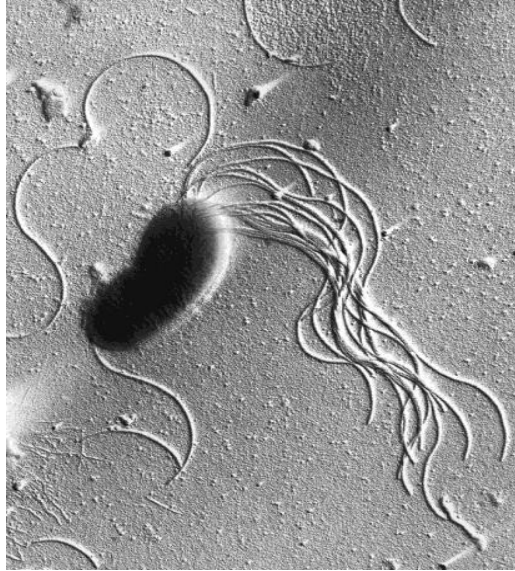
### 1.1.7.2. Το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens*

Στο γένος *Pseudomonas* περιλαμβάνονται είδη που ανήκουν στην οικογένεια Pseudomonadaceae. Είναι προαιρετικά ή υποχρεωτικά αναερόβια βακτήρια, αρνητικά κατά Gram και έχουν ραβδοειδές σχήμα (Santoyo et al., 2012). Διαθέτουν ένα ή περισσότερα μαστίγια (Harrigan, 1998) και δε σχηματίζουν σπόρια.

Πίνακας 4: Συστηματική κατάταξη του είδους *Pseudomonas fluorescens*

Βασίλειο	Bacteria
Φύλο	Proteobacteria
Κλάση	Gammaproteobacteria
Τάξη	Pseudomonadales
Οικογένεια	Pseudomonadaceae
Γένος	<i>Pseudomonas</i>
Είδος	<i>fluorescens</i>

Το είδος *Pseudomonas fluorescens* είναι φθορίζουσα ψευδομονάδα και παράγει χρωστικές ουσίες που φθορίζουν όταν διεγείρονται στην υπεριώδη ακτινοβολία (Harrigan, 1998). Κάποιες χρωστικές θεωρούνται υπεύθυνες για την παραγωγή σιδηροφόρων και πιθανώς αυτός είναι ο λόγος που τα βακτήρια αναπτύσσονται πολύ γρήγορα στο ριζικό σύστημα και έχουν μεγαλύτερο πλεονέκτημα στον αποικισμό του φυτού συγκριτικά με ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς. Επίσης έχουν τη δυνατότητα να αναπτύσσονται σε διάφορα υποστρώματα ώστε να αντλούν τις αναγκαίες πηγές θρεπτικών στοιχείων και επιβιώνουν σε συνθήκες οι οποίες θεωρούνται περιβάλλον καταπόνησης για πολλά βακτήρια (Santoyo et al., 2012). Μάλιστα τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν ενώσεις που είναι αρκετά τοξικές σε άλλους οργανισμούς, στις οποίες περιλαμβάνονται αλειφατικοί και αρωματικοί υδρογονάνθρακες, λιπαρά οξέα κ.α.



Εικόνα 13: *Pseudomonas fluorescens*

Σημαντικό ρόλο στη βιολογική αντιμετώπιση των παθογόνων έχει η παραγωγή αντιβιοτικών ενώσεων από το βακτήριο, όπως φεναζίνη-1-καρβοξυαμίδη (PCN), φεναζίνη-1-καρβοξυλικό οξύ (PCA), 2, 4 – διακέτυλφλορογλυσινόλη (DAPG), πυρολνιτρίνη, πυολουτεορίνη και ωμουκίνη (Meena, 2014). Το *Pseudomonas fluorescens* παράγει επίσης λυτικά ένζυμα, όπως χιτινάσες και πρωτεάσες για την αποδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος των παθογόνων μικροοργανισμών.

Τα βακτήρια αυτού του είδους είναι αποτελεσματικοί ως βιολογικοί παράγοντες για την αντιμετώπιση των ασθενειών, καθώς διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα μηχανισμών για την προστασία των φυτών. Έχουν τη δυνατότητα επίσης να επάγουν τη διασυστηματική άμυνα (Han et al., 2006). Δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν σε μη μολυσμένα φυτά, αναφέρουν τη συνεισφορά του βακτηρίου στην προώθηση της ανάπτυξης πολλών φυτικών ειδών (Adhikari et al., 2001).

## 1.2. Σκοπός της μελέτης

Οι προσβολές που προκαλούνται στα φυτά από τη βερτισιλλίωση είναι συχνές και σοβαρές. Βασικό πρόβλημα στην αντιμετώπιση του μύκητα αποτελούν ο παρασιτισμός των αγγείων του ξύλου και η αδυναμία αποτελεσματικής χημικής καταπολέμησης του. Τα ανταγωνιστικά βακτήρια που αναπτύσσονται στη ριζόσφαιρα έχουν σημαντικό ρόλο στην προστασία του φυτού από τους εδαφογενείς παθογόνους μικροοργανισμούς και μπορούν να αποτελέσουν κεντρικό εργαλείο για την αντιμετώπισή τους.



Ο χρόνος εφαρμογής των βιολογικών παραγόντων δεν έχει μελετηθεί διεξοδικά, ωστόσο αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την εξασφάλιση της μέγιστης αποτελεσματικότητάς τους εναντίον των παθογόνων. Στην παρούσα εργασία εξετάζεται η επίδραση του χρόνου εφαρμογής στην δράση των βιολογικών παραγόντων *Bacillus velezensis* K165 και *Pseudomonas fluorescens* B6, εναντίον του μύκητα *Verticillium dahliae*.

Στο ριζικό σύστημα φυτών μελιτζάνας εφαρμόστηκαν τα βακτηριακά στελέχη στις επτά ημέρες πριν την εφαρμογή του μύκητα *V. dahliae*, ταυτόχρονα με το μύκητα *V. dahliae* και μία ημέρα μετά την εφαρμογή του μύκητα *V. dahliae*.

Ελέγχεται η ένταση της ασθένειας, το ποσοστό ασθενών φύλλων και η έκφραση γονιδίων παθογένεσης στα φυτά, στις διαφορετικές χρονικές επεμβάσεις. Διερευνώνται οι μηχανισμοί δράσης των βιολογικών παραγόντων και η ικανότητα επαγωγής της διασυστηματικής άμυνας των φυτών.

## 2. Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1. Παρασκευή θρεπτικών υλικών ανάπτυξης μικροοργανισμών

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε εργαστηριακές συνθήκες πραγματοποιήθηκε σε κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα. Η αρχική ανάπτυξη τόσο του φυτοπαθογόνου μύκητα, όσο και των ανταγωνιστικών βακτηρίων συντελέστηκε σε θρεπτικό υλικό στέρεας μορφής. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα εκχύλισματος πατάτας με δεξτρόζη και άγαρ (Potato Dextrose Agar, P.D.A.)

Για την παρασκευή του θρεπτικού υλικού P.D.A. χρησιμοποιήθηκε κωνική φιάλη ενός λίτρου με 500ml απεσταγμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O) στο οποίο προστέθηκαν 200g πατάτα καθαρισμένη και τεμαχισμένη και ακολούθησε βρασμός για 45 λεπτά. Ακολούθησε διήθηση του περιεχομένου της κωνικής χρησιμοποιώντας υφασμάτινο πλέγμα για να διαχωριστεί το υγρό εκχύλισμα από τα στέρεα τεμαχίδια. Προστέθηκε 20g δεξτρόζη και συμπληρώθηκε με απεσταγμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O) σε ογκομετρικό κύλινδρο μέχρι να φτάσει τα 1000ml. Τέλος προστέθηκαν 20g άγαρ, αναδεύτηκε το διάλυμα για ομογενοποίηση και τοποθετήθηκε σε κλίβανο αποστείρωσης στους 121°C υπό πίεση 1,2 atm για 20 λεπτά.

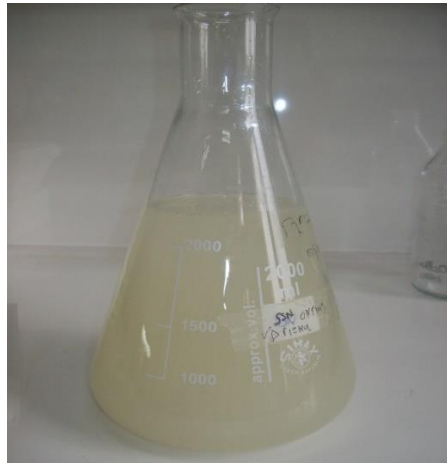


Εικόνα 14: Τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα P.D.A.

Για τη δημιουργία του μικροβιακού μολύσματος ώστε να πραγματοποιηθεί εμβολιασμός στα φυτά στο θερμοκήπιο, απαιτήθηκε η παρασκευή τεχνητών θρεπτικών υλικών σε υγρή μορφή. Για την εφαρμογή του μύκητα *Verticillium dahliae* στα φυτά μελιτζάνας χρησιμοποιήθηκε το υγρό τεχνητό θρεπτικό διάλυμα Σουκρόζης και Νιτρικού Νατρίου (Sucrose Sodium Nitrate, S.S.N.). Ενώ για την εφαρμογή των βακτηριακών στελεχών

*Bacillus velezensis* K165 και *Pseudomonas fluorescens* B6 χρησιμοποιήθηκε το υγρό τεχνητό θρεπτικό διάλυμα Nutrient Broth with Glycerol (N.G.).

Για την παρασκευή του υγρού θρεπτικού υποστρώματος διάλυμα Σουκρόζης και Νιτρικού Νατρίου (Sucrose Sodium Nitrate, S.S.N.) χρησιμοποιήθηκε κωνική φιάλη δύο λίτρων στην οποία προστέθηκαν 1 λίτρο απεσταγμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O), 15g σακχαρόζης (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>), 1g δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 2g νιτρικού νατρίου (NaNO<sub>3</sub>), 0,5g χλωριούχου καλίου (KCL), 0,5g ένυδρου θεικού μαγνησίου (MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O) και 1ml διαλύματος ιχνοστοιχείων (Trace element solution). Το υγρό διάλυμα αναδεύτηκε για ομογενοποίηση και τοποθετήθηκε σε κλίβανο αποστείρωσης στους 121°C υπό πίεση 1,2 atm για 20 λεπτά.



Εικόνα 15: Δοχείο με θρεπτικό διάλυμα S.S.N.

Πίνακας 5: Σύνθεση του υγρού θρεπτικού διαλύματος Σουκρόζης και Νιτρικού Νατρίου (Sucrose Sodium Nitrate, SSN)

Απεσταγμένο νερό (ddH <sub>2</sub> O)	1 L
Σακχαρόζη (C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> )	15.0 g
Δισόξινο Φωσφορικό Κάλιο (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.0 g
Νιτρικό Νάτριο (NaNO <sub>3</sub> )	2.0 g
Χλωριούχο Κάλιο (KCl)	0.5 g
Ένυδρο θειικό μαγνήσιο (MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O)	0,5 g
Διάλυμα Ιχνοστοιχείων	1.0 ml

Αναλυτικότερα το διάλυμα ιχνοστοιχείων (Trace element solution), αποτελούταν από 100ml απεσταγμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O), 249mg ένυδρου θεικού σιδήρου (FeSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O), 40mg ένυδρου θεικού χαλκού (CuSO<sub>4</sub>5H<sub>2</sub>O), 44mg ένυδρου θεικού ψευδαργύρου (ZnSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O), 41mg ένυδρου θεικού μαγγανίου (MnSO<sub>4</sub>4H<sub>2</sub>O) και 51mg ένυδρου μολυβδαινικού νατρίου (NaMoO<sub>4</sub>2H<sub>2</sub>O). Ύστερα από την τοποθέτηση σε κλίβανο αποστείρωσης, το διάλυμα ιχνοστοιχείων (Trace element solution), διατηρείται στους 4°C για περαιτέρω χρήση.

Πίνακας 6: Σύνθεση του Διαλύματος Ιχνοστοιχείων

Απεσταγμένο νερό (ddH <sub>2</sub> O)	100 mL
Ένυδρος Θεικός Σίδηρος (FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O)	249 mg
Ένυδρος Θεικός Χαλκός (CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O)	40 mg
Ένυδρος Θεικός Ψευδάργυρος (ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O)	44 mg
Ένυδρο Θεικό Μαγγάνιο (MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O)	41 mg
Ένυδρο Μολυβδαινικό Νάτριο (NaMoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O)	51 mg

Για την Παρασκευή του υγρού θρεπτικού υποστρώματος Nutrient Glycerol (N.G.) χρησιμοποιήθηκε κωνική φιάλη δύο λίτρων στην οποία προστέθηκαν ένα λίτρο απεσταγμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O), 13g Nutrient Broth και 20g γλυκερόλης (Glycerol). Αφού τοποθετήθηκαν τα συστατικά το υγρό διάλυμα αναδεύτηκε μέχρι πλήρους διάλυσης και τοποθετήθηκε σε κλίβανο αποστείρωσης στους 121°C υπό πίεση 1,2 atm για 20 λεπτά.



Εικόνες 16, 17: Παρασκευή θρεπτικού διαλύματος Nutrient Broth with Glycerol

Πίνακας 7: Συστατικά του υγρού θρεπτικού υλικού Nutrient Broth with Glycerol (N.G.)

Απεσταγμένο νερό (ddH <sub>2</sub> O)	1 L
Nutrient Broth	13 g
Γλυκερόλη	20 g

## 2.2. Προετοιμασία του μύκητα *Verticillium dahliae*

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν στη πειραματική διαδικασία διατέθηκαν από τη συλλογή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Οι απομονώσεις του μύκητα *Verticillium dahliae* έχουν διατηρηθεί ως αιώρημα κονιδίων σε σωλήνες Eppendorf σε υδατικό διάλυμα γλυκερόλης 25% στους -80 °C.

Αρχικά ο μύκητας μεταφέρθηκε ασηπτικά στο θάλαμο σταθερής νηματικής ροής σε τρυβλία Petri διαμέτρου 9cm με θρεπτικό διάλυμα εκχυλίσματος πατάτας (P.D.A.) και αναπτύχθηκε για 2 ημέρες σε σκοτεινό επωαστικό θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 28°C. Από την καλλιέργεια διατήρησης σε τρυβλία Petri με το στερεό υπόστρωμα P.D.A., ο μύκητας μεταφέρθηκε σε φιάλες χωρητικότητας 250 ml που περιείχαν 100 ml με το υγρό θρεπτικό διάλυμα S.S.N. Στη συνέχεια οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε περιστροφικό επωαστικό θάλαμο στους 25°C, στις 180 r.p.m. για 5 ημέρες, για την ανάπτυξη αιωρήματος κονιδίων του μύκητα. Ακολούθησε ο προσδιορισμός της πυκνότητας του μολύσματος στο υδατικό αιώρημα με τη χρήση αιματοκυτταρόμετρου και μικροσκοπίου. Ο υπολογισμός της τελικής συγκέντρωσης έγινε με βάση τον τύπο  $C_1V_1 = C_2V_2$ . Κατά αυτόν τον τρόπο η συγκέντρωση του *Verticillium dahliae* που χρησιμοποιήθηκε στο υπόστρωμα ανάπτυξης για τη μόλυνση των φυτών ήταν  $10^7$  κονίδια/ml.

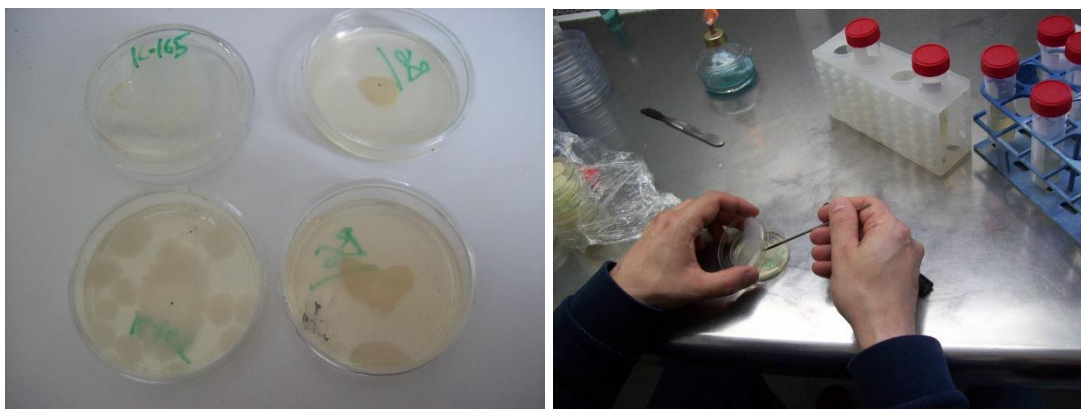


Εικόνα 18: Το μόλυσμα με το *V. dahliae* μετά την επώασή του

### 2.3. Προετοιμασία των βακτηρίων *Bacillus velezensis* K165 και *Pseudomonas fluorescens* B6

Το στέλεχος *Bacillus velezensis* K165, έχει απομονωθεί το 2004 από τα ακρορρίζια φυτών τομάτας, που καλλιεργήθηκαν σε ηλιοαπολυμασμένο έδαφος (Tjamos et al., 2004). Το γεγονός ότι το ριζοβακτήριο απομονώθηκε από την ενδοριζόσφαιρα ακρορριζίων είναι σημαντικό, διότι υποδηλώνει ότι είναι καλά προσαρμοσμένο στην εν λόγω περιοχή, η οποία αποτελεί τον πιο δεκτικό ιστό του φυτού για την είσοδο του παθογόνου. Το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens* B6, διατέθηκε επίσης από τη συλλογή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Οι απομονώσεις των βακτηριακών στελεχών έχουν διατηρηθεί ως αιώρημα κυττάρων σε σωλήνες Eppendorf σε υδατικό διάλυμα γλυκερόλης 25% στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Πραγματοποιήθηκε μεταφορά των βακτηρίων με την μέθοδο της γραμμικής διασποράς, υπό ασηπτικές συνθήκες στο θάλαμο σταθερής νηματικής ροής, σε τρυβλία Petri διαμέτρου 9cm με θρεπτικό διάλυμα εκχυλίσματος πατάτας (P.D.A). Η βακτηριακή αποικία αναπτύχθηκε για 2 ημέρες σε σκοτεινό επωαστικό θάλαμο με σταθερή θερμοκρασία  $28^{\circ}\text{C}$ . Ακολούθησε η λήψη βακτηριακών κυττάρων από την περιφέρεια αναπτυσσόμενης νεαρής αποικίας, με τη χρήση μυκητολογικού κρίκου διαμέτρου 4mm και η μεταφορά τους σε δοχεία falcon με θρεπτικό διάλυμα NG (Nutrient Broth Glycerol). Στη συνέχεια τα δοχεία τοποθετήθηκαν σε περιστροφικό επωαστικό θάλαμο στους  $25^{\circ}\text{C}$ , στις 180 r.p.m. για 2 ημέρες. Η τελική συγκέντρωση του υδατικού αιωρήματος βακτηριακών κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε στο υπόστρωμα ανάπτυξης για τον εμβολιασμό των φυτών ήταν  $10^8\text{cfu/ml}$ .



Εικόνες 19, 20: Βακτηριακή αποικία σε P.D.A. και μεταφορά σε δοχεία με NG

## 2.4. Φυτικό υλικό

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων παθογένειας, χρησιμοποιήθηκαν φυτά μελιτζάνας *Solanum melongena* της ποικιλίας Black Beauty. Η συγκεκριμένη ποικιλία επιλέχτηκε για τους σκοπούς του πειράματος, διότι είναι ευαίσθητη στη βερτισιλλίωση (Pegg, 1974) και τα συμπτώματα της ασθένειας γίνονται εμφανή στο φύλλωμά της. Οι σπόροι για τους σκοπούς αποθήκευσης διατηρήθηκαν στους 4°C. Κατά τη χρησιμοποίησή τους φυτεύτηκαν απευθείας σε γλαστράκια διαμέτρου 15 cm, περιεκτικότητας χώματος περίπου 300 cm<sup>3</sup>. Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε συνολικά περιλάμβανε 280 φυτά μελιτζάνας.

## 2.5. Δοκιμές παθογένειας

Η πειραματική διαδικασία διεξήχθη το 2022 στο πειραματικό θερμοκήπιο του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Μελετήθηκε η επίδραση του χρόνου εφαρμογής των ανταγωνιστικών βακτηρίων σε φυτά μελιτζάνας για την αντιμετώπιση της βερτισιλλίωσης. Στο πείραμα εφαρμόστηκε σχέδιο τυχαιοποιημένων πλήρων ομάδων. Στην κάθε επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν 20 φυτά.

Πίνακας 8: Τα πειραματικά τεμάχια όπως ορίστηκαν για τις ανάγκες του πειράματος

Επέμβαση μόνο με <i>V. dahliae</i>	Vd
Καμία επέμβαση στα φυτά	Mock
<i>B. velezensis</i> K165 επτά ημέρες πριν την εφαρμογή <i>V. dahliae</i>	K165 (-7d)
<i>B. velezensis</i> K165 την ίδια ημέρα με την εφαρμογή <i>V. dahliae</i>	K165 (0d)
<i>B. velezensis</i> K165 μία ημέρα μετά την εφαρμογή <i>V. dahliae</i>	K165 (1d)
<i>P. fluorescens</i> B6 επτά ημέρες πριν την εφαρμογή <i>V. dahliae</i>	B6 (-7d)
<i>P. fluorescens</i> B6 την ίδια ημέρα με την εφαρμογή <i>V. dahliae</i>	B6 (0d)
<i>P. fluorescens</i> B6 μία ημέρα μετά την εφαρμογή <i>V. dahliae</i>	B6 (1d)



Εικόνες 21, 22: Φυτάρια μελιτζάνας μετά τη σπορά και στο στάδιο των 2 πραγματικών φύλλων

Οι επεμβάσεις με τους μικροοργανισμούς εφαρμόστηκαν υπό πίεση με τη χρήση σύριγγας στο ριζικό σύστημα των φυτών, στο στάδιο των δύο πραγματικών φύλλων. Η κάθε επέμβαση περιείχε 10 ml αιωρήματος των μολυσμάτων. Η θερμοκρασία στο χώρο του θερμοκηπίου που αναπτύχθηκαν τα φυτά ήταν  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .





Εικόνα 23: Εμβολιασμός φυτών με μικροοργανισμούς

## 2.6. Καταγραφή των συμπτωμάτων της ασθένειας

Η καταγραφή των συμπτωμάτων της ασθένειας στα φυτά μελιτζάνας περιλάμβανε την καταμέτρηση του ποσοστού ασθενών φύλλων του φυτού, με συμπτώματα μάρανσης χλώρωσης και νέκρωσης προς το σύνολο των πλήρως σχηματισθέντων φύλλων. Η καταγραφή των συμπτωμάτων της βερτισιλλίωσης λάμβανε χώρα ανά χρονικό διάστημα δύο ημερών και άρχισε με την εκδήλωση των πρώτων συμπτωμάτων της ασθένειας 7 ημέρες μετά τη μόλυνση.



Εικόνες 24, 25: Συμπτώματα μάρανσης και χλώρωσης από *Verticillium dahliae*

## 2.7. Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων

Τα δείγματα ελήφθησαν 2 και 7 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα *Verticillium dahliae* (2 and 7 dpi - days post inoculation). Το κάθε δείγμα αποτελούταν από πέντε φυτά ανά εφαρμογή. Πραγματοποιήθηκε συλλογή ιστού του υπέργειου τμήματος των φυτών και εμβαπτίστηκε απευθείας σε υγρό άζωτο, ώστε να αποφευχθεί η αλλοίωση των μεταγραφημάτων των κυττάρων. Με την ολοκλήρωση της συλλογής τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

## 2.8. Προσδιορισμός των επίπεδων έκφρασης των γονιδίων PR1 και PR4

Για να διαπιστωθεί αν η προστασία των φυτών που είχαν μολυνθεί από τον μύκητα *Verticillium dahliae* οφείλεται στην επαγωγή των αμυντικών μηχανισμών από το βιολογικό παράγοντα για κάθε χρονική επέμβαση, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων PR1 και PR4 με τη χρήση της μεθόδου real time-PCR. Τα γονίδια αυτά έχουν ρόλο στην άμυνα των φυτών. Η έκφραση του γονιδίου PR1 είναι δείκτης ενεργοποίησης του μονοπατιού του σαλικυλικού οξέος (Fatouros et al., 2018) Η εφαρμογή των βιολογικών παραγόντων, όπως και η μόλυνση με το μύκητα επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων.

Στις αλληλεπιδράσεις φυτό-παθογόνο έχει παρατηρηθεί η σύνθεση πρωτεϊνών που ονομάστηκαν πρωτεΐνες παθογένεσης (pathogenesis related proteins, PRs). Έχει διαπιστωθεί ότι ο σχηματισμός αυτών των πρωτεϊνών επάγεται διασυστηματικά στο φυτό και όχι μόνο τοπικά στο σημείο μόλυνσης, με σκοπό τον περιορισμό της εξάπλωσης του παθογόνου.

Οι πρωτεΐνες παθογένεσης είναι κυρίως όξινης μορφής και εκκρίνονται στους μεσοκυττάρους χώρους. Οι βασικής μορφής πρωτεΐνες συναντώνται σε χαμηλή συγκέντρωση στα χυμοτόπια. Η έκφραση τους εξαρτάται από το είδος του ιστού, το αναπτυξιακό στάδιο, τους μικροοργανισμούς και την αβιοτική καταπόνηση (Gkizi et al., 2021). Έχει προταθεί ότι οι πρωτεΐνες παθογένεσης που συναντώνται στους μεσοκυττάρους χώρους σχηματίζουν την πρώτη γραμμή άμυνας εναντίον των παθογόνων. Εάν αυτή η γραμμή άμυνας διαρρηχθεί τότε απελευθερώνονται οι πρωτεΐνες παθογένεσης των χυμοτοπίων (Kitajima and Sato, 1999).

Οι PR1 πρωτεΐνες συγκεντρώνονται σε υψηλά επίπεδα στα φυτά μετά τη μόλυνση τους από ένα παθογόνο μικροοργανισμό έχουν μοριακό βάρος 15-17 kDa. Οι PR4 πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα δέσμευσης της χιτίνης και ανήκουν στην οικογένεια των χιτινοδεσμευτικών λεκτινών, με ευρύ φάσμα μυκητοκτόνου δράσης. Το μοριακό τους βάρος είναι 13-14,5 kDa.

Η ακτίνη είναι η πλέον άφθονη πρωτεΐνη στα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα. Είναι πολύ συντηρημένο μόριο και αποτελεί κρίσιμο παράγοντα σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες, που κυμαίνονται από την κυτταρική κινητικότητα και τη διατήρηση του κυτταρικού σχήματος, έως της πολικότητας στη ρύθμιση της μεταγραφής. Για τη διαδικασία της RT-PCR χρησιμοποιήθηκε σαν σταθερά για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των PR1 και PR4 πρωτεϊνών.

Για τους σκοπούς του πειράματος απομονώθηκε το ολικό RNA από τα φυτά των εφαρμογών και χρησιμοποιήθηκε για να υπολογιστούν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων με τη μέθοδο Real time PCR. Ακολουθήθηκαν οι παρακάτω διαδικασίες.

### 2.8.1. Απομόνωση RNA

- Τα δείγματα του φυτικού ιστού που συλλέχτηκαν κονιορτοποιήθηκαν σε πορσελάνινο γουδί με υγρό άζωτο και τοποθετήθηκαν 80-100 mg από κάθε επέμβαση σε σωληνάριο τύπου Eppendorf χωρητικότητας 1,5 ml



Εικόνα 26: Κονιορτοποίηση φυτικού ιστού με τη χρήση αζώτου

- Προσθήκη 300 μl διαλύματος λύσης κυττάρων (cell lysis solution)

Πίνακας 9: Παρασκευή 10 ml διαλύματος λύσης κυττάρων (cell lysis solution)

Διάλυμα	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
10% SDS	2 ml	2%
0,5 M κιτρικό νάτριο (sodium citrate)	1,36 ml	68 mM
1 M κιτρικό οξύ (citric acid)	1,32 ml	132 mM
0,5 M EDTA	20 μl	1 mM

Το pH του διαλύματος πρέπει να είναι όξινο για την απενεργοποίηση των ενζύμων που καταστρέφουν το RNA. Μετά την ανάμειξη όλων των συστατικών το τελικό διάλυμα αποστειρώνεται σε κλίβανο στους 121°C υπό πίεση 1,2 atm για 20 λεπτά.

- Έντονη ανάμειξη με τη χρήση vortex για 20 sec και ανάμειξη με αναστροφή των σωληνάρων τύπου Eppendorf



Εικόνα 27: Vortex για την ανάμειξη του φυτικού ιστού με το διάλυμα λύσης κυττάρων

- Επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου σε συνεχή αναστροφή για καλύτερη ανάμειξη
- Προσθήκη 100 μl διαλύματος καθίζησης πρωτεϊνών και DNA (protein– DNA precipitation solution), το οποίο είχε προψυχθεί σε πάγο

Πίνακας 10: Παρασκευή 10 ml διαλύματος καθίζησης πρωτεϊνών και DNA (protein– DNA precipitation solution)

Διάλυμα	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
5M NaCl	8 ml	4 M
0,5 M κιτρικό νάτριο (sodium citrate)	320 μl	16 mM
1 M κιτρικό οξύ (citric acid)	320 μl	32 mM

Μετά την ανάμειξη όλων των συστατικών το τελικό διάλυμα αποστειρώνεται σε κλίβανο στους 121°C υπό πίεση 1,2 atm για 20 λεπτά.

- Ελαφριά ανάμειξη χτυπώντας και αναστρέφοντας τα σωληνάρια τύπου Eppendorf
- Επώαση για 10 min σε θερμοκρασία 4°C
- Φυγοκέντρηση για 15 min στις 14.000 rpm, σε θερμοκρασία 4°C



Εικόνα 28: Φυγόκεντρος με ψύξη

- Μεταφορά υπερκείμενου, περίπου 300 μl, σε καινούριο σωληνάριο τύπου Eppendorf αποφεύγοντας την ενδιάμεση φάση. Αν υπάρχουν υπολείμματα ιστών στο υπερκείμενο, η διαδικασία επαναλαμβάνεται.
- Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης, περίπου 300 μl, για κατακρήμνιση του RNA και ελαφριά ανάδευση με αναστροφή για ομογενοποίηση
- Επώαση 10 min σε θερμοκρασία 4°C
- Φυγοκέντρηση για 5 min στις 14.000 rpm, σε θερμοκρασία 4°C
- Απομάκρυνση υπερκείμενου
- Προσθήκη 300 μl αιθανόλης 70% για καθαρισμό του ιζήματος



Εικόνα 29: Δείγματα και αντιδραστήρια τοποθετημένα σε πάγο κατά τη διαδικασία

- Φυγοκέντρηση για 5 min στις 14.000 rpm, σε θερμοκρασία 4°C
  - Απομάκρυνση υπερκείμενου
  - Στέγνωμα του ιζήματος (σχηματισμός pellet)
  - Επαναιώρηση του ιζήματος σε 25 μl αποστειρωμένο δισαπασταγμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O) και ανάμειξη μέχρι να διαλυθεί το ίζημα
  - Φυγοκέντρηση για 10 sec στις 14.000 rpm, σε θερμοκρασία 4°C
- (Τροποποίηση του πρωτοκόλλου των Onate-Sanchez and Vicente-Carbajosa, 2008)

### 2.8.2. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης RNA

Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας απομόνωσης του ολικού RNA, πραγματοποιείται εκτίμηση της ποιότητας του απομονωμένου υλικού και υπολογισμός της συγκέντρωσής του, ώστε να χρησιμοποιηθεί στις αντιδράσεις που ακολουθούν. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση φασματοφωτόμετρου Nanodrop.

Η απορρόφηση στο 260 nm μετράει τη συγκέντρωσή του RNA και η απορρόφηση στα 280 nm μετράει τις δευτερεύουσες ουσίες που απομονώθηκαν μαζί με το RNA, όπως οι πρωτεΐνες. Ο λόγος 260nm προς 280nm αποτελεί δείκτης μέτρησης της καθαρότητας του δείγματος RNA. Αφού ολοκληρώθηκε αυτή η διαδικασία τα δείγματα αραιώθηκαν με

αποστειρωμένο δισαπεσταγμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O), ώστε η τελική συγκέντρωση του RNA μετά την προσθήκη των αντιδραστηρίων να είναι σε όλα τα δείγματα 500 ng/10 μl.



Εικόνα 30: Φασματοφωτόμετρο Nanodrop

### 2.8.3. Καταστροφή υπολειμμάτων DNA

Προκειμένου να καταστραφούν τα εναπομείναντα μόρια DNA πραγματοποιήθηκε χειρισμός του RNA με το ένζυμο δεοξυριβοζονουκλεάση. Ακολούθηθηκε η εξής διαδικασία:

- Σε κάθε δείγμα προστέθηκε 1 μl DNase I
- Τοποθέτηση των δειγμάτων για επώαση σε θερμοκρασία 37°C για 15 min
- Προσθήκη 1 μl EDTA σε κάθε δείγμα
- Τοποθέτηση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο για επώαση στους 65°C για 10 min προκειμένου να απενεργοποιηθεί η DNase I



Εικόνα 31: Υδατόλουτρο

#### 2.8.4. Εφαρμογή αντίστροφης μεταγραφάσης

Για τη μετατροπή του mRNA σε cDNA χρησιμοποιήθηκε το Prime Script RT reagent kit σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αρχικά 500 ng RNA από κάθε δείγμα, αραιώθηκαν με αποστειρωμένο δισαπεσταγμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O) μέχρι τελικό όγκο 7 μl. Στη συνέχεια για αντίδραση τελικού όγκου 10 μl για κάθε δείγμα προστέθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- 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)

#### 2.8.5. Real-time PCR

Αρχή της Real-time PCR είναι η διαδικασία ενίσχυσης μιας DNA αλληλουχίας με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR) και ταυτόχρονα της ανίχνευσης του παραγόμενου προϊόντος σε πραγματικό χρόνο καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης (Real-time), μέσω της χρήσης ειδικών φθορίζοντων χρωστικών που ενσωματώνονται στην αλληλουχία που ενισχύεται. Η διαδικασία βασίζεται στη χρήση μιας φθορίζουσας ουσίας που ενσωματώνεται σε όλα τα δίκλινα μόρια DNA ανεξαρτήτων αλληλουχίας βάσεων. Η φθορίζουσα ουσία φθορίζει κατεξοχήν όταν ενσωματώνεται στο DNA ενώ πρακτικά δεν φθορίζει όταν είναι ελεύθερη στο διάλυμα της PCR. Η Real-time PCR πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή Applied biosystems StepOnePlus Real-time PCR. Για τις αντιδράσεις ενίσχυσης χρησιμοποιήθηκε το master mix FastGene IC Green 2x qPCR universal mix και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό StepOne v.2.3. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της ακτίνης (Actin) χρησιμοποιήθηκαν ως σημείο αναφοράς για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των άλλων γονιδίων.





Εικόνα 32: Θερμοκυκλοποιητής Real-time PCR

Ο υπολογισμός της έκφρασης των γονιδίων πραγματοποιήθηκε με την εξίσωση: Έκφραση του γονιδίου =  $2^{-\Delta C_t}$ . Όπου  $\Delta C_t$  είναι η διαφορά του μέσου οριακού κύκλου (threshold cycle) του εξεταζόμενου γονιδίου από τον μέσο οριακό κύκλο του γονιδίου αναφοράς για την ίδια εφαρμογή.

Πίνακας 11: Αντιδραστήρια και αντίστοιχες ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την RT-PCR

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
2x FastGene IC Green PCR Master mix	5 $\mu$ l
Forward Primer	0,5 $\mu$ l
Reverse Primer	0,5 $\mu$ l
Δείγμα cDNA	1 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	3 $\mu$ l

Πίνακας 12: Θερμοκρασία και αντίστοιχοι χρόνοι για την ενίσχυση των επιθυμητών αλληλουχιών και τη δημιουργία της καμπύλης αποδιάταξης των προϊόντων της RT-PCR

Στάδια	Χρόνος	Θερμοκρασία (°C)	Αποτέλεσμα
Στάδιο 1	3 min	95	Ενεργοποίηση της HotStarTaq DNA πολυμεράσης
Στάδιο 2	3 sec	95	Αποδιάταξη του DNA
	30 sec	60	Υβριδισμός εκκινητών / επιμήκυνση αλυσίδας
Στάδιο 3	15 sec	95	Δημιουργία της καμπύλης αποδιάταξης των προϊόντων της RT-PCR (Dissociation curve)
	1 min	60	
	15 sec	95	

\*Το στάδιο 2 επαναλήφθηκε για 40 κύκλους. Η εξειδίκευση των εκκινητών και ο σχηματισμός των διμερών των εκκινητών παρακολούθηθηκαν από την καμπύλη διαχωρισμού της RT-PCR. Η κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε 3 επαναλήψεις.

Πίνακας 13: Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των επίπεδων έκφρασης των γονιδίων

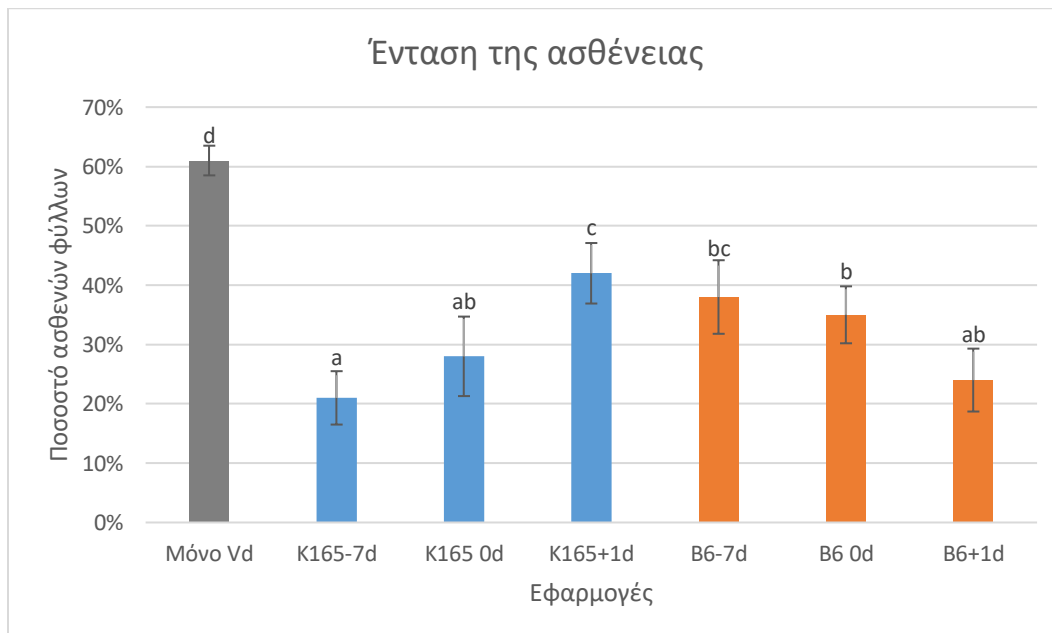
Γονίδιο	Αλληλουχία	Αναφορές
PR1	5'-TCACAACCAGGCACGAGGAG-3' 5'-CACCGCTACCCCAGGCTAAG-3'	Pantelides et al., 2010
PR4	5'-ATAATCCGGCGCAGAATAAT-3' 5'-GCGGTCCAGCCATACTTG-3'	Pantelides et al., 2010
ACTIN	5'-TTGCCGCATGCCATTCT -3' 5'-TCGGTGAGGATATTCATCAGGTT-3'	Herman et al., 2008

### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1. Ένταση της ασθένειας

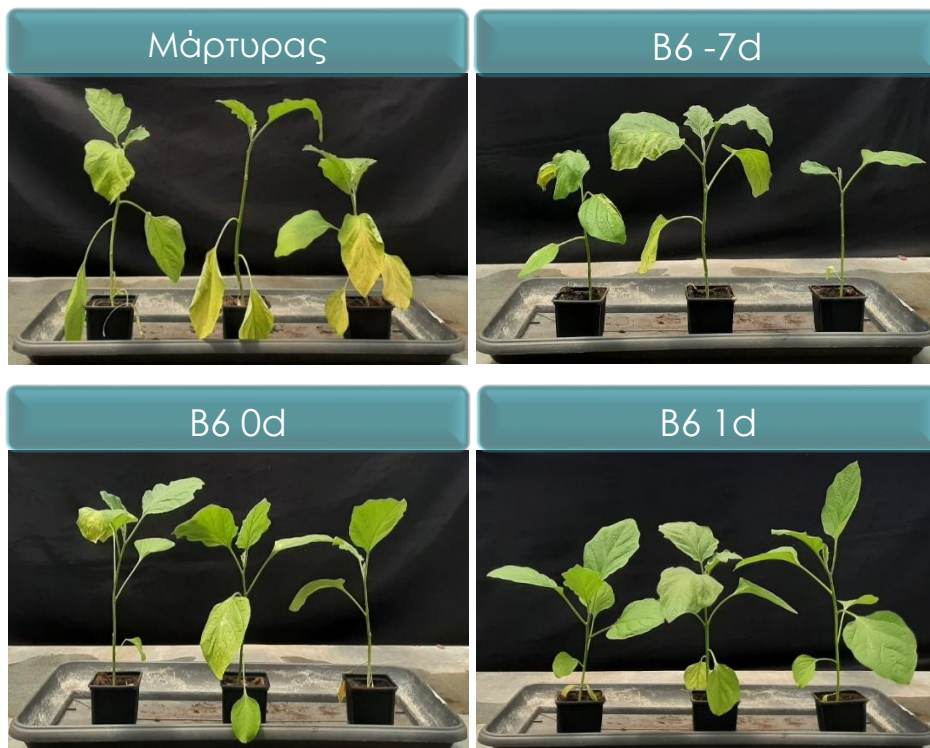
Τα αποτελέσματα του πειράματος παθογένειας έδειξαν ότι η επέμβαση με το βιολογικό παράγοντα *B. velezensis* K165 στην εφαρμογή 7 ημέρες πριν τη μόλυνση του μύκητα, μείωσε σημαντικά την ένταση των συμπτωμάτων της ασθένειας, σε ποσοστό 65% σε σχέση με τα φυτά του μάρτυρα. Στις υπόλοιπες επεμβάσεις με το στέλεχος K165 παρόλο που παρατηρήθηκε μείωση ήταν σημαντικά μικρότερη. Η επέμβαση που παρουσίασε τη μικρότερη επίδραση στην ένταση της ασθένειας με το συγκεκριμένο βακτήριο ήταν η εφαρμογή τη χρονική στιγμή μία ημέρα μετά τη μόλυνση με το μύκητα, καταγράφοντας ποσοστό ασθενών φύλλων 42%.

Αντίθετα στις επεμβάσεις με το βιολογικό παράγοντα *P. fluorescens* B6, η εφαρμογή που μείωσε σημαντικά την ένταση της ασθένειας ήταν τη χρονική στιγμή μία ημέρα μετά τη μόλυνση με το μύκητα. Το ποσοστό ασθενών φύλλων που παρουσίασε αυτή η επέμβαση ήταν 24%. Η μείωση που παρατηρήθηκε σε σχέση με το μάρτυρα ήταν 60%. Ακολούθησε η επέμβαση που πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα με την εφαρμογή του μύκητα με ποσοστό 35% και τελευταία η επέμβαση 7 ημέρες πριν το μύκητα, με ποσοστό ασθενών φύλλων 38%. Όπως ήταν αναμενόμενο τα φυτά του μάρτυρα παρουσίασαν τη μεγαλύτερη ένταση της ασθένειας με ποσοστό ασθενών φύλλων 61%.





Εικόνες 33-36: Τα φυτά με τις επεμβάσεις με το βακτήριο *B. velezensis* K165

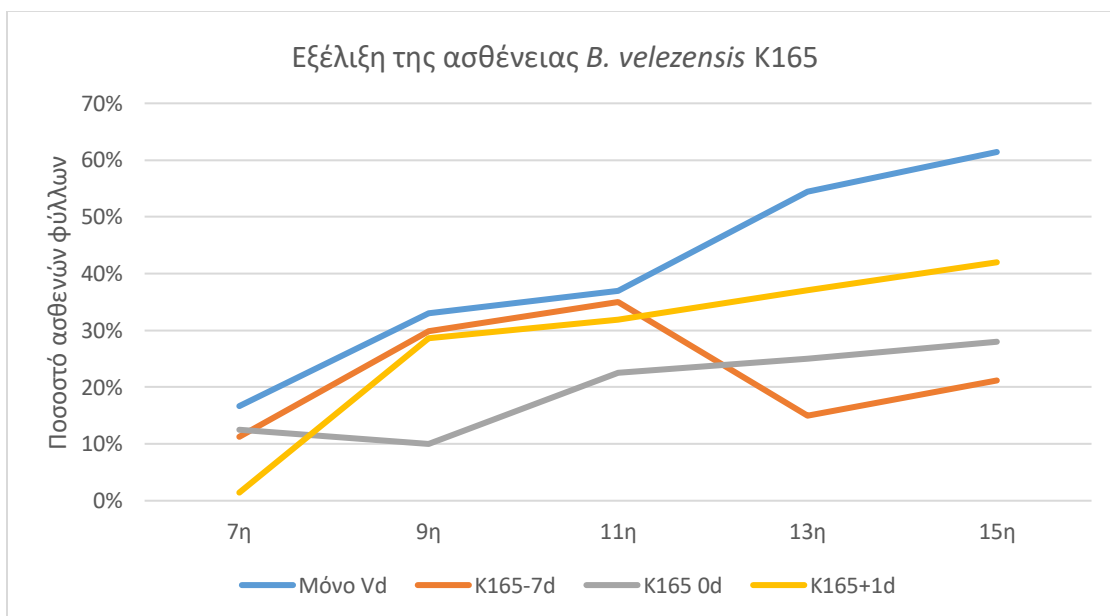


Εικόνες 37-40: Τα φυτά με τις επεμβάσεις με το βακτήριο *P. fluorescens* B6

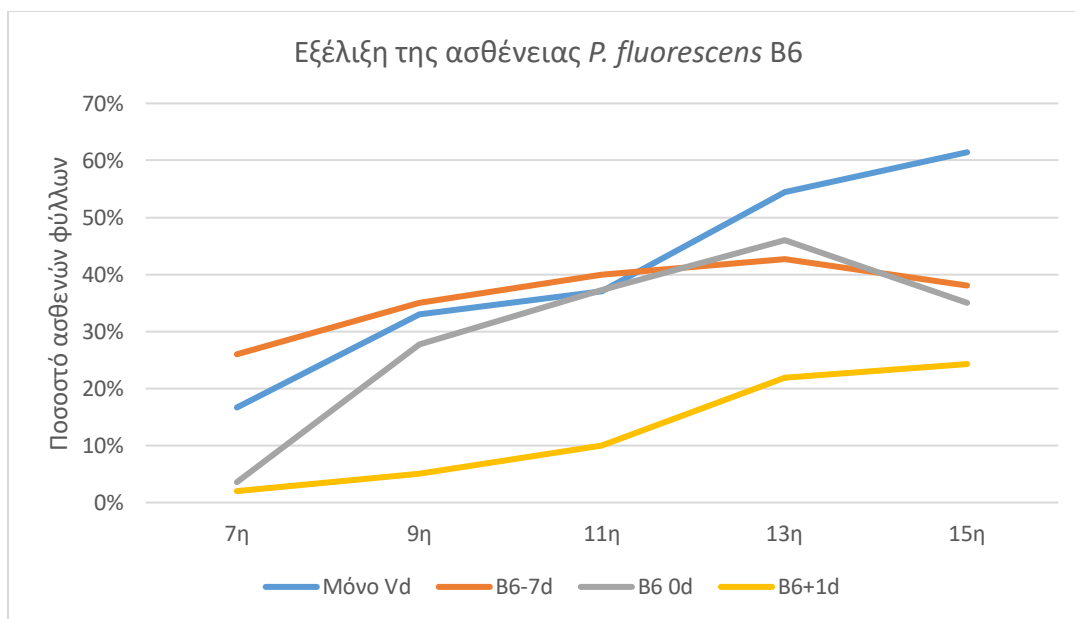
### 3.2. Εξέλιξη της ασθένειας

Τα πρώτα συμπτώματα στα φυτά του πειράματος παθογένειας παρατηρήθηκαν την 7<sup>η</sup> ημέρα από τη μόλυνση με το μύκητα *V. dahliae*. Η καταγραφή των συμπτωμάτων λάμβανε χώρα ανά 2 ημέρες και διήρκησε 15 ημέρες. Το μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών φύλλων καταγράφηκε στα φυτά του θετικού μάρτυρα.

Στις επεμβάσεις με το βακτήριο *B. velezensis* K165 παρατηρήθηκε ομαλή εξέλιξη της ασθένειας έως την 11<sup>η</sup> ημέρα, ενώ στη συνέχεια η εφαρμογή του βακτηρίου 7 ημέρες πριν από τη μόλυνση με το μύκητα μείωσε σημαντικά την ένταση της ασθένειας.

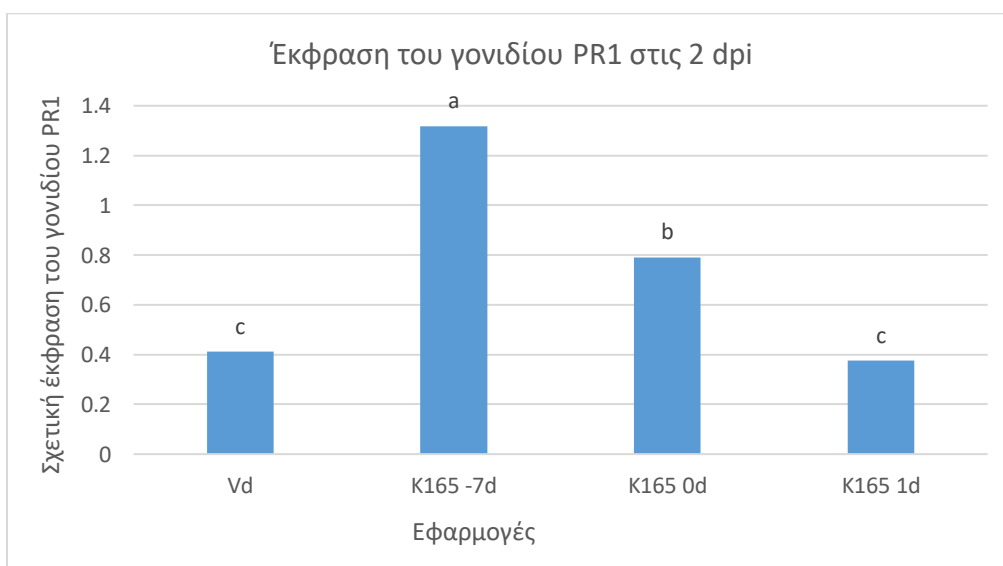


Η εξέλιξη της ασθένειας στις επεμβάσεις με το βακτήριο *P. fluorescens* B6 παρουσίασε εξαρχής σημαντική διαφορά στην εφαρμογή του βακτηρίου μία ημέρα μετά το μύκητα. Η διαφορά στην έκφραση των συμπτωμάτων συγκριτικά με τις υπόλοιπες επεμβάσεις διατηρήθηκε μέχρι το τέλος του πειράματος, ωστόσο ελαττώθηκε τις τελευταίες μέρες. Τα φυτά του μάρτυρα μετά την 11<sup>η</sup> ημέρα παρουσίασαν ραγδαία επιδείνωση στα συμπτώματα της ασθένειας.

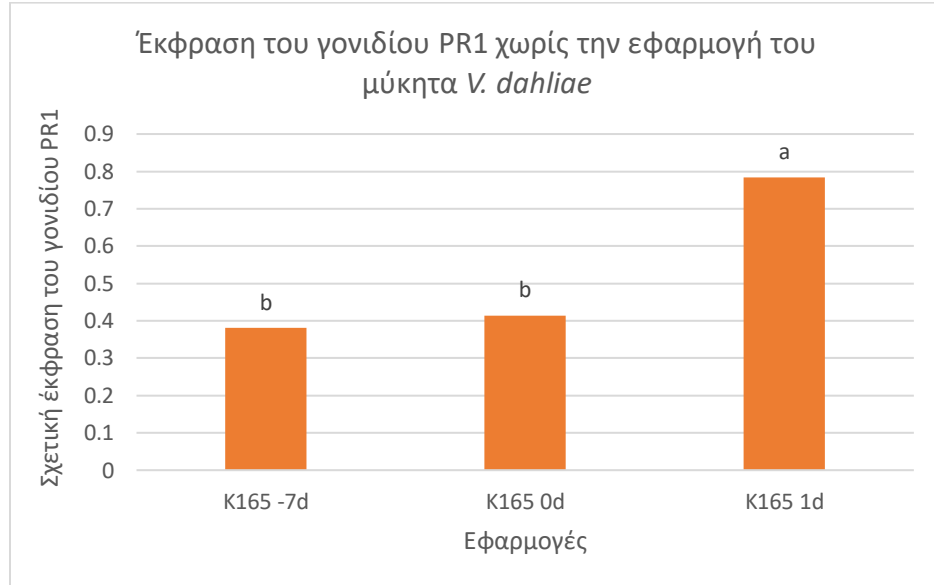


### 3.3. Έκφραση γονιδίου PR1 στην εφαρμογή *B. velezensis* K165 στις 2 dpi

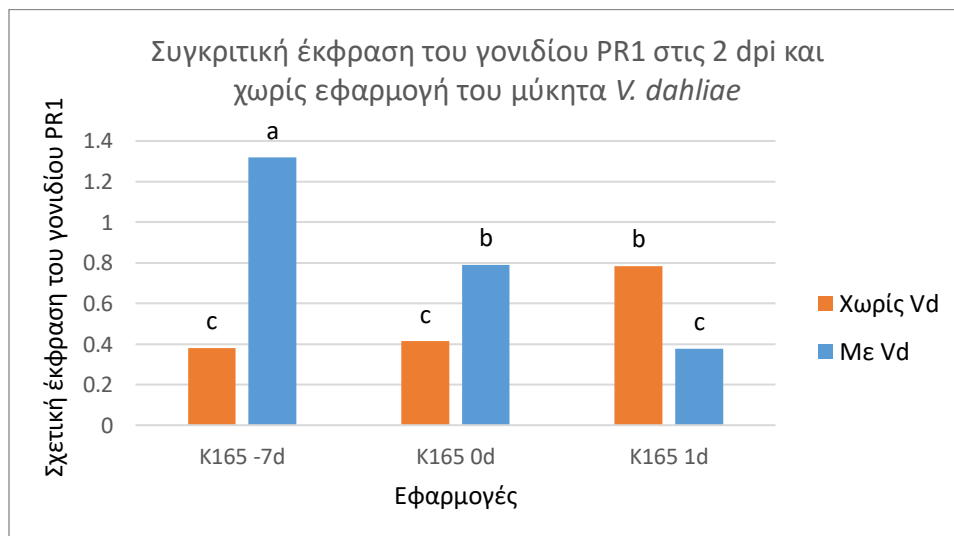
Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στην επαγωγή της διασυστηματικής άμυνας παρουσιάζονται στα παρακάτω γραφήματα. Η έκφραση του γονιδίου PR1 στις 2 ημέρες μετά τη μόλυνση (days post inoculation – dpi) είναι ιδιαίτερα αυξημένη στην εφαρμογή του βακτηρίου *B. velezensis* K165 7 ημέρες πριν το *V. dahliae*. Ακολουθεί η εφαρμογή ταυτόχρονα με το μύκητα. Τη χαμηλότερη τιμή στην έκφραση του γονιδίου καταγράφουν η εφαρμογή μία ημέρα μετά το μύκητα και η επέμβαση με το μάρτυρα, στην οποία δεν χρησιμοποιήθηκαν βιολογικοί παράγοντες.



Στις επεμβάσεις χωρίς την εφαρμογή του μύκητα, αλλά μόνο του στελέχους *B. velezensis* K165 παρατηρείται μικρή αύξηση στην έκφραση του γονιδίου PR1 στην εφαρμογή του βακτηρίου τη χρονική περίοδο μία ημέρα μετά. Οι υπόλοιπες επεμβάσεις κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα.

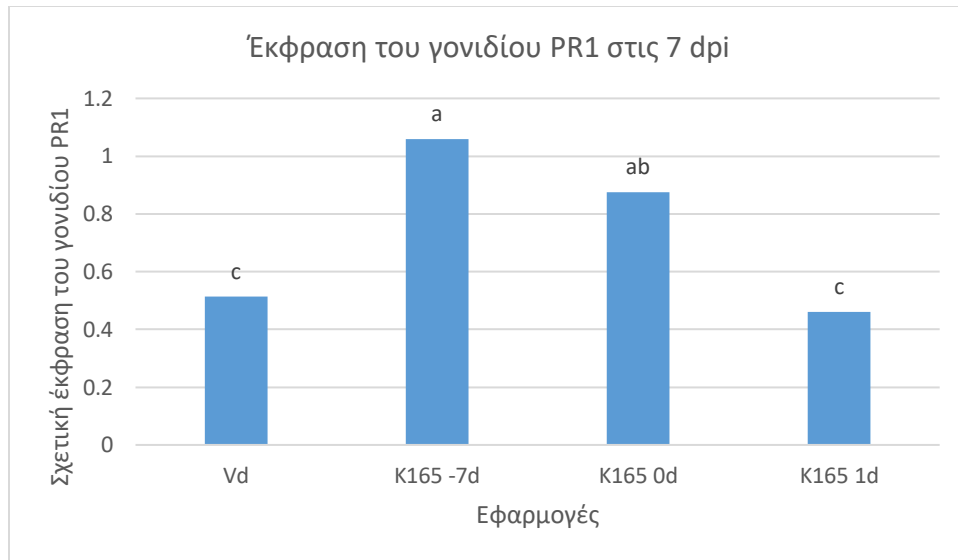


Από τη συγκριτική έκφραση του γονιδίου PR1 παρατηρείται ότι τα φυτά που είχαν μολυνθεί με το μύκητα και είχαν δεχτεί επέμβαση με το *B. velezensis* K165 στις 7 ημέρες πριν τη μόλυνση, είχαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Τα φυτά αυτά είχαν και τα πιο ήπια συμπτώματα στην ένταση της ασθένειας. Η χαμηλότερη έκφραση του γονιδίου καταγράφηκε στις επεμβάσεις που δεν χρησιμοποιήθηκε ο μύκητας *V. dahliae* τη χρονική περίοδο 7 ημέρες πριν και μηδέν ημέρες, αλλά και στην επέμβαση με το K165 μία ημέρα μετά το μύκητα.

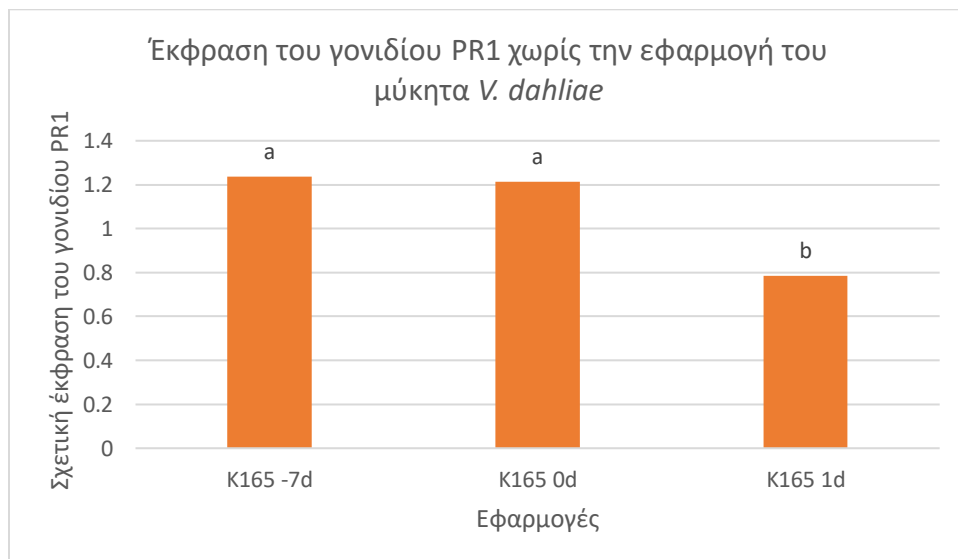


### 3.4. Έκφραση γονιδίου PR1 στην εφαρμογή *B. velezensis* K165 στις 7 dpi

Με βάση τη μέτρηση που πραγματοποιήθηκε στις 7 dpi, παρατηρείται μικρή αύξηση της έκφρασης του γονιδίου στην επέμβαση με το στέλεχος K165 όταν χορηγήθηκε 7 ημέρες πριν την εφαρμογή του *V. dahliae*. Στις υπόλοιπες επεμβάσεις παρουσιάζεται πτωτική τάση στην έκφραση του γονιδίου PR1. Τη χαμηλότερη τιμή στην έκφραση του γονιδίου καταγράφουν η εφαρμογή μία ημέρα μετά το μύκητα και η επέμβαση με το μάρτυρα.

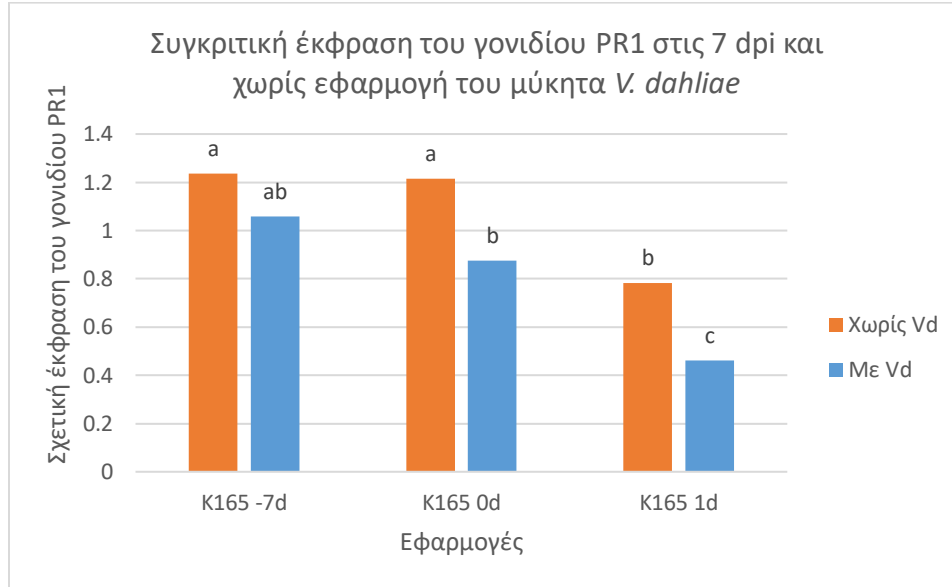


Από τον παρακάτω πίνακα, προκύπτει ότι στις επεμβάσεις χωρίς την εφαρμογή του *V. dahliae*, τη χαμηλότερη τιμή για την έκφραση του γονιδίου PR1 κατέγραψε η επέμβαση με το *B. velezensis* K165 τη χρονική περίοδο μία ημέρα μετά. Στις υπόλοιπες επεμβάσεις υπάρχει παρόμοια αύξηση της έκφρασης του γονιδίου.



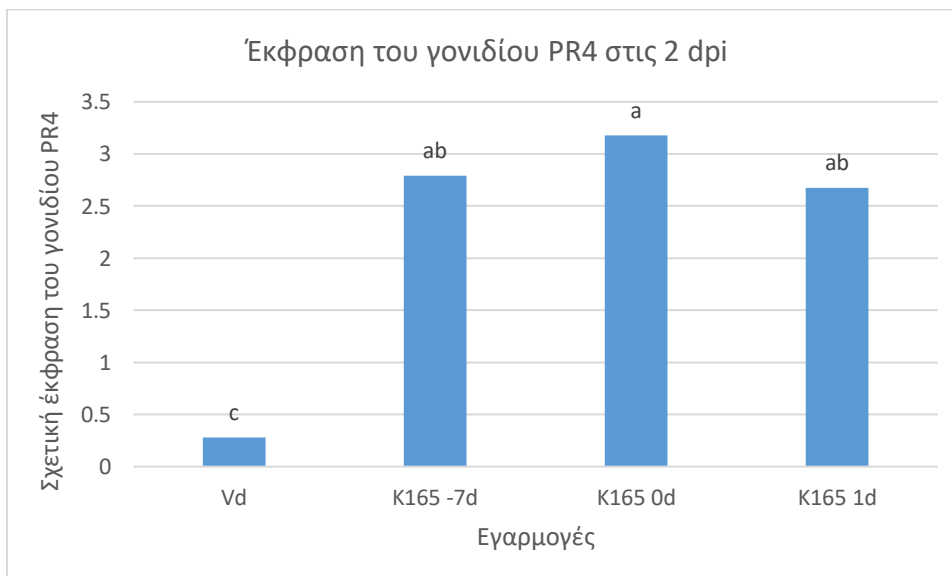


Στο διάγραμμα της συγκριτικής έκφρασης του γονιδίου PR1 φαίνεται ότι στις επεμβάσεις χωρίς το μύκητα *V. dahliae* η τιμή του γονιδίου ήταν αυξημένη και στις τρεις εφαρμογές. Η επέμβαση τη χρονική περίοδο μία ημέρα μετά τη μόλυνση με το μύκητα, κατέγραψε τα χαμηλότερα επίπεδα.

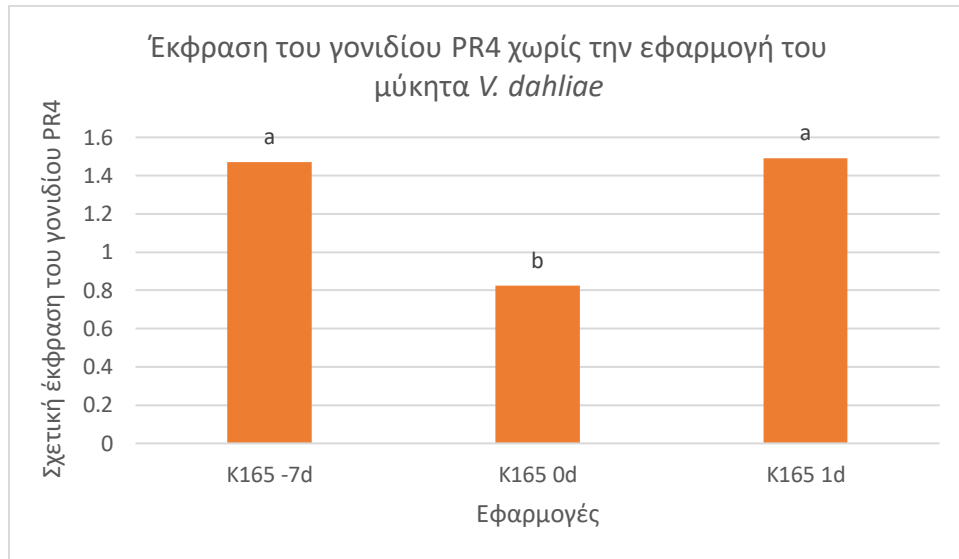


### 3.5. Έκφραση γονιδίου PR4 στην εφαρμογή *B. velezensis* K165 στις 2 dpi

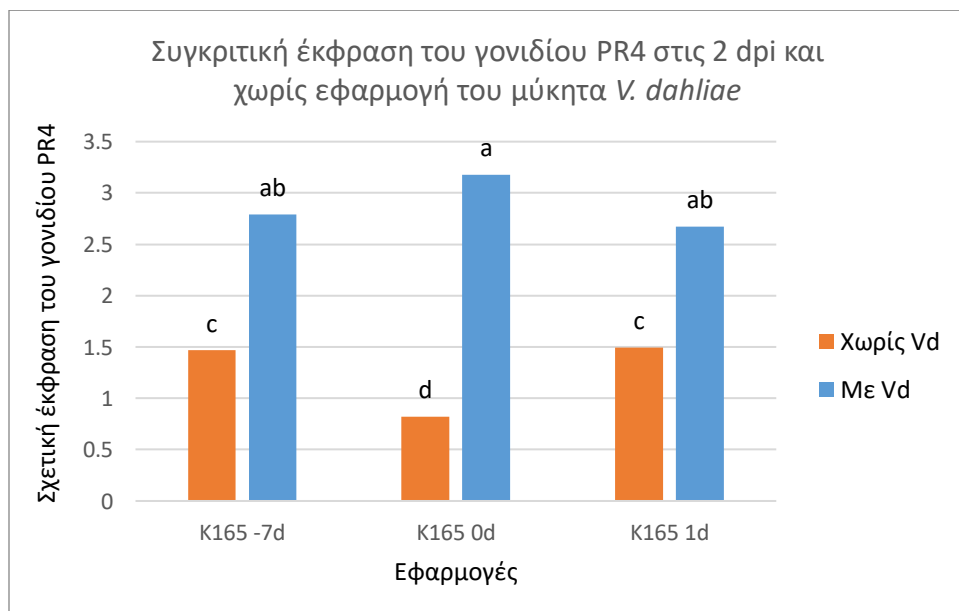
Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου PR4 στις 2 dpi είναι έντονα αυξημένα στις εφαρμογές με το βακτήριο *B. velezensis* K165, σε αντίθεση με το μάρτυρα. Ωστόσο δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφοροποιήσεις στην έκφραση του γονιδίου ανάλογα με το χρόνο εφαρμογής του βιολογικού παράγοντα.



Στις επεμβάσεις που πραγματοποιήθηκαν χωρίς την εφαρμογή του μύκητα, η έκφραση του γονιδίου PR4 είναι αυξημένη τόσο στην εφαρμογή του βακτηρίου τη χρονική περίοδο 7 ημέρες πριν, όσο και στην εφαρμογή του τη χρονική περίοδο μία ημέρα μετά. Στη συγκεκριμένη μέτρηση η εφαρμογή του βακτηρίου τη χρονική περίοδο μηδέν ημέρες κατέγραψε τη χαμηλότερη τιμή έκφρασης.

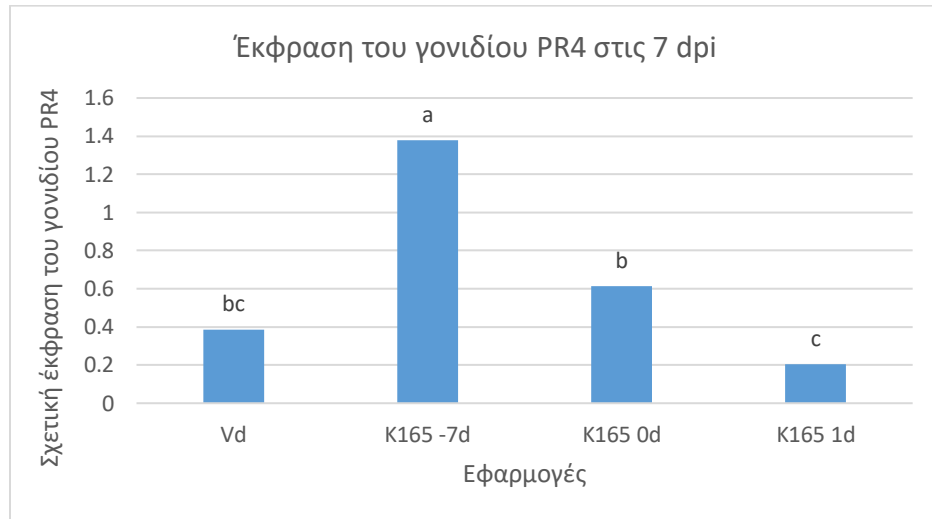


Από τη συγκριτική έκφραση του γονιδίου PR4 στις 2 dpi στα φυτά που μολύνθηκαν και σε αυτά που δεν μολύνθηκαν με το *V. dahliae*, φαίνεται ότι τα φυτά που είχαν μολυνθεί με το μύκητα και είχαν δεχτεί επέμβαση με το *B. velezensis* K165 υπερέκφρασαν το συγκεκριμένο γονίδιο. Από την άλλη τα φυτά που δεν μολύνθηκαν με το μύκητα είχαν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου PR4.

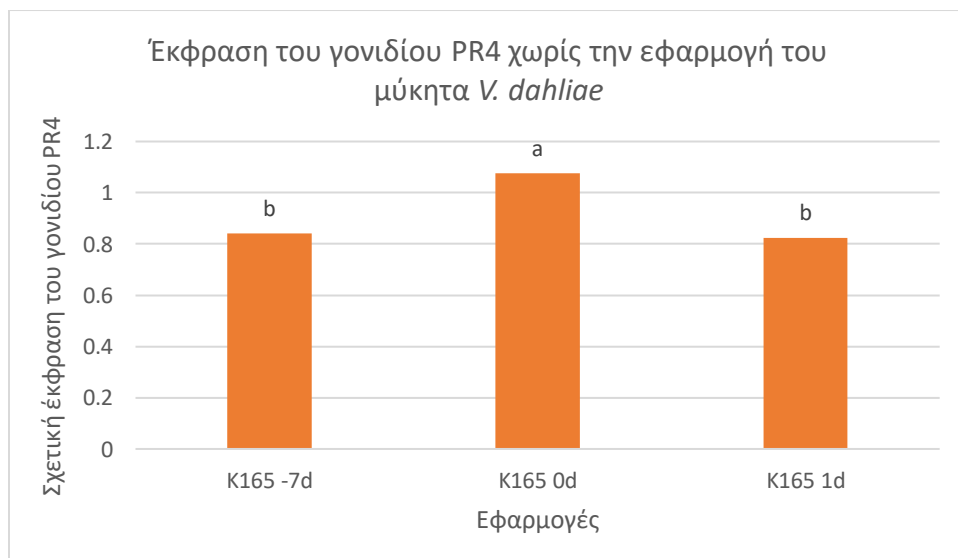


### 3.6. Έκφραση γονιδίου PR4 στην εφαρμογή *B. velezensis* K165 στις 7 dpi

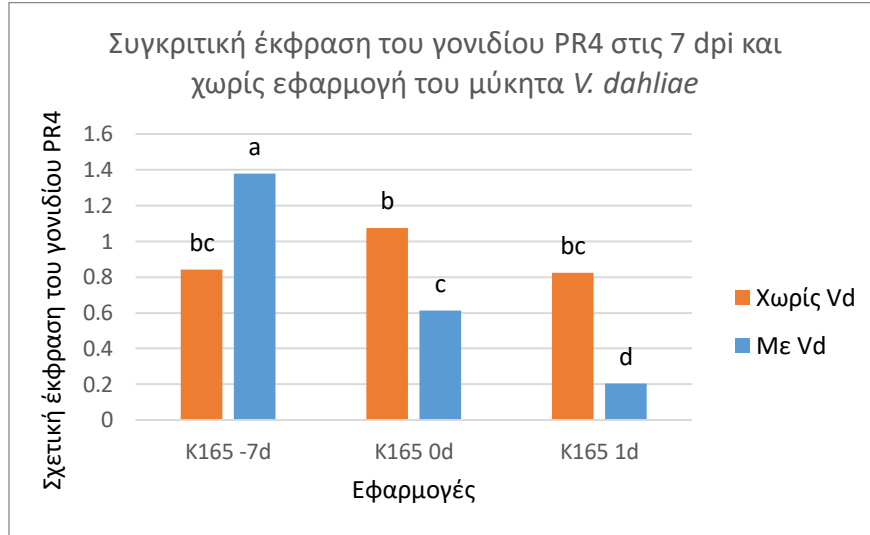
Από τη μελέτη του γονιδίου PR4 στις 7 dpi προκύπτει ότι η έκφρασή του είναι σημαντικά αυξημένη στην εφαρμογή του βακτηρίου *B. velezensis* K165 7 ημέρες πριν μύκητα. Ακολουθεί η εφαρμογή που πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα με το μύκητα, όπου η έκφραση είναι τουλάχιστον 2 φορές μικρότερη από την προηγούμενη. Η χαμηλότερη τιμή στην έκφραση του γονιδίου καταγράφηκε και σε αυτή την περίπτωση στην εφαρμογή του βακτηρίου μία ημέρα μετά τη μόλυνση με το μύκητα.



Στις επεμβάσεις με απουσία του μύκητα, παρατηρείται αυξημένη τιμή στην έκφραση του γονιδίου στην εφαρμογή του *B. velezensis* K165 τη χρονική περίοδο μηδέν ημέρες. Οι επεμβάσεις τόσο στην εφαρμογή του βακτηρίου τη χρονική περίοδο 7 ημέρες πριν, όσο και μία ημέρα μετά παρουσίασαν ελαφριά μείωση στην έκφραση του PR4.

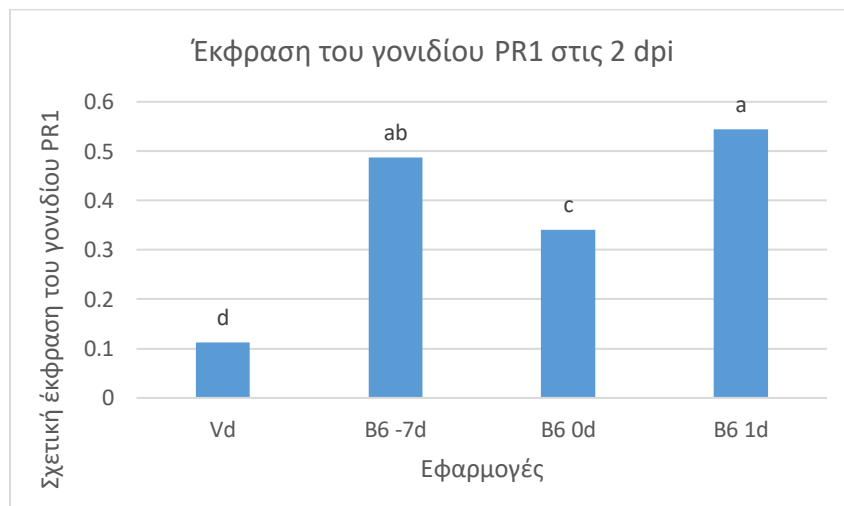


Με βάση το διάγραμμα της συγκριτικής έκφρασης του PR4, φαίνεται ότι στην εφαρμογή του *B. velezensis* K165 7 ημέρες μετά τη μόλυνση, το γονίδιο υπερεκφράστηκε. Μειωμένη έκφραση παρατηρήθηκε στις επεμβάσεις χωρίς το μύκητα *V. dahliae*, ενώ οι επεμβάσεις ταυτόχρονα με το μύκητα και μία ημέρα μετά κατέγραψαν τη χαμηλότερη έκφραση.

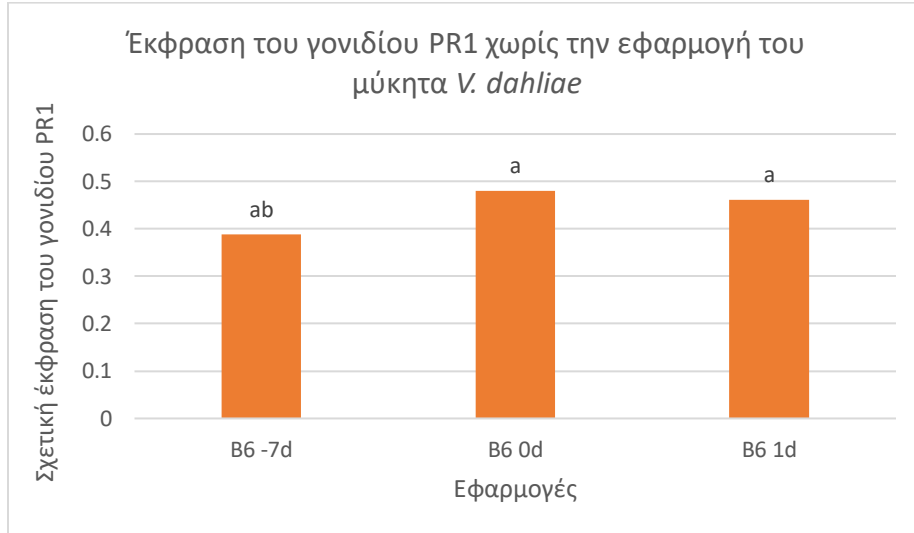


### 3.7. Έκφραση γονιδίου PR1 στην εφαρμογή *P. fluorescens* B6 στις 2 dpi

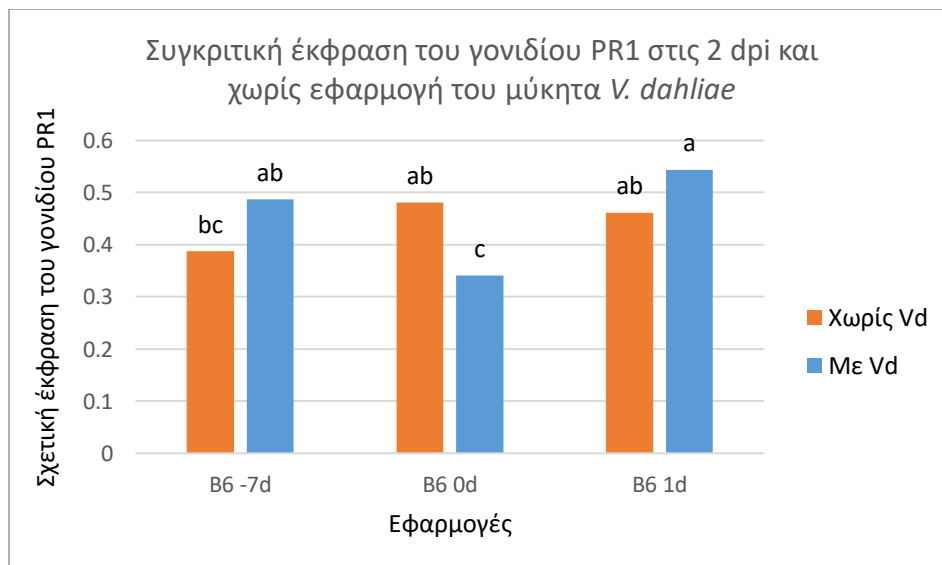
Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στην επαγωγή της διασυστηματικής άμυνας μελετήθηκαν και στις εφαρμογές με το βιολογικό παράγοντα *P. fluorescens* B6. Όπως παρουσιάζεται στο παρακάτω γράφημα η έκφραση του γονιδίου PR1 στις 2 dpi είναι αυξημένη στην επέμβαση με το βακτήριο που χορηγήθηκε μία ημέρα μετά το *V. dahliae*. Σε ελαφρώς χαμηλότερα επίπεδα καταγράφηκε η εφαρμογή του βακτηρίου 7 ημέρες πριν το μύκητα. Αρκετά μειωμένη ήταν η έκφραση του γονιδίου στα φυτά που εμβολιάστηκαν ταυτόχρονα με το μύκητα, ενώ η εφαρμογή του μάρτυρα παρουσίασε ελάχιστη τιμή.



Στις επεμβάσεις χωρίς τη μόλυνση με το *V. dahliae*, παρατηρείται αυξημένη έκφραση του γονιδίου στην επέμβαση με το βακτηριακό στέλεχος *P. fluorescens* B6 τη χρονική περίοδο μηδέν ημέρες και μία ημέρα μετά. Ελαφρώς μειωμένη είναι η έκφραση του PR1 στην εφαρμογή τη χρονική περίοδο 7 ημέρες πριν.

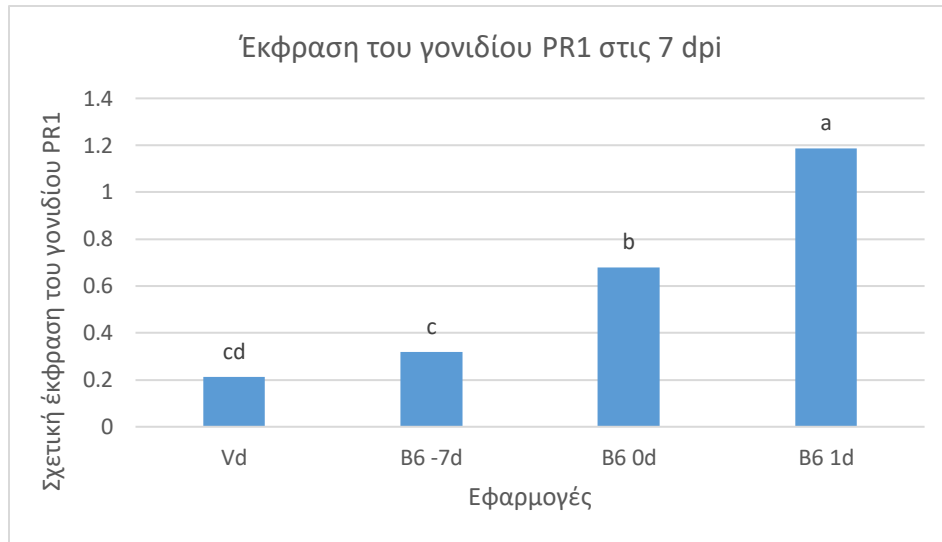


Στο διάγραμμα της συγκριτικής έκφρασης του γονιδίου PR1 η εφαρμογή του B6 μία ημέρα μετά το μύκητα *V. dahliae* παρουσίασε μια μικρή αύξηση στη τιμή. Στις εφαρμογές χωρίς το μύκητα δεν προέκυψαν σημαντικές διαφορές. Η χαμηλότερη έκφραση του γονιδίου καταγράφηκε στην εφαρμογή του βακτηρίου ταυτόχρονα με το μύκητα.

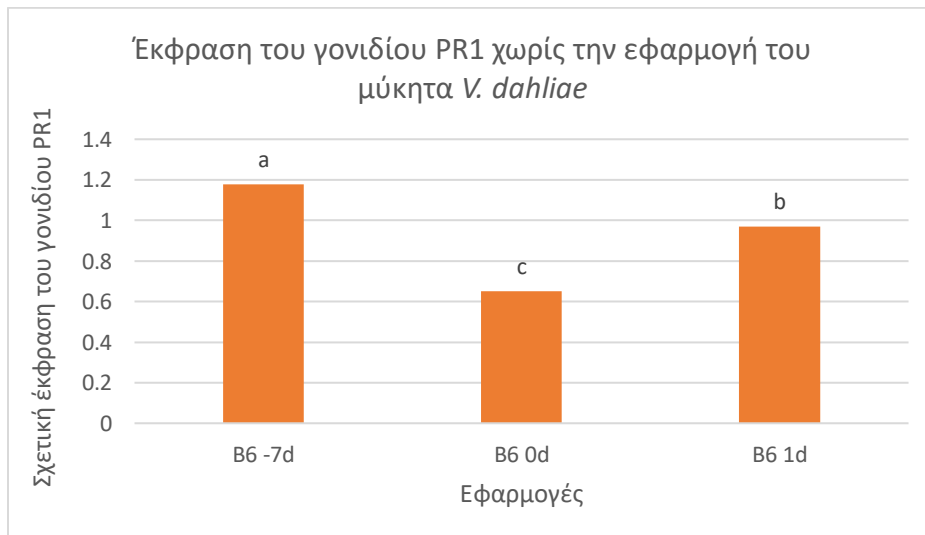


### 3.8. Έκφραση γονιδίου PR1 στην εφαρμογή *P. fluorescens* B6 στις 7 dpi

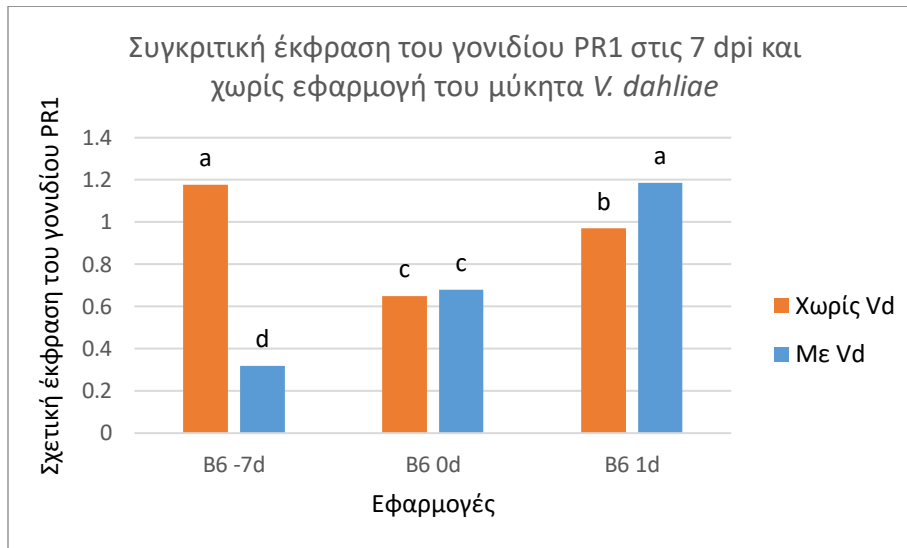
Αυξημένη έκφραση του PR1 στις 7 dpi προκύπτει στην εφαρμογή του στελέχους B6 μία ημέρα μετά από το μύκητα. Η έκφραση του γονιδίου μειώνεται σημαντικά στις υπόλοιπες εφαρμογές, με τις χαμηλότερες τιμές να παρουσιάζουν ο μάρτυρας και η επέμβαση 7 ημέρες πριν το *V. dahliae*.



Από το διάγραμμα της έκφρασης του PR1 χωρίς την παρουσία του μύκητα *V. dahliae*, φαίνεται ότι αυξημένη έκφραση έχει η εφαρμογή του βακτηρίου τη χρονική περίοδο 7 ημέρες πριν και ακολουθεί η εφαρμογή τη χρονική περίοδο μία ημέρα μετά. Τη χαμηλότερη έκφραση κατέγραψε η εφαρμογή του B6 τη χρονική περίοδο μηδέν ημέρες.

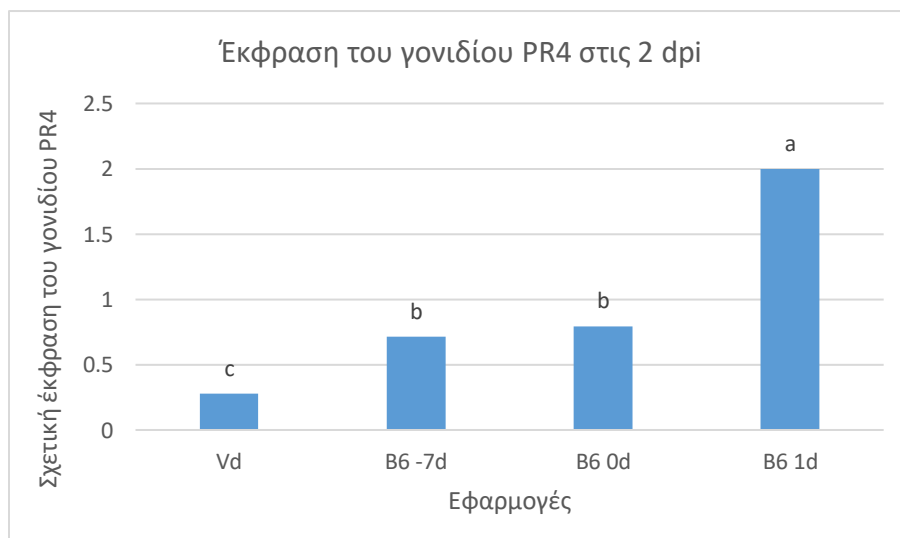


Από τη συγκριτική έκφραση του γονιδίου PR1 στις 7 dpi στα φυτά που μολύνθηκαν και σε αυτά που δεν μολύνθηκαν με το *V. dahliae*, φαίνεται ότι τόσο τα φυτά που είχαν μολυνθεί με το μύκητα και είχαν δεχτεί επέμβαση με το *P. fluorescens* B6 μία ημέρα μετά, όσο και τα φυτά που εφαρμόστηκε το στέλεχος 7 ημέρες πριν χωρίς το μύκητα, είχαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Στις επεμβάσεις τη χρονική περίοδο μηδέν ημέρες, προέκυψαν παρόμοιες τιμές για τις εφαρμογές με το μύκητα και χωρίς αυτόν.

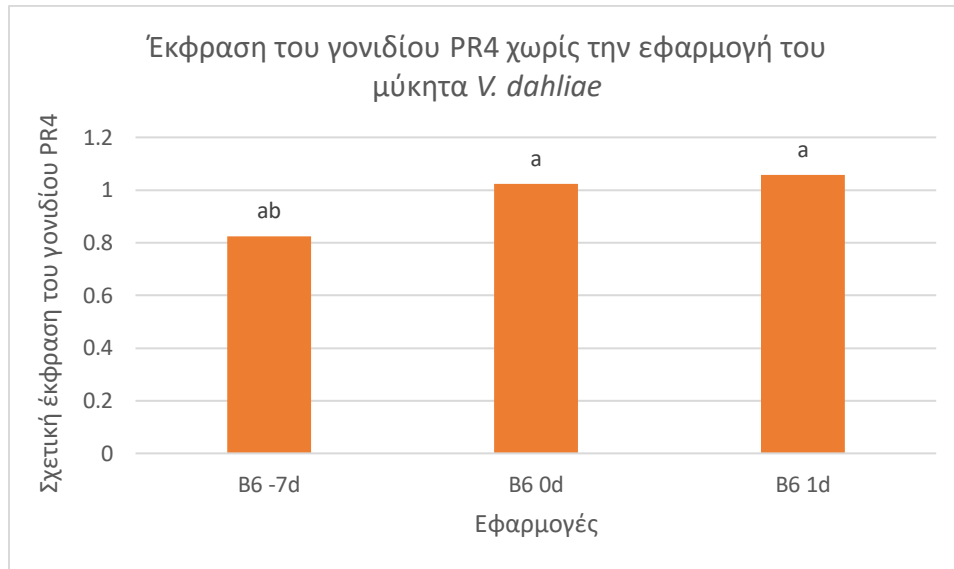


### 3.9. Έκφραση γονιδίου PR4 στην εφαρμογή *P. fluorescens* B6 στις 2 dpi

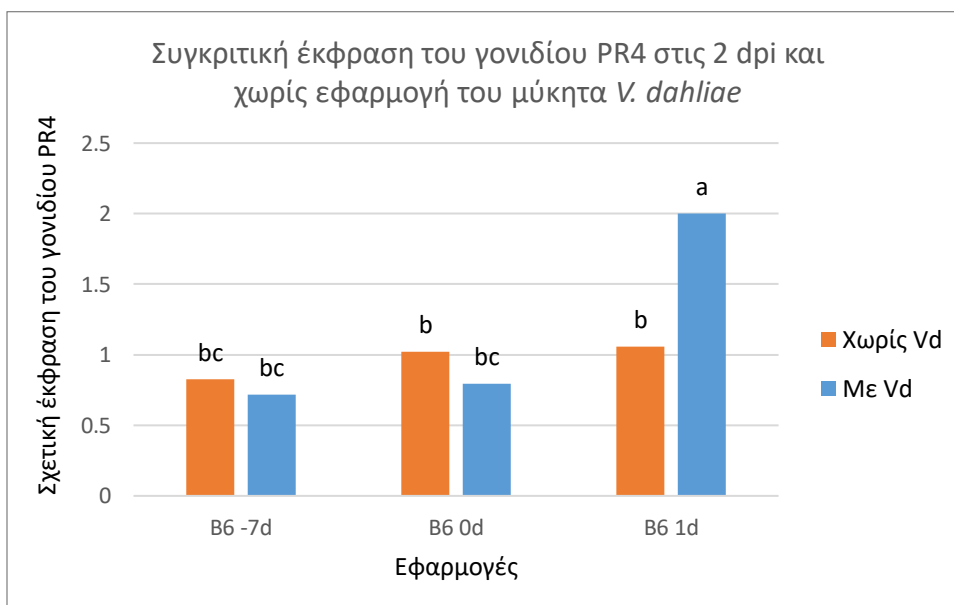
Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου PR4 στις 2 dpi είναι ιδιαίτερα αυξημένα στην εφαρμογή του βακτηρίου *P. fluorescens* B6 μία ημέρα μετά το μύκητα. Οι υπόλοιπες εφαρμογές κυμαίνονται σε χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης. Η εφαρμογή του μάρτυρα κατέγραψε τη χαμηλότερη έκφραση και σε αυτήν τη μέτρηση.



Στις επεμβάσεις που πραγματοποιήθηκαν χωρίς την εφαρμογή του μύκητα, η έκφραση του γονιδίου PR4 είναι αυξημένη τόσο στην εφαρμογή του *P. fluorescens* B6 τη χρονική περίοδο 0 ημέρες, όσο και στην εφαρμογή τη χρονική περίοδο μία ημέρα μετά. Παρατηρείται μικρή μείωση της έκφρασης του γονιδίου στην εφαρμογή τη χρονική περίοδο 7 ημέρες πριν.



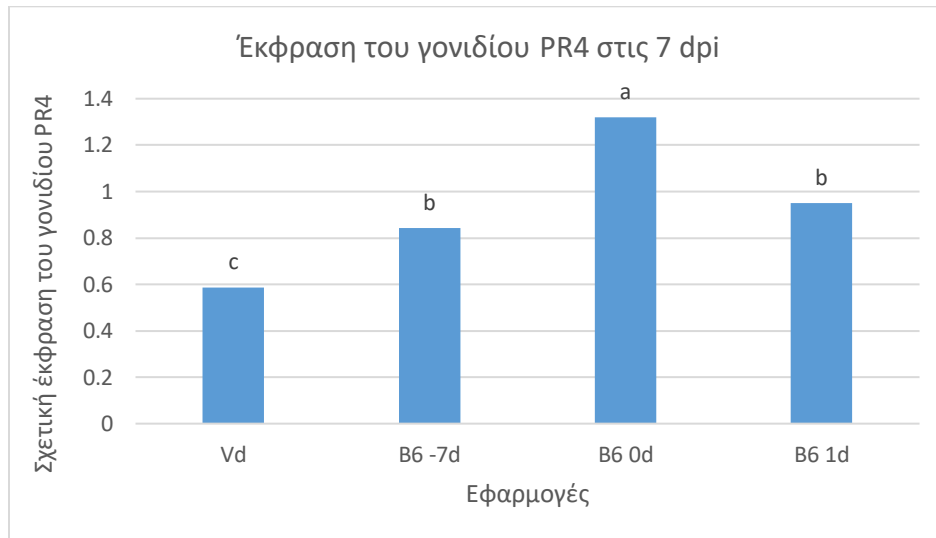
Με βάση το διάγραμμα της συγκριτικής έκφρασης του PR4, προκύπτει υπερέκφραση του γονιδίου στην εφαρμογή του στελέχους *P. fluorescens* B6 μία ημέρα μετά την εφαρμογή του μύκητα. Η έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου είναι περίπου δύο φορές μεγαλύτερη από τις υπόλοιπες επεμβάσεις, στις οποίες δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στην έκφραση του.



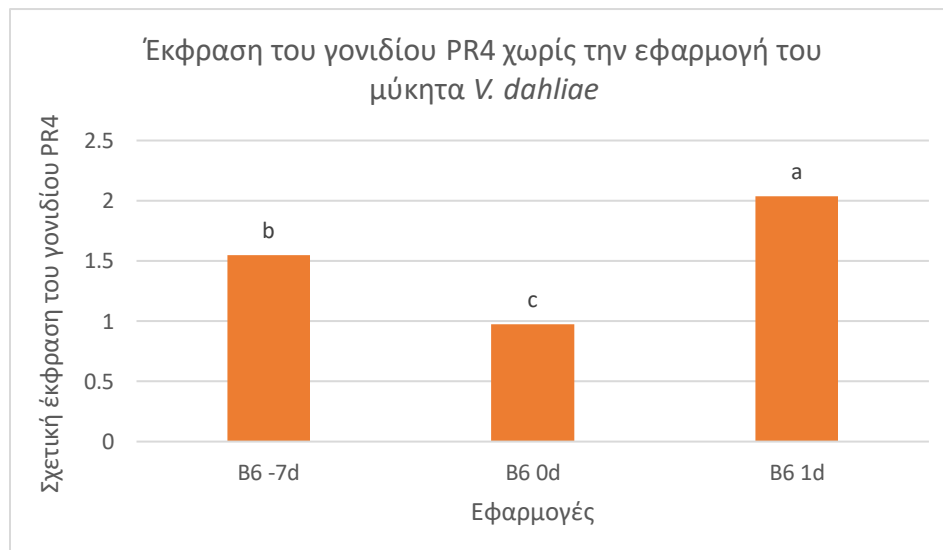


### 3.10. Έκφραση γονιδίου PR4 στην εφαρμογή *P. fluorescens* B6 στις 7 dpi

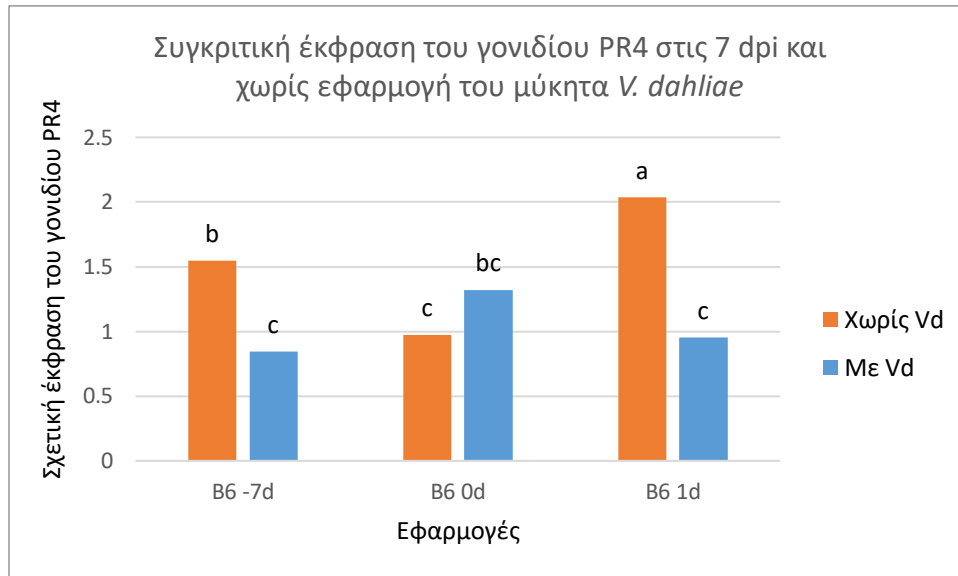
Από τη μελέτη του γονιδίου PR4 στις 7 dpi, προκύπτει ότι η έκφρασή του είναι αυξημένη στην εφαρμογή του βακτηρίου *P. fluorescens* B6 ταυτόχρονα με το μύκητα. Ακολουθούν οι εφαρμογές που πραγματοποιήθηκαν μία ημέρα μετά το μύκητα και 7 ημέρες πριν. Η χαμηλότερη τιμή στην έκφραση του γονιδίου καταγράφηκε στην επέμβαση με το μάρτυρα.



Στις επεμβάσεις χωρίς τη μόλυνση με το *V. dahliae*, παρατηρείται αυξημένη έκφραση του γονιδίου στην επέμβαση με το βακτηριακό στέλεχος *P. fluorescens* B6 τη χρονική περίοδο μία ημέρα μετά. Μειωμένη έκφραση παρουσιάζεται στην εφαρμογή του στελέχους τη χρονική περίοδο 7 ημέρες πριν. Τη χαμηλότερη τιμή στη έκφραση του PR4 τη καταγράφει η εφαρμογή τη χρονική περίοδο μηδέν ημέρες.



Με βάση το διάγραμμα της συγκριτικής έκφρασης του PR4, φαίνεται ότι στην εφαρμογή του *P. fluorescens* B6 στα φυτά που δεν μολύνθηκαν με το μύκητα, τη χρονική περίοδο μία ημέρα μετά, η έκφραση του γονιδίου παρουσίασε αυξημένες τιμές. Σχετικά μειωμένη είναι η έκφραση στην εφαρμογή 7 ημέρες πριν, χωρίς τη μόλυνση με το μύκητα και ακολουθεί η εφαρμογή του στελέχους ταυτόχρονα με το *V. dahliae*.



## 4. Συζήτηση – Συμπεράσματα

Το αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη βιολογική αντιμετώπιση των ασθενειών των φυτών οφείλεται σε πολλούς παράγοντες. Η χρήση συνθετικών φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων μειώνει την ποιότητα των φυτικών προϊόντων λόγω της υπολειμματικότητας τους. Επιβαρύνει το περιβάλλον και το οικοσύστημα και υπάρχει αυξημένος κίνδυνος ανάπτυξης ανθεκτικότητας από τα παθογόνα, δυσχεραίνοντας την αντιμετώπισή τους. Επίσης μερικές ασθένειες, όπως το βερτισίλλιο, δεν επιδέχονται χημική αντιμετώπιση.

Οι προσβολές που προκαλούνται στα φυτά από τη βερτισιλλίωση είναι συχνές και σοβαρές. Ο μύκητας *Verticillium dahliae* προκαλεί σημαντικές καταστροφές σε πολλές καλλιέργειες, με κίνδυνο ολικής απώλειας της παραγωγής. Κύρια προβλήματα στην αντιμετώπιση του μύκητα αποτελούν ο παρασιτισμός των αγγείων του ξύλου, η ύπαρξη ανθεκτικών διαχειμάζουσων μορφών, μικροσκληρωτίων, που αποτελούν απειλή για το χωράφι για πολλά έτη και η έλλειψη αποτελεσματικών μυκητοκτόνων. Ο έλεγχος της ασθένειας περιλαμβάνει τη λήψη καλλιεργητικών μέτρων, ανθεκτικών ποικιλιών, τη μέθοδο της ηλιοαπολύμανσης και τη βιολογική αντιμετώπιση.

Οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί που δρουν ανταγωνιστικά έναντι των παθογόνων βρίσκονται στον πυρήνα της βιολογικής αντιμετώπισης. Οι βιολογικοί παράγοντες που αναπτύσσονται στη ριζόσφαιρα έχουν σημαντικό ρόλο στην προστασία του φυτού από τους εδαφογενείς παθογόνους μικροοργανισμούς, διότι βρίσκονται και ανταγωνίζονται στο ίδιο ενδιαίτημα.

Υπάρχουν αρκετά είδη βακτηρίων που αποικίζουν τη ριζόσφαιρα και έχουν την ικανότητα να δρουν εναντίον παθογόνων μικροοργανισμών. Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα ανταγωνιστικά βακτήρια αντιμετωπίζουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς, είναι ο ανταγωνισμός για θρεπτικά στοιχεία, η αντιβίωση, ο παρασιτισμός και η επαγόμενη διασυστηματική ανοχή των φυτών. Ενώ πολλές φορές επικρατεί κάποιος συνδυασμός των παραπάνω μηχανισμών.

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τα βακτήρια *Bacillus velezensis* K165 και *Pseudomonas fluorescens* B6. Το στέλεχος K165 έχει αποτελεσματική δράση έναντι εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων όπως *Verticillium dahliae* και *Fusarium oxysporum*. Επιταχύνει το ρυθμό ανάπτυξης των φυτών και επάγει τη διασυστηματική άμυνα. Σημαντικό ρόλο στη δράση του ανταγωνιστικού βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* έχει η παραγωγή αντιβιοτικών ενώσεων και λυτικών ενζύμων που αποδομούν το κυτταρικό τοίχωμα των παθογόνων μικροοργανισμών.

Ο χρόνος εφαρμογής των βιολογικών παραγόντων δεν έχει μελετηθεί διεξοδικά και αποτελεί κρίσιμο παράγοντα η εφαρμογή των μικροβιακών βιολογικών σκευασμάτων στη σωστή χρονικά στιγμή, ώστε να εξασφαλισθεί η δράση τους εναντίον των παθογόνων.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση του χρόνου εφαρμογής στην δράση δύο γνωστών βιολογικών παραγόντων, *Bacillus velezensis* K165 και *Pseudomonas fluorescens* B6, εναντίον του μύκητα *Verticillium dahliae*. Για το σκοπό αυτό, εφαρμόστηκαν τα στελέχη K165 και B6 στο ριζικό σύστημα φυτών μελιτζάνας στις επτά ημέρες πριν την εφαρμογή του μύκητα *V. dahliae*, ταυτόχρονα με το μύκητα *V. dahliae* και μία ημέρα μετά την εφαρμογή του μύκητα *V. dahliae*. Ελέγχεται η ένταση της ασθένειας, το ποσοστό ασθενών φύλλων και η έκφραση γονιδίων παθογένεσης στα φυτά, στις διαφορετικές χρονικές επεμβάσεις. Επίσης διερευνώνται οι μηχανισμοί δράσης των βιολογικών παραγόντων και η ικανότητα επαγωγής της διασυστηματικής άμυνας των φυτών.

Η ανάλυση των πειραματικών δεδομένων της παρούσας εργασίας καταδεικνύει την διαφοροποίηση της αποτελεσματικότητας των βιολογικών παραγόντων, ανάλογα με το χρόνο εφαρμογής τους, στην αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών και συγκεκριμένα του μύκητα *Verticillium dahliae*. Η επέμβαση με το ανταγωνιστικό βακτήριο *Bacillus velezensis* K165 στις 7 ημέρες πριν την εφαρμογή του μύκητα είχε ως αποτέλεσμα την έντονη, στατιστικά σημαντική διαφορά στο ποσοστό ασθενών φύλλων συγκριτικά με τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Παρουσίασε μειωμένα συμπτώματα σε ποσοστό 50% συγκριτικά με την εφαρμογή του στελέχους μία ημέρα μετά τη μόλυνση. Ενώ η διαφοροποίηση στην ασθένεια των φύλλων με τα φυτά του μάρτυρα έφτασε το 65%.

Όσον αφορά τις επεμβάσεις με το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens* B6, παρατηρήθηκε επίσης σημαντική επίδραση του χρόνου εφαρμογής στην αποτελεσματικότητα του εναντίον του *Verticillium dahliae*. Ωστόσο η πιο αποτελεσματική επέμβαση καταγράφηκε στην εφαρμογή του βακτηρίου μία ημέρα μετά τη μόλυνση με το μύκητα. Η ένταση των συμπτωμάτων της ασθένειας ήταν σημαντικά μειωμένη συγκριτικά με τις υπόλοιπες χρονικές επεμβάσεις. Παρουσίασε μειωμένα συμπτώματα σε ποσοστό 37% συγκριτικά με την εφαρμογή του στελέχους 7 ημέρες πριν τη μόλυνση και 31% συγκριτικά με την εφαρμογή του ταυτόχρονα με το μύκητα. Τέλος η εφαρμογή του *P. fluorescens* B6 μία ημέρα μετά τη τεχνητή μόλυνση, κατέγραψε μείωση 60% σε σχέση με το μάρτυρα.

Η εξέλιξη της ασθένειας ήταν διαφορετική για τους δύο βιολογικούς παράγοντες. Τα πρώτα συμπτώματα στα φυτά παρατηρήθηκαν μια εβδομάδα μετά τη μόλυνση με το μύκητα *V. dahliae*. Στις επεμβάσεις με το βακτήριο *B. velezensis* K165, παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση στα συμπτώματα ασθενών φύλλων την 11<sup>η</sup> ημέρα, για την εφαρμογή 7 ημέρες πριν το μύκητα. Η μέγιστη διαφορά εντοπίζεται την 13<sup>η</sup> ημέρα για τη συγκεκριμένη επέμβαση, η οποία ήταν και η πιο αποτελεσματική. Αντίθετα στις επεμβάσεις με το βακτήριο *P. fluorescens* B6 παρατηρήθηκε έντονη διαφοροποίηση από την έναρξη των συμπτωμάτων στα φυτά, στην εφαρμογή του βακτηρίου μία ημέρα μετά τη μόλυνση με το μύκητα. Η μέγιστη διαφορά καταγράφηκε την 9<sup>η</sup> ημέρα από τη τεχνητή μόλυνση. Η διαφοροποίηση υπήρξε έως το τέλος του πειράματος, αλλά μειώθηκε στη συνέχεια.

Παρατηρούμε διαφορετική συμπεριφορά των δύο βιολογικών παραγόντων τόσο στην αποτελεσματικότητά τους με βάση το χρόνο εφαρμογής τους, όσο και στην εξέλιξη της έντασης της ασθένειας στα φυτά. Το βακτήριο *B. velezensis* K165 αποδίδει καλύτερα στην εφαρμογή του 7 ημέρες πριν τη μόλυνση των φυτών με το παθογόνο και η επίδραση του στη μείωση των συμπτωμάτων των φυτών είναι έντονη αλλά όχι άμεσα. Ενώ το βακτήριο *P. fluorescens* B6 αποδίδει καλύτερα στην εφαρμογή του μία ημέρα μετά τη μόλυνση των φυτών από το *V.dahliae* και η επίδραση του στη μείωση της έντασης της ασθένειας είναι έντονη άμεσα και στη πορεία μειώνεται.

Για τη διερεύνηση των μηχανισμών δράσης των βιολογικών παραγόντων, αξιολογήθηκε η ικανότητα επαγωγής της διασυστηματικής άμυνας των φυτών. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μοριακή ανάλυση των πρωτεϊνών παθογένεσης, PR1 και PR4. Παρατηρώντας την έκφραση των γονιδίων που μελετήθηκαν, προκύπτει ότι η εφαρμογή του *B. velezensis* K165 στις 7 ημέρες πριν τη μόλυνση με το μύκητα υπερεκφράζει το γονίδιο PR1 τόσο στα δείγματα που ελήφθησαν στις 2 ημέρες μετά τη μόλυνση (days post inoculation – dpi), όσο και στις 7 dpi. Στην έκφραση του γονιδίου PR4 στις 2 dpi δεν φαίνεται σημαντική διαφοροποίηση για τις επεμβάσεις, ενώ η εφαρμογή του στελέχους 7 ημέρες πριν το μύκητα καταγράφει έντονη αύξηση της έκφρασης του PR4 στις 7 dpi.

Η μοριακή ανάλυση των φυτών που είχαν εμβολιαστεί με το βακτήριο *P. fluorescens* B6 εμφάνισε χαμηλές τιμές στην έκφραση του γονιδίου PR1 στις 2 dpi και αυξήθηκε η τιμή του στην εφαρμογή του στελέχους μία ημέρα μετά το μύκητα στις 7 dpi. Η έκφραση του γονιδίου PR4 είναι αυξημένη στην εφαρμογή του βακτηρίου μία ημέρα μετά το *V.dahliae* στις 2 dpi, αλλά μειώνεται στις 7 dpi. Ως εκ τούτου δεν μπορούμε να ισχυριστούμε ότι η προστασία που προκύπτει από την εφαρμογή του βακτηρίου οφείλεται στην έκφραση του γονιδίου λόγω της μείωσης της έκφρασης του με την πάροδο του χρόνου.

Η εφαρμογή του μάρτυρα παρουσίασε τις χαμηλότερες τιμές στην έκφραση των γονιδίων. Η αντίδραση ευπάθειας που προκύπτει από τη μόλυνση, διαφέρει ποσοτικά από την επαγωγή της άμυνας ως προς την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στις αμυντικές αντιδράσεις. Στα φυτά που έχει εφαρμοστεί μόνο ο παθογόνος μύκητας δεν ενεργοποιείται η διασυστηματική άμυνα, σε αντίθεση με τα φυτά όπου έχει πραγματοποιηθεί η επέμβαση του *V.dahliae* και του ανταγωνιστικού βακτηρίου.

Η απλή εφαρμογή των ανταγωνιστικών βακτηρίων χωρίς το φυτοπαθογόνο μύκητα προκαλεί επίσης αύξηση της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων. Η έκφραση τους δεν διαφοροποιείται ιδιαίτερα για τις διαφορετικές χρονικές επεμβάσεις, καθώς χωρίς τη μόλυνση με το παθογόνο φθίνει η λειτουργική αξία της χρονικής παραμετροποίησης. Στις επεμβάσεις με το συνδυασμό του παθογόνου μύκητα με τους βιολογικούς παράγοντες, η επαγωγή της άμυνας ήταν πιο έντονη, κυρίως στις εφαρμογές με το *B. velezensis* K165, καθώς θεωρείται πιο ωφέλιμη για τα φυτά διότι δεν καταναλώνουν άσκοπα ενέργεια στην επαγωγή των αμυντικών τους αντιδράσεων εν απουσία παθογόνων μικροοργανισμών.

Τα μοριακά δεδομένα φανερώνουν την υπερέκφραση των γονιδίων άμυνας στην εφαρμογή του *B. velezensis* K165 στις 7 ημέρες πριν τη μόλυνση με το μύκητα *V.dahliae*. Από το πείραμα παθογένειας προκύπτει ότι η συγκεκριμένη χρονική εφαρμογή μείωσε στο 65% την ένταση της ασθένειας στα φυτά, καταγράφοντας τα πιο ήπια συμπτώματα από τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Κατά συνέπεια, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η φυτοπροστατευτική δραστηριότητα του βακτηριακού στελέχους αποδίδεται στην επαγωγή των μηχανισμών άμυνας των φυτών και η πιο αποτελεσματική εφαρμογή του επιτυγχάνεται στις 7 ημέρες πριν τη μόλυνση με το *V.dahliae*. Η ενεργοποίηση της διασυστηματικής άμυνας των φυτών από το βιολογικό παράγοντα *Bacillus velezensis* προκύπτει και από προηγούμενες έρευνες με το συγκεκριμένο στέλεχος (Tjamos et al., 2005).

Στις επεμβάσεις με το βακτήριο *P. fluorescens* B6, η μεγαλύτερη μείωση των συμπτωμάτων της ασθένειας προκύπτει στην εφαρμογή του στελέχους μία ημέρα μετά τη τεχνητή μόλυνση με το παθογόνο μύκητα. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες ή σε συνδυασμό αυτών. Η άμεση δράση του βακτηρίου μία ημέρα μετά το μύκητα, πιθανώς σχετίζεται κυρίως με τη παραγωγή αντιβιοτικών ενώσεων και το μικροβιακό ανταγωνισμό στη ριζόσφαιρα και σε μικρότερο βαθμό με την επαγωγή της άμυνας του φυτού. Ο βιολογικός παράγοντας *Pseudomonas fluorescens* διαθέτει ευρύ φάσμα προστατευτικών μηχανισμών. Παράγει πληθώρα αντιβιοτικών ενώσεων (Meena, 2014) που εμποδίζουν την ανάπτυξη των παθογόνων, καθώς και λυτικά ένζυμα που αποδομούν το κυτταρικό τους τοίχωμα.

Η χρήση φυτοπροστατευτικών μικροοργανισμών για την αντιμετώπιση των ασθενειών των φυτών και ιδιαίτερα αυτών που οφείλονται σε εδαφογενή παθογόνα αναμένεται να αυξηθεί τα επόμενα χρόνια, λόγω του περιορισμού των χημικών σκευασμάτων. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα με διαφορετικούς ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς σε περισσότερες ασθένειες, για τον εντοπισμό της αποτελεσματικότερης χρονικής εφαρμογής τους. Η σωστή χρονικά στιγμή στη χορήγησή των βιολογικών παραγόντων, μπορεί να εξασφαλίσει τη δράση τους εναντίον των παθογόνων και να επιτευχθεί μια φιλική προς το περιβάλλον στρατηγική αντιμετώπισης των ασθενειών των φυτών.

## 5. Βιβλιογραφία

- Adhikari, T. B., Joseph, C. M., Yang, G., Phillips, D. A. and Nelson, L. M. (2001). Evaluation of bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease of rice. *Canadian Journal of Microbiology*. 47, pp. 916-924
- Adler, J. (1996). Effect of Amino Acids and Oxygen on Chemotaxis in *Escherichia coli*. *Journal Of Bacteriology*. 92, pp 121-129
- Agrios, G.N. (2005). *Plant Pathology*. Elsevier, CA: Academic Press
- Andrews, S. C., Robinson, A. K. and Rodriguez-Quinones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS microbiology reviews*. 27, pp. 215–237
- Antonopoulos, D.F., Tjamos, S.E., Antoniou, P.P., Rafeletos, P. and Tjamos, E.C. (2008). Effect of *Paenibacillus alvei*, strain K165, on the germination of *Verticillium dahliae* microsclerotia in planta. *Biol Control*. 46, pp. 166–170
- Araujo, F.F., Henning, A.A. and Hungria, M. (2005). Phytohormones and Antibiotics Produced by *Bacillus subtilis* and their Effects on Seed Pathogenic Fungi and on Soybean Root Development. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 21(8-9), pp. 1639–1645
- Ash, C., Priest, F.G., and Collins, M.D. (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 64, pp. 253- 260
- Audenaert, K., Pattery, T., Cornelis, P. and Hofte, M. (2002). Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin and pyocyanin. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 15, pp. 1147-1156
- Barnett, H. L. and Binder, F. L. (1973). The fungal host-parasite relationship. *Annu. Rev. Phytopathology*. 11, pp. 273-292
- Benhamou, N, Belanger, R.R. and Paulitz, T.C. (1996). Induction of differential host responses by *Pseudomonas fluorescens* in Ri T-DNA-transformed pea roots after challenge with *Fusarium oxysporum* f.sp. pisi and *Pythium ultimum*. *Phytopathology*. 86, pp. 1174–1185
- Benhamou, N., Tuzun, S. and Kloepper, J.W. (1998). Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Planta*. 204, pp. 153-168
- Berry, R.M. and Armitage J.P. (2008). How bacteria change gear. *Science*. 320(5883), pp. 1599–1600

- Bolwerk, A., Lagopodi, A.L., Wijfjes, A.H.M., Lamers, G. E. M., Chin-A-Woeng, T.F.C., Lugtenberg, B.J.J. and Bloemberg, G.V. (2003). Interactions in the tomato rhizosphere of two *Pseudomonas* biocontrol strains with the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Molecular plant-microbe interactions*. 16, pp. 983–93
- Braun, V. and Hantke, K. (2011). Recent insights into iron import by bacteria. *Current opinion in chemical biology*. 15(2), pp. 328–334
- Chao, W. L., Nelson, E B., Harman, G. E. and Liorente B. (1986). Colonization of the rhizosphere by biological control agents applied to seeds. *Phytopathology*. 76, pp. 60-65
- Chet, I. and Baker, R. (1980). Induction of suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology*. 70, pp. 994-998
- Chet, I., Ordentlich, A., Shapira, R. Oppenheim, A. (1990). Mechanisms of biocontrol of soilborne plant pathogens by rhizobacteria. *Plant and Soil*. 129, pp. 85-92
- Chin-A-Woeng, T.F., Bloemberg, G.V, Mulders, I.H., Dekkers, L.C. and Lugtenberg, B.J. (2000). Root colonization by phenazine-1-carboxamideproducing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. *Molecular plant-microbe interactions*. 13, pp. 1340–1345
- Chin-A-Woeng, T.F., Bloemberg, G.V., van der Bij, van der Drift K.M.G. M., Schripsema, J., Kroon B., Scheffer, R.J., Keel C., Bakker, P.A.H.M., Tichy, H.V., de Bruijn, Thomas-Oates, J.E. and Lungtenberg, B.J.J. (1998). Biocontrol by phenazine-1-carboxamide producing by *Pseudomonas chlororaphis* PCL 1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicis lycopersici*. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 11, pp. 1069-1077
- Chellemi, D. O. and Olson, S. M. (1994). Effect of soil solarization and fumigation on survival of soil-borne pathogens of tomato in North-Florida. *Plant Disease*. 78, pp. 1167-1172
- Chemin, L. and Chet, L. (2002). Microbial enzymes in biocontrol of plant pathogens and pests. In: *Enzymes in the environment: activity, ecology and applications*. R. G. Chet and D. R. P. Burns (eds). Marcel Dekker, N. Y., pp. 171-225
- Compant, S., Duffy, B., Niwak, J., Clement, C. and Barka, E. A. (2005). Use of plant growth promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, pp. 4951-4959
- Dakora, F.D. and Phillips, D.A. (2002). Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil*. 245, pp. 35–47.



- Davey, M. E. and O' Toole A. G. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64, pp. 847-867
- Dekkers, L.C., Mulders, I.H.M., Phoelich, C.C., Chin-A-Woeng, T.F.C., Wijffjes, A.H.M. and Lugtenberg, B.J.J. (2000). The *sss* colonization gene of the tomato- *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 can improve colonization of other wild-type *Pseudomonas* spp. bacteria. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 13, pp. 1177-1183
- De Meyer, G., and Hofte, M. (1997). Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathology*. 89, pp. 588- 593
- Dennis, C. and Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 57, pp. 25-39
- DeVay, J.E. (1989). Selection, characterization, pathogenicity and virulence of pectinase-deficient mutants of *Verticillium albo-atrum*. In: *Vascular wilt diseases of plants*, Tjamos E.C. and Beckman C.H. (eds.). Springer-Verlag, pp. 19-217
- Dhouib, H., Zouari, I., Abdallah, D. B., Belbahri, L., Taktak, W., Triki, M. A., Tounsi, S. (2019). Potential of a novel endophytic *Bacillus velezensis* in tomato growth promotion and protection against *Verticillium* wilt disease. *Biological Control* Vol. 139, 104092
- Dimkic, I., Janakiev, T., Petrovic, M., Degrassi, G., Fira, D. (2022). Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms - A review. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. Vol. 117, 101754
- Doornbos, R.F., Geraats, B.P.J., Kuramae, E.E., Van Loon, L.C. and Bakker, P.A.H.M. (2011). Effects of jasmonic acid, ethyl- ene, and salicylic acid signaling on the rhizosphere bacterial community of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Inter- act.* 24, pp. 395–407
- Dupuy, L.X. and Silk, W.K. (2016). Mechanisms of Early Microbial Establishment on Growing Root Surfaces. *Soil Science Society of America Vadose Zone Journal*. 15, pp. 1-13
- Ebel J. and Mithofer A. (1998). Early events in the elicitation of plant defense. *Planta*. 206, pp. 335-348
- Fatouros, G., Gkizi, D., Fragkogeorgi, G. A., Paplomatas, E. J., Tjamos S. E. (2018). Biological control of *Pythium*, *Rhizoctonia* and *Sclerotinia* in lettuce: association of the

plant protective activity of the bacterium *Paenibacillus alvei* K165 with the induction of systemic resistance. *Plant Pathology*. 67, pp. 418–425

Foster, R. C. (1986). The ultrastructure of the rhizoplane and rhizosphere. *Annual Review of Phytopathology*. 24, pp. 211-234

Fradin, E.F. and Thomma, B.P.H.J. (2006). Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V.dahliae* and *V.albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology*. 7, pp. 71-86

Fravel, D. R. (1988). Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*. 26: 75-91

Fuqua, C., Parsek, M. R. and Greenberg, E. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: Acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annual Review of Genetics*. 35, pp. 439-468

Gamalero, E., Lingua, G., Berta, G., Lemanceau, P. (2003). Methods for studying root colonization by introduced beneficial bacteria. *Agronomie*. 23, pp. 407–418

Georgakopoulos, D.G., Hendson, M., Panopoulos, N.J., and Schroth, M.N. (1994). Cloning of a phenazine biosynthetic locus of *Pseudomonas aureofaciens* PGS12 and analysis of its expression in vitro with the ice nucleation reporter gene. *Applied and environmental microbiology*. 60, pp. 2931–2938

Gerik, J. S. and Huisman, O. C. (1985). Mode of colonization of roots by *Verticillium* and *Fusarium*. In: *Ecology and management of soilborne plant pathogens*. C. A. Parker, A. D. Rovira, K. J. Moore and P. T. W. Wong (eds). American Phytopathological Society, pp. 80-83

Gkizi, D., Gonzalez Gil, A., Pardal, A., Piquerez, S., Sergaki, C., Ntoukakis, V. and Tzamos S. (2021). The bacterial biocontrol agent *Paenibacillus alvei* K165 confers inherited resistance to *Verticillium dahliae*. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 72(12), pp. 4565-4576

Gkizi, D., Poulaki, E., Tzamos, S. (2021). Towards Biological Control of *Aspergillus carbonarius* and *Botrytis cinerea* in Grapevine Berries and Transcriptomic Changes of Genes Encoding Pathogenesis-Related (PR) Proteins. *Plants*. 10(5), 970

Haas, D. and Defago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat.Rev. Microbiol*. 3, pp. 307–319

Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. and Stoodley P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Natural Reviews of Microbiology*. 2, pp. 95-108

- Han, S.H., Anderson, A.J., Yang, K.Y., Cho, B.H., Kim, K.Y., Lee, M.C. and Kim, Y.C. (2006). Multiple determinants influence root colonization and induction of induced systemic resistance by *Pseudomonas chlororaphis* O6. *Molecular plant pathology*. 7, pp. 463-472
- Handelsman, J. and Stabb, E. V. (1996) *Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens*, *The Plant Cell*. Vol. 8, pp. 1855-1869
- Harman, G.E., Petzoldt, R., Comis, A. and Chen, J. (2004). Interactions Between *Trichoderma harzianum* Strain T22 and Maize Inbred Line Mo17 and Effects of These Interactions on Diseases Caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*. 94, pp. 147–53
- Harrigan, W. F. (1998). Topley and Wilson's *Microbiology and Microbial Infections*. *International Journal of Food Science and Technology*. 33(2), pp. 194-195
- Harris, D.C. and Yang, J.R. (1996). The relationship between the amount of *Verticillium dahliae* in soil and the incidence of strawberry wilt as a basis for disease risk prediction. *Plant Pathology*. 45, pp. 106-114
- Hawke, M. A. and Lazarovits G. (1994). Production and manipulation of individual microsclerotia of *Verticillium dahliae* for use in studies of survival. *Phytopathology*. 84, pp. 883-890
- Herman, M. A. B., Davidson, J. K., Smart, C.D. (2008). Induction of plant defense gene expression by plant activators and *Pseudomonas syringae* pv. tomato in greenhouse-grown tomatoes. *Phytopathology* 98(11), pp. 1226–1232
- Heydari, A. and Passarakli M. (2010). A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of Biological Sciences*. 10, pp. 273-290
- Huang, H. C. and Hoes, J. A. (1976). Penetration and infection of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Coniothyrium minitans*. *Can. J. Bot.* 54, pp. 406-410
- Huang, H. C. and Kokko, E. G. (1993). *Trichothecium roseum*, a mycoparasite of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Bot.* 71, pp. 1631-1638
- Huisman, O. C. and Gerik, J.S. (1989). Dynamics of colonization of plant roots by *Verticillium dahliae* and other fungi. In: *Vascular wilt diseases of plants*. E. C. Tjamos and C. H. Beckman (eds). Springer-Verlag. H28, pp. 1-17
- Ji, C. and Kuc, J. (1996). Antifungal activity of cucumber -1,3-glucanase and chitinase. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 49, pp. 257-265

- Jousset, A., Schulz, W., Scheu, S. and Eisenhauer, N. (2011). Intraspecific genotypic richness and relatedness predict the invasibility of microbial communities. *The ISME Journal* 5, pp. 1108–1114
- Keykhasaber, M., Pham K.T.K., Thomma, B.P.H.J., Hiemstra, J.A. (2017). Reliable detection of unevenly distributed *Verticillium dahliae* in diseased olive trees. *Plant Pathology*. 66, pp. 641–650
- Kiraly, Z., Klement Z., Solymosy F. and Voros J. (1970). *Methods on Plant Pathology*. Akademiai Kiado, Budapest.
- Kitajima, S. and Sato, F. (1999). Plant pathogenesis-related proteins: molecular mechanisms of gene expression and protein function. *J. Biochem.* 125, pp. 1-8
- Klosterman, S.J., Atallah, Z.K., Vallad, G.E., Subbarao, K. V. (2009). Diversity, Pathogenicity, and Management of *Verticillium* Species. *Annual Review Phytopathology*. 47, pp. 39–62
- Kobayashi, D.Y., Reedy, R.M., Bick, J. and Oudemans, P.V. (2002). Characterization of a chitinase gene from *Stenotrophomonas maltophilia* strain 34S1 and its involvement in biological control. *Applied and environmental microbiology*. 68, pp. 1047–1054.
- Lareen, A., Burton, F. and Schafer, P. (2016). Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes. *Plant Mol Biol*. 90, pp. 575–587
- Lebuhn, M., Heulin, T. and Hartmann A. (1997). Production of auxin and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plants roots. *FEMS Microbiology Ecology*. 22, pp. 325-334
- Leeman, M., Den Ouden, F.M., Van Pelt, J.A., Dirkx, F.P.M., Steijl, H., Bakker, P.A.H.M., and Schippers, B. (1996). Iron availability affects induction of systemic resistance to *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology*. 86, pp. 149-155
- Ligoxigakis, E.K. (2009). Determination of pathotypes of *Verticillium dahliae* and new hosts of *V. dahliae* race-2, and spread of the pathogen in Crete. In: *Proceedings of the 10th International Verticillium Symposium*, Tjamos E.C. (ed.), pp. 101
- Lugtenberg, B. and Dekkers, L. C. (1999). What make *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? *Environmental Microbiology*. 1, pp. 9-13
- Lugtenberg, B. and Kamilova, F. (2009). Plant growth promotion rhizobacteria. *Annual Review Microbiology*. 63, pp. 541-556
- Lugtenberg, B., Malfanova, N., Kamilova, F., and Berg, G. (2013). Microbial control of plant diseases. In: *Endophytic bacteria with plant growth promoting and biocontrol abilities*

“Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere” Malfanova, N.V., de Bruijn, F. J., Wiley-Blackwell. 4, pp. 68-93

Malfanova, N., Lugtenberg, B. and Berg, G. (2013). Bacterial endophytes: who and where, and what are they doing there? In Endophytic bacteria with plant growth promoting and biocontrol abilities “Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere” Malfanova, N.V., de Bruijn, F. J.(ed), Wiley-Blackwell. 2, pp. 15-39

Maurhofer, M., Keel, C., Schnider, U., Voisard, C., Haas, D., Defago, G. (1992). Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO on its disease suppressive capacity. *Phytopathology*. 82, pp. (190- 195).

Meena, B. (2014). Biological Control of Pest and Diseases Using Fluorescent Pseudomonads. In: Sahayaraj K. (ed.), Basic and Applied Aspects of Biopesticides. Springer India. 2, pp. 17-29

Metraux, J.P., Nawrath, C., and Genoud, T. (2002). Systemic acquired resistance. *Euphytica*. 124, pp. 237- 243

Miller, M.B. and Bassler, B.L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Review in Microbiology*. 55, pp. 165-199

M’Piga, P., Belanger, R.R., Paulitz, T.C. and Benhamou, N. (1997). Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 50, pp. 301–320

Mukerji, K. G. and Garg, K. L. (1988). Biocontrol of plant diseases. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 224

Nair, J.R., Narasimman, G. and Sekar, V. (2004). Cloning and partial characterization of zwittermicin A resistance gene cluster from *Bacillus thuringiensis* sub sp. *kurstaki* strain HD1. *Journal of Applied Microbiology*. 97, pp. 495-503

Nega, A. (2014). Review on Concepts in Biological Control of Plant Pathogens. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*. 27, pp. 2224-3208

Neilands, J.B. (1995). Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *Journal of biological chemistry*. Vol. 270(45), pp. 26723-26726

Neilands, J.B. and Nakamura, K. (1991). Detection, determination, isolation, characterization and regulation of microbial iron chelates, In *CRC Handbook of Microbial Iron Chelates*. Edited by G. Winkelmann

- Neumann, G. and Romheld, V. (2001). The release of root exudates as affected by the plant's physiological status. In: The rhizosphere. R. Pinton, Z. Varanini and Nannipieri P. (eds). Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, pp. 41-93
- Notz, R., Maurhofer, M., Dubach, H., Haas, D. and Défago, G. (2002). Fusaric acid-producing strains of *Fusarium oxysporum* alter 2, 4-diacetylphloroglucinol biosynthetic gene expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in vitro and in the rhizosphere of wheat. *Applied and Environmental Microbiology*. 68, pp. 2229–2235
- Oñate-Sánchez and Vicente-Carbajosa. (2008). DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques. *BMC Research Notes* volume 1, Article number: 93
- Overbeek van L.S. and Saikkonen K. (2016). Impact of Bacterial–Fungal Interactions on the Colonization of the Endosphere. *Trends in Plant Science*. 21, pp 230-242
- Ownley, B.H., Weller, D.M. and Thomashow, L.S. (1992). Influence of in situ and in vitro pH on suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Phytopathology*. 82, pp. 178–184
- Pal, K.K. and McSpadden, Gardener B. (2006). *Biological Control of Plant Pathogens*. The Plant Health Instructor, pp. 1-25
- Pantelides, I. S., Tjamos, S. E. and Paplomatas, E. J. (2010). Ethylene perception via ETR1 is required in *Arabidopsis* infection by *Verticillium dahliae*. *Mol Plant Pathol*. 11 (2), pp. 191–202
- Papavizas, G. C. and Lumsden, R. D. (1980). Biological control of soilborne fungal propagules. *Annual Review of Phytopathology*. 18, pp. 389-413
- Papavizas, G. C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol*. 23, pp. 23-54
- Parker, J. (2003). Plant recognition of microbial patterns. *Trends in Plant Science* 8, pp. 245-247
- Pegg, G.F. (1981). Biochemistry and physiology of pathogenesis. In: Mace, M.E., Bell, A. A., Beckman, C.H. (Eds.). *Fungal Wilt Diseases of Plants*. Academic Press, New York, pp. 193-253
- Pegg, G.F. (1989). Pathogenesis in vascular diseases of plants. In: *Vascular wilt diseases of plants*, Tjamos E.C. and Beckman C.H. (eds.). Springer-Verlag, pp. 51-94
- Pegg, G. F. (1974). *Verticillium* diseases. *Review of Plant Pathology*. 53, pp. 156-182

- Perry, J.W. and Evert, R.F.(1984). Structure of microsclerotia of *Verticillium dahliae* in roots of russet Burbank potatoes. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*. 62, pp. 396-401
- Peter Jeffries. (2002). The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. Department of biosciences, The university of kent
- Philippot, L., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P. and Putten, W.H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat Rev Microbiol*. 11, pp. 789-799.
- Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., Van Pelt, J.A., Van Loon, L.C. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 10, pp. 1571-1580
- Pliego, C., Kamilova, F. and Lugtenberg, B. (2011). Plant Growth-Promoting Bacteria: Fundamentals and Exploitation., In: *Bacteria in Agrobiolgy. Crop Ecosystems*, pp. 295-343
- Raaijmakers, J.M., Moenne-Loccoz, Y., Paulitz, T.C., Alabouvette, C. and Steinberg, C. (2009). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil*. 321(1-2), pp. 341–361
- Raaijmakers, J.M., Vlami, M. and de Souza J.T. (2002). Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, pp. 537–47
- Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V. and Samiyappan, R. (2001). Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection*. 20(1), pp. 1–11
- Rovira, A. D. (1991). Rhizosphere research-85 years of progress and frustration. In: *The rhizosphere and plant growth*. D. C. Keister and P. B. Cregan (eds). Kluwer Academic Publishers, pp. 3-13
- Sahebani, N. and Gholamrezaee, N. (2021). The biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 against root knot nematode (*Meloidogyne javanica*) is dependent on the plant species. *Biological Control*. Vol. 152, 104445
- Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M.C. and Govindappa M. (2012). Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Science and Technology*. 22, pp. 37–41
- Schuhegger, R., Ihring, A., Gantner, S., Bahnweg, G., Knappe C., Vogg G., Hutzler P., Schmid M., van Breusegem F., Eberl L., Hartmann A. and Langebartels C. (2006).

Induction of systemic resistance in tomato by N-acylhomoserine lactone– producing rhizosphere bacteria. *Plant Cell Environ.* 29, pp. 909-918

Shanahan, P., O'Sullivan, D. J., Simpson, P., Glennon, J. D. and O'gara, F. (1992). Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Applied and environmental microbiology.* 58, pp. 353–358

Singh H.B. (2013). Management of Plant Pathogens with Microorganisms. *Proc Indian Natn Sci Acad.* 80, pp. 443-454

Somers, E., Vanderleyden, J. and Srinivasan, M. (2004). Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Critical reviews in microbiology.* 30(4), pp. 205–40

Swadling, I. R. and Jeffries, P. (1996). Isolation of microbial antagonists for biocontrol of grey mold disease of strawberry. *Biocontrol Science Technology.* 6, pp. 125-136

Szczech, M. and Shoda, M. (2006). The effect of mode of application of *Bacillus subtilis* RB14-C on its efficacy as a biocontrol agent against *Rhizoctonia solani*. *Journal of Phytopathology.* 154(6), pp. 370-377

Tjamos, E. C. and Paplomatas, E. J. (1988). Long-term effect of soil solarization in controlling *Verticillium* wilt of globe artichokes in Greece. *Plant Pathology.* 37, pp. 507-515.

Tjamos, E. C. (1989). Vascular wilt diseases of plants. E. C Tjamos and C. Beckman (eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Tjamos, S. E., Flemetakis, E., Paplomatas, E. J. and Katinakis P. (2005). Induction of resistance to *Verticillium dahliae* in *Arabidopsis thaliana* by the biocontrol agent K-165 and pathogenesis-related proteins gene expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 18, pp. 555-561

Tu, J. C. (1980). *Gliocladium virens*, a destructive mycoparasite of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology.* 70, pp. 670-674

Van Loon, L.C. and Bakker, P.A.H.M. (2006). Root-associated bacteria inducing systemic resistance. *Plant-associated bacteria,* pp. 269-316

Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M and Pieterse, C. M. J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology.* 30, pp. 453-483

Van Loon, L.C. (1997). Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology.* 103, pp. 753- 765



Van Peer, R., Niemann, G.J., and Schippers, B. (1991). Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology*. 81, pp. 728- 734

Van Rij, E.T., Wesselink, M., Chin-A-Woeng, T.F., Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J. (2004). Influence of environmental conditions on the production of phenazine-1-carboxamide by *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391. *Mol Plant Microbe Interact.* 17, pp. 557-566

Van Wees, S.C.M., De Swart, E.A.M., Van Pelt, J.A., Van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J. (2000). Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate and jasmonate dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, pp. 8711-8716

Varo, A., Raya-Ortega, M.C. and Trapero, A. (2016). Selection and evaluation of microorganisms for biocontrol of *Verticillium dahliae* in olive. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 121(3), pp. 767-777

Verbon, E.H. and Liberman, L.M., (2016). Beneficial Microbes Affect Endogenous Mechanisms Controlling Root Development. *Trends in Plant Science*. 21, pp. 218–229

Weller, D. M. (1988). Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 26, pp. 379-407

Whitelaw, M. A. (2000). Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*. 69, pp. 99-151

Wilson, M., Crawford, E. K and Campbell, R. (1988). Biological control by *Trichoderma harzianum* of damping-off of lettuce caused by *Rhizoctonia solani*. *Bulletin OEPP*. 18, pp. 83-89

Wulff, E.G., Mguni, C.M., Mansfeld- Giese, K., Fels, J., Lubeck, M. and Hockenhull J. (2002). Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathology*. 51, pp. 574-584

Zimdahl R. L., 2015. Antibiotics. In: Zimdahl R. L. (eds), *Six Chemicals That Changed Agriculture*. Academic press, Colorado, pp. 165–182

Παναγόπουλος, Χ.Γ. (2007). Ασθένειες καρποφόρων δένδρων και αμπέλων. Εκδόσεις ΑΘ. Σταμούλης, Αθήνα

Τζάμος, Ε.Κ. (2007). Φυτοπαθολογία, Β' Έκδοση. Εκδόσεις ΑΘ. Σταμούλης, Αθήνα